

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vergleichende in-vitro Untersuchung zur Aktivierung
von Natürlichen Killerzellen aus der Leber und dem
peripheren Blut im Kontext einer Hepatitis-C-
Virusinfektion

Inaugural – Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leonie Hess

2020

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vergleichende in-vitro Untersuchung zur Aktivierung
von Natürlichen Killerzellen aus der Leber und dem
peripheren Blut im Kontext einer Hepatitis-C-
Virusinfektion

Inaugural – Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leonie Hess

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. Jens M. Werner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kilian Weigand

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	8
1.1	Wissenschaftlicher Hintergrund.....	8
1.1.1	Die Geschichte der Hepatitis-C-Virusinfektion	8
1.1.2	Das Hepatitis-C-Virus (HCV).....	8
1.1.3	Die HCV-Infektion	9
1.1.3.1	Epidemiologie.....	9
1.1.3.2	Übertragungswege des HCV.....	10
1.1.3.3	Die akute HCV-Infektion.....	11
1.1.3.4	Die chronische HCV-Infektion	11
1.1.3.5	Folgeerkrankungen	12
1.1.3.6	Die Therapie der HCV-Infektion mit direkt antiviralen Medikamenten (DAA)	14
1.2	Die Immunantwort bei der HCV-Infektion	15
1.2.1	Grundsätzlicher Aufbau des menschlichen Immunsystems.....	15
1.2.2	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	16
1.2.3	Bisherige Erkenntnisse zur Reaktion des angeborenen Immunsystems auf mit dem HCV infizierte Zellen	18
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Geräte	20
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.3	Chemikalien, Lösungen und Kits	22
2.4	Software	23
2.5	Verwendung von Zellkulturen	24
2.5.1	Verwendete Zelllinien.....	24
2.5.1.1	Lunet BLR Luc ubi neo JFH	24

2.5.1.2	Lunet BLR	25
2.5.1.3	K562-Zellen	25
2.5.2	Auftauen von Zellen	25
2.5.3	Passagieren der Zellen	26
2.6	Durchführung der Isolation von mononukleären Zellen	27
2.6.1	Isolation von mononukleären Zellen aus humanem Blut.....	27
2.6.2	Isolation von mononukleären Zellen aus humanem Lebergewebe	28
2.6.3	Finale Isolation der mononukleären Zellen aus Blut und Lebergewebe durch Biocoll.....	28
2.6.4	Bestimmung der Lymphozytenzahl	30
2.7	MACS-Sorting.....	30
2.7.1	Isolation von Zellpopulationen durch MACS-Sorting.....	31
2.7.1.1	Isolation von B-Zellen	31
2.7.2	Depletion von Zellpopulationen durch MACS-Sorting.....	32
2.7.2.1	Depletion von CD14 ⁺ Zellen	32
2.7.2.2	Depletion von CD56 ⁺ NK- Zellen	33
2.8	Ko-Kulturen aus Lunet- Zellen und Lymphozyten.....	33
2.8.1	Ausplattieren der Lunet-Zellen	33
2.8.2	Fertigstellung der Ko-Kultur durch Zugabe von Lymphozyten	34
2.8.3	Ernten der mononukleären Zellen.....	35
2.8.4	Stimulation mit Interleukin-12 und Interleukin-15	36
2.8.5	Zugabe von Golgi-Plug	36
2.9	Luciferase- Messung	36
2.9.1	Lyse der Lunet BLR Luc ubi neo JFH –Zellen.....	37
2.9.2	Messung am OMEGA Plattenleser	37
2.10	Durchflusszytometrie.....	38
2.10.1	Flourescence activated cell sorting (FACS).....	38
2.10.2	Färben der Zellen	38

2.10.2.1	Oberflächenfärbungen.....	38
2.10.2.2	Intrazelluläre Färbungen.....	39
2.10.2.3	Färbung mit FITC- CD107a/ LAMP-1 Antikörpern.....	40
2.10.3	Kompensationen.....	41
2.11	Laktat- Dehydrogenase Assay	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Messung der antiviralen Aktivität durch Luciferase.....	46
3.1.1	B-Zellen als Negativkontrolle hatten einen geringeren Einfluss auf die virale Aktivität von Replikon-Zellen als PBL und IHL.....	46
3.1.2	IHL zeigten einen stärkeren antiviralen Effekt als PBL	48
3.1.3	Der antivirale Effekt von PBL und IHL war von Natürlichen Killerzellen abhängig.....	49
3.1.4	CD14 ⁺ -Zellen hatten Einfluss auf die angeborene Immunantwort bei HCV-Infektionen von PBL und IHL.....	50
3.2	Ergebnisse der Durchflusszytometrie	52
3.2.1	Analyse und Interpretation der Daten	52
3.2.2	Untersuchung der Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) sowie der Marker TRAIL und CD107a.....	54
3.2.3	Betrachtung der Produktion von TNF- α durch NK-Zellen in vollständigen PBL- und IHL- Populationen.....	55
3.2.3.1	Nach Kontakt mit dem HCV produzierten NK-Zellen in IHL vermehrt TNF- α	55
3.2.3.2	Intrahepatische NK-Zellen produzierten mehr TNF- α als periphere NK-Zellen.....	57
3.2.4	Untersuchungen zur Abhängigkeit der Produktion von TNF- α durch NK-Zellen in PBL und IHL von CD14 ⁺ -Zellen	58
3.2.4.1	CD14 ⁺ -Zellen stimulierten periphere NK-Zellen zur Produktion von TNF- α	58
3.2.5	Betrachtung der Produktion von TRAIL und IFN- γ durch NK-Zellen in vollständigen PBL- und IHL- Populationen.....	59

3.2.5.1	Die Frequenz und Expression von TRAIL war nach Kontakt mit dem HCV nicht erhöht.....	60
3.2.5.2	NK-Zellen IHL wirkten stärker zytotoxisch als NK-Zellen in PBL	62
3.2.5.3	Die Produktion von IFN- γ war nach Kontakt mit dem HCV nicht erhöht	63
3.2.5.4	NK-Zellen in IHL produzierten mehr IFN- γ als NK-Zellen in PBL ...	64
3.2.6	Untersuchungen zur Abhängigkeit der Zytotoxizität und IFN- γ Produktion durch NK-Zellen in PBL und IHL von CD14 ⁺ -Zellen	65
3.2.6.1	CD14 ⁺ -Zellen hatten Einfluss auf die Zytotoxizität von intrahepatischen NK-Zellen.....	65
3.2.6.2	CD14 ⁺ -Zellen hatten keinen Einfluss auf die Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen in PBL und IHL	66
3.3	Weitere Untersuchungen zur Zytotoxizität von NK-Zellen in PBL und IHL ..	68
3.3.1	Betrachtung der Expression von CD107a durch NK-Zellen.....	70
3.3.1.1	CD107a wurde nach Kontakt mit dem HCV von PBL und IHL nicht verstärkt exprimiert	70
3.3.1.2	NK-Zellen in IHL exprimierten mehr CD107a als NK-Zellen in PBL	73
3.3.2	LDH Assay	75
3.3.2.1	Nach Kontakt von PBL und IHL mit HCV-infizierten Zellen war LDH nicht erhöht	76
3.3.2.2	Die LDH- Quantität nach Ko-Kultur von PBL mit Replikon- und Lunet-Zellen ohne Replikon entsprach der von IHL	78
4	Diskussion	79
4.1	Aktuelle Erkenntnisse über die Immunantwort bei der HCV-Infektion	79
4.2	Die Wertigkeit des HCV-Replikon-Systems zur Untersuchung von HCV-Infektionen	82
4.3	Intrahepatische mononukleäre Zellen weisen eine stärkere antivirale Aktivität auf als mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut	83
4.4	Die Immunantwort bei HCV-Infektionen in der Leber wird durch CD56 ⁺ NK-Zellen und CD14 ⁺ -Zellen beeinflusst.....	84

4.5	Unterschiede in der Immunantwort von intrahepatischen NK-Zellen im Vergleich zu NK-Zellen aus peripheren Blut auf das HCV	85
4.5.1	NK-Zellen in IHL produzieren unabhängig von CD14 ⁺ - Zellen nach Kontakt mit dem HCV mehr TNF- α	85
4.5.2	Die Zytotoxizität von NK-Zellen in PBL nach Kontakt mit dem HCV ist abhängig von CD14 ⁺ -Zellen	87
4.5.3	Der Kontakt mit dem HCV führt in PBL und IHL zu keiner Veränderung in der Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen.....	88
4.6	Mögliche Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse	90
4.6.1	Isolation von intrahepatischen Lymphozyten	90
4.6.2	MACS-Sorting.....	92
5	Zusammenfassung	93
6	Ausblick	95
7	Anhang	97
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	97
7.2	Tabellenverzeichnis.....	97
7.3	Abbildungsverzeichnis	97
7.4	Literaturverzeichnis	100
8	Danksagung	114

1. Einleitung

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

1.1.1 Die Geschichte der Hepatitis-C-Virusinfektion

Das weltweit verbreitete Hepatitis-C-Virus (HCV), welches sich ursprünglich wohl aus Viren von Nagetieren entwickelte, ist noch nicht sehr lange bekannt.⁽¹⁾ Erste Hinweise für die Existenz des HCV gab es erst in den 1970er Jahren. Nach der Entdeckung der Hepatitis-A- und Hepatitis-B-Viren wurde zu dieser Zeit das routinemäßige Screening nach Hepatitis-B Antikörpern in den Blutspendediensten eingeführt. Die Häufigkeit einer Posttransfusionshepatitis, einer Entzündung der Leber bei Empfängern von Bluttransfusionen, wurde durch das Screening der Blutspender zwar stark gesenkt, dennoch erkrankten immer noch etwa 10% der Patienten trotz Ausschluss einer Hepatitis A oder B an einer Leberentzündung. Diese wurde daraufhin als „Non-A-Non-B-Hepatitis“ charakterisiert.⁽²⁾ Erstmals beschrieben und molekular charakterisiert wurde das HCV im Jahr 1989 von Qui-Lim Choo et al.⁽³⁾ Das HCV war damit das Erste, welches mit molekularbiologischen Techniken entdeckt wurde.⁽⁴⁾ Das neu entdeckte Virus wurde „Hepatitis-C-Virus“ genannt und ersetzte den Begriff der „Non-A-Non-B-Hepatitis“. Bereits 1990 wurden die erste Generation spezieller HCV-Antikörpernachweissysteme etabliert, wodurch das Übertragungsrisiko stark reduziert werden konnte.⁽²⁾ Noch heute haben viele Patienten, die in den Jahren vor 1992 durch Bluttransfusionen oder Injektionen mittels nicht ausreichend desinfizierten Injektionsbesteck mit dem HCV infiziert wurden, mit der Infektion und den Folgeerkrankungen zu kämpfen.

1.1.2 Das Hepatitis-C-Virus (HCV)

Das HCV ist ein Einzel-Plusstrang RNS- Virus, welches rund 9600 Nukleotide umfasst und etwa 45nm groß ist. Sein Genom weist eine Ähnlichkeit mit den Flaviviren und Pestiviren auf. Dennoch wird es als eigene Gattung zu den Hepaciviridae der Familie der Flaviviridae gezählt.⁽²⁾ Es werden insgesamt sieben Genotypen und 67 Subtypen unterschieden.⁽⁵⁾ Die Genotypen unterscheiden sich dabei in 31-33% ihrer Nukleotide.⁽⁴⁾ Die Verteilung dieser Genotypen variiert geographisch. In Europa und den USA als auch weltweit ist der Genotyp 1 mit etwa 60-70% am häufigsten vorzufinden, während Genotyp 2 und 3 bei 30% der HCV-Infektionen nachzuweisen

sind. In Ägypten dominiert hingegen der Genotyp 4 des HCV, in Südafrika Genotyp 5 und in Hongkong Genotyp 6.^(2, 6)

Die Replikation des HCV findet in den Hepatozyten der Leber statt. Die Aufnahme des Virus in die Wirtszelle wird unter anderem durch die Eintrittsrezeptoren Scavenger-Rezeptor der Klasse B Typ I (SR-BI), Claudin-1 (CLDN1), CD81 und Occludin (OCLN) vermittelt.⁽⁷⁾ Durch das Abschnüren eines Endosoms der Zellmembran gelangt das HCV in die Zelle in der ein Coreprotein-RNA-Komplex im Zytoplasma freigesetzt wird. Mittels der NS5B-Polymerase werden in nächsten Schritt mRNA-Kopien der Plusstränge angefertigt, mit deren Hilfe an den Ribosomen der Zelle Virusproteine, wie zum Beispiel die HCV-spezifischen Hüllproteine E1 und E2, synthetisiert werden. Der Vorgang der Proteinsynthese wird auch Translation genannt. Diese Proteine werden im Endoplasmatischen Retikulum zusammen mit mRNA, welches über ein Core-Protein an der Virusmembran befestigt wird, zu einem Virus-Partikel verpackt und über den Golgi-Apparat aus der Zelle geschleust.^(4,8)

Da die RNA-Polymerase die mRNA mit einer sehr hohen Fehlerrate repliziert, kommt es bereits kurz nach der Infektion zum Vorkommen vieler Abweichungen von der ursprünglichen Genomsequenz, die man als Quasispezies bezeichnet.⁽⁴⁾ Das sich schnell verändernde Virus entgeht so im großem Maße dem Zugriff des Immunsystems. Diese Immunevasion wird als eine der Ursachen für die hohe Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer chronischen HCV-Infektion diskutiert.⁽⁹⁾

1.1.3 Die HCV-Infektion

1.1.3.1 Epidemiologie

Neben den HCV-Genotypen ist auch die Prävalenz der HCV-Infektion geschichtlich bedingt regional stark unterschiedlich. Weltweit geht man von etwa 170 Millionen HCV-infizierten Menschen aus, was einer Prävalenz von 2,6% entspricht. In Deutschland sind rund 0,3% der Normalbevölkerung betroffen, in den USA 1,8%. Die meisten Staaten weltweit weisen ähnliche Zahlen auf, wobei die Prävalenz in Staaten Afrikas, dem östlichen Mittelmeerraum und der Westpazifik-Region signifikant höher ist als in Nordamerika und Europa.^(2,6) Einzelne Staaten weisen außergewöhnlich hohen Prävalenzen um die 20% auf, welche durch geschichtliche Gegebenheiten begründet sind.^(2,10)

Die hohe HCV-Prävalenz in Ägypten lässt sich beispielsweise darauf zurückzuführen, dass in den 1950er bis in die 1980er Jahren, also vor der Entdeckung des HCV, die ägyptischen Gesundheitsbehörden zusammen mit der Weltgesundheitsorganisation (WHO) einen großflächigen Kampf gegen die dort sehr häufige Bilharziose führte. Zu diesem Zweck wurde den Erkrankten Brechweinstein injiziert. Da das Injektionsbesteck durch mangelnde Desinfektion und Verwendung desselben Bestecks bei verschiedenen Patienten teilweise kontaminiert war, wurden viele Menschen mit dem HCV infiziert. 70-90% der oft mehrmals injizierten Betroffenen erkrankten später an einer chronischen Hepatitis. Insgesamt wird die Zahl auf 6 Millionen auf solche Weise infizierte Personen geschätzt. Es wird vermutet, dass es sich dabei um den schwersten Fall von iatrogen übertragenen Krankheitserregern in der Geschichte handelt.^(11,12)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass vor allem Menschen aus Ländern mit niedrigem Durchschnittseinkommen und schlechter medizinischer Versorgung vermehrt von HCV-Infektionen betroffen sind. Viele dieser Betroffenen haben aufgrund fehlender Krankenversicherung oder struktureller Diskriminierung keinen oder nur eingeschränkten Zugang zur Therapie der Infektion und ihren Folgeerkrankungen wie dem Hepatozellulären Karzinom und der Leberzirrhose. Inwieweit die neue Therapie gegen das HCV mit DAAs (siehe 1.1.3.6. *Die Therapie der HCV-Infektion mit direkt antiviralen Medikamenten*) auch diesen Menschen zugänglich gemacht wird, ist noch abzuwarten. Eine Impfung gegen das HCV gibt es bislang nicht.

1.1.3.2 Übertragungswege des HCV

Der Mensch ist der einzige natürliche Wirt für das HCV. Hauptübertragungsursache ist heutzutage die Exposition mit kontaminierten Blut.⁽¹³⁾ Besonders Konsumenten von intravenös oder nasal konsumierten Drogen wie Heroin oder Kokain, welche sich das Spritzbesteck bzw. Aspirationsröhrchen mit anderen Konsumenten teilen, sind vermehrt betroffen. Ein weiterer Übertragungsweg ist die Infektion mit dem Virus durch Nadelstichverletzungen im medizinischen Bereich, bei denen kontaminiertes Blut übertragen wird. Das Risiko daraufhin unbehandelt eine HCV-Infektion zu entwickeln, liegt bei <1%. Auch eine vertikale Virustransmission von der Mutter auf das Kind ist möglich und lässt sich in 3-10% der Fälle beobachten. Die Übertragung ist dabei sowohl in utero durch die Plazenta als auch bei der Entbindung möglich. In seltenen

Fällen ist eine sexuelle Übertragung des HCV dokumentiert. Das Übertragungsrisiko ist allerdings sehr gering.

Generell ist die Wahrscheinlichkeit einer Infektion bei allen Übertragungswegen wesentlich von der Viruslast des kontaminierten Blutes sowie von Vorerkrankungen der betroffenen Personen abhängig. Insbesondere eine Ko-Infektion mit HIV führt zu einem erhöhten Risiko einer Virustransmission, da eine HIV-Infektion beim Spender des kontaminierten Blutes zu einer erhöhten Viruslast, und beim Empfänger zu einer insuffizienten Immunabwehr führen kann.⁽¹⁴⁾ Um einen gesunden Menschen mit dem HCV zu infizieren, werden etwa 100 bis 500 HCV-Partikel benötigt.⁽¹⁴⁾

1.1.3.3 Die akute HCV-Infektion

Die akute HCV-Infektion wird definiert als eine Infektion mit dem HCV, die vor weniger als 6 Monaten erworben wurde. Die Inkubationszeit beträgt ca. 8 Wochen. Von einer akuten Hepatitis C wird gesprochen, wenn es neben der Infektion zu Leberfunktionseinschränkungen kommt.

Nur bei 20% der Infizierten zeigen sich typische Symptome einer akuten Hepatitis, wie Ikterus, Abgeschlagenheit, Fieber und Bauchschmerzen. In seltenen Fällen kann es außerdem zu fulminanten Verläufen der Infektion kommen, welche in einem Leberversagen enden. Typisch sind außerdem fluktuierende Transaminasenerhöhungen. Transaminasen sind Enzyme, welche bei Leberschädigung im Blut vermehrt nachweisbar sind.

Etwa 15-20 % der akuten HCV-Infektionen heilen innerhalb von 6 Monaten spontan aus. Bei ca. 80% der Patienten geht sie unbehandelt in eine chronische HCV-Infektion über.⁽¹⁵⁾

1.1.3.4 Die chronische HCV-Infektion

Besteht eine HCV-Infektion länger als 6 Monate fort, bezeichnet man diese als chronische HCV-Infektion. Kommt es zudem zu Leberfunktionseinschränkungen und gegebenenfalls extrahepatischen Manifestationen der Infektion wird von einer Chronischen Hepatitis C gesprochen.

Die Chronische Hepatitis C verläuft meist jahrelang klinisch uncharakteristisch und mild. Mögliche Symptome sind unter anderem Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Oberbauchschmerzen und Juckreiz.⁽¹⁴⁾ Bei zwei Drittel der Patienten treten außerdem im Verlauf extrahepatische Manifestationen auf.⁽¹⁶⁾ So sind beispielsweise 80% der Kryoglobulinämien durch HCV-Infektionen verursacht.⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾ Außerdem sind unter anderem Lymphome, Depressionen, Arthritiden und ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und insbesondere Schlaganfälle als Manifestationen einer chronischen Hepatitis C außerhalb der Leber beschrieben worden.⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

1.1.3.5 Folgeerkrankungen

Nach etwa 20 Jahren entwickeln 20% der chronifiziert HCV infizierten Patienten eine Leberzirrhose, davon versterben etwa ein Viertel an einem Leberversagen. Bei einem chronischen Verlauf mit Leberzirrhose ist außerdem das Risiko der Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) stark erhöht. Im Durchschnitt entarten 2-4% der HCV bedingten Leberzirrhosen pro Jahr.⁽²¹⁾ Die Prognose eines HCC ist vor allem bei Vorliegen einer Leberzirrhose aufgrund der limitierten therapeutischen Möglichkeiten ungünstig. Ohne Therapie sind nach 6 Monaten nur noch 50% der Patienten mit dieser Diagnose am Leben. Wird das Karzinom bereits früh erkannt und im Rahmen der Milan-Kriterien eine Lebertransplantation durchgeführt, kann das Langzeit-Überleben auf 75% nach vier Jahren verbessert werden.^(22, 23)

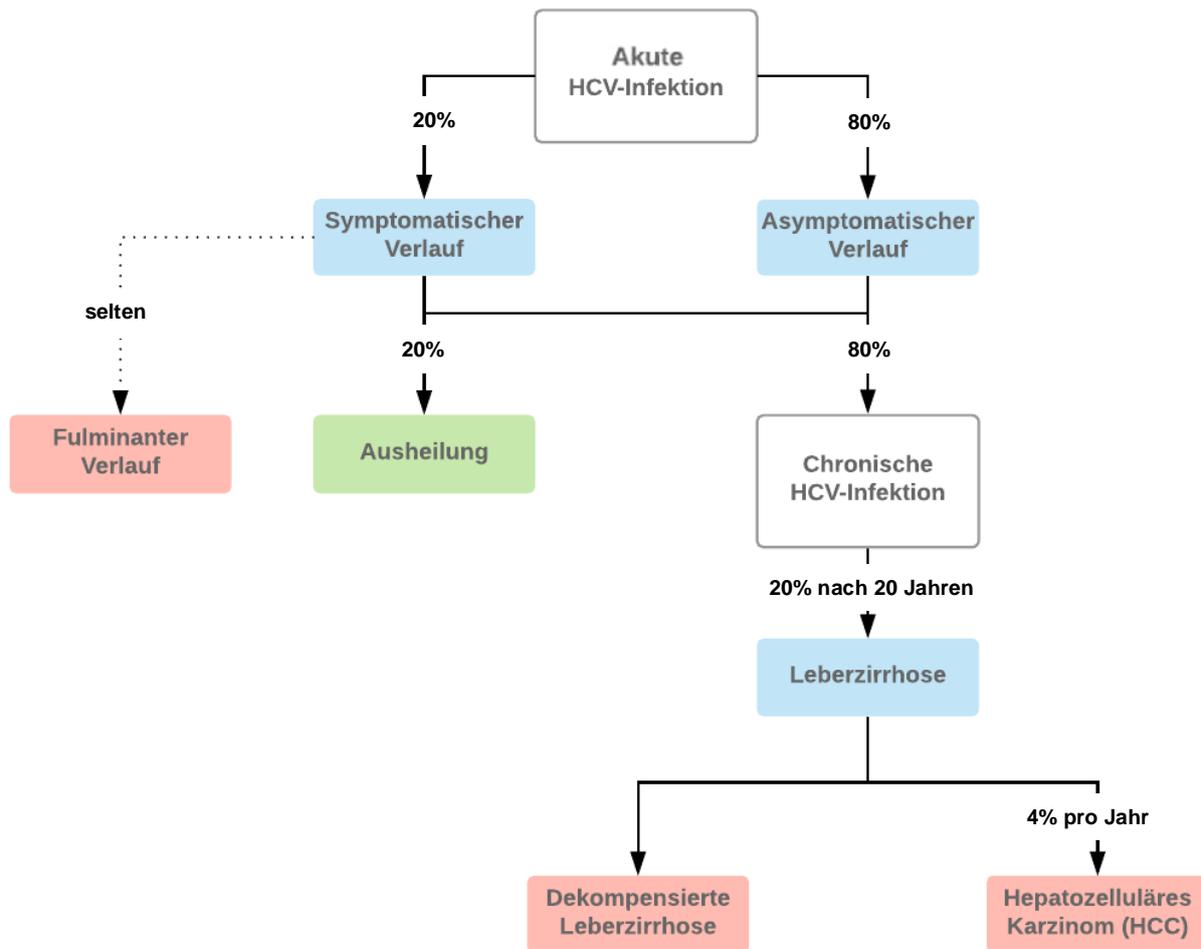


Abbildung 1: Flussdiagramm zu den Verlaufsformen der HCV-Infektion

20% der akut HCV-infizierten Patienten entwickeln einen symptomatischen Verlauf, welcher in seltenen Fällen eine fulminante Entwicklung zeigt. Unabhängig davon ob ein Patient Symptome entwickelt, heilen 20% der akuten HCV-Infektionen untherapiert aus, während 80% eine chronische HCV-Infektion entwickeln. Diese kann Folgeerkrankungen wie eine Leberzirrhose und ein HCC begünstigen.

(Abbildung modifiziert nach „Verlaufsformen der Hepatitis-C-Infektion“ aus dem Kapitel „Hepatitis C“, URL: <https://next.amboss.com/de/article/IS0v-2#Zea41d9f610b41c8bcb1377f59e4ff96b>, AMBOSS GmbH, Berlin und Köln, Germany, Stand 25.08.2020)

1.1.3.6 Die Therapie der HCV-Infektion mit direkt antiviralen Medikamenten (DAA)

Im Jahr 2014 wurden antiviral wirkenden Substanzen (direct acting antivirals, DAA) zugelassen, welche zu neuen Therapieempfehlungen bei chronischen HCV-Infektionen geführt haben. Eine Interferonbasierte Therapie, wie sie noch vor wenigen Jahren praktiziert wurde, ist inzwischen obsolet. Der Therapieerfolg wird 12 Wochen nach Ende der antiviralen Therapie durch Messung der HCV-RNA bestimmt. Ist keine RNA nachweisbar, liegt einer dauerhafte Eradikation der HCV-Infektion vor.⁽¹⁴⁾

Derzeit werden noch unterschiedliche interferonfreie Kombinationstherapien mit DAAs für verschiedene HCV Genotypen erforscht. In ersten Studien konnten einige Kombinationstherapien bereits Heilungsraten von 98% erzielen.⁽²⁴⁾

1.2 Die Immunantwort bei der HCV-Infektion

1.2.1 Grundsätzlicher Aufbau des menschlichen Immunsystems

Das Immunsystem ist ein sehr komplexes Gebilde aus verschiedenen Organen, Zelltypen, Proteinen und Molekülen, das bis heute in vielen Teilen noch nicht verstanden ist. Der menschliche Körper benötigt das Immunsystem um sich vor der Schädigung durch körperfremde Substanzen und verschiedensten Erregern wie Bakterien, Viren oder Pilze zu schützen. Außerdem beseitigt es körpereigene Zellen, die tot, infiziert oder entartet sind und damit ihrer ursprünglichen Funktion nicht mehr nachkommen. Grundsätzlich kann man das menschliche Immunsystem in ein unspezifisches (angeborenes) und ein spezifisches (früher: erworbenes) Immunsystem unterteilen.

Das angeborene Immunsystem besteht neben anatomischen und physiologischen Barrieren wie Epithelien aus unspezifischen Abwehrzellen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Zudem werden ihm entzündliche Reaktionen und das Komplementsystem zugeordnet. Im Unterschied zum spezifischen Immunsystem ist die Struktur der beteiligten Proteine im Genom festgelegt und kann daher nicht angepasst werden. Die Aufgabe des unspezifischen Immunsystem ist es, eingedrungene Erreger bereits nach Minuten mittels charakteristischer Proteinmuster, sogenannter Antigene, zu erkennen und anzugreifen. Die meisten Infektionen können durch dieses System innerhalb von Stunden abgewehrt werden. Generell kann das angeborene Immunsystem als ein ständig verfügbares, schnell und weitgefächert wirkendes, aber unspezifisches System charakterisiert werden.

Durch verschiedene Mechanismen, wie der Bildung einer Schleimkapsel oder der andersartigen Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen, können manche Bakterien, virusinfizierte Zellen oder entartete Zellen dieser ersten unspezifischen Immunantwort entkommen. Solche körperschädlichen Zellen können somit zunächst nicht eliminiert werden. In diesem Fall muss das spezifische Immunsystem eingreifen. Das spezifische Immunsystem wird durch Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert, welche Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren. Antigen-spezifische T-Zellen werden dadurch aktiviert und können wiederum zytotoxisch wirken. Außerdem können sie mittels der Ausschüttung von Zytokinen sowohl ihre eigene Reaktion

verstärken als auch B-Zellen aktivieren, welche als Plasmazellen spezifische Immunglobuline zur Bekämpfung der Infektion produzieren.

Zusammenfassend ist die spezifischer Immunantwort der angeborenen Immunantwort nachgeschaltet und braucht insgesamt länger um eine Infektion zu bekämpfen. Allerdings ist sie aufgrund der hohen Spezialisierung meist effektiver. Kommt es des Weiteren zu einer Reinfektion mit dem gleichen Erreger, kann das spezifische Immunsystem durch die Bildung von Gedächtniszellen die Infektion umgehend erkennen und schnell und hochspezifisch bekämpfen. Es ist folglich im Vergleich zum angeborenen Immunsystem adaptiv und einer stetigen Veränderung unterworfen. ⁽²⁵⁾

In dieser Arbeit soll im Folgenden die Antwort des angeborenen Immunsystems auf chronische HCV-Infektionen untersucht werden. Für die unspezifische Immunantwort auf HCV-Infektionen sind vor allem nachfolgend beschriebene Zellen relevant.

1.2.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Zur Bekämpfung von Tumorzellen und intrazellulären Erregern wie Viren und einigen Bakterien und Protozoen sind im angeborenen Immunsystem die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zuständig. Die NK-Zellen sind Lymphozyten, die aktivierende und hemmende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen. Mit den aktivierenden Rezeptoren erkennen und binden diese Zellen an pathologische Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche der Zielzellen. Dies führt zu einer Aktivierung der NK-Zelle. Binden jedoch gleichzeitig hemmende Rezeptoren an MHC-Klasse-I-Moleküle, wird die Aktivierung verhindert und die Zielzelle wird nicht geschädigt.

MHC-Klasse-I-Moleküle sind Proteinkomplexe, die von allen kernhaltigen Zellen des Körpers getragen werden. Auf Ihnen werden Spaltprodukte von Proteinen präsentiert, die ein Abbild von in der Zelle synthetisierten Proteinen darstellen. Die MHC-Klasse-I-Moleküle mit ihren präsentierten Antigenen werden regelmäßig von zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen) des Immunsystems kontrolliert. „CD“ steht dabei für „Cluster of Differentiation“ und beschreibt die Einteilung der Zellen anhand von membrangebundenen CD-Glykoproteine, welche zellspezifisch exprimiert werden. Erkennen die CD8⁺T-Zellen pathologische Antigene zum Beispiel aufgrund einer Entartung oder Infizierung der Zelle, wird die erkrankte Zelle abgetötet.

Insbesondere Tumorzellen sowie virusinfizierte Zellen können dieser Kontrolle durch zytotoxische T-Zellen entgehen, in dem sie die Expression von MHC-I-Klasse-Molekülen herunterregulieren. Allerdings können nun die hemmenden Rezeptoren der NK-Zellen nur noch vermindert an die entsprechenden Proteinkomplexe binden. Ist die Summe der hemmenden Signale aufgrund der fehlenden Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle zu gering und die aktivierenden Signale sind vorherrschend, kommt es zu einer Aktivierung der NK-Zellen.

NK-Zellen können in mindestens zwei Arten unterschieden werden. Abhängig von der Art der NK-Zelle reagiert die Zelle auf das aktivierende Signal durch Ausschüttung unterschiedlicher Substanzen. 90% der NK-Zellen im humanen Blut sind Zellen, welche wenig CD56 exprimieren (CD56⁺, CD16⁺). Diese werden auch als „dim“ beschrieben. Ihre Hauptaufgabe ist es, ohne Voraktivierung pathologische Zielzellen zu vernichten. Dies gelingt ihnen mittels der Ausschüttung von zytotoxischer Granula mit Perforinen oder Granzymen. Außerdem können NK-Zellen die Apoptose der Zielzelle durch die Expression der Oberflächenmoleküle tumor necrosis factor–related apoptosisinducing ligand (TRAIL) und FasL induzieren.⁽²⁶⁾ Durch die Ausbildung einer immunologischen Synapse können dabei sehr genau spezifische Zielzellen zerstört werden ohne dass angrenzende, gesunde Zellen beeinträchtigt werden.⁽²⁷⁾ Des Weiteren sind NK-Zellen beschrieben, welche viel CD56, dafür kein CD16 exprimieren (CD56⁺⁺, CD16⁻). Die Funktion dieser „brighten“ NK-Zellen ist vor allem die Kommunikation und Aktivierung von anderen Immunzellen über Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) oder Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α).^(25,28) In Hinblick auf die Immunantwort bei HCV-Infektionen spielt insbesondere IFN- γ eine wichtige Rolle, da es die HCV-Replikation in vitro inhibiert.^(29,30) Während der Anteil an „brighten“ CD56⁺⁺, CD16⁻ NK-Zellen im Blut nur etwa 10% entspricht, ist ihr Anteil in der Leber und anderen lymphatischen Geweben bis auf 50% erhöht.⁽³¹⁾

1.2.3 Bisherige Erkenntnisse zur Reaktion des angeborenen Immunsystems auf mit dem HCV infizierte Zellen

Zahlreiche Studien lassen darauf schließen, dass bei der Bekämpfung von HCV-infizierten Zellen durch das menschliche Immunsystem NK-Zellen eine elementare Rolle spielen. Es konnte nachgewiesen werden, dass NK-Zellen bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion aktiviert sind.⁽³²⁻³⁴⁾ Im Kontakt mit HCV-infizierten Zellen sind NK-Zellen allerdings wesentlich weniger zytotoxisch aktiv und schütten weniger Interferon- γ aus, als dies bei anderen Viruserkrankungen der Fall ist.^(32,33) Aus welchem Grund die aktivierten NK-Zellen bei HCV-Infektionen weniger effektiv sind, ist nicht bekannt. Möglich ist aber, dass die verminderte Antwort der NK-Zellen auf das HCV ursächlich dafür sein kann, dass das menschliche Immunsystem in den meisten Fällen im Gegensatz zu anderen Viruserkrankungen das Virus nicht adäquat bekämpfen kann und viele akuten Infektionen in chronische Verläufe übergehen.

Um dieses Phänomen aufzuklären ist es essentiell, die Einflüsse auf NK-Zellen zu kennen, welche die Effektorantwort der NK-Zellen modulieren. Zur Aufklärung dieses Sachverhalts wurde bereits beschrieben, dass aus peripherem Blut isolierte Monozyten das HCV in den Hepatozyten erkennen und daraufhin unter anderem Interleukin-18 (IL-18) ausschütten, um NK-Zellen zu aktivieren. Bei Patienten mit chronischen HCV-Infektionen ist die Funktion der Monozyten reduziert. Dies führt wiederum zu einer verminderten Anschüttung von IFN- γ durch NK-Zellen.⁽³⁵⁾ Für diese Publikation wurden ausschließlich aus humanem Blut isolierte Lymphozyten (PBLs) analysiert.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Bestreben der vorliegenden Arbeit war es nun zu untersuchen, ob die Immunantwort bei Lymphozyten, welche aus humanem Lebergewebe isoliert wurden und in Kontakt mit HCV-infizierten Zellen kamen, mit der von PBLs vergleichbar ist. Dies scheint besonders interessant, da das HCV nur in den Hepatozyten repliziert und daher primär mit den lokalen hepatischen Lymphozyten in Kontakt tritt. Des Weiteren unterscheiden sich die Immunzellen in der Leber (IHLs) von peripheren Lymphozyten im Blut in ihrer Zusammensetzung. So ist der Anteil von NK-Zellen in der Leber höher als im Blut.⁽²⁷⁾ Das Ziel der Arbeit war es daher, die antivirale Antwort von PBL und IHL zu vergleichen. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob NK-Zellen auch in der Leber einen Anteil am antiviralen Effekt der Lymphozyten haben und durch welchen Mechanismus dieser vermittelt wird.

Außerdem befinden sich in der Leber spezifische Immunzellen wie die leberansässigen Kupffer-Zellen, welche im Blut nicht zu finden sind. Bei Kupffer-Zellen handelt es sich um Monozyten, welche aus dem Blut in die Sinusoide der Leber transmigrieren und dort zu leberspezifischen Makrophagen differenzieren.⁽³⁶⁾ Als direkter Abkömmling der Monozyten war es daher naheliegend, die Bedeutung hepatischer Kupffer-Zellen bzw, leberansässigen Monozyten und Makrophagen im Kontext der HCV-Replikation zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob leberansässige Monozyten wie ihre Äquivalenten im peripheren Blut das HCV erkennen, durch dieses ebenfalls aktiviert werden und einen antiviralen Effekt vermitteln können. Ein direkter Einfluss von HCV- exponierten Kupffer-Zellen auf die Virusreplikation ist bislang nicht bekannt.⁽³⁷⁾

2 Material und Methoden

Im Folgenden sollen nun zunächst die wissenschaftlichen Methoden erläutert werden, mit deren Hilfe die Versuche durchgeführt wurden. Auch die benutzten Materialien und Versuchsumstände werden aufgeführt. Alle Arbeitsschritte und Versuche, bei denen Zellen verwendet wurden, wurden bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank Hera Safe der Firma Heraeus durchgeführt.

2.1 Geräte

Gerätename	Firma
autoMACS Pro Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Dampfsterilisator Varioklav 400E	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD, Heidelberg
FLUOstar Omega Microplate Reader	BMG LABTECH
Gefahrenstoffschränk FWF 90	Düperthal Sicherheitstechnik, Karlstein
Gefrierschränk (-80°C) 923	Forma Scientific, Marietta, USA
MACS Chill 15 Rack	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop: Axio Observer Z1	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop: Primo Vert	Carl Zeiss, Oberkochen
Pipettierhilfe Pipetman L P1000L	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetman L P200L	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetman L P20L	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetman L P2L	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe S1 Pipett Filler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbank HeraSafe (H9 + H18)	Heraeus, Hanau
Trocken- und Wärmeschränk ED53	Binder, Tuttlingen
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

Vortexer VF2	Janke & Kunkel (IKA-Werke), Staufen
Wasserbad 7L 1002	GFL, Burgwedel
Zählkammer Reichert Bright-Line	Hausser Scientific, Horsham, USA
Zentrifuge 5415C	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Zentrifuge Sorvall ST 40R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
16 Well Platte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Anatomische Pinzette (115 mm)	Braun, Melsungen
Chirurgische Schere (115 mm)	Braun, Melsungen
Cryo.s™ 2 ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Cryo-Clear Etiketten	Carl Roth, Karlsruhe
EASYstraine Zellsieb, 70µm	Greiner bio one, Frickenhausen
Einmalspritze 1ml Plastipak	BD Biosciences, Heidelberg
Kryo Box 9x9	GLW, Würzburg
MACS Separation Column 25LS	Miltenyi Biotec, Bergisch
Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen 10µl	Starlab, Hamburg
Pipettenspitzen 100-1000µl	Corning, Corning, NY, USA
Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt, Nümbrecht
PP Röhrchen 15ml/50ml (Falcon)	Greiner bio one, Frickenhausen
Rundboden- (FACS-) Röhrchen 5ml Deckel	Corning, Kaiserslautern
Rundboden- (FACS-) Röhrchen, 5ml	Corning, Corning, NY, USA

Safe Lock Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Skalpell No. 10	FEATHER Safety Razor, Osaka, Japan
Stabpipette 2 ml (mit Filter)	Corning, Kaiserslautern
Stabpipette 2 ml (ohne Filter)	Carl Roth, Karlsruhe
Stabpipette PS 5 ml, 10ml, 25ml, 50ml	nerbe plus, Winsen/Luhe
Zellkulturflasche mit Filter 75 cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.3 Chemikalien, Lösungen und Kits

Material	Firma
BD Cytotfix/Cytoperm	BD Heidelberg
BD Golgi Plug (Brefeldin A)	BD Heidelberg
BD Perm/Wash	BD Heidelberg
Biocoll Separating Solution	Merck Millipore, Billerica, USA
BSA Fraction V	Biomol GmbH, Hamburg
CD14 MicroBeads human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD56 MicroBeads human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Collagenase Typ IV CLS IV	Merck Millipore, Billerica, USA
Desinfektionsmittel: Incidin Plus	Ecolab, Monheim am Rhein
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I (Bovine Pancreas)	Merck Millipore, Billerica, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Karlsbad, USA
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA 500 mM (pH 8.0)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

FCS (fetal calf serum)	Biochrom GmbH, Berlin
Gentamicin 80 SF	HEXAL, Holzkirchen
Isopropanol (70%)	Braun, Melsungen
Isopropanol (for analysis)	Merck Millipore, Billerica, USA
Isopropanol (for molecular biology)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay	Promega Corporation, Madison, USA
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Luciferase Assay Systems E1500	Promega Corporation, Madison, USA
MACS B Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MEM NEAA (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin 100ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 [-] L-Glutamine	LONZA, Basel, Schweiz
Trypan Blue 0,5%	Merck Millipore, Billerica, USA
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasser (bidestilliert)	Merck Millipore, Billerica, USA

2.4 Software

Software	Firma
BD FACSDiva Software 6.0	BD Heidelberg
FlowJo	FlowJo, Ashland, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond USA

2.5 Verwendung von Zellkulturen

Um die Wechselwirkungen zwischen angeborenen Immunzellen mit den HCV-infizierten Hepatozyten zu untersuchen, wurde mit der Methode der Zellkultur gearbeitet. Eine Zellkultur beschreibt das Kultivieren von tierischen oder pflanzlichen Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus.

Alle Materialien für die Zellkultur waren dabei entweder steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor der Benutzung in einem Autoklaven bei 120 °C mit Wasserdampf sterilisiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungs-Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.5.1 Verwendete Zelllinien

Für die Versuche wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet, welche im Folgenden beschrieben werden.

2.5.1.1 Lunet BLR Luc ubi neo JFH

Zum einen wurden Huh-7-Zellen, welche mit einem subgenomischen HCV-Replikon transfiziert wurden (Lunet BLR Luc ubi neo JFH) benutzt. Diese Zellen stellen im Versuchsaufbau mit HCV infizierte Hepatozyten dar. Das HCV-Replikon ist mit einer Luciferase getaggt. Um die virale Aktivität der Zellen zu bestimmen, werden diese mithilfe des PROMEGA Luciferase Assay Systems lysiert und anschließend mit Luciferin versetzt, welches durch Luciferase gespalten wird.

Die ursprünglichen Huh7-Zellen wurde 1982 dem Lebertumor eines 57-jährigen japanischen Patienten entnommen und anschließend von H. Nakabayshi und J. Sato als Zelllinie etabliert. ⁽³⁸⁾ Es handelt sich dabei um differenzierte Hepatozyten, welche sich aus einem Leberzellkarzinom ableiten.

Bis ins Jahr 2005 konnte das HCV nicht im Labor kultiviert werden. Die Etablierung des HCV-Replikon Systems durch R. Bartenschlager machte dies möglich und führte unter anderem zur Entwicklung der neuen Medikamente gegen HCV-Infektionen. ^(39,40)

2.5.1.2 Lunet BLR

Als Negativkontrolle wurden außerdem Lunet BLR Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um Huh7-Zellen ohne dem beschriebenen Replikon. Diese Zellen weisen keine Virusaktivität auf

2.5.1.3 K562-Zellen

Für einige Versuchsreihen wurden außerdem K562-Zellen verwendet. K562-Zellen waren die ersten vom Menschen entnommenen, unsterblichen myeloische Leukämie-Zellen, die etabliert wurden. Die Zelllinie stammt von einer 53-jährigen Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie in einer Blastenkrise.⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾

Die K562-Zellen dienten als Zielzellen der NK-Zellen zur Stimulation der Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen. Sie wurden in DMEM Medium kultiviert, welches mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde.⁽²⁸⁾⁽⁴³⁾

2.5.2 Auftauen von Zellen

Die Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen als auch die Lunet BLR Zellen wurden im flüssigen Stickstofftank bei -160°C konserviert. Für die Versuche wurden Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen bis zur 8. Passage verwendet. Damit konnte gewährleistet werden, dass die Zellen eine ausreichende virale Aktivität des HCV-Replikons aufwiesen. Lunet BLR Zellen wurden bis zur 20. Passage verwendet. Wurde die Anzahl der Passagen bei der jeweiligen Zellart überschritten, wurden neue Zellen mit geringerer Passage aufgetaut und verwendet. Beim Transport der Zellen vom Stickstofftank zur Sterilbank wurden die Zellen auf Trockeneis gelagert. Somit wurde verhindert, dass die Zellen zu schnell auftauen und unbrauchbar werden.

Pro aufzutauendes Cryoval wurde zunächst 1ml PBS und 10µl DNase I (50mg/l) in einen 50ml Falcon gegeben. In dieser Suspension wurden die Zellen in einem späteren Schritt zum Auftauen überführt.

Die tiefgefrorenen Zellen wurden nun wie oben beschrieben vom Stickstofftank zu einem 37°C warmen Wasserbad bei der Sterilbank transportiert. In diesem wurden sie nun für etwa 2 Minuten erwärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern in der Mitte des Cryovals vorhanden war. Daraufhin wurde das Zellgemisch in das vorbereitete

Falcon mit der Suspension aus PBS und DNase I hinzugefügt und resuspendiert. Nach 4 Minuten wurden pro aufgetautem Cryoval weitere 2 ml PBS zu dem Falcon hinzugefügt. Nach weiteren 2 Minuten noch einmal 4 ml pro Cryoval. Anschließend wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das feste Zellpellet am Boden des Falcons wurde in 10 ml des vorbereiteten DMEM- Mediums komplett resuspendiert und die Zellsuspension in eine 75 cm² große Kulturflasche überführt. Das DMEM- Medium besteht aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), welches mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, und 1% MEM NEAA (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids) versetzt wurde. Zu den Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen wurde außerdem 2% Geneticin (G418), einem Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside, und bei den Lunet BLR Zellen 0,1% Blastocidin, einem Antibiotikum und –mykotikum, als Schutz für die Zellen in die Kulturflasche gegeben. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C gelagert.

Einen Tag nach dem Auftauen der Zellen wurde das Medium gewechselt. Dazu wurde das alte Medium aus der Flasche abpipettiert und daraufhin 10 ml neues DMEM-Medium sowie Blastocidin bzw. G418 hinzugegeben.

2.5.3 Passagieren der Zellen

Um zu vermeiden, dass die Zellen durch Nährstoffmangel absterben, wurden sie alle 3-4 Tage passagiert. Dazu wurde zunächst das alte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und der Zellrasen mit 10ml PBS gewaschen, um zurückbleibendes FCS, das die folgenden Enzymreaktion mit Trypsin stören könnte, zu entfernen. Bei Trypsin handelt es sich um ein Verdauungsenzym, welches beim Menschen im Pankreas produziert wird. Nach dem Waschen lösten 2ml dieser Peptidase adhären Zellen vom Boden der Zellkulturflasche, indem sie extrazelluläre Proteine spalteten. Nach einer Minute wurde das Trypsin abgesaugt und die Flasche für weitere 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Zellrasen wurde anschließend durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden gelöst und die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2ml DMEM-Medium gestoppt.

Die im DMEM-Medium gelösten Zellen wurden nun entweder für einen Versuch ausplattiert oder zum weiteren Wachstum in eine neue 75 cm² großen Kulturflasche

subkultiviert. Dazu wurde ein Teil der Zellen (meist 1/6tel) in die neue Flasche überführt, auf 10 ml DMEM-Medium aufgefüllt und anschließend Blasticidin oder G418 hinzugegeben. Anschließend wurden die neuen Zellkulturflaschen in den 37° warmen Brutschrank gestellt.

2.6 Durchführung der Isolation von mononukleären Zellen

Für die Versuche benötigten wir außerdem mononukleäre Zellen, welche sowohl aus humanem Blut (PBL) als auch aus humanem Lebergewebe (IHL) isoliert wurden. Zu den mononukleären Zellen gehören neben den Lymphozyten auch einige Monozyten als auch ein kleiner Prozentsatz aus dendritischen Zellen wie Makrophagen. Da Lymphozyten mit weitem Abstand den größten Teil ausmachen, werden die isolierten Zellproben im Folgenden als *Lymphozyten* beschrieben.

2.6.1 Isolation von mononukleären Zellen aus humanem Blut

Um mononukleäre Zellen aus dem Blut eines Patienten zu isolieren, wurde diesem zunächst mittels CPDA-Röhrchen (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) Röhrchen Blut entnommen. Das Citrat in den Röhrchen verhindert dabei die Gerinnung der Blutzellen sowie der anderen Blutbestandteile, welche die Energieversorgung der Zellen bis zur weiteren Verarbeitung gewährleisten. Insgesamt wurden 5 Blutröhrchen mit jeweils 8 ml pro Patienten abgenommen

Die Blutröhrchen wurden dann für 10 Minuten bei 1600rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde zweimal 1 ml des Plasmaüberstands in ein Cryovial abpipettiert. Dieses wurde dann bei -80°C gelagert und das restliche Plasma verworfen. Die verbleibenden Blutzellen und die in dem Plasma enthaltenen Thrombozyten wurden in ein 50ml Falcon überführt und mit PBS in einem Verhältnis von mindestens 1:1 verdünnt. Daraufhin wurde das verdünnte Blut auf Biocoll, eine Trennlösung, welche zur Isolierung der mononukleären Zellen verwendet wird, in einem 50ml Falcon aufgetragen.

Das weitere Prozedere wird in Abschnitt „3.2.2.3. *Aufschichten auf Biocoll*“ beschrieben.

2.6.2 Isolation von mononukleären Zellen aus humanem Lebergewebe

Das humane Lebergewebe, aus dem hepatische Lymphozyten isoliert werden sollten, erhielten wir von Patienten der Visceralchirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Regensburg. Diese hatten sich im Vorfeld schriftlich bereit erklärt, Teile ihrer im Rahmen einer für den Patienten notwendigen (Teil-) Resektion entnommenen Leber der Forschung zu spenden.

Das erhaltene Stück tumorfreies Lebergewebe wurde unter der Sterilbank zunächst mit ca. 10 ml an warmen Verdauungspuffer mit Hilfe einer 10 ml Spritze versetzt. Dabei wurde der Puffer an verschiedenen Stellen des Leberstückes appliziert, bevorzugt an Gefäßen, um ihn gleichmäßig zu verteilen. Der Verdauungspuffer ist aus HBSS mit 2% FCS und 0,6% BSA sowie den Enzymen Kollagenase IV (500mg/l) und DNase I (50mg/l) zusammengesetzt und wird verwendet, um das Gewebe anzudauen. Daraufhin wurde das Gewebe mit einem Skalpell in etwa 1mm große Stücke zerkleinert und anschließend für 15min bei 37°C inkubiert. Nach etwa 7 Minuten wurde das Gemisch gevortext. Nach Ende der Inkubationszeit wurde kaltes HBSS zu dem Gemisch gegeben um die Enzymreaktionen von Kollagenase IV und DNase I gestoppt. Die kleinen Leberstücke wurden daraufhin unter regelmäßigem Spülen mit kaltem HBSS mithilfe eines Stempels einer 10ml Spritze durch ein 40-µm-nylon Sieb gepresst. Anschließend wurde das gesiebte Gemisch für 10 Minuten bei 1600rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf 10 ml über dem Pellet verworfen. In den Falcon mit dem Pellet wurden danach ca. 20ml an neuen HBSS pipettiert und das Gemisch resuspendiert und durch ein 70-µm-nylon Sieb gespült, um grobe Bestandteile im Gemisch heraus zu filtern. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand wieder bis auf 10ml abpipettiert und das Pellet in ca. 40 ml neuen HBSS resuspendiert. Zum Schluss wurde die Suspension auf 15ml Biocoll in einem 50ml Falcon aufgetragen. Wie auch bei der Isolation von Blutlymphozyten wurde ab diesem Zeitpunkt nach dem Prozedere welches in 3.2.2.3. *Aufschichten auf Biocoll* beschrieben wurde vorgegangen.

2.6.3 Finale Isolation der mononukleären Zellen aus Blut und Lebergewebe durch Biocoll

Biocoll ist eine Trennlösung zur Isolierung von mononukleären Zellen aus Zellsuspensionen wie beispielsweise Blut und Leber. Die Lymphozyten bleiben

aufgrund ihres geringeren Dichtegradienten auf der Biocoll-Schicht liegen, während die schwereren Bestandteile wie Erythrozyten nach unten durchwandern. Bei der Isolation wurden 15 ml der Trennlösung in einem 50ml Falcon gegeben und maximal das Doppelte an Zellsuspension vorsichtig aufgeschichtet. Anschließend wurden die Falcons bei 2300 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das überstehende Plasma verworfen und die Interphase aus Lymphozyten mit einer 5ml Pipette in einen neuen 50ml Falcon (bei Fett 15ml Falcon) überführt. Anschließend wurden die Falcons mit PBS aufgefüllt und nochmal für 10 min bei 1600rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des kompletten Überstandes wurde das Pellet der Lymphozyten erneut in wenigen Milliliter PBS gelöst. Daraufhin wurden die Lymphozyten aus dem gleichen Gewebe von verschiedenen Falcons in einem gesammelt und dieser mit RPMI-Medium auf 40 ml aufgefüllt. RPMI-Medium wurde bereits im Vorfeld vorbereitet, indem 50ml RPMI 1640 [-] L-Glutamine 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 2 mM L-Glutamin versetzt wurden.

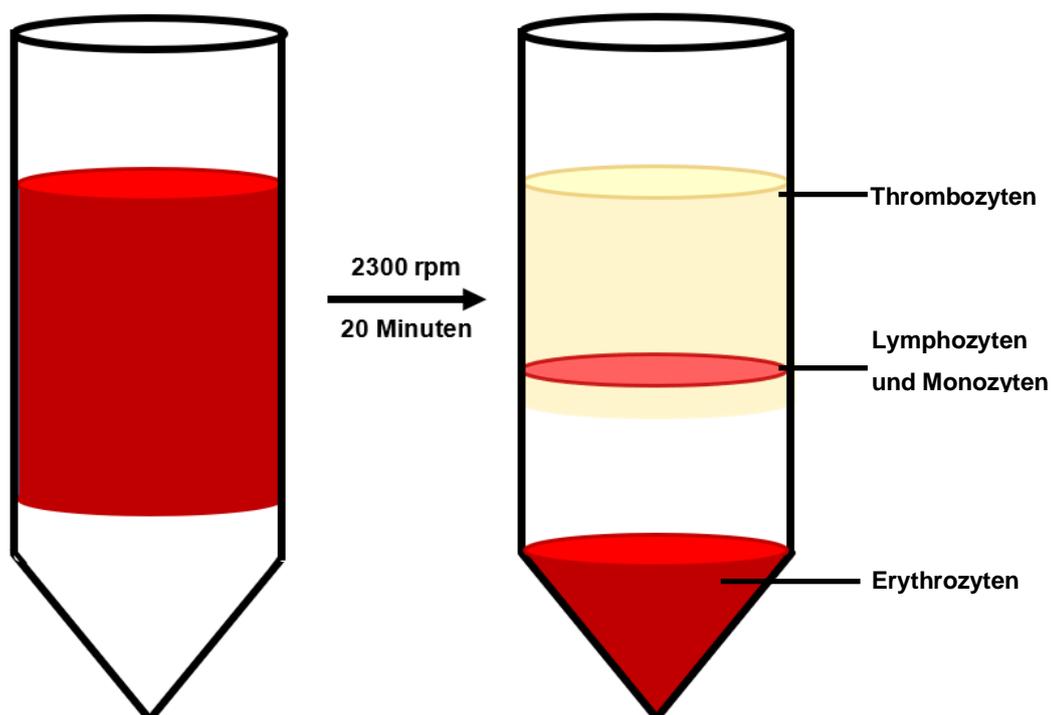


Abbildung 2: Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation von Blut und Lebergewebe

Das Blut als auch das bearbeitete Lebergewebe desselben Patienten werden auf Biocoll aufgeschichtet und anschließend für 20 Minuten mit 2300rpm zentrifugiert. Dadurch werden das Blut und das Lebergewebe in verschiedenen zellulären Komponenten aufgetrennt und es lassen sich die mononukleären Zellen isolieren.

2.6.4 Bestimmung der Lymphozytenzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer und der Trypanblau-Exklusionstest verwendet. Dabei wurden 10µl der Zellsuspension mit 90µl Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt und dann 10µl vom Gemisch unter das Deckglas auf die Zählkammer aufgetragen. Gezählt werden nur große helle Zellen in den Großquadranten, da Trypanblau tote Zellen, deren Zellmembran durchlässig ist, blau färben kann. Die Zellzahl pro 1 ml ergibt sich dann mit folgender Formel:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

Die Zellen wurden anschließend abhängig vom Versuchsaufbau in mehrere 15 ml Falcons überführt.

2.7 MACS-Sorting

Bei dieser Arbeit wurde die Relevanz einzelner Zellgruppen bei der Immunantwort der Lymphozyten auf das HCV untersucht. Dafür mussten einzelne Zelltypen aus dem Gesamtgemisch der Lymphozyten, abhängig vom Versuchsaufbau, isoliert oder entfernt werden. Dies gelang durch *Magnetic Cell Separation* (MACS). Durch diese Methode, welche Anfang der 1990er Jahre durch die Firma Miltenyi Biotec entwickelt wurde, ist es möglich, Zelltypen anhand von bestimmten Oberflächenstrukturen von Zellgemischen zu trennen.⁽⁴⁴⁾ Dabei wurden etwa 50nm große Magnetpartikel, welche an Antikörper gebunden sind mit der Zellsuspension in Lösung gebracht. Dieser Komplex aus Magneteilchen und Antikörpern wird auch *MicroBead* genannt. Die Antikörper erkennen spezifische Strukturen auf den Zelloberflächen und binden die MicroBeads an die gewünschte Zellpopulation. Anschließend wurden die markierten Zellen (englisch *target cells*) durch den autoMACS SeparatorTM von den übrigen Zellen getrennt. Das Gerät lässt das Zellgemisch dabei durch eine Säule fließen, welche von einem starken Magnetfeld umgeben ist. Beim Spülen der Säule verbleiben die mit den magnetischen MicroBeads markierten Zellen in dieser, während die unmarkierten Zellen ausgeschwemmt werden. Erst wenn das Magnetfeld ausgeschaltet und die Säule erneut gespült wird, können auch die markierten Zellen separat gewonnen werden. Durch die wiederholte Behandlung eines Zellgemisches mit MicroBeads können Zellgemische auch in mehrere Zellpopulationen aufgeteilt werden. Dies wird auch fraktionierte Trennung genannt.⁽⁴⁵⁾

2.7.1 Isolation von Zellpopulationen durch MACS-Sorting

Durch die Methode des MACS- Sorting konnten einzelne Zellpopulationen isoliert werden, um damit Versuche durchzuführen. Werden die mit MicroBeads markierten target cells für weitere Versuche genutzt, wird das Verfahren *positive Selektion* (englisch *positive selection*) genannt. Handelt es sich bei den Zielzellen jedoch um die unmarkierten Zellen, nennt man die Isolation der Zellpopulation mittels MACS auch *Abreicherung* (englisch *Depletion*).⁽⁴⁵⁾ Diese Methode hat den Vorteil, dass die Versuchsergebnisse nicht durch MicroBeads verändert oder beeinflusst werden können.

2.7.1.1 Isolation von B-Zellen

Markierung der Zellen durch MicroBeads

Die für unsere Versuchsreihen benötigten B-Zellen wurden mit dem Verfahren der negativen Isolation isoliert. Dafür wurde das *B Cell Isolation KIT II, human* von Miltenyi Biotec verwendet, welches in einem Kühlschrank bei 4°C ohne Lichtexposition gelagert wurde.

Zunächst wurde der für das Verfahren benötigte MACS-Puffer hergestellt. Dafür wurden zu 50ml PBS steril 2 mM EDTA (pH 8.0) und 0,5% BSA Fraction V hinzugefügt. Anschließend wurde die ausgezählte Suspension aus PBL oder IHL 10 min mit 1600rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro 10^7 Zellen wurde daraufhin unter der Sterilbank 40 µl MACS-Puffer sowie 10 µl des im Kit erhaltenen *B Cell Biotin-Antibody-Cocktails* in das Falcon gegeben, das Zellpellet darin resuspendiert und danach für 5 Minuten bei 4°C ohne Lichtexposition inkubiert. Der B Cell Biotin-Antibody Cocktail enthält an das Vitamin Biotin (Vitamin B7) konjugierte Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD2, CD14, CD16, CD36, CD36, CD43 und CD235a (Glycophorin A). Diese Antikörper markieren alle Lymphozyten außer B-Zellen. Nach der Inkubationsphasen wurden 30 µl MACS- Puffer pro 10^7 Zellen als auch 20 µl pro 10^7 Zellen an *Anti-Biotin MicroBeads* hinzugefügt, resuspendiert und die Suspension erneut für 10 Minuten im 4°C-Kühlschrank inkubiert. Bei den Anti-Biotin MicroBeads handeln es sich um mit monoklonale Antibiotin-Antikörpern konjugierte Magnetpartikel. Diese Antikörper bindet in der Zellsuspension an das Biotin der Biotin-Antikörper versehen somit die markierten Lymphozyten mit kleinen Magneten.

Magnetische Separation der Zellen durch den autoMACS™ Separator

Während der Inkubationsphase wurde nun der autoMACS™ Separator vorbereitet, der zur Magnetischen Separation der Zellen notwendig ist. Nach dem Einschalten wurde das Gerät zunächst mit der „Rinse“ Funktion gereinigt und die Probenanzahl eingestellt. Dabei wurde festgelegt, dass der Separator nach jeder durchgelaufenen Probe mit der „Rinse“-Funktion gewaschen wird. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Falcons mit den markierten Lymphozyten zusammen mit leeren Falcons mit Hilfe eines MAC Chill Racks, welcher die dauerhafte Kühlung der Proben gewährleistete, zum autoMACS™ Separator transportiert und die „Depletes“ Funktion gestartet. Die Magnetische Separation der Zellen wurde anschließend wie in „2.3. MACS Sorting“ erläutert durchgeführt. In den leeren Falcons wurden die Lymphozyten gesammelt, welche mit MicroBeads markiert waren. Von allen Zellpopulationen wurden Proben genommen und in FACS-Tubes gegeben, um später in der FACS-Analyse die Reinheit der Populationen festzustellen. Die übrigen mit MicroBeads markierten Zellen wurden verworfen, während die unmarkierte B-Zellpopulation zur Durchführung der Versuche eingesetzt wurde.

2.7.2 Depletion von Zellpopulationen durch MACS-Sorting

Neben der Isolierung ist auch eine Entfernung von einzelnen Zellpopulation mittels MACS-Sorting möglich. Für die Durchführung unserer Versuchsreihen war es nötig in einigen Proben CD56⁺ NK- Zellen, in anderen CD14⁺ Monozyten und Makrophagen zu depletieren.

2.7.2.1 Depletion von CD14⁺ Zellen

Zur Eliminierung der CD14⁺ Monozyten und Makrophagen aus der Gesamtlymphozytensuspension wurden *humane CD14 MicroBeads* von Miltenyi Biotec angewendet. Nach Herstellung des MACS-Puffers, wie in „2.3.1.1 Isolation von B-Zellen“ beschrieben, wurden die bereits ausgezählten Lymphozyten bei 1600 rps für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden pro 10⁷ Zellen 80 µl MACS-Puffer sowie 20 c CD14 MicroBeads zur Zellsuspension in den Falcons hinzugefügt und resuspendiert. Die Falcons wurden dann für 15 Minuten im 4°C-Kühlschrank ohne Lichtexposition inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit

wurden die Zellen mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen versetzt und bei 1600 rps für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet am Boden des Falcons in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Falcons daraufhin im 4°C-Kühlschrank verwahrt.

Die Magnetische Separation der CD14⁺- Zellen durch den autoMACS™ Separator wurde wie in „2.3.1.1 Isolation von B-Zellen“ beschrieben durchgeführt. Auch hier wurden von allen markierten und unmarkierten Zellpopulationen Proben entnommen, um später in der FACS- Analyse die Reinheit der Populationen festzustellen. Die übrigen mit MicroBeads markierten CD14⁺- Zellen wurden verworfen, während die unmarkierte Lymphozytensuspension zur Durchführung der Versuche eingesetzt wurden und im Folgenden als *ohne CD14⁺* beschrieben wird.

2.7.2.2 Depletion von CD56⁺ NK- Zellen

Für weitere Versuchsreihen war außerdem die Entfernung von CD56⁺ NK-Zellen aus der Gesamtlymphozytenpopulation notwendig. Hierzu wurden *humane CD56 MicroBeads* von Miltenyi Biotec verwendet. Bis auf die Verwendung der CD56 MicroBeads anstelle der CD14 MicroBeads entspricht das Prozedere dabei exakt dem in „2.3.2.1 Depletion von CD14⁺-Zellen“ besprochenen Verfahren. Die Lymphozytensuspension ohne CD56⁺-Zellen wurde als *ohne CD56⁺* beschrieben.

2.8 Ko-Kulturen aus Lunet- Zellen und Lymphozyten

In der Ko-Kultur wurden Lunet BLR Zellen bzw. Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen zusammen mit peripheren Blutlymphozyten bzw. intrahepatischen Lymphozyten, die zuvor isoliert wurden, oder vorher mittels MACS- Sorting isolierten oder depletierten Zellpopulationen für mindestens 20 Stunden kultiviert.

2.8.1 Ausplattieren der Lunet-Zellen

Zur Durchführung der Versuche mussten die geernteten Lunet- Zellen in drei 24-Well-Platten ausplattiert werden. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst mithilfe einer Neubauer-Zählkammer und der Trypitanblau-Exklusionstest ausgezählt. Daraufhin wurde weiteres DMEM-Medium zu der Lösung hinzugefügt, bis bei den

Gesamtlymphozytenpopulationen aus PBLs und IHLs eine Konzentration von 2×10^6 Zellen pro 0,5 ml erreicht war. Bei den PBL und IHL-Zellpopulationen, bei denen mittels MACS- Sorting $CD14^+$ Monozyten bzw. $CD56^+$ NK-Zellen eliminiert wurden, wurde durch die Zugabe des DMEM-Mediums eine Konzentration von $1,8 \times 10^6$ Zellen pro 0,5 ml erzeugt. Daraufhin wurden in jedes entsprechend beschriftete Well der 24-Well Platte 0,5 ml das Zellgemisch pipettiert und die Platte für etwa 4 Stunden bei 37° Grad inkubiert. In dieser Zeit konnten die Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen bzw. Die Lunet BLR Zellen langsam auf den Boden der Wells absinken und dort anhaften.

2.8.2 Fertigstellung der Ko-Kultur durch Zugabe von Lymphozyten

Die Zellzahl der isolierten Blutlymphozyten als auch Leberlymphozyten wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer und des Trypanblau-Exklusionstests bestimmt und mit RPMI- Medium ergänzt, bis die Konzentration der Zellsuspension 4×10^6 Zellen pro ml beträgt.

Nach dem Ausplattieren der Lunet-Zellen in der 24-Well Platte und einer Inkubationszeit derselbigen von 4 Stunden werden jeweils 0,5ml, entsprechend 2×10^6 der Blut- und Leberlymphozyten gleichmäßig auf die Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen bzw. die Lunet BLR Zellen verteilt. Zur Negativkontrolle verblieben zwei Wells mit Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen ohne Lymphozyten.

NK-Zellen als auch $CD14^+$ Monozyten bzw. Makrophagen machen jeweils etwa 10% der peripheren mononukleären Blutzellen aus.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ Für den Versuch ist es essentiell, dass die Zellanzahl der anderen Populationen, wie B-Zellen oder T-Helferzellen, bei den Proben ohne $CD16^+$ sowie ohne $CD56^+$ identisch zu der Zellzahl bei den Proben mit allen Lymphozyten ist. Ansonsten kann ein möglicher Unterschied bei der Virussuppression oder Ausschüttung von Zytokinen nicht sicher nur auf das Fehlen der $CD16^+$ bzw. $CD56^+$ Zellen in den depletierten Zellproben zurückgeführt werden. Die Zellanzahl der Suspensionen ohne $CD16^+$ und ohne $CD56^+$ werden daher mithilfe der Neubauer-Zählkammer und des Trypanblau-Exklusionstests bestimmt und mit RPMI-Medium ergänzt, bis die Konzentration der Zellsuspension $3,6 \times 10^6$ Zellen pro ml, also 10% weniger als bei der Suspension mit der Gesamtlymphozytenpopulation, beträgt. Anschließend werden jeweils 0,5ml und damit entsprechend $1,8 \times 10^6$ der PBL und IHL

ohne CD14⁺ bzw. CD56⁺ Zellen wie auf Abbildung 4 und 5 dargestellt auf Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen bzw. die Lunet BLR Zellen pipettiert.

Äquivalent zu dem im oberen Absatz beschriebenen Prinzip wurden zudem die Zellzahl der isolierten B-Zell-Populationen aus PBL und IHL mit der Neubauer-Zählkammer und dem Trypanblau-Exklusionstest bestimmt und mit RPMI- Medium ergänzt, bis die Konzentration der Zellsuspension $0,4 \times 10^6$ Zellen pro ml entsprach. Daraufhin wurden auch hier 0,5ml (entsprechend $0,2 \times 10^6$ B-Zellen) auf Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen bzw. die Lunet BLR Zellen gegeben (siehe Abbildung 5).

Zur Negativkontrolle verblieben zwei Wells mit Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen ohne Lymphozyten (siehe Abbildung 5).

Zusätzlich wurden FMO-Kontrollen (Fluorescence Minus One) mit jeweils rund 2×10^6 Zellen und für die Kompensation der FACS- Analyse 9 FACS-Röhrchen mit je ca. 1×10^6 Blutlymphozyten vorbereitet.

Die fertigen Ko-Kulturen wurden anschließend für 18 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.8.3 Ernten der mononukleären Zellen

Nach Ende der 18 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium mit den enthaltenen mononukleären Zellen unter vorsichtigen Spülen des Kulturbodens aus den Wells entfernt und in FACS-Tubes überführt. Daraufhin wurden auf die verbliebenen Lunet BLR und Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen am Boden der Wells je 300 µl PBS gegeben um das Austrocknen der Zellen zu verhindern. Diese Zellen wurden im Folgenden wie in „2.5. Luciferase Messung“ beschrieben weiter behandelt.

Die sich in den FACS-Tubes befindende Suspension aus Medium und Lymphozyten wurde anschließend bei 1400 rpm für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand aus Medium abpipettiert und in Deepwellplatten überführt. Diese wurden anschließend bei -20°C eingefroren. Auf das verbleibende Zellpellet aus mononukleären Zellen wurde direkt 500 µl RPMI Medium gegeben. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Zellen zu jeder Zeit ausreichend mit Nährstoffen versorgt wurden.

2.8.4 Stimulation mit Interleukin-12 und Interleukin-15

Einige der Zellproben aus mononukleären Zellen sollten für den Versuchsaufbau mit den Interleukinen 12 und 15 (IL-12 und IL-15) stimuliert werden. Hierzu wurde zunächst IL-12 bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml mit PBS verdünnt. Anschließend wurden 1 µl pro ml RPMI Medium an dem verdünnten IL-12 sowie 4 µl pro ml an IL-15 in ausreichend RPMI Medium pipettiert und resuspendiert. Daraufhin wurden 500 µl der Interleukinhaltigen Suspension in die FACS- Tubes mit den zu stimulierenden Zellen gegeben. In alle anderen FACS- Tubes mit Lymphozyten, welche nicht stimuliert werden sollten, wurden 500 µl RPMI-Medium gegeben. Die Proben wurden dann für 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.8.5 Zugabe von Golgi-Plug

Golgi-Plug enthält Brefeldin A und hemmt den intrazellulären Transport von Proteinen in Lymphozyten. Dadurch kommt es zur Akkumulation von Interleukinen im Golgi-Apparat und Endoplasmatische Retikulum der Zelle und ermöglicht es später die quantitative Ausschüttung von Zytokinen eines Lymphozyten mittels FACS- Analyse zu bestimmen.⁽⁴⁹⁾

Zu diesem Zweck wurden die Zellproben nach Ablauf der 14 Stunden Inkubationszeit mit 5 µl Golgi-Plug (1:5 verdünnt mit RPMI-Medium) versetzt, resuspendiert, und anschließend für 4 weitere Stunden bei 37°C inkubiert.

2.9 Luciferase- Messung

Um die virale Aktivität der Lunet BLR Luc ubi neo JFH Zellen nach der Inkubation mit den unterschiedlichen Lymphozytenproben zu bestimmen, werden die Replikon-Zellen lysiert und anschließend mit Luciferin versetzt, welches durch die Luciferase des HCV-Replikons gespalten wird. In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg konnte die durch die enzymatische Spaltung entstehende Fluoreszenz mithilfe eines FLUOstar Omega Microplate Readers von BMG LABTECH zu gemessen.

2.9.1 Lyse der Lunet BLR Luc ubi neo JFH –Zellen

Die Lyse der Replikon-Zellen wurde mithilfe des Luciferase Assay Systems E1500 von Promega durchgeführt. Zunächst wurde Luciferase Assay Reagent (LAR), welches die Luciferase enthält, durch die Zugabe von 10 ml Luciferase Assay Buffer zum Flakon mit Luciferase Assay Substrate. Das fertig gestellte LAR wurde anschließend in 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes verteilt und durch außen angebrachte Aluminiumfolie vor Lichtexposition geschützt. Nach der Benutzung des LAR wurde der Rest im -20°C Kühlschrank gelagert. Vor jeder neuen Verwendung der Luciferase Assay Reagent wurde diese bei Raumtemperatur aufgetaut. Außerdem wurde die Cell Culture Lysis Reagent im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt.

Zur Lysierung der Replikon- Zellen wurde jedes Well zunächst drei Mal vorsichtig mit 0,5 ml PBS Puffer gewaschen ohne das Zellen vom Boden gelöst wurden. Anschließen wurden die Wells mit 300 µl Cell Culture Lysis Reagent Cell Culture Lysis Reagent versetzt und für 20 Minuten unter ständigem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Lysis Reagent in den Wells vorsichtig resuspendiert um auch die restlichen Lunet BLR Luc ubi neo JFH-Zellen vom Boden zu lösen und in 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes überführt welche dann für 5 Minuten mit der Eppendorf Zentrifuge 5414C bei 1500 rpm zentrifugiert wurden. Das führte dazu, dass die Zellbruchstücke sich auf den Boden der Tubes absenkten während sich das HCV-Replikon im Überstand befindet. Anschließend wurde der Überstand aus Lysis Reagent abpipettiert, in Deepwellplatten überführt und daraufhin bei -20°C eingefroren.

2.9.2 Messung am OMEGA Plattenleser

Zur Messung der Fluoreszenz, welches bei der Spaltung des an das HCV-Replikon getaggte Luciferin entsteht, wurden zum einen die gefrorenen Proben, als auch das LAR bei Raumtemperatur ohne Lichtexposition aufgetaut. Anschließend wurden 150 µl der aufgetauten Proben in eine Fluoreszenz-Platte pipettiert und mit 150 µl Luciferase Assay Substrat versetzt und die entstehende Fluoreszenz sofort mithilfe des FLUOstar Omega Microplate Readers von BMG LABTECH gemessen.

2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie beschreibt ein Messverfahren, welches die quantitative, hochwertige Analyse von membranständigen Oberflächenantigenen und damit die molekulare Charakterisierung bei geringem Materialverbrauch und Färbeaufwand ermöglicht. Bei diesem Verfahren fließen Zellen in einer hohen Geschwindigkeit einzeln an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbei. Abhängig von der Form, Struktur oder Färbung der Zellen wird die Spannung bzw. der Lichtstrahl unterschiedlich beeinflusst bzw. gebrochen. Aufgrund der Streuung kann auf die Größe der Zellen (FSC) und deren Granularität (SSC) geschlossen und somit verschiedene Zellen voneinander unterschieden werden.⁽⁵⁰⁾

2.10.1 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Das Fluorescence activated cell sorting (FACS) ist eine spezielle Methode der Durchflusszytometrie. Der Begriff FACS ist ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Becton Dickinson, wird aber in der Fachwelt als Begriff für Fluoreszenz- geregelte Zellsortierungen benutzt. Bei FACS- Messungen werden die Zellen vorher mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Antikörpern versetzt, welche an spezielle Moleküle der Zellen binden und somit bestimmte Strukturen markieren. Dadurch ist es möglich, Zellpopulationen, die entsprechende Strukturen aufweisen (positive Population) von anderen Zellen abzugrenzen, die nicht über das gesuchte Merkmal verfügen (negative Population).

2.10.2 Färben der Zellen

Um später eine FACS- Analyse mit den geernteten Lymphozytenpopulationen durchführen zu können, müssen diese zunächst mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen angefärbt werden. Dabei unterscheidet man Oberflächenfarbstoffe von Intrazellulären Farbstoffen.

2.10.2.1 Oberflächenfärbungen

Mit der Oberflächenfärbung werden Moleküle auf der Zelle angefärbt, die unterschiedliche Entwicklungsstadien/-linien von Leukozyten repräsentieren oder

distinkte Funktionen haben. Diese Moleküle wurden ursprünglich als Differenzierungs-Antigene bezeichnet.

Für die Färbung wurde zunächst der FACS- Puffer aus 500 ml PBS, 2 ml 0,5% EDTA sowie 12,5 ml Fetales Kalbsserum (FCS) hergestellt. Anschließend wurden die Zellproben in den FACS- Tubes zunächst mit 2 ml FACS Puffer versetzt, bei 1300 rpm für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Währenddessen wurde Ethidium Monazid (EMA) 1:10 mit PBS verdünnt. Mit EMA ist es möglich, tote Zellen zu markieren, um diese in der Analyse zu separieren.⁽⁵¹⁾ Nach Beendigung der Zentrifugation wurde in jedes Tube 5 µl verdünntes EMA pipettiert und die Tubes für 10 Minuten auf Eis ca. 18 cm unter 40-Watt fluoreszierendes Licht inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut mit 2 ml PBS gewaschen, mit den entsprechenden Farbstoff-markierten Antikörpern versetzt (siehe Tabelle 1) und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit 2 ml PBS gewaschen.

Farbe	Antigen	Volumen in $\frac{\mu\text{l}}{100 \mu\text{l}}$	Bestimmung von
PerCP-Cy5.5	CD14	0,5	Monozyten
PerCP-Cy5.5	CD19	1,0	B-Zellen
Pe-Cy7	CD56	0,5	NK- Zellen
APC-Cy7	CD3	1,0	T-Zellen
V500	CD16	0,5	NK-Zell Subpopulationen

Tabelle 1: Verwendete Farbstoffe bei Oberflächenfärbungen

2.10.2.2 Intrazelluläre Färbungen

Durch Intrazelluläre Färbungen können intrazellulären Proteinen wie Zytokine, Transkriptionsfaktoren oder phosphorylierten Proteine markiert und dadurch in der anschließenden FACS- Analyse identifiziert und charakterisiert werden. Bei unseren Versuchsreihen interessierten wir uns vor allem für die Ausschüttung der Zytokine

Interferon- γ und Tumor Necrosis Factor- α sowie den Marker TRAIL für die Zytotoxizität von NK-Zellen. Die Sekretion der Zytokine wurde bereits vorher wie in „2.4.4. *Stimulation mit Interleukin-12 und Interleukin-15*“ beschrieben durch die Verwendung des Protein Transporter Inhibitoren Golgi-Plug geblockt. Dadurch akkumulieren die Zytokine im endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat der Zellen und können so durchflusszytometrisch gemessen werden.

Nach Durchführung der Oberflächenfärbung wurden die Zellen jedes Tubes in 250 μ l BD Cytofix/Cytoperm resuspendiert, für 20 Minuten bei 4°C inkubiert und daraufhin zweimal mit 500 μ l 1:10 verdünnten BD Perm/Wash gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellproben mit den entsprechenden Antikörpern versetzt (siehe Tabelle 2) und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dem erneuten zweimaligen Waschen mit 1 ml BD Perm/Wash wurden die Tubes mit jeweils 200 μ l FACS Puffer versetzt und die Zellen noch am selben Tag mittels Durchflusszytometrie (FACS Canto II BD, Heidelberg) analysiert.

Farbe	Antigen	Volumen in $\frac{\mu\text{l}}{100 \mu\text{l}}$	Bestimmung von
APC	TRAIL	0,5	TRAIL (CD253)
PE	IFN- γ	5,0	IFN- γ
FITC	TNF- α	0,5	TNF- α

Tabelle 2: Verwendete Farbstoffe für Intrazellulären Färbungen

2.10.2.3 Färbung mit FITC- CD107a/ LAMP-1 Antikörpern

Für einige Versuche wurden PBL und IHL mit FITC- CD107a (LAMP-1) von Biolegend, San Diego, USA gefärbt. Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1) oder auch CD107a (Cluster of Differentiation 107a) ist ein transmembranes Glycoprotein.⁽⁵²⁾ Bei Zunahme der Degranulation von NK-Zellen wird CD107a vermehrt exprimiert und kann somit als Degranulationsmarker erfasst werden.⁽⁵³⁾

Die Antikörper wurden nach mindestens 18 Stunden Inkubationszeit in einer Konzentration von 15 µl/ml direkt zur Ko-Kultur aus PBL und IHL mit Lunet BLR bzw. Lunet BLR Luc ubi neo JFH ggf. zusätzlich mit K562-Zellen gegeben.

2.10.3 Kompensationen

Bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe können bei der Durchflusszytometrie im Kanal eines anderen Fluorophors in Abhängigkeit von seiner relativen Helligkeit und seinem Emissionsspektrum durch Artefakte zu falsch positiven Signalen führen. Das würde die Messungen verfälschen und zu veränderten Ergebnissen führen. Um dies zu verhindern setzten wir Kompensationen ein, um das Signal eines bestimmten Kanals von anderen Kanälen, die im gleichen Experiment verwendet wurden, zu isolieren. Dazu wurden Proben von peripheren mononukleären Zellen mit einzelnen Farbstoffen wie in *Tabelle 3* aufgeführt gefärbt und als Kompensationen bei der FACS- Analyse verwendet. Außerdem wurde eine Kompensationsprobe ohne Farbstoffe belassen. Die Kompensationen werden im Folgenden auch FMO (fluorescence minus one) genannt.

Farbe	Antigen	Volumen in $\frac{\mu\text{l}}{100 \mu\text{l}}$
BV510	CD8	0,5
PerCP-Cy5.5	CD14, EMA	0,5
PerCP-Cy5.5	CD19, EMA	2,0
PerCP-Cy5.5	CD14 AND CD19, EMA	2,0
Pe-Cy7	CD56	1,0
APC-Cy7	CD3	3,0
V500	CD16	0,6
APC	CD4	3,0
PE	CD45RA	5,0 (1:10 mit PBS verdünnt)
FITC	CD45	5,0
FITC	CD3	5,0

Tabelle 3: Verwendete Farbstoffe für Kompensationen

2.11 Laktat- Dehydrogenase Assay

In einigen Versuchen wurde außerdem mittels dem LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay von Promega die Freisetzung des Stoffwechsellzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) gemessen. LDH befindet sich in allen Körperzellen und somit auch in Hepatozyten. Kommt es zur Zerstörung der Zelle wird LDH freigesetzt. Die Quantität von LDH ist dabei proportional zur Anzahl der zerstörten Zellen. LDH ist daher ein valider Parameter für Zytotoxizität.

Zunächst wurde die LDH Detection Reagent hergestellt. Dazu wurden der im Kit enthaltene LDH Detection Enzyme Mix mit dem Reductase Substrate, welche zuvor bei Raumtemperatur aufgetaut wurden, vermischt. Die zu messenden Proben,

bestehend aus dem abpipettierten Überstand der Ko-Kulturen, wurde aufgetaut und zu 50 µl/Well in einer Pierce White Opaque 96-Well Platte ausplattiert. Außerdem wurden positive und negative LDH-Kontrollen entsprechend des LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay- Protokolls vorbereitet und ausplattiert. Anschließend wurden 50 µl der LDH Detection Reagent zu jeder Zellprobe gegeben und die 96-Well Platte für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Lumineszenz, welche sich proportional zur Quantität an LDH in der Probe verhält, mithilfe des Varioskan® Flash-Readers von Thermo Scientific bestimmt.

3 Ergebnisse

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der angeborenen Immunantwort bei HCV-Infektionen. Dabei kann man den experimentellen Ablauf in drei Arbeitsschritte unterteilen (siehe Abb.3):

Zunächst wurden Huh-7-Zellen, welche mit einem subgenomischen HCV-Replikon transfiziert wurden (Lunet BLR Luc ubi neo JFH), kultiviert. Diese stellen ein in vitro Modell der HCV-infizierten Leberzellen dar. Die Virusreplikation dieser Zellen konnte nach Ende der Ko-Kultur (siehe Schritt 2) mithilfe des Varioskan® Flash-Readers von Thermo Scientific bestimmt werden.

Im zweiten Schritt wurden humane mononukleäre Zellen aus Blut (PBL) und Leber (IHL) isoliert und mit Lunet BLR Luc ubi neo JFH -Zellen sowie mit Lunet BLR Luc zur Negativkontrolle für 14 Stunden sowie 4 weitere Stunden nach Zugabe von Goli-Plug in Ko-Kultur gebracht, um eine Untersuchung der Immunantwort von Natürlichen Killerzellen auf das HCV zu ermöglichen. Außerdem wurden mittels MACS-Sorting einzelne Zelltypen isoliert oder entfernt und anschließend ihrerseits in Ko-Kultur gebracht. Durch diese Versuche soll der Einfluss dieser Zellgruppen auf die Immunantwort gegen das HCV bestimmt werden. Diese Zellmodelle bilden die Grundlage für den letzten Arbeitsschritt. In einigen Versuchen wurden zur Stimulation der NK-Zellen mononukleäre Zellen zusätzlich 6 Stunden mit den Interleukinen-12 und -15 versetzt.

Nach Ende der Inkubationszeit der Ko-Kulturen wurden im letzten Schritt PBL und IHL, als auch Zellpopulation aus denen CD14⁺- Zellen entfernt wurden, mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde das Augenmerk insbesondere auf NK-Zellen gelegt. Bei diesen Untersuchungen stand die Fragestellung im Vordergrund, ob NK-Zellen die Virusaktivität durch Aktivierung verringern und durch welchen Mechanismus dies geschieht. Hierbei wurde insbesondere die Expression und Ausschüttung der Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) sowie den Marker TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) für die Bestimmung der Zytotoxizität von NK-Zellen untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es außerdem, Unterschiede in der Aktivierung und Ausschüttung verschiedener Zytokine und Marker von PBL und IHL aufzuzeigen. Außerdem wurde betrachtet, ob diese Effekte von anderen Zellpopulationen abhängig sind.

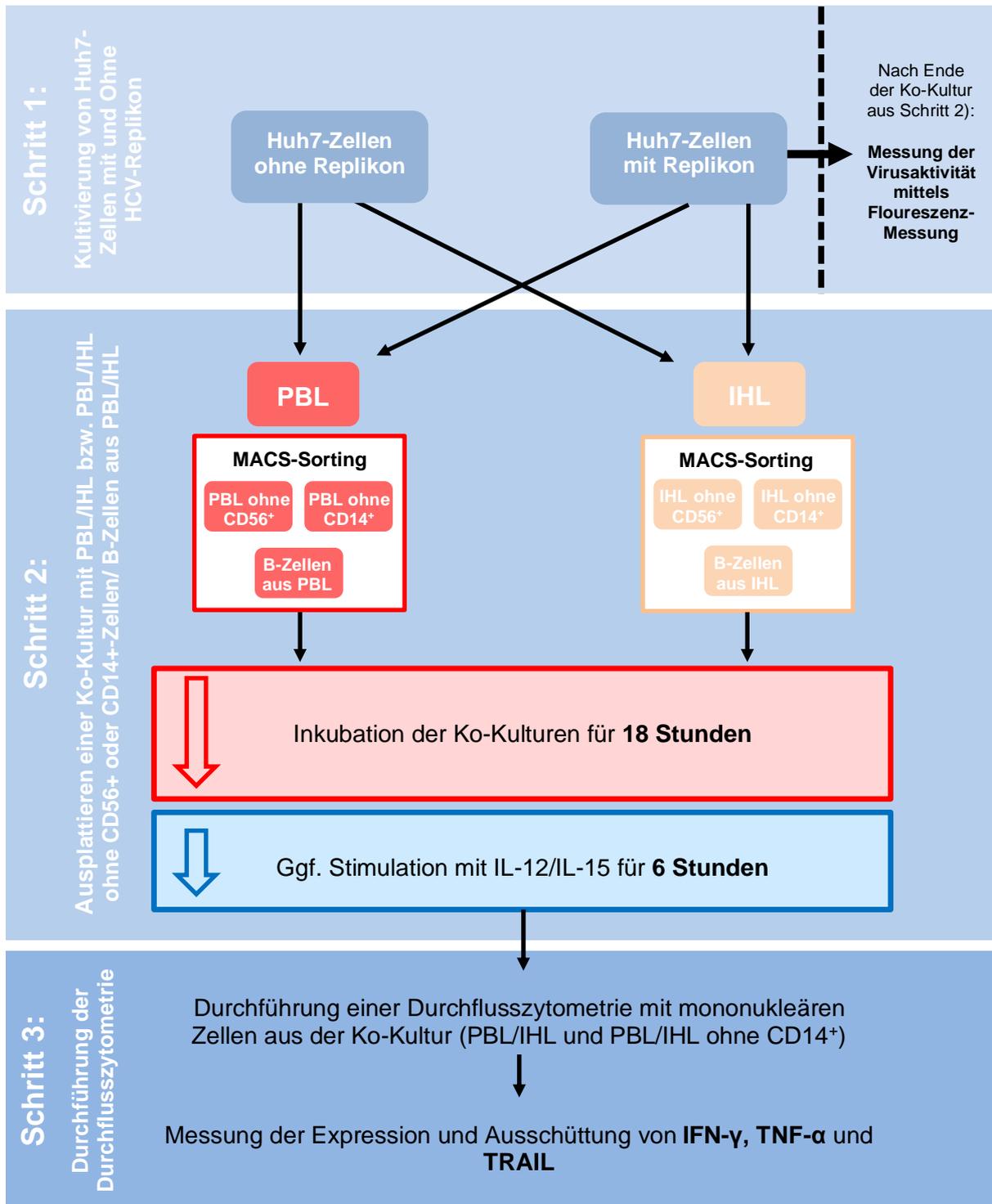


Abbildung 3: Überblick über den allgemeinen Versuchsaufbau und experimentellen Ablauf

3.1 Messung der antiviralen Aktivität durch Luciferase

Zunächst werden nun die Ergebnisse der Luciferase-Messungen besprochen. Diese lassen Rückschlüsse auf die verbleibende HCV-RNA Replikation der Replikon-Zellen nach der Ko-Kultur zu. Im Umkehrschluss lässt sich dadurch die antivirale Aktivität der mononukleären Zellen, welche sich als zweite Komponente in der Ko-Kultur befanden, bestimmen. Alle Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3.1.1 B-Zellen als Negativkontrolle hatten einen geringeren Einfluss auf die virale Aktivität von Replikon-Zellen als PBL und IHL

Um mögliche Effekte des MACS-Sortings auf die verbliebene HCV-RNA-Replikationsrate der Replikon-Zellen auszuschließen, wurden B-Zellen als Negativkontrolle aus PBL und IHL mittels MACS- Sorting isoliert und die antivirale Aktivität dieser Zellen mit der von vollständigen PBL- und IHL-Populationen verglichen (siehe Abb.4). Hierbei zeigte sich die Replikationsrate der Replikon-Zellen nach Ko-Kultur bei PBL ($10 \pm 10\%$ vs. $48 \pm 30\%$, $P= 0,0078$) und IHL ($3,4 \pm 2,5\%$ vs. $16 \pm 15\%$, $P= 0,0117$) im Vergleich zu den B-Zellpopulationen stark vermindert. Wie zu erwarten, zeigten isolierten B-Zellen somit eine deutlich geringere antivirale Aktivität als die vollständigen Populationen aus PBL und IHL. Daraus lässt sich ableiten, dass die antiviralen Effekte der jeweiligen Zellisolate nicht von der Behandlung der Zellen durch MACS-Sorting verursacht wurden.

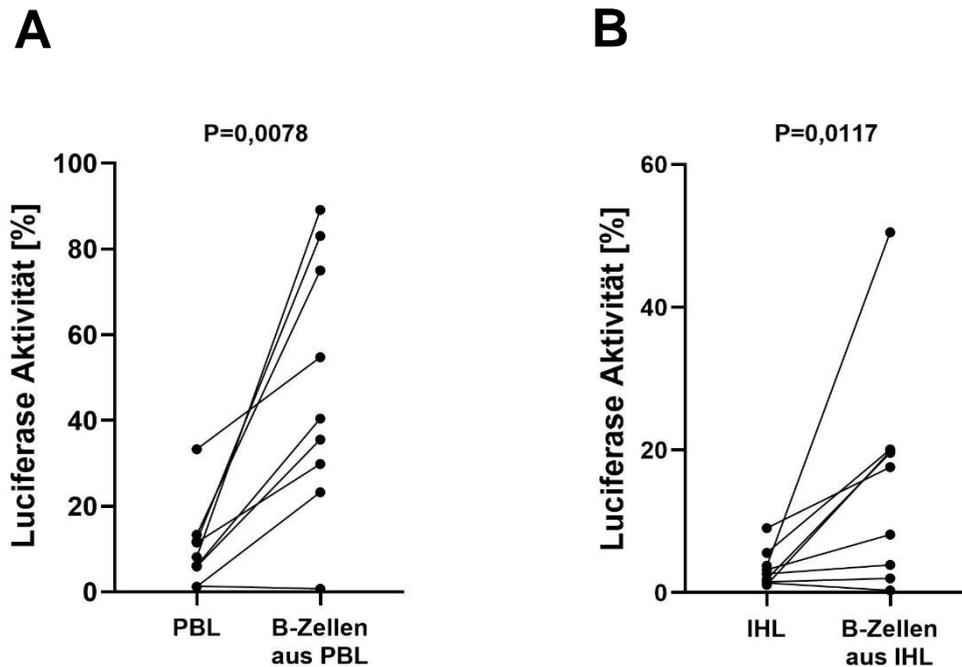


Abbildung 4: Vergleich der Luciferase Aktivität von Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit B-Zellen sowie PBL bzw. IHL

Aus mononukleären Zellen aus Blut und Leber wurden mittels MACS-Sorting B-Zellen isoliert. Diese wurden neben vollständigen PBL und IHL Populationen mit HCV-Replikon-Zellen für 18 Stunden in Ko-Kultur gebracht. Anschließend wurde die verbleibende Luciferase-Aktivität der Replikon-Zellen gemessen. Die Luciferase-Aktivität der Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL bzw. mit B-Zellen aus PBL ist in (A) dargestellt. Auch die Luciferase-Aktivität von Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit IHL sowie B-Zellen aus IHL (B) wird im Vergleich abgebildet. Als statistischer Test wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet.

3.1.2 IHL zeigten einen stärkeren antiviralen Effekt als PBL

Zudem wurde die HCV-RNA-Replikationsrate der Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL und IHL betrachtet. Dabei konnte festgestellt werden, dass Replikon-Zellen nach Kontakt mit PBL über eine höhere Replikationsrate verfügten als Replikon-Zellen, welche sich in Ko-Kultur mit IHL des selben Patienten befanden ($14 \pm 14\%$ vs. $4,6 \pm 4\%$, $P= 0,0021$). Wie in Abb. 5 zu sehen, reduzierten intrahepatische mononukleäre Zellen die HCV-RNA-Replikationsrate der Replikon-Zellen demnach deutlich mehr und hatten somit eine stärkere antivirale Aktivität als mononukleäre Zellen aus dem Blut des selben Patienten. Diese Ergebnisse sind insofern bemerkenswert, da bisherige Publikationen, welche die Immunantwort von mononukleären Zellen auf das HCV untersuchten, ausschließlich PBL für ihre Untersuchungen verwendeten. Wir konnten hiermit allerdings zeigen, dass intrahepatische Lymphozyten eines Probanden stärker antiviral auf das HCV reagieren können als PBL des selben Probanden. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Untersuchungsergebnisse dieser Veröffentlichungen nicht unbedingt Rückschlüsse auf die Immunreaktion auf das HCV in der Leber von infizierten Patienten zulassen.

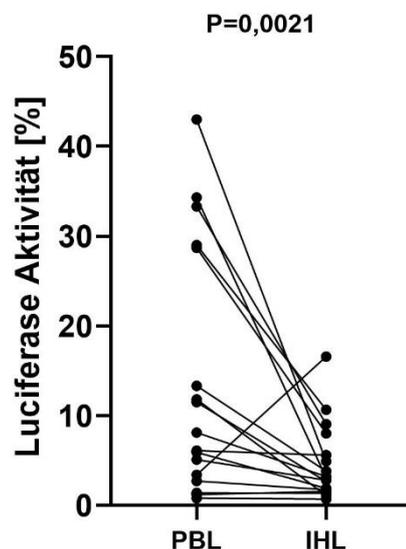


Abbildung 5: Die virale Aktivität von Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL und IHL im Vergleich

PBL und IHL wurden 18 Stunden mit Replikon-Zellen in Ko-Kultur gebracht. Anschließend wurde die verbleibende virale Aktivität der HCV-Replikon-Zellen durch die Luciferase Aktivität bestimmt. In dem Diagramm wird der Vergleich der viralen Aktivität nach Ko-Kultur mit PBL bzw. IHL gezeigt. Der Wilcoxon-Rangsummentest wurde hier als statistischer Test verwendet.

3.1.3 Der antivirale Effekt von PBL und IHL war von Natürlichen Killerzellen abhängig

Nach diesem bemerkenswerten Untersuchungsergebnis interessierten wir uns in einem nächsten Schritt, ob die antivirale Aktivität von PBL und IHL eines Patienten durch die selben Zellen vermittelt wird. Es wurde bereits beschrieben, dass Natürliche-Killerzellen in PBL nach Kontakt mit dem HCV vermehrt aktiviert werden ^(32,33,54,55) und ein essentieller Bestandteil der antiviralen Immunantwort von PBL sind.⁽³⁵⁾ Um zu untersuchen, ob NK-Zellen neben PBL auch in IHL antiviral wirken, wurden CD56⁺ NK-Zellen mittels MAC-Sorting aus PBL- und IHL-Populationen des selben Patienten entfernt und neben PBL und IHL-Zellen in Ko-Kultur mit Replikon-Zellen gegeben. Im Vergleich zu unbehandelten PBL und IHL war die Replikationsrate von PBL ohne CD56⁺ NK-Zellen ($15 \pm 15\%$ vs. $43 \pm 29\%$, $P= 0,0004$) und IHL ohne CD56⁺ NK-Zellen ($5 \pm 5\%$ vs. $12 \pm 9\%$, $P= 0,0007$) erhöht (siehe Abb.6). Wir schlossen daraus, dass die antivirale Aktivität von PBL als auch von IHL von CD56⁺ NK-Zellen abhängig ist. NK-Zellen waren nach unseren Untersuchungsergebnissen somit ein essentieller Bestandteil der antiviralen Immunantwort von PBL als auch von IHL eines Probanden.

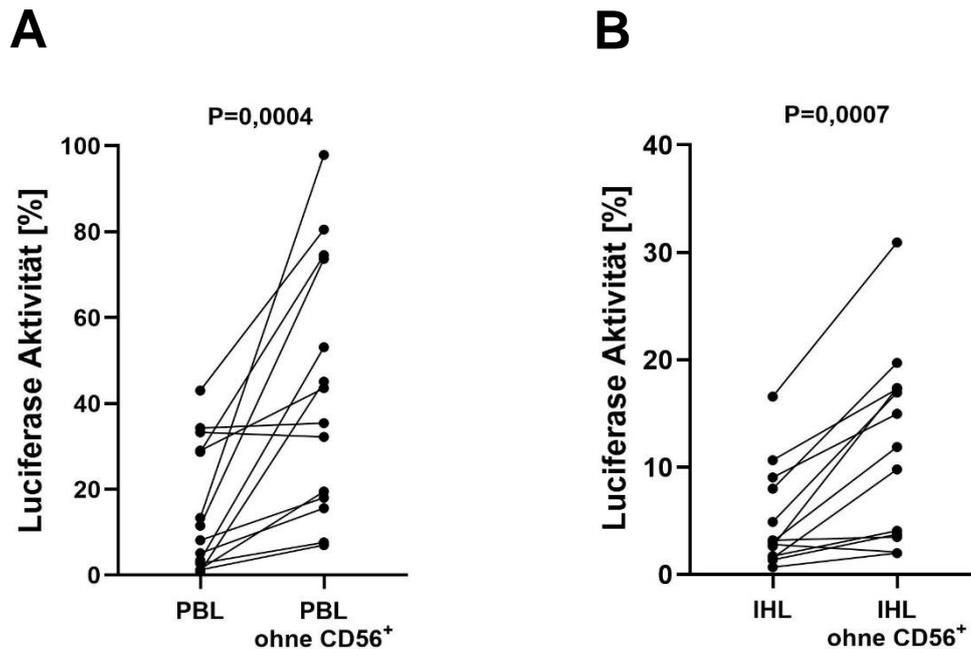


Abbildung 6: Vergleich der viralen Aktivität von Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL bzw. IHL und PBL/ IHL nach Depletion von CD56⁺-Zellen

Mittels MACS-Sorting wurden aus PBL und IHL CD56⁺-Zellen entfernt und die CD56⁺-Zell-negativen Populationen (ohne CD56⁺) als auch PBL und IHL für 18 Stunden mit Replikon-Zellen in Ko-Kultur gebracht. Nach Beendigung der Ko-Kultur wurde die Luciferase-Aktivität der Replikon-Zellen gemessen. In den Diagrammen wird die Luciferase-Aktivität der Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL bzw. PBL ohne CD56⁺ (A) und die der Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit IHL bzw. IHL ohne CD56⁺ (B) verglichen. Als statistischer Test wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet.

3.1.4 CD14⁺-Zellen hatten Einfluss auf die angeborene Immunantwort bei HCV-Infektionen von PBL und IHL

Serti und Werner et al. wiesen in Ihrer Veröffentlichung nach, dass CD14⁺ Monozyten in PBL nach Kontakt mit dem HCV vermehrt IL-18 produzieren, um NK-Zellen zu aktivieren.⁽³⁵⁾ CD14⁺-Zellen haben somit einen indirekten Einfluss auf die antivirale Immunantwort von PBL auf das HCV. Im Folgenden wurde untersucht, ob CD14⁺ Monozyten auch einen Einfluss auf den antiviralen Effekt von mononukleären Zellen aus der Leber haben.

Dazu wurden nach Depletion der CD14⁺ Zellen mittels MACS-Sorting vollständige als auch depletierte Populationen aus PBL und IHL in Ko-Kultur mit Replikon- Zellen gebracht. Bei der anschließenden Luciferase-Messung zeigte sich, wie in Abb. 7 dargestellt, eine höhere HCV-RNA-Replikationsrate bei Replikon-Zellen, welche sich

in Ko-Kultur mit CD14⁺ depletierten PBL ($10 \pm 9\%$ vs. $32 \pm 28\%$, $P=0,002$) und IHL ($3 \pm 2\%$ vs. $15 \pm 15\%$, $P=0,0059$) befanden als bei Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit vollständigen PBL- und IHL-Populationen. Somit konnte gezeigt werden, dass neben CD56⁺ NK-Zellen auch CD14⁺-Zellen Einfluss auf die antivirale Aktivität von IHL bei HCV-Infektionen haben.

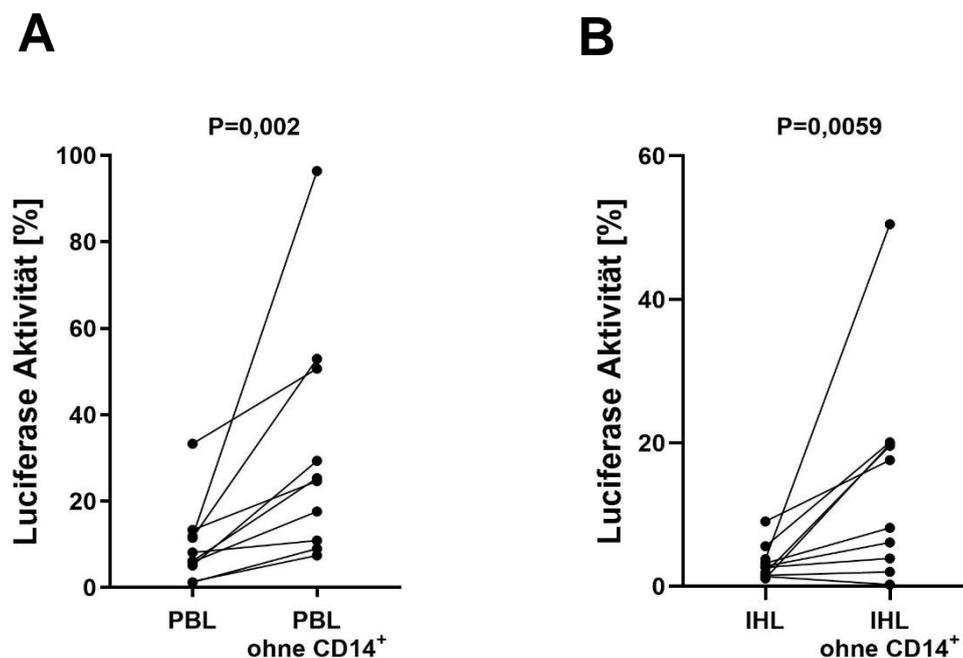


Abbildung 7: Die virale Aktivität von Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL bzw. IHL und PBL bzw. IHL nach Depletion von CD14⁺-Zellen im Vergleich

Nach der Depletion von CD14⁺ Zellen aus PBL und IHL wurden die CD14-negativen Populationen (ohne CD14⁺) neben PBL und IHL mit Replikon-Zellen für 24 Stunden ko-kultiviert. Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität der Replikon-Zellen bestimmt. In den Diagrammen wird die Luciferase-Aktivität der Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL bzw. PBL ohne CD14⁺ (A) und die der Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit IHL bzw. IHL ohne CD14⁺ (B) vergleichend dargestellt. Hier wurde außerdem der Wilcoxon-Rangsummentest als statistischer Test verwendet.

3.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

In den Ergebnissen der Luciferase-Messungen konnte gezeigt werden, dass intrahepatische Lymphozyten die HCV-RNA-Replikationsrate stärker verringern als periphere Lymphozyten. Außerdem konnte festgestellt werden, dass sowohl bei Leber- als auch Blutlymphozyten CD56⁺ NK -Zellen und CD14⁺ Monozyten einen wichtigen Anteil an der antiviralen Immunantwort haben. In den folgenden Untersuchungen galt es nun zu analysieren, durch welche Zytokine und Mechanismen der antivirale Effekt der intrahepatischen und peripheren NK-Zellen vermittelt wird und ob die Produktion dieser Botenstoffe durch CD14⁺ Monozyten beeinflusst wird. Hierbei war insbesondere von Interesse, ob der Unterschied in der antiviralen Aktivität von Blut- und Leberlymphozyten durch Differenzen in der Zytokin-vermittelten Immunantwort der NK- Zellen erklärt werden kann. Um die Ausschüttung der Zytokine und Expression von Markern durch die NK- Zellen zu messen, wurde nach Beendigung der Ko-Kulturen eine Durchflusszytometrie (FACS Canto II) durchgeführt.

3.2.1 Analyse und Interpretation der Daten

Die Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen Daten wurde mithilfe der Analysesoftware FlowJo durchgeführt. Um die gleichbleibend hohe Qualität der Daten zu sichern, wurden zunächst auf einige Faktoren geachtet, welche im Folgenden beschrieben werden. Zunächst wurde die regelrechte Akquisition der mononukleären Zellen durch die FSC-Area und Time kontrolliert. Daraufhin wurde anhand des FSC-Area und HSC-Height überprüft, ob mononukleären Zellen die Zählkammer einzeln nacheinander passiert und keine Zellaggregate gebildet haben. Im folgenden Schritt wurde das Lymphozyten-Gate mittels der FSC-Area und SSC-Area ausgewählt und im Anschluss durch ein Exclusion-Gate tote Zellen, B-Zellen und Monozyten ausgeschlossen. Die Zellen außerhalb des Exklusion-Gates wurden in der folgenden Analyse nicht mehr berücksichtigt.

Aus dieser Zellauswahl wurde das CD56-positive und CD3-negative NK-Zell-Gate bestimmt. Im letzten Schritt wurde die NK-Zell Population auf die Ausschüttung und Expression verschiedener Marker und Zytokine, wie INF- γ , TNF- α , TRAIL und in späteren Versuchen auch CD107a, untersucht. Der gesamte Analyseprozess wird in Abbildung 7 anhand von Beispielhaften Blots geschildert.

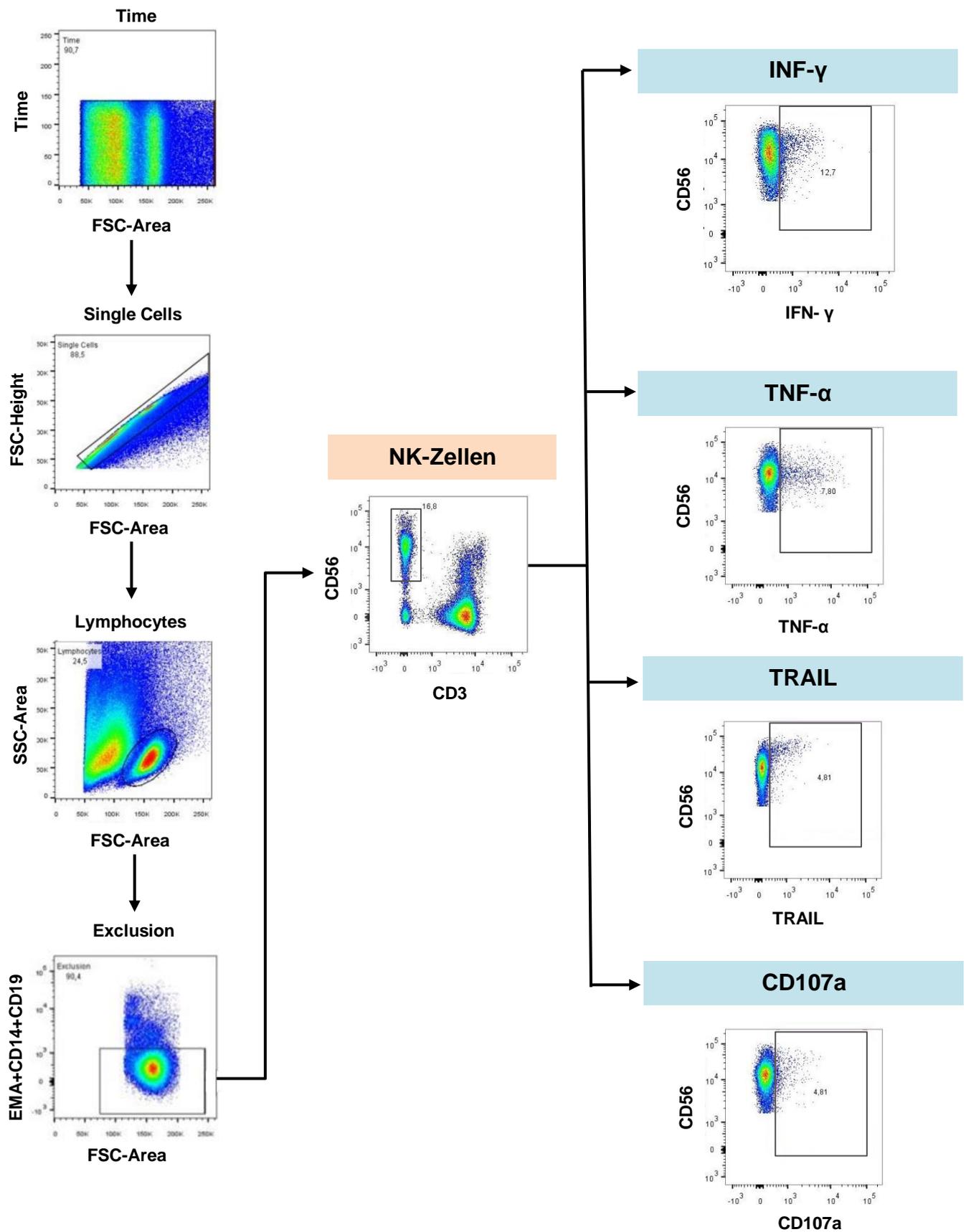


Abbildung 7 Durchführung der Analyse von Daten aus der Durchflusszytometrie

Die Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen Daten wurde mithilfe der Analysesoftware FlowJo durchgeführt

3.2.2 Untersuchung der Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) sowie der Marker TRAIL und CD107a

Bei unseren Untersuchungen wurde die Ausschüttung der Zytokine IFN- γ und TNF- α sowie die Expression des Markers TRAIL zur Bestimmung der Zytotoxizität von NK-Zellen betrachtet. In einer späteren Versuchsreihe wurde außerdem der Marker CD107a bestimmt. Das NK-Zellen bei Aktivierung vermehrt diese Zytokine und Marker synthetisieren bzw. exprimieren ist bereits bekannt. Es wurde gezeigt, dass NK-Zellen in PBL nach Kontakt mit dem HCV vermehrt TNF- α und IFN- γ produzieren und dass diese Zytokine in erster Linie für den antiviralen Effekt der Lymphozyten verantwortlich sind.⁽³⁵⁾ IFN- γ wird dabei insbesondere von CD56⁺⁺ NK-Zellen zur Kommunikation und Aktivierung von anderen Immunzellen ausgeschüttet.^(25,28) IFN- γ inhibiert außerdem die HCV-Replikation in vitro und ist somit von zentralen Interesse in dieser Arbeit.^(29,30) Jedoch ist die Produktion dieser Zytokine bei PBL von chronisch HCV-infizierten Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermindert.^(16,32,35) Beide Zytokine scheinen somit ein wichtiger Teil der Immunantwort von mononukleären Zellen auf das HCV zu sein. Da die Arbeiten zu dieser Thematik nur mit PBL durchgeführt wurden, sollten in unseren Untersuchungen mögliche Unterschiede zwischen PBL und IHL in der Produktion dieser Zytokine aufgezeigt werden, um zu evaluieren, ob die bereits beschriebenen Ergebnisse auf die Immunantwort von mononukleären Zellen in der Leber übertragbar sind. Zudem wurden mittels Durchflusszytometrie der Marker TRAIL zur Bestimmung der Zytotoxizität von NK-Zellen in PBL und IHL bestimmt. In späteren Versuchen wurde außerdem die Expression des Markers CD107a untersucht. Auch dieser Marker wird bei der Ausschüttung von zytotoxischer Granula vermehrt exprimiert und lässt daher Rückschlüsse auf die Zytotoxizität einer Zelle zu.

Ziel dieser durchflusszytometrischen Untersuchung ist es, zwei Fragestellungen aufzuklären: Zum einen gilt es herauszufinden, ob NK-Zellen in PBL und IHL von nicht infizierten Patienten durch den Kontakt mit dem HCV zur Produktion von Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α bzw. zur vermehrten Zytotoxizität stimuliert werden. Außerdem soll untersucht werden, ob CD14⁺-Monozyten Einfluss auf die Produktion von antiviral wirksamen Zytokinen durch NK-Zellen in PBL und IHL haben.

3.2.3 Betrachtung der Produktion von TNF- α durch NK-Zellen in vollständigen PBL- und IHL- Populationen

Zunächst wurde die Produktion des Zytokins TNF- α durch NK-Zellen in PBL und IHL nach Kontakt mit dem HCV untersucht. In einem ersten Schritt wurden für jeden Versuch mononukleäre Zellen aus Blut und Leber eines Patienten isoliert und anschließend für 18 Stunden mit Lunet-Zellen, welche mit einem HCV-Replikon transfiziert wurden, als auch Lunet-Zellen ohne Replikon in Ko-Kultur gebracht. Durch diese Untersuchungen sollte analysiert werden, ob NK-Zellen in PBL und IHL durch den Kontakt mit dem HCV zur vermehrten Produktion von TNF- α stimuliert werden. Des Weiteren wurde der Unterschied in der Frequenz und Expression von TNF- α zwischen NK-Zellen in PBL und IHL untersucht.

3.2.3.1 Nach Kontakt mit dem HCV produzierten NK-Zellen in IHL vermehrt TNF- α

Um zu untersuchen, ob NK-Zellen in PBL bzw. IHL durch den Kontakt mit dem HCV zur Produktion von TNF- α stimuliert werden, wurden PBL und IHL eines Patienten nach der Ko-Kultur für 18 Stunden mit HCV-Replikon-Zellen (HCV) sowie Lunet-Zellen ohne Replikon als Negativkontrolle (Lunet) durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde die Frequenz und Expression von TNF- α produzierenden NK-Zellen betrachtet. Wie in Abb. 8 dargestellt, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der TNF- α - Produktion zwischen NK-Zellen aus PBL (A), welche in Kontakt mit HCV-Replikon-Zellen kamen im Vergleich zu Zellen ohne Kontakt zum Replikon (PBL: $1,3 \pm 1,0$ % vs. $1,1 \pm 0,7$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 255 ± 73 MFI vs. 245 ± 57 MFI, $P = \text{n.s.}$). NK-Zellen aus IHL (B) zeigten jedoch eine signifikant erhöhte Expression von TNF- α nach Kontakt mit dem HCV-Replikon im Vergleich zur Negativkontrolle (IHL Frequenz: $2,9 \pm 1,7$ % vs. $2,6 \pm 2,2$ %, $P = \text{n.s.}$). Die Frequenz der gleichen Werte war nicht signifikant (IHL Expression: 290 ± 69 MFI vs. 250 ± 29 MFI, $P = 0,0313$).

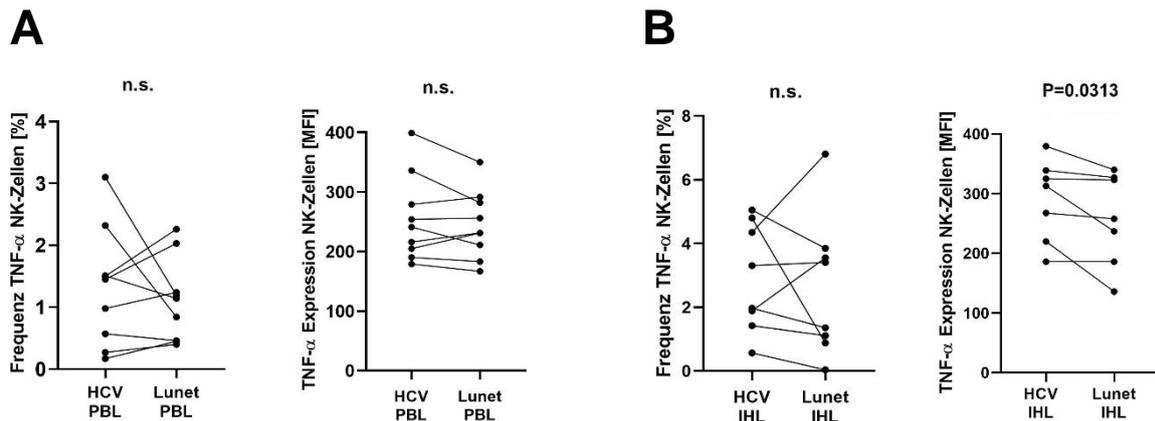


Abbildung 8: Frequenz und Expression von TNF- α produzierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle

Mononukleäre Zellen aus dem Blut und der Leber eines Patienten wurden mit Huh7-Lunet-Zellen mit und ohne Replikon für 16 Stunden in Ko-Kultur gebracht. Im Anschluss wurden die mononukleären Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden die Frequenz und die Expression von TNF- α produzierenden NK-Zellen in den PBL- (A) und IHL-Populationen (B) nach Kontakt mit HCV-infizierten Zellen (HCV) und der Negativkontrolle ohne Virus (Lunet) ermittelt und der Vergleich in dieser Abbildung dargestellt. Als statistischer Test wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass NK-Zellen in PBL durch den Kontakt mit dem HCV nicht vermehrt TNF- α produzierten. Die Produktion von TNF- α durch NK-Zellen in IHL war jedoch nach Kontakt mit dem HCV signifikant erhöht. Somit scheint die antivirale Aktivität von IHL, im Gegensatz zu der von PBL, durch TNF- α vermittelt.

3.2.3.2 Intrahepatische NK-Zellen produzierten mehr TNF- α als periphere NK-Zellen

Zudem wurde die Frequenz und Expression von TNF- α produzierenden NK-Zellen in PBL mit jenen aus IHL verglichen. Es zeigte sich, dass intrahepatische NK-Zellen mehr TNF- α produzierten als periphere NK-Zellen (siehe Abb.9). Dies ließ sich für Zellen nach Kontakt mit dem HCV-Replikon (A) ebenso nachweisen wie für mononukleäre Zellen nach Kontakt mit Lunet-Zellen ohne Replikon (B) (HCV: $1,2 \pm 0,9 \%$ vs. $2,9 \pm 1,7 \%$, $P = 0,0078$ u. 242 ± 54 MFI vs. 290 ± 69 MFI, $P = 0,0469$) (Lunet: $1,1 \pm 0,7 \%$ vs. $2,8 \pm 2,1 \%$, $P = 0,0156$ u. 232 ± 48 MFI vs. 278 ± 56 MFI, $P = 0,0078$). Die vermehrte Produktion von TNF- α durch intrahepatische NK-Zellen war somit nicht vom Kontakt mit HCV-Replikon-Zellen abhängig.

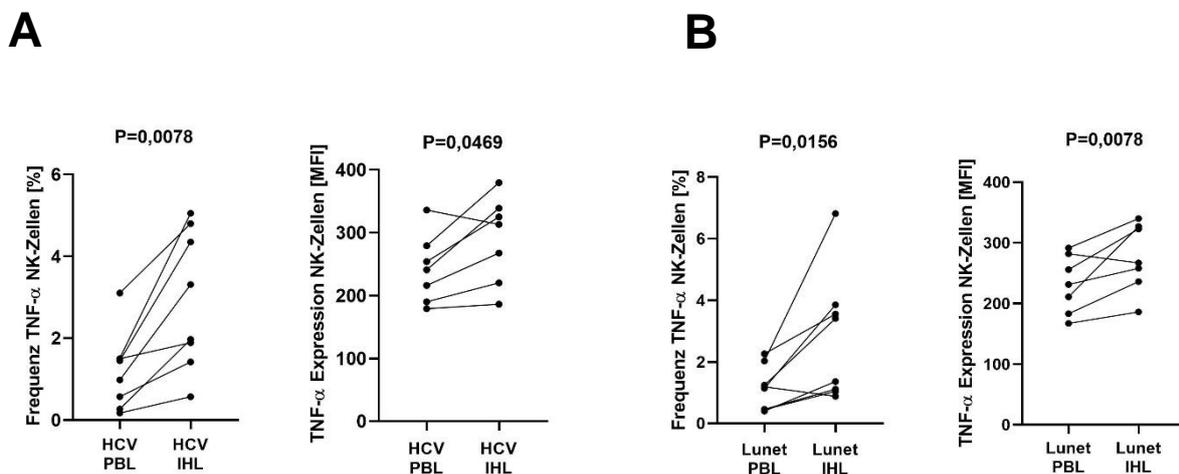


Abbildung 9 Frequenz und Expression von TNF- α produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL im Vergleich

PBL und IHL wurden 18 Stunden mit Replikon-Zellen (HCV) und Lunet-Zellen ohne Replikon (Lunet) ko-kultiviert und nachfolgend durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden die TNF- α produzierenden NK-Zellen in den PBL- und IHL-Populationen bestimmt. In dieser Abbildung werden die Frequenz und Expression der TNF- α produzierenden NK-Zellen aus PBL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (A) und Lunet-Zellen ohne Replikon (B) mit jenen aus IHL verglichen. Der Wilcoxon-Rangsummentest wurde hier als statistischer Test verwendet.

3.2.4 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Produktion von TNF- α durch NK-Zellen in PBL und IHL von CD14⁺-Zellen

Nachdem die Ergebnisse in den Luciferase-Messungen drauf hinwiesen, dass CD14⁺ Monozyten und Makrophagen einen wichtigen Anteil an der antiviralen Aktivität von mononukleären Blut- und Leberzellen haben, konzentrierten wir uns in den folgenden Versuchen darauf zu ermitteln, inwieweit NK-Zellen in PBL und IHL bei Kontakt mit dem HCV durch CD14⁺-Zellen zur Produktion dieses Zytokins stimuliert werden. Es wurde bereits in einer Veröffentlichung von Seri und Werner et al. beschrieben, dass CD14⁺- Zellen das HCV erkennen und durch die Ausschüttung von IL-18 periphere NK-Zellen zur verstärkten Produktion des Zytokins IFN- γ stimulieren könne.⁽³⁵⁾ Das Ziel war es zu analysieren, ob CD14⁺-Zellen auch Einfluss auf die Produktion TNF- α durch periphere und intrahepatische NK-Zellen haben.

Zu diesem Zweck wurden CD14⁺-Zellen mittels MACS-Sorting aus PBL- und IHL-Populationen entfernt. Diese Zellpopulationen ohne CD14⁺-Zellen werden im Folgenden als „PBL ohne CD14⁺“ und „IHL ohne CD14⁺“ beschrieben. Der weitere Versuchsaufbau wurde wie in „3. Ergebnisse“ beschrieben durchgeführt.

3.2.4.1 CD14⁺-Zellen stimulierten periphere NK-Zellen zur Produktion von TNF- α

Um die mögliche Stimulation der TNF- α Produktion von NK-Zellen durch CD14⁺-Zellen zu untersuchen wurden PBL und IHL sowie PBL ohne CD14⁺ und IHL ohne CD14⁺ mit Replikon-Zellen für 18 Stunden ko-kultiviert und anschließend mit den Interleukinen -12 und -15 für weitere 6 Stunden stimuliert. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, wie in Abb. 10 dargestellt, ein signifikanter Unterschied in der Frequenz und Expression von TNF- α durch NK-Zellen zwischen PBL und PBL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (A) (HCV mit PBL: $4,8 \pm 1,7$ % vs. $2,2 \pm 1,6$ %, $P = 0,0242$ u. 348 ± 57 MFI vs. 284 ± 54 MFI, $P = 0,0128$).

Bei der Produktion von TNF- α durch intrahepatische NK-Zellen in IHL im Vergleich zu intrahepatischen NK-Zellen in IHL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit HCV-Replikon-Zellen (B) zeigte sich jedoch kein Unterschied (HCV mit IHL: $3,3 \pm 1,8$ % vs. $3,7 \pm 2,6$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 355 ± 87 MFI vs. 336 ± 102 MFI, $P = \text{n.s.}$).

Aus den Ergebnissen kann der Rückschluss gezogen werden, dass CD14⁺-Zellen periphere NK-Zellen zur vermehrten TNF- α stimulierten. Intrahepatische NK-Zellen schienen hingegen nicht durch CD14⁺-Zellen zu einer gesteigerten Frequenz und Expression von TNF- α angeregt werden.

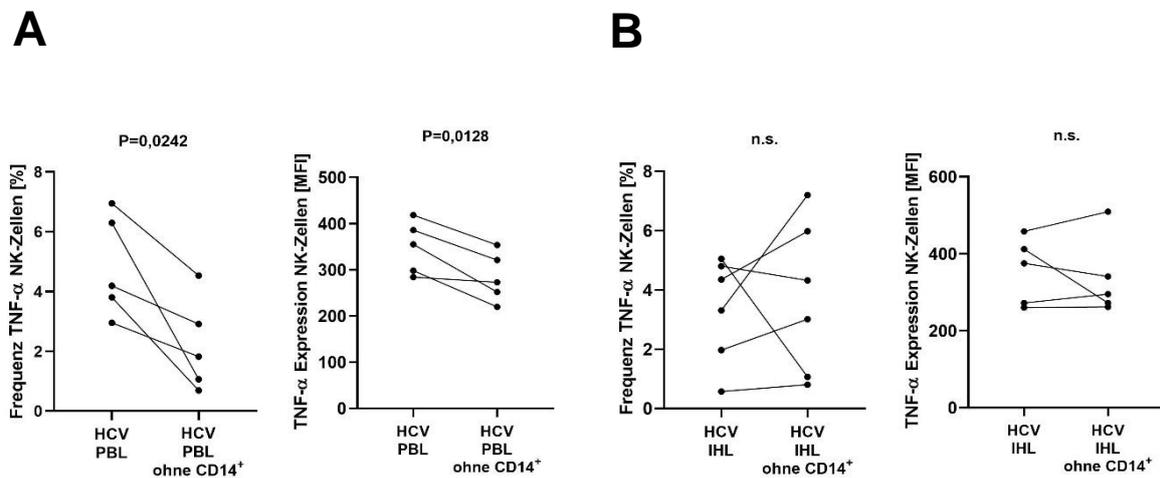


Abbildung 10: Frequenz und Expression von TNF- α produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL im Vergleich zu PBL ohne CD14⁺ und IHL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen stimuliert mit IL-12 und IL-15

Nach der 18- stündigen Ko-Kultur von PBL und IHL als auch PBL ohne CD14⁺ und IHL ohne CD14⁺ mit Replikon-Zellen und anschließender Stimulation mit IL-12 und IL-15 wurden die mononukleären Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde die Frequenz und Expression von TNF- α durch NK-Zellen analysiert. In dieser Abbildung werden PBL mit PBL ohne CD14⁺ (A) sowie IHL mit IHL ohne CD14⁺ (B) nach Ko-Kultur mit Replikon -Zellen verglichen. Als statistischer Test wurde der Abhängige t-Test verwendet.

3.2.5 Betrachtung der Produktion von TRAIL und IFN- γ durch NK-Zellen in vollständigen PBL- und IHL- Populationen

Die Untersuchungsergebnisse zur Produktion von TNF- α haben gezeigt, dass intrahepatische NK-Zellen im Gegensatz zu peripheren NK-Zellen durch den Kontakt mit dem HCV zur vermehrten Ausschüttung des Zytokins stimuliert werden. Dieser Stimulation war nicht von CD14⁺-Zellen abhängig. Bei peripheren NK-Zellen schienen CD14⁺- Monozyten jedoch stimulierend auf die TNF- α einzuwirken. Diese Ergebnisse zeigen somit Unterschiede in der Zytokinproduktion sowie Beeinflussung dieser durch CD14⁺-Zellen von intrahepatischen und peripheren NK-Zellen, welche die Differenz in der antiviralen Aktivität von Blut- und Leberlymphozyten, die sich in den Luciferase-Messungen zeigte, erklären könnte.

In einem weiteren Schritt konzentrierte man sich in der Folge auf weitere Zytokine und Marker, denen in der aktuellen Literatur ein Effekt auf die antivirale Aktivität von peripheren NK-Zellen zugeschrieben wurde. Von besonderem Interesse waren dabei TRAIL als Marker für Zytotoxizität und das Zytokin IFN- γ . Die Bestrebung war es herauszufinden, ob auch für IFN- γ und TRAIL Unterschiede in der Produktion bzw. Expression von intrahepatischen und peripheren NK-Zellen gezeigt werden können. Analog zu den Untersuchungen mit TNF- α wurde dafür zunächst die Produktion von TRAIL und IFN- γ durch NK-Zellen in vollständigen PBL- und IHL- Populationen betrachtet. In weiteren Untersuchungen wurde außerdem analysiert, ob CD14⁺-Zellen Einfluss auf die Produktion bzw. Expression von IFN- γ und TRAIL durch intrahepatische bzw. periphere NK-Zellen haben.

3.2.5.1 Die Frequenz und Expression von TRAIL war nach Kontakt mit dem HCV nicht erhöht

Um die Zytotoxizität von NK-Zellen in PBL und IHL nach Kontakt mit HCV-infizierten Zellen zu untersuchen, wurde die Frequenz und Expression des Markers TRAIL durchflusszytometrisch nach Durchführung der 18-stündigen Ko-Kultur gemessen. Wie in Abb. 11 abgebildet, zeigte sich kein Unterschied in der Population von NK-Zellen in PBL und IHL, welche nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zu Negativkontrollen mit Lunet BLR-Zellen ohne dem HCV-Replikon TRAIL produzierten (PBL: $2,6 \pm 2,6$ % vs. $3,0 \pm 4,4$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 70 ± 20 MFI vs. 71 ± 34 MFI, $P = \text{n.s.}$) (IHL: $8,5 \pm 8,3$ % vs. $8,5 \pm 8,5$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 112 ± 60 MFI vs. 114 ± 70 MFI, $P = \text{n.s.}$).

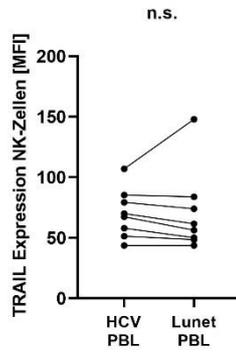
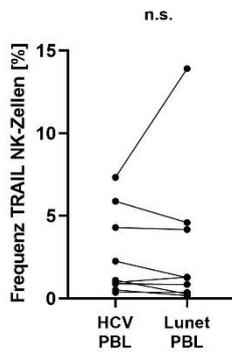
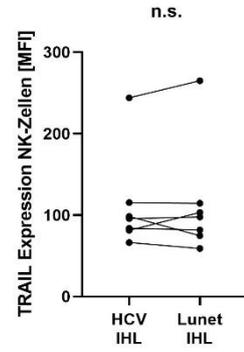
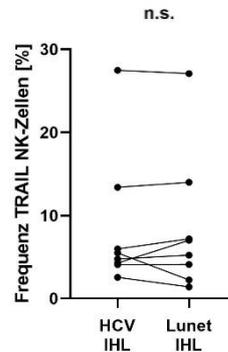
A**B**

Abbildung 11: Frequenz und Expression von TRAIL produzierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle

Mononukleäre Zellen aus dem Blut und der Leber wurden mit Lunet-Zellen mit und ohne Replikon für 18 Stunden in Ko-Kultur gebracht. Im Anschluss wurden die mononukleären Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden die TRAIL produzierenden NK-Zellen in den PBL- (A) und IHL-Populationen (B) ermittelt. Die Frequenz und die Expression von TRAIL produzierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon- (HCV) und nicht Replikon-Zellen (Lunet) sind im Vergleich dargestellt. Als statistischer Test wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass NK-Zellen in PBL und IHL durch den Kontakt mit HCV-infizierten Zellen nicht zur vermehrten Zytotoxizität stimuliert wurden.

3.2.5.2 NK-Zellen IHL wirkten stärker zytotoxisch als NK-Zellen in PBL

Des Weiteren wurde die Frequenz und Expression von TRAIL exprimierenden NK-Zellen aus peripheren sowie intrahepatischen mononukleären Zellen verglichen (siehe Abb. 12). Hierbei zeigte sich, dass NK-Zellen in IHL unabhängig vom Kontakt mit HCV-Replikon-Zellen mehr TNF- α produzierten als NK-Zellen in PBL (HCV: $1,6 \pm 1,7$ % vs. $5,6 \pm 7,4$ %, $P = 0,0024$ u. 54 ± 31 MFI vs. 90 ± 55 MFI, $P = 0,0015$) (Lunet: $1,3 \pm 1,5$ % vs. $5,7 \pm 7,5$ %, $P = 0,0105$ u. 58 ± 27 MFI vs. 95 ± 58 MFI, $P = 0,0068$).

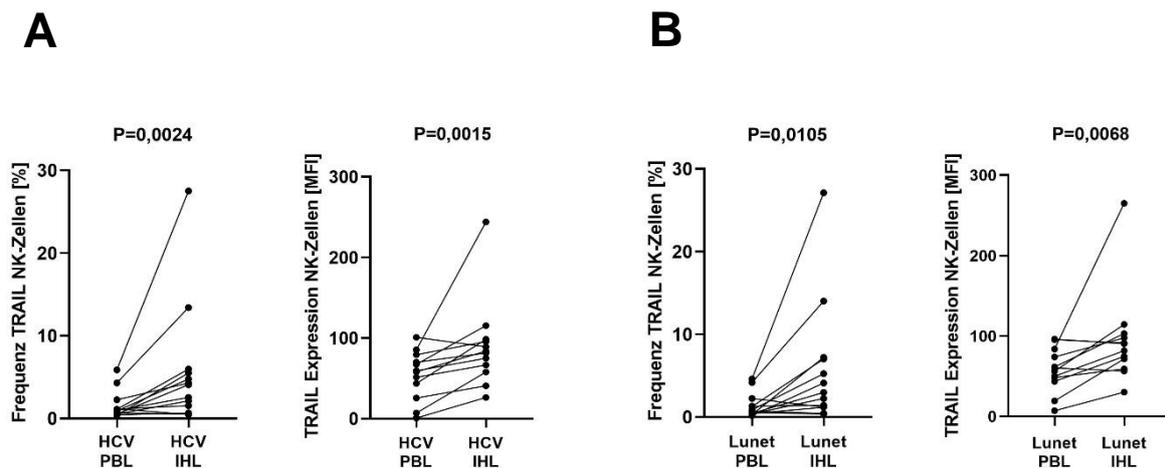


Abbildung 18: Frequenz und Expression von TRAIL produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL im Vergleich

PBL und IHL wurden 18 Stunden mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon ko-kultiviert und nachfolgend durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden die TRAIL produzierenden NK-Zellen in den PBL- und IHL-Populationen bestimmt. In dieser Abbildung werden die Frequenz und Expression der TRAIL produzierenden NK-Zellen aus PBL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (HCV) (A) und Lunet-Zellen ohne Replikon (Lunet) (B) mit jenen aus IHL verglichen. Es wurde der Wilcoxon-Rangsummentest als statistischer Test angewendet.

3.2.5.3 Die Produktion von IFN- γ war nach Kontakt mit dem HCV nicht erhöht

Parallel zu den Untersuchungen des Markers TRAIL wurde außerdem die IFN- γ Produktion von peripheren und intrahepatischen NK- Zellen untersucht. Die Frequenz und Expression von NK-Zellen in PBL (A) und IHL (B), welche nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen IFN- γ produzieren, war, wie in Abb. 12 gezeigt, im Vergleich zu Negativkontrollen mit Lunet- BLR-Zellen ohne dem HCV-Replikon nicht erhöht (PBL: $0,9 \pm 0,7$ % vs. $20,5 \pm 20,3$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 113 ± 29 MFI vs. 109 ± 26 MFI, $P = \text{n.s.}$) (IHL: $2,8 \pm 2,8$ % vs. $2,4 \pm 2,7$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 165 ± 40 MFI vs. 155 ± 47 MFI, $P = \text{n.s.}$).

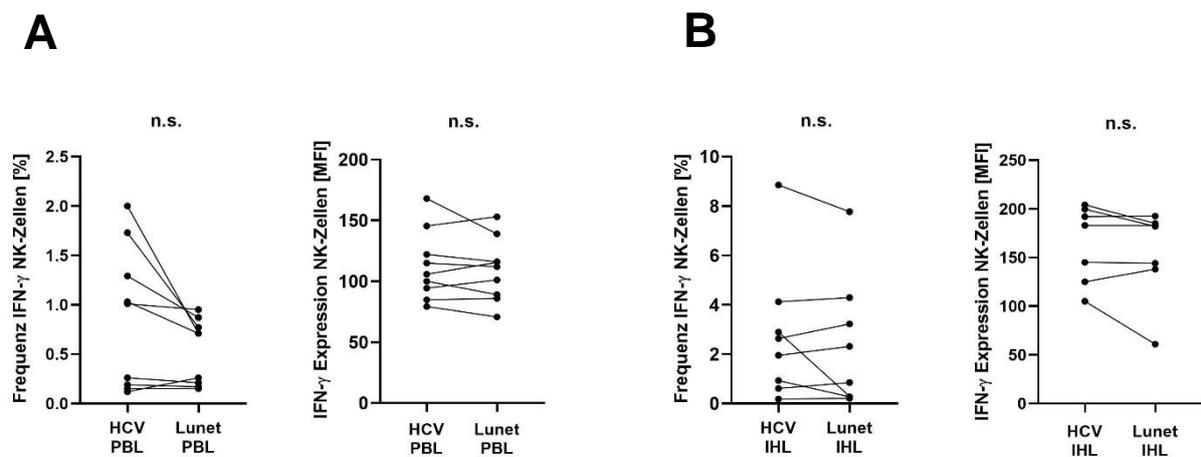


Abbildung 12: Frequenz und Expression von IFN- γ produzierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle

Mononukleäre Zellen aus dem Blut und der Leber wurden mit Lunet-Zellen mit und ohne Replikon für 18 Stunden in Ko-Kultur gebracht. Im Anschluss wurden die mononukleären Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die IFN- γ produzierenden NK-Zellen in den PBL- (A) und IHL-Populationen (B) ermittelt. Die Frequenz und die Expression von IFN- γ produzierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon- (HCV) und nicht Replikon-Zellen (Lunet) sind im Vergleich dargestellt. Als statistischer Test wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass NK-Zellen durch den Kontakt mit HCV-infizierten Zellen nicht zur Produktion von IFN- γ stimuliert wurden.

3.2.5.4 NK-Zellen in IHL produzierten mehr IFN- γ als NK-Zellen in PBL

Um Unterschiede in der Produktion von Zytokinen zwischen NK-Zellen aus PBL und IHL zu erfassen, wurden auch die Frequenz und Expression von IFN- γ produzierenden NK-Zellen in PBL mit solchen in IHL verglichen (siehe Abb.13). Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Frequenz und Expression an IFN- γ produzierenden NK-Zellen in IHL im Vergleich zur NK-Zell Population in PBL. Diese Ergebnisse ließen sich für PBL und IHL, welche sich in Ko-Kultur mit Replikon-Zellen befanden (A), als auch für mononukleäre Zellen nach Ko-Kultur mit Lunet-Zellen ohne Replikon (B) gleichermaßen replizieren (HCV: $0,8 \pm 0,8 \%$ vs. $2,7 \pm 2,8 \%$, $P = 0,0391$ u. 114 ± 32 MFI vs. 165 ± 40 MFI, $P = 0,0156$) (Lunet: $0,5 \pm 0,3 \%$ vs. $2,4 \pm 2,7 \%$, $P = 0,0391$ u. 109 ± 30 MFI vs. 155 ± 47 MFI, $P = 0,0313$). IHL produzierten unabhängig vom Kontakt mit dem HCV mehr IFN- γ als PBL.

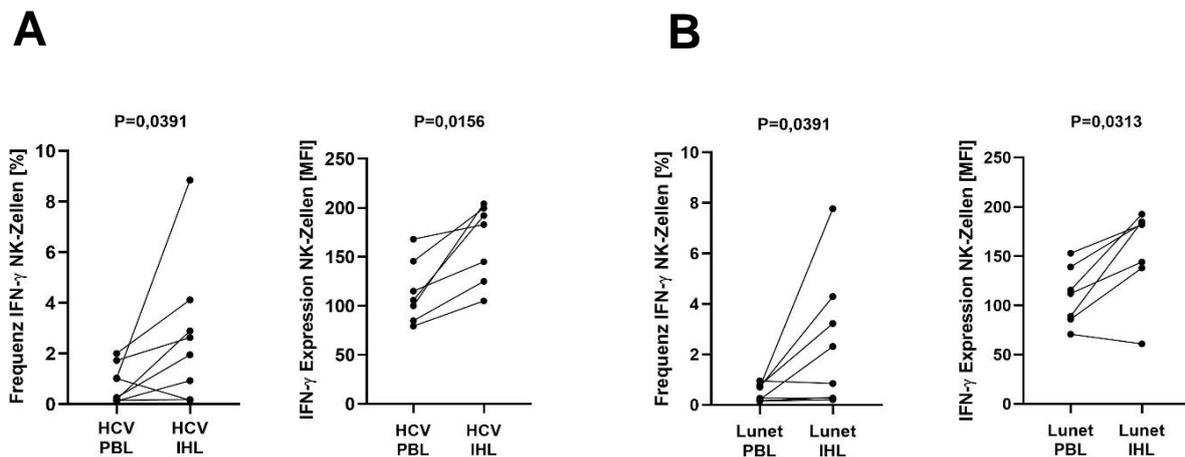


Abbildung 13 Vergleich von Frequenz und Expression von IFN- γ produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL

Mononukleäre Zellen aus dem Blut und der Leber wurden mit Lunet-Zellen mit und ohne Replikon für 18 Stunden in Ko-Kultur gebracht und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden die IFN- γ produzierenden NK-Zellen in den PBL- und IHL-Populationen ermittelt. In dieser Abbildung werden die Frequenz und Expression der IFN- γ produzierenden NK-Zellen aus PBL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (HCV) (A) und Lunet-Zellen ohne Replikon (Lunet) (B) mit jener aus IHL verglichen. Als statistischer Test fand der Wilcoxon-Rangsummentest Anwendung.

3.2.6 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Zytotoxizität und IFN- γ Produktion durch NK-Zellen in PBL und IHL von CD14⁺-Zellen

Entsprechend den Untersuchungen in „3.2.4 Untersuchungen zu Abhängigkeit der Produktion von TNF- α durch NK-Zellen in PBL und IHL von CD14⁺-Zellen“, wurde außerdem der Einfluss von CD14⁺ Monozyten und Makrophagen auf die Expression von TRAIL und Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen in PBL und IHL betrachtet. Dabei wurden erneut CD14⁺ Zellen mittels MACS-Sorting aus PBL- und IHL-Populationen entfernt und die durchflusszytometrisch bestimmte Ausschüttung bzw. Expression von TRAIL und IFN- γ durch PBL und IHL ohne CD14⁺-Zellen mit der von vollständigen PBL- und IHL-Populationen verglichen.

3.2.6.1 CD14⁺-Zellen hatten Einfluss auf die Zytotoxizität von intrahepatischen NK-Zellen

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Zytotoxizität von NK-Zellen anhand des Markers TRAIL von CD14⁺-Zellen untersucht (siehe Abb.14). Dazu wurden, nach Depletion der CD14⁺-Zellen, PBL ohne CD14⁺ und IHL ohne CD14⁺ mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon für 18 Stunden ko-kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Bei der Frequenz und Expression von TRAIL durch NK-Zellen in PBL bzw. PBL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit HCV-Replikon-Zellen (A) konnte kein signifikanter Unterschied beschrieben werden ($3,0 \pm 2,6$ % vs. $1,8 \pm 1,9$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 83 ± 43 MFI vs. 62 ± 19 MFI, $P = \text{n.s.}$). Die Frequenz und Expression von TRAIL in IHL ohne CD14⁺ zeigte sich jedoch gegenüber der von IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (C) signifikant gemindert ($7,7 \pm 8,4$ % vs. $2,2 \pm 0,9$ %, $P = 0,0156$ u. 122 ± 66 MFI vs. 81 ± 31 MFI, $P = 0,0078$).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass CD14⁺-Zellen Einfluss auf die Zytotoxizität von NK-Zellen in IHL hatten. Möglicherweise werden intrahepatische NK-Zellen durch CD14⁺- Zellen, welche in den Kontakt mit dem HCV kamen, zur vermehrten Zytotoxizität stimuliert. In PBL ist die Frequenz und Expression von TRAIL und damit die Zytotoxizität der NK-Zellen unabhängig von CD14⁺-Zellen.

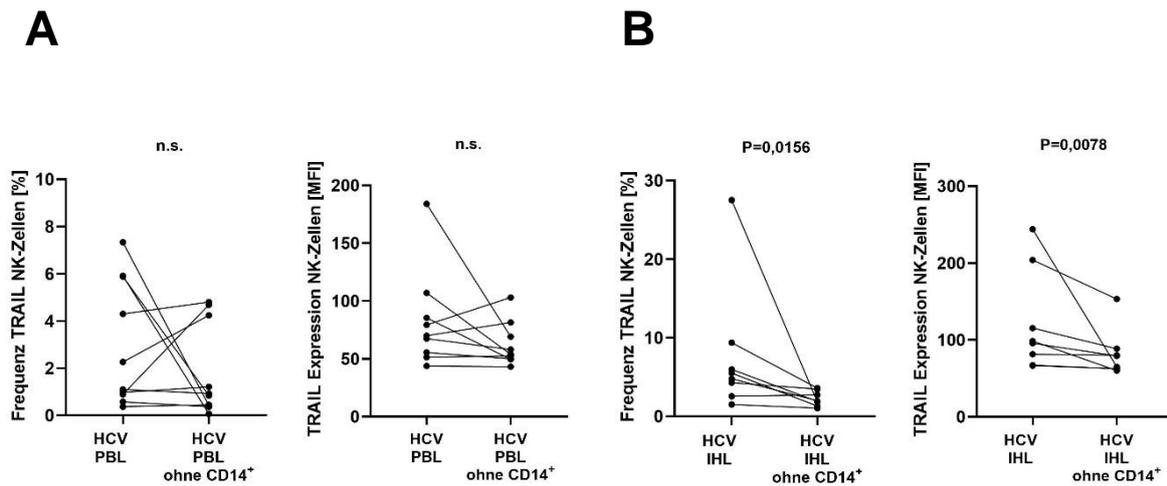


Abbildung 14: Frequenz und Expression von TRAIL produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL im Vergleich zu PBL ohne CD14⁺ und IHL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen

Nachdem PBL und IHL sowie PBL ohne CD14⁺ und IHL ohne CD14⁺ für 18 Stunden mit Replikon-Zellen ko-kultiviert wurden, wurde die Frequenz und Expression von TRAIL produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. In der Abbildung werden PBL mit PBL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit HCV-Replikon -Zellen (HCV) (A) und IHL mit IHL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit Replikon -Zellen (B) verglichen. Als statistischer Test wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet.

3.2.6.2 CD14⁺-Zellen hatten keinen Einfluss auf die Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen in PBL und IHL

Des Weiteren wurde die Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen in PBL ohne CD14⁺ und IHL ohne CD14⁺ im Vergleich zu PBL und IHL untersucht (siehe Abb.15). Der Versuchsaufbau wurde dabei analog zu dem in „3.2.6.1 CD14⁺-Zellen haben Einfluss Zytotoxizität von NK-Zellen in IHL“ beschriebenen durchgeführt.

Bei den Ergebnissen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der IFN- γ Produktion von NK-Zellen in vollständigen Populationen aus PBL (A) und IHL (B) im Vergleich zu solchen ohne CD14⁺-Zellen nach Kontakt mit Replikon-Zellen (PBL: $1,0 \pm 0,7$ % vs. $0,8 \pm 0,7$ %, $P = n.s.$ u. 130 ± 41 MFI vs. 125 ± 33 MFI, $P = n.s.$) (IHL: $3,6 \pm 2,8$ % vs. $3,8 \pm 2,3$ %, $P = n.s.$ u. 171 ± 39 MFI vs. 182 ± 55 MFI, $P = n.s.$).

CD14⁺-Zellen hatten somit keinen Einfluss auf die Produktion von IFN- γ durch periphere und intrahepatische NK-Zellen.

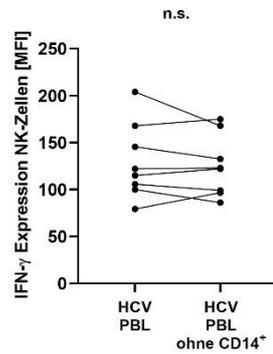
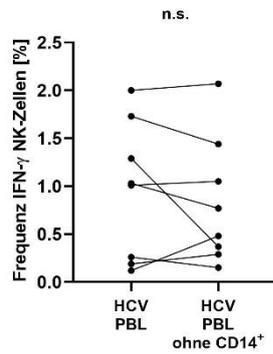
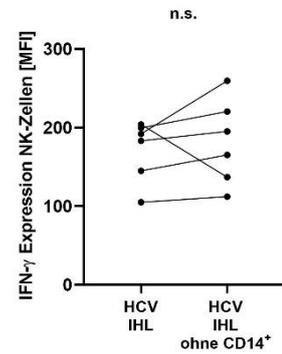
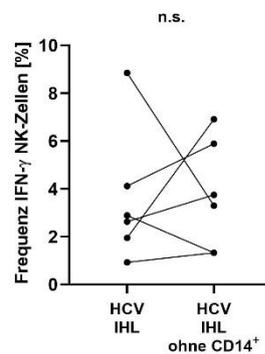
A**B**

Abbildung 15: Frequenz und Expression von IFN- γ produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL im Vergleich zu PBL ohne CD14⁺ und IHL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen

PBL und IHL als auch PBL ohne CD14⁺ und IHL ohne CD14⁺ wurden für 18 Stunden mit Replikon - Zellen ko-kultiviert und anschließend die IFN- γ Produktion der NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. In der Abbildung werden PBL mit PBL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit HCV-Replikon -Zellen (A) und IHL mit IHL ohne CD14⁺ nach Ko-Kultur mit Replikon -Zellen (B) gegenübergestellt. Der Wilcoxon-Rangsummentest wurde hier als statistischer Test verwendet.

3.3 Weitere Untersuchungen zur Zytotoxizität von NK-Zellen in PBL und IHL

Die Ergebnisse in der Durchflusszytometrie zeigten, dass CD14⁺-Zellen nach Kontakt mit dem HCV NK-Zellen in IHL zur vermehrten Zytotoxizität stimulierten. Bei PBL konnten wir diesen Effekt nicht nachweisen.

Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, wurde in in einer nächsten Versuchsreihe die Ausschüttung von zytotoxischer Granula durch die durchflusszytometrische Messung von CD107a bestimmt. CD107a (Cluster of Differentiation 107a) oder auch Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1) ist ein transmembranes Glycoprotein.⁽⁵²⁾ Bei Zunahme der Degranulation von NK-Zellen wird CD107a vermehrt exprimiert und ist somit wie TRAIL ein Marker für die Zytotoxizität von NK-Zellen.⁽⁵³⁾ Außerdem wurde der Einfluss von zytotoxischer Granula auf den antiviralen Effekt von PBL und IHL mit Hilfe von LDH-Assays untersucht. Die LDH ist ein Enzym welches sich in allen Körperzellen, somit auch in Hepatozyten, befindet. Kommt es zur Zerstörung der Zelle, wird LDH freigesetzt. Die Quantität von LDH ist dabei proportional zur Anzahl der zerstörten Zellen. LDH ist daher ein valider Parameter für Zytotoxizität.

In dieser Versuchsreihe wurden mononukleäre Zellen aus Blut und Leber des selben Patienten isoliert und für 18 Stunden mit Lunet BLR Luc ubi neo JFH oder Lunet BLR-Zellen ko-kultiviert. Teilweise wurden die PBL und IHL zusätzlich mit K562-Zellen stimuliert. Es wurden dabei zwei verschiedene Stimulationen durchgeführt: zum einen wurden K562 direkt zu Beginn der Ko-Kultur hinzugefügt und für die komplette 16-stündige Dauer der Ko-Kultur in dieser belassen. Wurde die PBL und IHL auf solche Weise stimuliert, wird dies im Folgenden mit dem Zusatz *18h K562* gekennzeichnet. Zum anderen wurden PBL und IHL nur die letzten 4 Stunden mit K562-Zellen stimuliert. Diese Stimulation wird mit den Zusatz *4h K562* gekennzeichnet.

Nach Ende der Ko-Kultur wurde die Zytotoxizität durch zwei verschiedene Methoden gemessen. Einerseits wurden mononukleären Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurde die Expression von CD107a durch NK-Zellen in PBL und IHL gemessen. Andererseits wurde mittels des LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay von Promega die Freisetzung des Stoffwechsellzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt. Ein Überblick über den beschriebenen Versuchsaufbau wird in Abbildung 16 gezeigt.

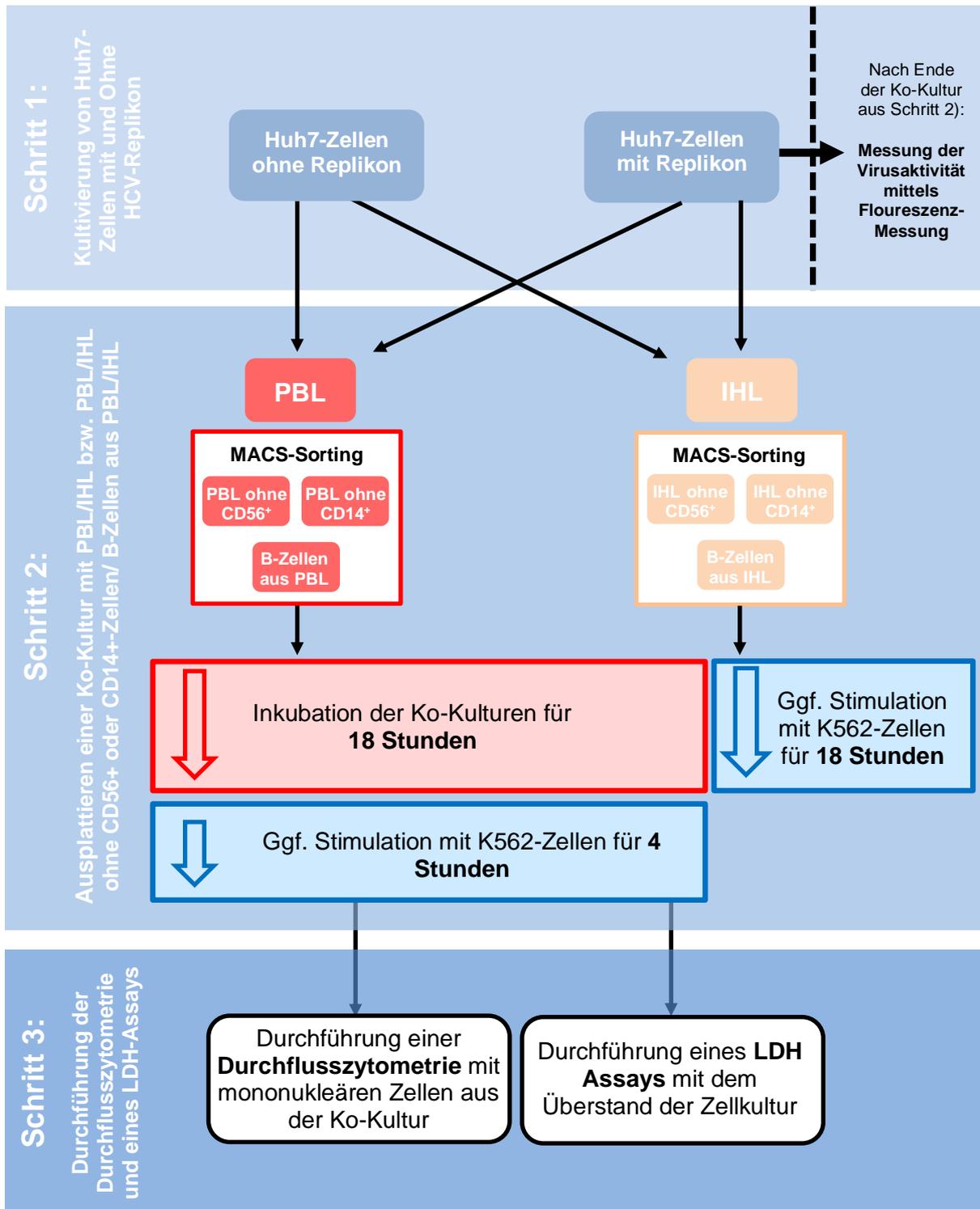


Abbildung 16 Überblick über den Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zytotoxizität von NK-Zellen

3.3.1 Betrachtung der Expression von CD107a durch NK-Zellen

Zunächst wurden CD107a- exprimierende NK-Zell Populationen in PBL und IHL untersucht. Ziel der Versuche war es, die Zytotoxizität von NK-Zellen in mononukleären Zellen aus Blut und Leber durch einen zweiten Marker neben TRAIL zu validieren.

3.3.1.1 CD107a wurde nach Kontakt mit dem HCV von PBL und IHL nicht verstärkt exprimiert

Als Erstes wurden PBL und IHL nach 18-stündiger Ko-Kultur mit Replikon-Zellen mit mononukleären Zellen, welche mit Lunet-Zellen ohne Replikon ko-kultiviert wurden, verglichen (siehe Abb.17). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CD107a-Produktion von NK-Zellen in PBL (A) (PBL: $1,0 \pm 0,5$ % vs. $0,9 \pm 0,3$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 82 ± 20 MFI vs. 83 ± 28 MFI, $P = \text{n.s.}$) und IHL (B) (IHL: $6,4 \pm 4,8$ % vs. $26,4 \pm 4,1$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 204 ± 126 MFI vs. 213 ± 133 MFI, $P = \text{n.s.}$) nach Kontakt mit dem HCV im Vergleich zu Zellen, welche nicht mit dem Virus in Kontakt waren.

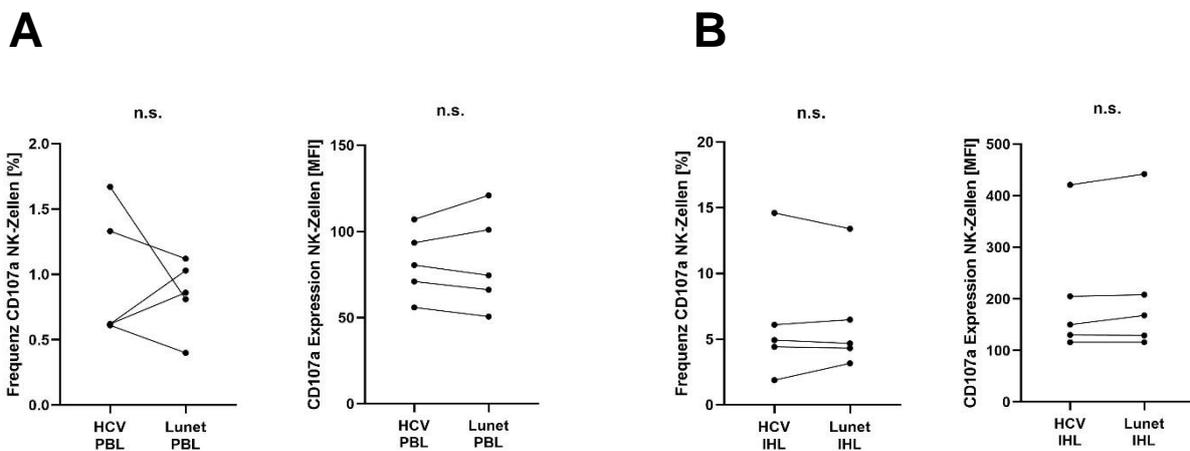


Abbildung 17: Frequenz und Expression von CD107a exprimierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle

PBL und IHL wurden für 16 Stunden mit Replikon-Zellen bzw. Lunet-Zellen ohne Replikon ko-kultiviert und anschließend die Frequenz und Expression CD107a Produktion der NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. In dieser Abbildung wird die Frequenz und Expression der CD107a - produzierenden NK- Zellen in PBL (A) und IHL (B) nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (HCV) mit der CD107a Produktion nach Ko-Kultur mit Lunet-Zellen ohne Replikon (Lunet) (B) verglichen. Als statistischer Test wurde der Abhängige *t*-Test verwendet.

Auch wenn die mononukleären Zellen, wie in Abb. 18 dargestellt, zusätzlich für 18 Stunden (A+B) mit K562-Zellen stimuliert wurden, ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei der CD107a Expression von NK-Zellen in PBL bzw. IHL in Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (HCV PBL. mit 18h K562: $52,5 \pm 13,4$ % vs. $54,0 \pm 11,9$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 799 ± 453 MFI vs. 824 ± 402 MFI, $P = \text{n.s.}$) (Lunet IHL. mit 18h K562: $58,7 \pm 7,6$ % vs. $59,1 \pm 10,2$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 933 ± 311 MFI vs. 951 ± 343 MFI, $P = \text{n.s.}$) nachweisen.

Dasselbe gilt auch für die Stimulation mit K562-Zellen für 4 Stunden (C+D). Bei dieser konnte für PBL bzw. IHL in Ko-Kultur mit Replikon-Zellen in Gegenüberstellung mit mononukleären Blut- und Leberzellen in Ko-Kultur mit Lunet-Zellen ohne Replikon (HCV IHL. mit 4h K562: $9,4 \pm 11,2$ % vs. $14,1 \pm 19,1$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 161 ± 168 MFI vs. 251 ± 274 MFI, $P = \text{n.s.}$) (Lunet IHL. mit 4h K562: $14,1 \pm 5,1$ % vs. $16,8 \pm 1,5$ %, $P = \text{n.s.}$ u. 315 ± 100 MFI vs. 381 ± 98 MFI, $P = \text{n.s.}$) kein signifikanter Unterschied in der Expression von CD107a durch NK-Zellen festgestellt werden.

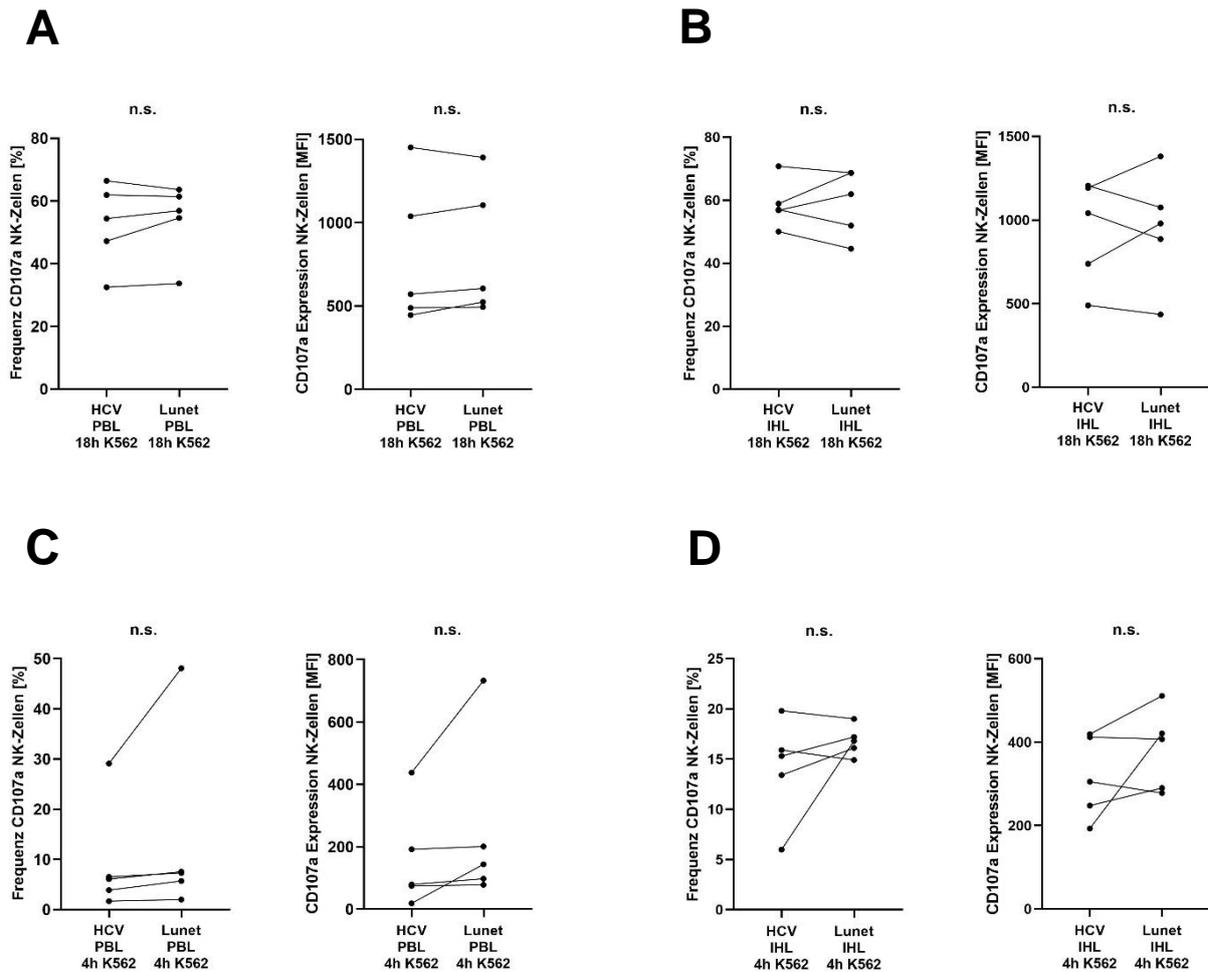


Abbildung 18: Frequenz und Expression von CD107a- exprimierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle nach Stimulation mit K562-Zellen für 18 und 4 Stunden

Nach der 18-stündigen Ko-Kultur von mononukleären Zellen mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon wurde die Frequenz und Expression der CD107a Expression von NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. In der Abbildung wird die Frequenz und Expression der CD107a- produzierenden NK- Zellen in PBL und IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (HCV) mit der CD107a Produktion nach Ko-Kultur mit Lunet-Zellen ohne Replikon (Lunet) verglichen, welche für 18 (A+B) bzw. 4 Stunden (C+D) mit K562-Zellen stimuliert wurden. Als statistischer Test wurde der Abhängige *t*-Test angewendet.

3.3.1.2 NK-Zellen in IHL exprimierten mehr CD107a als NK-Zellen in PBL

Des Weiteren wurde die Expression von CD107a durch NK-Zellen in PBL mit der in IHL verglichen (siehe Abb. 19). Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Frequenz und Expression der CD107a-Produktion von NK-Zellen in IHL im Vergleich zu NK-Zellen in PBL. Dieser signifikante Unterschied ließ sich nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (A) (+ Repl.: $0,1 \pm 0,5 \%$ vs. $7,2 \pm 4,2 \%$, $P = 0,0364$ u. 82 ± 20 MFI vs. 244 ± 136 MFI, $P = 0,0430$) als auch mit Lunet-Zellen ohne Replikon (B) (- Repl.: $0,8 \pm 0,3 \%$ vs. $6,4 \pm 4,0 \%$, $P = 0,0459$ u. 83 ± 28 MFI vs. 253 ± 146 MFI, $P = n.s.$) nachweisen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Versuchsreihe, in der TRAIL als Marker für die Zytotoxizität von NK-Zellen gemessen wurde.

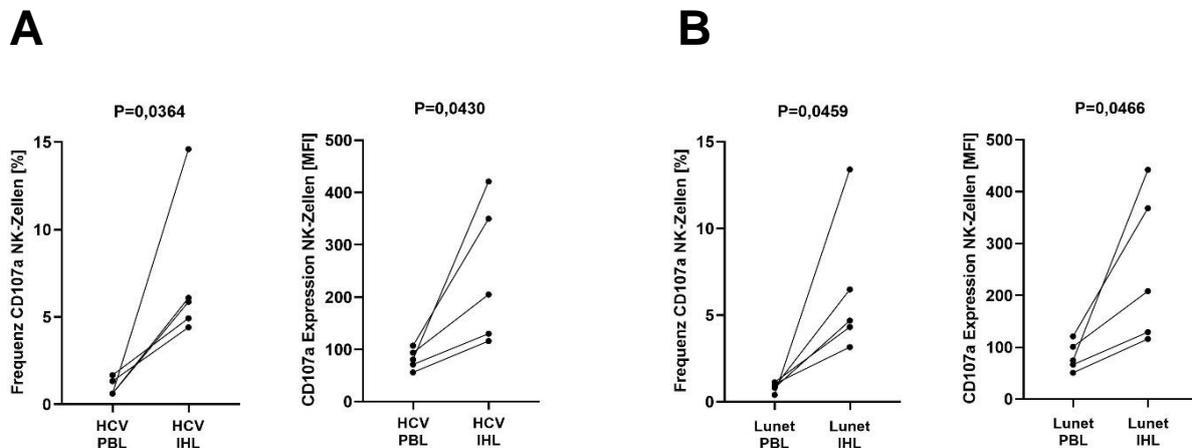


Abbildung 19: Frequenz und Expression von CD107a produzierenden NK-Zellen in PBL im Vergleich zu IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon

Mononukleäre Zellen aus Blut und Leber wurden nach einer 18-stündigen Ko-Kultur mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde die Frequenz und Expression der CD107a produzierenden NK-Zellen gemessen. In der Abbildung werden die CD107a produzierenden NK-Zellen in PBL mit NK-Zellen in IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (HCV) (A) bzw. mit Lunet-Zellen ohne Replikon (Lunet) (B) verglichen. Als statistischer Test wurde der Abhängige *t*-Test eingesetzt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die mononukleären Zellen außerdem für 18 bzw. 4 Stunden mit K562-Zellen stimuliert. Dies wird in Abb. 20 dargestellt. Die Ergebnisse der 18-stündigen Stimulation wiesen keinen Unterschied bei der Produktion von CD107a durch NK-Zellen in PBL im Vergleich zu IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (A) (HCV mit *18h K562*: $52,5 \pm 13,4 \%$ vs. $58,7 \pm 7,6 \%$, $P = n.s.$ u. 799 ± 434 MFI vs. 933 ± 311 MFI, $P = n.s.$) und der Negativkontrolle ohne Replikon (B) (Lunet mit *18h K562*: $54,0 \pm 11,9 \%$ vs. $59,2 \pm 10,7 \%$, $P = n.s.$ u. 824 ± 402 MFI

vs. 951 ± 343 MFI, $P = \text{n.s.}$) auf. Wurden die mononukleären Zellen allerdings für 4 Stunden mit K562-Zellen stimuliert, ließen sich die Ergebnisse ohne Stimulation bestätigen. Hier zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte Produktion von CD107a durch NK-Zellen in IHL im Vergleich zu NK-Zellen in PBL sowohl nach Ko-Kultur mit Replikon- Zellen (C) (HCV mit 4h K562: $4,8 \pm 2,0$ % vs. $18,7 \pm 6,3$ %, $P = 0,0051$ u. 112 ± 78 MFI vs. 364 ± 63 MFI, $P = 0,0084$) als auch nach Ko-Kultur mit Lunet-Zellen ohne Replikon (D) (Lunet mit 4h K562: $7,9 \pm 5,5$ % vs. $23,1 \pm 14,1$ %, $P = 0,0225$ u. 188 ± 138 MFI vs. 444 ± 188 MFI, $P = 0,0128$).

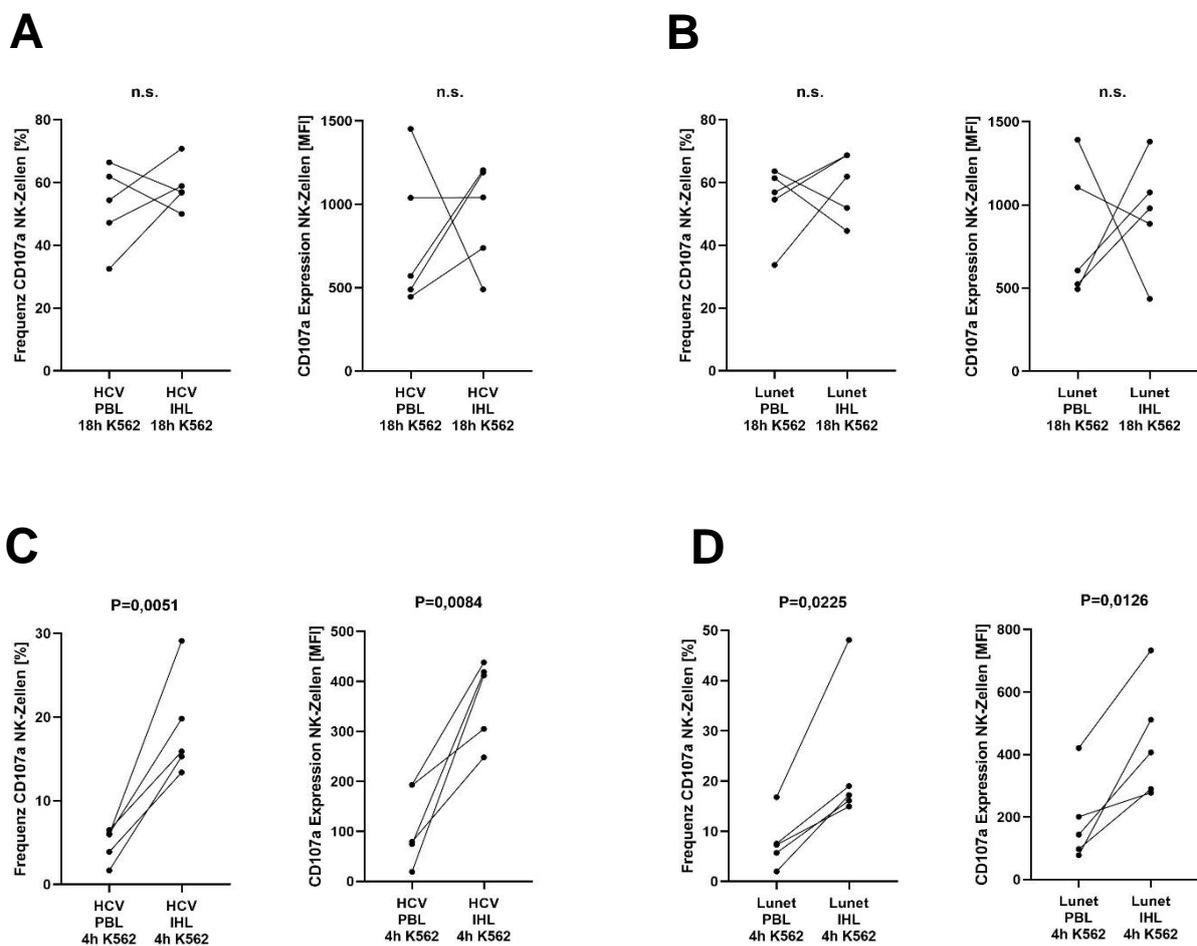


Abbildung 20: Frequenz und Expression von CD107a produzierenden NK-Zellen in PBL im Vergleich zu IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon nach Stimulation mit K562-Zellen für 18 und 4 Stunden

PBL und IHL wurden für 18 Stunden mit Replikon-Zellen und der Negativkontrolle ohne Replikon ko-kultiviert und anschließend die CD107a produzierenden NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. In der Abbildung werden die CD107a produzierenden NK-Zellen in PBL mit NK-Zellen in IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (HCV) bzw. mit Lunet-Zellen ohne Replikon (Lunet) und nach Stimulation mit K562-Zellen für 18 (A+B) und 4 Stunden (C+D) verglichen. Als statistischer Test fand hier der Abhängige t -Test Anwendung.

3.3.2 LDH Assay

Mittels TRAIL und CD107a konnte durch zwei verschiedene Marker die Zytotoxizität von NK-Zellen in PBL und IHL nach Kontakt mit dem HCV bestimmt werden. Durch die Nutzung des LDH Assay sollte nun die Wirkung des Todeszell- Liganden und der zytotoxischen Granula auf die virusinfizierten Hepatozyten gemessen werden. LDH ist ein Enzym welches sich in allen Körperzellen, somit auch in Hepatozyten, befindet. Kommt es zur Zerstörung der Zelle, wird LDH freigesetzt. Die Quantität von LDH ist dabei proportional zur Anzahl der zerstörten Zellen und wird mithilfe des Assays durch Lumineszenz in der Einheit RLU (Relative Lichteinheiten) gemessen.

Für diese Versuchsreihe wurden periphere und intrahepatische mononukleäre Zellen eines Patienten für 18 Stunden mit Lunet BLR Luc ubi neo JFH -Zellen als auch mit Lunet BLR-Zellen ko-kultiviert. Teilweise wurden außerdem für die gesamte 18-stündige Inkubationszeit bzw. in anderen Versuchen für die letzten 4 Stunden der Ko-Kultur K562-Zellen zur Stimulation der NK-Zellen hinzugefügt. Diese stimulierten Kulturen werden mit *18h K562* und *4h K562* gekennzeichnet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der zellfreie Überstand der Ko-Kulturen abpipettiert und mit dem LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay, wie in „2.11 Laktat Dehydrogenase Assay“ erläutert, behandelt. Anschließend wurde die Lumineszenz, welche sich proportional zur Quantität an LDH in der Probe verhält, mithilfe des Varioskan® Flash-Readers von Thermo Scientific bestimmt.

3.3.2.1 Nach Kontakt von PBL und IHL mit HCV-infizierten Zellen war LDH nicht erhöht

Zunächst wurde untersucht, ob die Quantität von LDH in der Ko-Kultur von PBL und IHL mit virusinfizierten Hepatozyten im Vergleich zu der Ko-Kultur mit Hepatozyten ohne Virus erhöht ist (siehe Abb. 21). Bei den Untersuchung zeigte sich weder bei PBL ($0,5 \pm 0,2$ vs. $0,5 \pm 0,2$, $P = \text{n.s.}$) noch bei IHL ($0,5 \pm 0,3$ vs. $0,6 \pm 0,2$, $P = \text{n.s.}$) ein signifikanter Unterschied der LDH-Quantität in der LDH Messung.

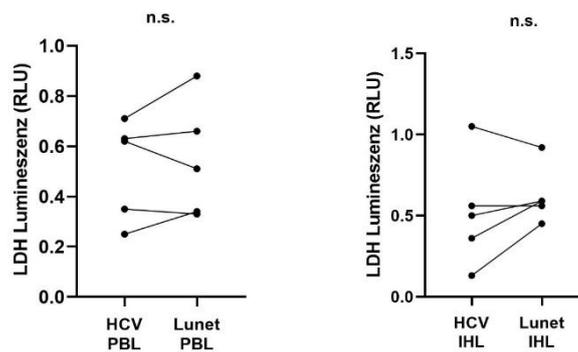


Abbildung 21: LDH-Quantität von PBL und IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Replikon

Nach der 18-stündigen Ko-Kultur von PBL und IHL mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon wurde der zellfreie Überstand der Ko-Kulturen abpipettiert und mittels des LDH Assays die Lumineszenz, welche sich proportional zur Quantität an LDH in der Probe verhält, gemessen. In der Abbildung wird die Quantität von LDH in den Ko-Kulturen mit PBL bzw. IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (HCV) mit der nach Ko-Kultur mit Lunet-Zellen ohne Replikon (Lunet) verglichen. Der Abhängige t -Test wurde hier als statistischer Test verwendet.

Wie in Abb. 22 dargestellt, konnte auch mit zusätzlich 18-stündiger (A) (PBL: $1,7 \pm 0,4$ vs. $1,6 \pm 0,5$, $P = \text{n.s.}$) (IHL: $1,5 \pm 0,8$ vs. $1,5 \pm 0,8$, $P = \text{n.s.}$) bzw. 4-stündiger (B) (PBL: $0,5 \pm 0,2$ vs. $0,5 \pm 0,2$, $P = \text{n.s.}$) (IHL: $0,5 \pm 0,2$ vs. $0,6 \pm 0,3$, $P = \text{n.s.}$) Stimulation der mononukleären Zellen mit K562-Zellen kein Unterschied in der Menge von LDH gefunden werden.

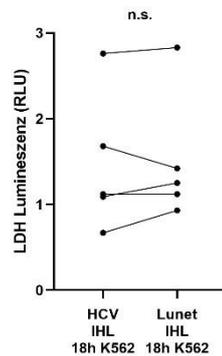
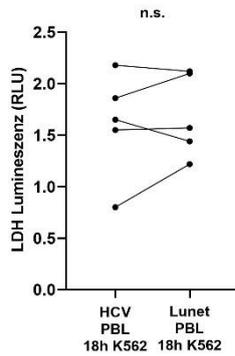
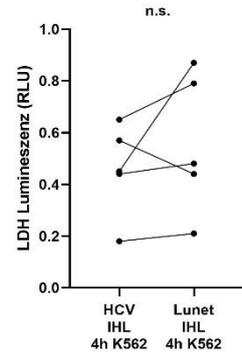
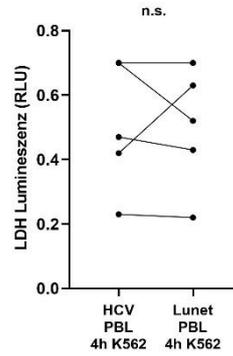
A**B**

Abbildung 22: LDH-Quantität von PBL und IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Replikon mit Stimulation in Form von K562-Zellen für 18 und 4 Stunden

PBL und IHL wurden für 18 Stunden mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon ko-kultiviert und für die gesamt 18- stündige Inkubationszeit bzw. die letzten 4 Stunden mit K562- Zellen stimuliert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand der Ko-Kulturen abpipettiert und mittels des LDH Assays die Lumineszenz bestimmt. In der Abbildung wird die Quantität von LDH in den Ko-Kulturen mit PBL bzw. IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen (HCV) und Lunet-Zellen ohne Replikon (Lunet) und zusätzlicher 18-stündiger (A) bzw. 4-stündiger (B) Stimulation mit K562-Zellen verglichen. Als statistischer Test wurde der Abhängige *t*-Test angewendet.

3.3.2.2 Die LDH- Quantität nach Ko-Kultur von PBL mit Replikon- und Lunet- Zellen ohne Replikon entsprach der von IHL

Zudem wurde die Menge von LDH nach Ko-Kultur von PBL mit Replikon-Zellen mit der von IHL nach-Ko-Kultur mit Replikon-Zellen verglichen (siehe Abb. 23). Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied in der LDH- Quantität zwischen beiden Zellgruppen gemessen werden. Dies gilt für PBL und IHL ohne Stimulation ($0,5 \pm 0,2$ vs. $0,5 \pm 0,3$, $P = n.s.$), also auch für jene mit zusätzlich 18- stündiger ($1,7 \pm 0,4$ % vs. $1,5 \pm 0,8$, $P = n.s.$) bzw. 4-stündiger Stimulation ($0,5 \pm 0,2$ vs. $0,5 \pm 0,2$, $P = n.s.$) in Form von K562-Zellen

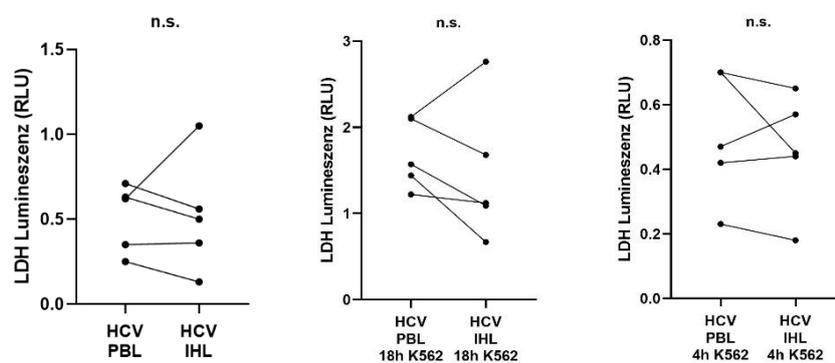


Abbildung 23 LDH-Quantität von PBL im Vergleich zu IHL nach Ko-Kultur mit Replikon- Zellen ohne Stimulation und nach Stimulation mit K562 für 18 und 4 Stunden

PBL und IHL wurden für 18 Stunden mit Replikon-Zellen ko-kultiviert. Weitere mononukleären Zellen wurden die gesamte 18-stündige Inkubationszeit bzw. die letzten 4 Stunden mit K562- Zellen stimuliert. Nach dem Abpipettieren des zellfreien Überstands wurde mittels des LDH Assays die Lumineszenz bestimmt. In der Abbildung wird die Quantität von LDH im Überstand der Ko-Kulturen von PBL mit IHL verglichen, welche mit Replikon-Zellen ko-kultiviert wurden. Dieser Vergleich ist für unstimulierte Zellen und für mononukleäre Zellen mit zusätzlicher 18-stündiger bzw. 4-stündiger Stimulation mit K562-Zellen dargestellt. Als statistischer Test wurde der Abhängige *t*-Test verwendet.

4 Diskussion

4.1 Aktuelle Erkenntnisse über die Immunantwort bei der HCV-Infektion

Eine der zentralen Fragenstellungen in der jahrelangen Forschung über das HCV ist, aus welchem Grund sich HCV-Infektionen in einigen Patienten chronifizieren während andere Patienten genesen. Der Schlüssel zur Antwort scheint das umfassende Verständnis der angeborenen und erworbenen Immunantwort auf das Virus zu sein. Es gilt als bewiesen, dass sowohl das Ausmaß der Leberschäden durch die Infektion und als auch die Krankheitsprogression durch die Immunantwort des Wirts beeinflusst werden.^(56–58) In früheren Untersuchungen konzentrierte man sich hauptsächlich auf die Rolle von virusspezifischen T-Zellen bei der Immunreaktion. Insbesondere CD8⁺ T-Zellen wurden dabei als Haupteffektorzellen der HCV-spezifischen Immunantwort ausgemacht, da die experimentelle Entfernung dieser Zellen bei Schimpansen die Abheilung von HCV-Infektionen verzögerte.⁽⁵⁹⁾ Zudem wurde bei infizierten Patienten^(60–62) als auch experimentell infizierten Schimpansen^(59,63) eine starke Reaktion von CD4⁺ T-Helfer-Zellen beschrieben, welche zusammen mit der Immunantwort von CD8⁺ T-Zellen zur Abheilung von HCV-Infektionen führte. Durch verschiedene Arbeiten in den letzten Jahren wurden jedoch mehrere, nicht redundante Mechanismen aufgedeckt, welche zur Abschwächung und Erschöpfung bis hin zum vollständigen Verlust von HCV-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen bei chronisch infizierten HCV-Patienten führten.^(64–69) Unter anderem zeigten mehrere Arbeiten, dass virusspezifische T-Zellen vermehrt inhibitorische Moleküle wie programmed death-1 (PD-1),^(66,67,70,71,71) cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4),^(67,71) T-Zell Immunoglobulin und mucin domain-containing molecule 3 (Tim-3)^(65,72) sowie 2B4 (CD244)^(71,73,74) auf ihrer Oberfläche exprimieren und die korrespondierenden Liganden in der entzündeten Leber hochreguliert werden. Durch längeren Kontakt von virusspezifischen T-Zellen mit HCV-infizierten Hepatozyten kommt es dadurch zum Ausbremsen der Immunantwort. Außerdem wurde beschrieben, dass ein inflammatorisch bedingter Anstieg von regulatorischen T-Zellzahlen,^(75–77) eine Reduktion des intrahepatischen Arginin-Levels⁽⁷⁸⁾ und eine Veränderung des Verhältnisses von T-Zell erhaltenden Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2)⁽⁷⁹⁾ und suppressiven Zytokinen wie IL-10 und transforming growth factor- β (TGF- β)^(80,81) die virusspezifische T-Zell-Antwort bei infizierten Patienten hemmt. Auch kommt es durch

die hohe Replikationsrate des HCV zusammen mit der hohen Fehlerrate seiner Polymerase häufig zu viralen Mutationen von wichtigen T-Zell-Epitopen. Dies führt dazu, dass zudem die bei chronischen Infektionen verbliebene T-Zell-Antwort ineffektiv wird.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass es in der chronischen Phase einer HCV-Infektion durch die beschriebenen Mechanismen zur massiven Herunterregulierung der Anzahl und Funktion von virusspezifischen T-Zellen kommt, wenn diese qualitativ oder quantitativ nicht in der Lage waren, das Virus in der akuten Phase der Erkrankung zu eliminieren. Ist eine chronische Infektion erst etabliert, ist der antivirale Effekt der verbleibenden virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen vernachlässigbar. Dies zeigte sich unter anderen in experimentellen Untersuchungen, in denen *in vivo* CD8⁺ T-Zellen entfernt wurden. Diese Maßnahme zeigte keinen Effekt auf die Höhe des ALT-Levels als Zeichen von Leberschäden noch auf die Virämie bei chronisch HCV-infizierten Schimpansen, während die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen bei akuten HCV-Infektionen die Leberschäden reduzierte und eine Abheilung der Infektion verhinderte.⁽⁵⁹⁾ Im Gegensatz zu dem ausführlichen Wissen über CD8⁺ T-Zellen ist über die Herunterregulierung von CD4⁺ T-Zellen bei chronischen HCV-Infektionen weniger bekannt. Dennoch scheint es auch bei dieser Zellgruppe im Rahmen von chronischen HCV-Infektionen zu Funktionseinschränkungen zu kommen.^(82,83)

In neueren Studien wurden außerdem NK-Zellen eine Rolle in der direkten Regulation von CD4⁺ und in der indirekten Regulation von CD8⁺ T-Zell-Immunantworten bei viralen Hepatitiden zugeschrieben. NK-Zellen machen die Mehrheit der angeborenen Immunzellen in der gesunden menschliche Leber aus.⁽⁸⁴⁾ Bei einer chronischen HCV-Infektion erhöht sich ihre Anzahl in der Leber, während sich die Anzahl von NK-Zellen im Blut verringert.^(33,85,86)

NK-Zellen werden insbesondere durch Chemokine von Kupffer-Zellen rekrutiert und durch Zytokine von Kupffer-Zellen, sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) und T-Zellen stimuliert.⁽⁸⁷⁾ Diese Zytokine umfassen unter anderem IL-12 und IL-15⁽⁸⁷⁾, welche in einigen der Versuchsreihen zur Stimulation von NK-Zellen eingesetzt wurden. Der genaue Mechanismus, mit dem NK-Zellen durch ein Zusammenspiel aus aktivierenden und hemmenden Signalen sowie Rezeptoren reguliert werden, wird in Kapitel „1.2.2. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)“ beschrieben.

Bei HCV-infizierten Patienten können im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen auf NK-Zellen vermehrt aktivierende Rezeptoren wie NKp30⁽⁵⁴⁾, NKp44⁽³²⁾, NKp46^(32,55), NKG2C⁽³²⁾, NKG2D⁽³³⁾ und CD122⁽³²⁾ nachgewiesen werden. Auch der inhibierende Rezeptor NKG2A wird nach Kontakt mit dem Virus vermehrt auf NK-Zellen exprimiert. Der Einfluss von diesen und anderen Signalen führt zur Aktivierung von NK-Zellen bei HCV- Infektionen. Dies zeigt sich auch durch die vermehrte Expression von CD69^(32,33), einem induzierbaren Oberflächen-Glykoprotein, welches bei lymphatischer Aktivierung synthetisiert wird. Unter optimalen Bedingungen ist es sogar möglich, dass aktivierte NK-Zellen durch die Produktion von antiviralen Zytokinen und zytotoxischer Granula, sowie durch die Rekrutierung von Zellen der adaptiven Immunantwort das HCV eliminieren können.⁽⁸⁸⁾ Dennoch zeigen mehrere Arbeiten, dass die Produktion von Zytokinen durch NK-Zellen trotz der Aktivierung bei chronischen HCV- Infektionen teilweise gehemmt wird. So ist die Produktion von antiviralen Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α bei chronisch HCV infizierten Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermindert.^(16,32,35) Serti und Werner et al. konnten in Ihrer Arbeit nachweisen, dass die verringerte Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen in PBL durch die gehemmte Funktion von CD14⁺ Monozyten und die dadurch resultierende geminderte Stimulation zu erklären ist.

CD14⁺ Monozyten und Makrophagen sind Teil des mononukleären Phagozytensystems, einem Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Monozyten sind aus dem Knochenmark stammende Leukozyten, die im Blut und in der Milz zirkulieren. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, „Gefahrensignale“ über Mustererkennungsrezeptoren erkennen zu können und Antigene zu phagozytieren und zu präsentieren. Des Weiteren können sie Chemokine ausschütten und sich als Reaktion auf Infektionen und Verletzungen vermehren.⁽⁸⁹⁾ Auf inflammatorische Signale hin können sie aus dem Blut in Gewebe transmigrieren und sich dort in Makrophagen und dendritische Zellen differenzieren.⁽⁸⁹⁾ Transmigrieren sie dabei aus dem Blut in die Sinuside der Leber, können sie sich unter anderem in leberspezifische Makrophagen, sogenannte Kupffer-Zellen, differenzieren.⁽³⁶⁾

Da für diese Veröffentlichung ausschließlich aus humanem Blut isolierte Lymphozyten (PBL) analysiert wurden, war es das Ziel unsere Arbeit, die Rolle von intrahepatischen NK-Zellen bei der Immunreaktion auf das HCV zu untersuchen. Außerdem sollte der

Einfluss von CD14⁺- Zellen auf die Immunantwort von intrahepatischen NK-Zellen quantifiziert werden.

4.2 Die Wertigkeit des HCV-Replikon-Systems zur Untersuchung von HCV-Infektionen

Lange mussten Untersuchungen zur HCV-Infektion an Schimpansen durchgeführt werden, da diese Tiere neben dem Menschen die einzigen Lebewesen darstellen, die von Natur aus anfällig für HCV-Infektionen sind.⁽⁹⁰⁾ Dies stellt immer noch das beste Modell für Studien zur angeborenen und adaptiven Immunantwort bei HCV-Infektion dar. Obwohl das Schimpansenmodell wertvolle Erkenntnisse lieferte, schränken begrenzte Verfügbarkeit, hohe Kosten und ethische Überlegungen ihren Nutzen ein. Die einzigen Tiermodelle mit kleinen Tieren für HCV-Infektionen die zur Zeit verfügbar sind, sind stark immundefiziente Mäuse mit menschlichen chimären Lebern.⁽⁹¹⁾ Diese Mäuse können jedoch nur begrenzt zur Untersuchung adaptiver Immunantworten verwendet werden.^(90,91)

Um die angeborene Immunantwort von NK-Zellen auf das HCV zu untersuchen, entschieden wir uns daher zur Verwendung des subgenomischen Replikon-Systems. Dieses wurde 1999 von Lohman et al. erstmalig in ihrer Publikation vorgestellt. Ihnen gelang es eine effiziente Virusreplikation in humanen Hepatomzellen (Huh7-Zellen) zu erzeugen, indem diese mit einem Subgenomen transfiziert wurden, welches einen selektierbaren Marker enthält, der mit der nichtstrukturellen Region (NS2-NS5B) von HCV verbunden ist.^(92,93) Seit der Etablierung dieses Modells wird dieses als wichtigstes System zur Untersuchung der HCV-Replikation und der zellulären Immunität genutzt. Auch die Entwicklung der neuen antiviral wirkenden Substanzen (direct acting antivirals, DAAs) basiert auf die Nutzung dieses Modells.⁽⁹⁴⁾ Das HCV-Replikon-System hat sich zur Erforschung der Immunantwort in zahlreichen Arbeiten bewährt. Dennoch sind die Bedingungen einer Kultur immer künstlich und können niemals vollständig die komplexen Einflüsse eines *in vivo* Systems nachbilden.

4.3 Intrahepatische mononukleäre Zellen weisen eine stärkere antivirale Aktivität auf als mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut

Durch die Messung der Luciferase-Aktivität nach Ko-Kultur mit mononukleären Zellen aus Blut und aus der Leber eines Patienten, konnte die verbliebene virale Aktivität der Replikon-Zellen bestimmt werden. Dabei konnten wir feststellen, dass die antivirale Aktivität von intrahepatischen mononukleären Zellen signifikant höher war als die von diesen Zellen aus peripheren Blut.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass intrahepatische NK-Zellen nach Kontakt mit dem HCV stärker aktiviert werden als solche im peripheren Blut.^(32,33,54) So zeigten Ahlenstiel et al., dass eine höhere Prozentzahl von NK-Zellen in der Leber nach Kontakt mit dem HCV Marker wie TRAIL, NKp46, and CD122 exprimieren als im Blut.⁽³²⁾ Dies spricht für eine verstärkte Aktivierung von NK-Zellen in IHL. Eine erhöhte Aktivität von intrahepatischen NK-Zellen erklärt den stärkeren antiviralen Effekt von IHL auf das Virus.

Auch für andere Viren die Hepatozyten befallen wurde eine verstärkte antivirale Aktivität von intrahepatischen NK-Zellen beschrieben. So zeigten Zhang, Zhang et al., dass intrahepatische NK-Zellen bei Patienten mit Hepatitis-B-Virusinfektion mehr Aktivierungsrezeptoren exprimieren und auch vermehrt zytotoxisch aktiv waren als NK-Zellen im peripheren Blut des gleichen Patienten.⁽⁹⁵⁾

Die Ursache für die unterschiedliche Aktivierung von intrahepatischen NK-Zellen im Vergleich zu NK-Zellen im peripheren Blut ist unklar. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine unterschiedliche Differenzierung von intrahepatischen NK-Zellen im Vergleich zu peripheren NK-Zellen sein: Es ist bekannt, dass NK-Zellen von hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark abstammen.^(96,97) Einige Vorläuferzellen differenzieren im Knochenmark aus, andere gelangen noch als undifferenzierte Vorstufen in andere Organe. So können NK-Zellvorläufer neben dem Knochenmark auch im fetalen Thymus, Lymphknoten, in der Leber und in der Milz gefunden werden, unreife NK-Zellen später in Knochenmark, Leber und Milz.⁽⁹⁸⁾ Es ist möglich, dass undifferenzierte Vorläuferzellen das Knochenmark verlassen um ihre Differenzierung an einem andere Ort, wie der Leber, fortzusetzen. Dafür spricht, dass man nur in der Leber eine Untergruppe von NK-Zellen gefunden hat, welche konstitutiv

den Marker TRAIL und nur eine geringe Menge der Reifemarkern Ly49-Rezeptoren und CD11b exprimieren.^(99–101) Auch eine andere Untergruppe an NK-Zellen, welche verstärkt den Marker CD11c exprimieren, konnte ausschließlich in der Leber nachgewiesen werden.⁽¹⁰²⁾ Dies spricht dafür, dass intrahepatische NK-Vorläuferzellen unter dem Einfluss von bestimmten Signalen wie Zytokinen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren, welche von lokalen Stromazellen produziert und exprimiert wurden, einen anderen Differenzierungsweg nehmen als in anderen Organen.⁽¹⁰³⁾

Für die Vermutung, dass intrahepatische NK-Zellen unter dem Einfluss von lokalen Zellen anders differenzieren wie NK-Zellen im peripheren Blut, sprechen auch Ergebnisse von vielen weiteren Studien, welche Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen zwischen intrahepatischen und peripheren NK-Zellen zeigten. Beispielsweise wurde beschrieben, dass intrahepatische NK-Zellen stärker zytotoxisch aktiv sind und mehr zytotoxische Mediatoren exprimieren^(104,105) als NK-Zellen im peripheren Blut. Auch CD69, ein akuter Aktivierungsmarker, wird von lebereigenen NK-Zellen vermehrt exprimiert.⁽¹⁰⁶⁾

Eine spezielle Differenzierung von intrahepatischen NK-Zellen könnte eine mögliche Erklärung für die stärkere antivirale Aktivität von NK-Zellen in IHL im Vergleich zu peripheren NK-Zellen sein.

4.4 Die Immunantwort bei HCV-Infektionen in der Leber wird durch CD56⁺ NK-Zellen und CD14⁺-Zellen beeinflusst

Wurden CD56⁺ NK-Zellen vor der Ko-Kultur aus PBL bzw. IHL eliminiert, wurde ein starker Rückgang der antiviralen Aktivität beobachtet. NK-Zellen scheinen daher einen wichtigen Beitrag zur Immunantwort auf das HCV beizutragen. Interessanterweise zeigte sich auch nach der Eliminierung von CD14⁺-Zellen ein Rückgang der antiviralen Aktivität.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus 4.3 zur stärkeren antiviralen Aktivität von intrahepatischen mononukleären Zellen im Vergleich zu mononukleären Zellen aus peripherem Blut schließen wir, dass die Immunantwort auf eine HCV-Infektion sowohl von CD56⁺ NK-Zellen als auch von CD14⁺-Zellen in der Leber und im Blut abhängig ist, die antivirale Aktivität von intrahepatischen mononukleären Zellen aber grundsätzlich etwas stärker ist.

Serti und Werner et al. beschrieben in ihrer Arbeit von 2014, dass aus peripheren Blut isolierte Monozyten das HCV in den Hepatozyten erkennen und daraufhin unter anderem Interleukin-18 (IL-18) ausschütten, um NK-Zellen zu aktivieren, welche wiederum das HCV bekämpfen können.⁽³⁵⁾ Auch eine weitere Arbeit von Zhang und Saha et al. zeigte, dass die Produktion von antiviral wirksamen IFN- γ durch NK-Zellen in PBL von Monozyten und dendritischen Zellen abhängig ist.⁽¹⁰⁷⁾ Für diese Publikation wurden ausschließlich aus humanem Blut isolierte mononukleären Zellen analysiert. Wir konnten in unseren Untersuchungen zum einen bestätigen, dass Monozyten die antivirale Aktivität von PBL positiv beeinflussen und somit die Ergebnisse dieser Arbeiten bestätigen. Zudem stellten wir, dass analog zu den mononukleären Zellen im Blut CD14⁺ Monozyten auch Einfluss auch auf intrahepatischen Lymphozyten zu haben scheinen. Unklar bleibt in unserem Versuchsmodell allerdings, ob der Einfluss von CD14⁺-Zellen auf die intrahepatische Immunantwort über die Ausschüttung von NK-Zell stimulierenden IL-18 vermittelt wird.

4.5 Unterschiede in der Immunantwort von intrahepatischen NK-Zellen im Vergleich zu NK-Zellen aus peripheren Blut auf das HCV

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass intrahepatische Lymphozyten einen stärkeren antiviralen Effekt auf das HCV bewirken als Lymphozyten aus dem Blut. In der weiteren Arbeit war daher von Interesse, ob diese unterschiedliche Wirksamkeit durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine von NK-Zellen bedingt ist. Dazu wurden die mononukleären Zellen nach Beendigung der Ko-Kulturen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

4.5.1 NK-Zellen in IHL produzieren unabhängig von CD14⁺- Zellen nach Kontakt mit dem HCV mehr TNF- α

In der Publikation von Serti und Werner et al. wurde unter anderem gezeigt, dass NK-Zellen in PBL nach Kontakt mit dem HCV vermehrt TNF- α und IFN- γ produzieren und dass diese Zytokine in erster Linie für den antiviralen Effekt der Lymphozyten verantwortlich sind.⁽³⁵⁾ TNF- α ist ein Zytokin, das an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen und an der immunvermittelten Reaktion auf Infektionen, insbesondere

gegen intrazelluläre Pathogene, beteiligt ist.⁽¹⁰⁸⁾ Die Rolle von TNF- α bei chronischen HCV-Infektionen ist bislang noch nicht gut verstanden. Die Serumspiegel von TNF- α und seinen löslichen Rezeptoren (sTNF-R55 und sTNF-R75) sind bei HCV-infizierten Patienten signifikant höher als bei gesunden Probanden.⁽¹⁰⁹⁾ Die TNF- α Serumspiegel korrelieren mit den Transaminasespiegeln im Serum, der histologischen Aktivität und der Fibrose der Leber, jedoch nicht mit den HCV-RNA-Spiegeln im Serum oder dem viralen Genotyp.^(109–111) Dies spricht dafür, dass TNF- α als Teil des apoptotischen Signalwegs im Rahmen von HCV- Infektionen vermehrt produziert wird und auch Teil der Immunantwort auf das Virus ist, jedoch keine Eliminierung des Virus bewirken kann. Eine mögliche Erklärung dafür bieten die Laboruntersuchungen von Ray et al. Diese haben gezeigt, dass das HCV-Kernprotein das Potenzial hat den TNF- α -vermittelten apoptotischen Signalweg zu hemmen, was einen selektiven Vorteil für die HCV-Replikation und die Vermeidung des antiviralen Abwehrmechanismus des Wirts zur Folge hat.⁽¹¹²⁾

In unseren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass NK-Zellen in intrahepatischen Lymphozyten nach Kontakt mit dem HCV vermehrt TNF- α produzierten. Wurden die Zellen mit Hepatozyten ohne Virusreplikon in Ko-Kultur gegeben, zeigte sich eine signifikant verminderte Ausschüttung von TNF- α . Es kann daraus geschlossen werden, dass intrahepatische NK-Zellen durch den Kontakt mit dem HCV zur Produktion des antiviral wirksamen TNF- α stimuliert werden. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass diese Stimulation von NK-Zellen unabhängig von CD14⁺-Monozyten geschieht, da sich nach Eliminierung der Monozyten kein Unterschied in der TNF- α Produktion feststellen ließ.

Diese vermehrte Zytokinproduktion nach Kontakt mit dem HCV ließ sich für NK-Zellen in PBL nicht nachweisen. Die Produktion von TNF- α änderte sich nach der Eliminierung von NK-Zellen nicht und es zeigte sich auch kein Unterschied zu NK-Zellen aus Blutlymphozyten, welche sich in Ko-Kultur mit Hepatozyten ohne das Virusreplikon befanden. Jedoch konnte festgestellt werden, dass im Gegensatz zu den NK-Zellen in IHL die Produktion von TNF- α durch NK-Zellen in PBL abhängig von CD14⁺- Monozyten zu sein schien. Wurden Monozyten aus PBL eliminiert, konnte eine signifikante Verminderung der Ausschüttung von TNF- α gemessen werden.

Unsere Ergebnisse bestätigen die von Serti und Werner et al. nicht. Im Gegensatz zu ihrer Arbeit konnten wir nicht nachweisen, dass die Produktion von TNF- α durch PBL

nach Kontakt mit dem HCV erhöht ist. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz könnte eine nicht ausreichende Anzahl an Versuchsergebnissen sein, welche für unsere Analyse herangezogen werden. Eine Analyse mit der Anzahl von weniger als 10 Untersuchungen, wie sie von uns durchgeführt wurde, kann durch mögliche statistische Ausreißer beeinflusst sein. Jedoch zeigten unsere Ergebnisse eine Abhängigkeit der Ausschüttung von TNF- α durch CD14⁺-Monozyten.

Außerdem zeigte unsere Arbeit, dass intrahepatische Lymphozyten mehr TNF- α produzieren als Lymphozyten aus dem Blut. Die Ausschüttung wurde durch den Kontakt mit dem HCV zusätzlich stimuliert, so dass es im Gegensatz zu PBL bei IHL zu einer vermehrten Produktion von TNF- α nach Kontakt mit dem Virus kam. Da für TNF- α bereits ein antiviraler Effekt auf das HCV beschrieben ist ⁽³⁵⁾, könnten diese Ergebnisse eine Erklärung für den stärkeren antiviralen Effekt von intrahepatischen Lymphozyten liefern.

4.5.2 Die Zytotoxizität von NK-Zellen in PBL nach Kontakt mit dem HCV ist abhängig von CD14⁺-Zellen

Des Weiteren wurde die Zytotoxizität von NK-Zellen in PBL und IHL durch die durchflusszytometrisch bestimmten Marker TRAIL und CD107a sowie der Messung von LDH bestimmt.

Bei Aktivierung können NK-Zellen durch zwei verschiedene Mechanismen zytotoxisch auf infizierte oder maligne Zellen wirken. Beide Signalwege setzen den direkten Kontakt der NK-Zelle mit den Zielzellen voraus.⁽²⁶⁾ Beim ersten Signalweg schütten NK-Zellen Toxine wie Perforine und Granzymen mittels Exozytose aus, welche die Apoptose der Zielzelle induzieren. Beim zweiten Signalweg wird die Apoptose der Zielzelle durch die Bindung von Todeszell-Liganden wie TRAIL oder FasL auf der Oberfläche der aktivierten NK-Zelle an entsprechende Rezeptoren auf ihren Zielzellen eingeleitet.^(26,113) Durch die Bestimmung der TRAIL-Expression auf NK-Zellen konnte die Zytotoxizität der NK-Zellen vor allem durch den zweiten Signalweg untersucht werden. Zudem bestimmten wir mittels Durchflusszytometrie die Expression des Marker CD107a, ein transmembranes Glykoprotein,⁽⁵²⁾ welches proportional zur Granulation von NK-Zellen exprimiert wird. ⁽⁵³⁾ Durch die Analyse dieses Markers

erhofften wir uns Rückschlüsse auf die Zytotoxizität von NK-Zellen, die durch den ersten Signalweg vermittelt wird.

Die Ergebnisse der Bestimmung von TRAIL und CD107a belegen, dass NK-Zellen in IHL unabhängig vom Kontakt mit dem HCV eine erhöhte Zytotoxizität aufweisen im Vergleich zu NK-Zellen in PBL. Jedoch konnte weder für NK-Zellen in PBL noch in IHL ein signifikanter Anstieg der Zytotoxizität beider Signalwege nach Kontakt mit dem HCV nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten unsere Untersuchungen für NK-Zellen aus intrahepatischen Lymphozyten einen Einfluss von Monozyten, da es nach der Eliminierung dieser CD14⁺- Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zytotoxizität von NK-Zellen kam. Dieser Effekt ließ sich für NK-Zellen in PBL nicht nachweisen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Immunantwort von NK-Zellen aus PBL auf das HCV durch eine gesteigerte Zytotoxizität der Zellen vermittelt ist, welche nicht durch CD14⁺- Monozyten beeinflusst wird. Für diese These, welche von unseren Untersuchungsergebnissen abweicht, sprechen Ergebnisse von anderen Publikationen. So konnten Ahlenstiel et al. zeigen, dass bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion eine erhöhte Anzahl von TRAIL exprimierenden NK-Zellen in peripheren Blutlymphozyten und somit erhöhter Zytotoxizität im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe vorliegt.⁽³²⁾ Auch konnten Oliviero et al. nachweisen, dass NK-Zellen von Lymphozyten aus peripheren Blut von Patienten mit chronischer HCV-Infektion eine höhere Zytotoxizität ausweisen als vergleichbare Zellen von gesunden Probanden.⁽³³⁾ In dieser Studie wurde CD107a als indirekter Marker für Zytotoxizität verwendet. Als mögliche Ursachen für die Diskrepanz unsere Untersuchungsergebnisse sind eine nicht ausreichende Anzahl von Daten zur Analyse oder eine zu kurze Inkubationszeit der NK-Zellen mit dem HCV denkbar. Eine zusätzliche Stimulation mit K562- Zellen zeigte keine Veränderung der Ergebnisse.

4.5.3 Der Kontakt mit dem HCV führt in PBL und IHL zu keiner Veränderung in der Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen

Zuletzt wurde die Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen in PBL und IHL nach Kontakt mit dem HCV untersucht. In Hinblick auf die Immunantwort bei HCV-Infektionen spielt besonders IFN- γ eine wichtige Rolle, da bereits nachgewiesen ist, dass dieses Zytokin die HCV-Replikation in vitro inhibiert.^(29,30) Außerdem kann IFN- γ im Rahmen der T-Zell vermittelten Abheilung von akuten HCV- Infektionen nachgewiesen werden.^(114,115)

Obwohl NK-Zellen im Rahmen chronischer HCV- Infektionen aktiviert werden^(32–34), ist die Produktion von IFN- γ vermindert. ^(32,33)

Bislang wurde mehrere Erklärungsansätze beschrieben, wie die NK-Zell-Aktivierung und die Produktion von IFN- γ bei chronischen HCV- Infektionen gehemmt wird.

Die ersten Studien berichteten, dass rekombinantes HCV E2-Protein und HCV-Virionen, die auf Gewebekulturplatten aufgetragen wurden, eine Quervernetzung von CD81 auf NK-Zellen bewirken und somit die NK-Zellaktivierung und die IFN- γ -Produktion hemmen.^(116–118) Yoon et al. zeigten jedoch, dass lösliche HCV-Virionen diesen Effekt nicht vermitteln.⁽¹¹⁹⁾ Sie schlossen daraus, dass das HCV E2-Protein und/oder HCV-Virionen zum Beispiel auf der Oberfläche von infizierten Zellen immobilisiert sein müssen um den immunsuppressiven Effekt auf NK-Zellen zu bewirken. Andere Arbeiten beschrieben wiederum, dass der direkte Zell-zu-Zell-Kontakt von isolierten NK-Zellen mit HCV- infizierten Hepatozyten die NK-Zell Funktion und somit die Produktion von IFN- γ also auch die Degranulation und Lyse von Zielzellen hemmt.⁽¹²⁰⁾ Diese Ergebnisse müssen allerdings kritisch hinterfragt werden, da die Untersuchungen mit isolierten NK-Zellen durchgeführt wurden und daher der zytokin- bzw. kontaktabhängige Einfluss von weiteren Zellarten, welche die Immunantwort von NK-Zellen verbessern und optimieren können,⁽¹²¹⁾ nicht berücksichtigt wurde. Tatsächlich beschrieb eine Studie von Zhang et al., dass NK-Zellen, die in Anwesenheit von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) mit HCV-infizierten Hepatozyten inkubiert wurden, sogar aktiviert anstatt inhibiert wurden.⁽¹⁰⁷⁾ Serti und Werner et al. zeigten zuletzt, dass die Inhibierung der NK-Zell-Funktion und damit der Produktion des antiviral wirksamen IFN- γ durch die bei chronisch HCV-infizierten Patienten verminderte Aktivität von CD14⁺- Monozyten, welche NK-Zellen durch die Ausschüttung des Zytokins IL-18 stimulieren, bedingt ist.⁽³⁵⁾

Alle diese Publikationen wurden mit NK- bzw. mononukleären Zellen durchgeführt, die aus dem Blut von Patienten gewonnen wurden. Wir verglichen in unserer Arbeit nun die Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen in PBL und IHL nach Kontakt mit dem HCV. Wir konnten zunächst zeigen, dass intrahepatische NK-Zellen unabhängig vom Kontakt mit dem Virus mehr IFN- γ produzieren als NK-Zellen in PBL. Jedoch konnten wir weder für mononukleäre Zellen aus der Leber noch aus dem Blut einen Unterschied in der Produktion von IFN- γ nach Kontakt mit dem HCV nachweisen. Auch war die Ausschüttung von IFN- γ durch NK-Zellen weder in PBL noch in IHL von CD14⁺-

Monozyten beeinflusst. Wurden die mononukleären Zellen zusätzlich mit IL-12 und IL15 stimuliert, zeigte dies keinen Unterschied in den Ergebnissen.

Unsere Untersuchungen zeigen somit, dass NK-Zellen in PBL und IHL nicht zur vermehrten Produktion von IFN- γ durch den Kontakt mit dem HCV stimuliert werden. Da die mononukleären Zellen von nicht-infizierten Patienten stammten, können keine Rückschlüsse auf die veränderte Ausschüttung des Zytokins bei Patienten mit chronischen HCV-Infektionen gezogen werden. Die von Serti und Werner et. al beschriebene Abhängigkeit der IFN- γ Produktion durch NK-Zellen in PBL von CD14⁺-Monozyten konnten wir durch unsere Untersuchungen nicht bestätigen. Jedoch gilt auch für diese Versuchsreihe, dass die Ergebnisse durch eine nicht ausreichende Versuchszahl oder zu kurze Inkubationszeit beeinflusst sein können.

4.6 Mögliche Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse

In diesem Kapitel soll diskutiert werden, ob unsere Untersuchungsergebnisse durch die verschiedenen Arten der Zellbearbeitung beeinflusst wurden. Wir haben als mögliche Messfehlerquellen insbesondere die aufwendige Isolation von intrahepatischen Lymphozyten sowie die Eliminierung oder Isolierung von bestimmten Zellarten durch das MACS-Sorting ausgemacht. Diese sollen im Folgenden erörtert werden.

4.6.1 Isolation von intrahepatischen Lymphozyten

Im Gegensatz zur Isolation von mononukleären Zellen aus Patientenblut müssen bei der Isolation von intrahepatischen Lymphozyten zunächst mehrere Maßnahmen unternommen werden, um die IHL vom hepatischen Gewebe zu trennen. Dazu wird das vorhandene Lebergewebe wie in „2.6.2 *Isolation von mononukleären Zellen aus humanen Lebergewebe*“ beschrieben mit einem Verdauungspuffer versetzt, das Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert und nach Beendigung der Verdauungsreaktion durch ein Sieb gepresst. Anschließend wurde das Gemisch erneute zweimal durch Resuspendieren, Zentrifugieren und Sieben gewaschen. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass sich in der entstehenden Zellsuspension aus intrahepatischen Lymphozyten im Vergleich zu Lymphozyten aus dem Blut vermehrt kleine Gewebereste befinden. Insbesondere bei verfetteten und/oder zirrhotischen Lebern

scheint dies ein Problem zu sein. Die verbleibende Gewebestücke könnten die Untersuchungsergebnisse beeinflussen, in dem Sie Einfluss auf Zytokinproduktion, Vermittlung und den Zellkontakt von Lymphozyten untereinander, als auch auf den Kontakt mit HCV-infizierten Hepatozyten in der Ko-Kultur haben. Auch ein Effekt des Lebergewebes auf die Replikationsrate des HCV-Replikon Systems ist nicht auszuschließen.

Um diesen Effekt zu quantifizieren wurden B-Zellen aus BL und IHL isoliert und mit HCV-Replikon-Zellen analog zu den Ko-Kulturen mit mononukleären Zellen inkubiert. Es wurde bereits beschrieben, dass B-Zellen und von diesen produzierte neutralisierende Antikörper nicht zur Bekämpfung einer HCV-Infektion benötigt werden, wie an Patienten mit Hypogammaglobulinämie gezeigt wurde.⁽¹²²⁾ Ein größerer Anstieg von neutralisierenden Antikörpern wurde zwar bei chronischen HCV-Infektionen beschrieben, diesen ist es aber nicht möglich zu einer Ausheilung der Infektion oder einer Erkennung von viralen Fluchtmutationen zu führen.⁽¹²³⁾ Sie scheinen als eine geeignete Zellpopulation zu sein, um einen möglichen beeinflussenden Effekt der Zellisolation unabhängig von einer Immunantwort von Zellen zu sein, da die B-Zellen selber keinen Effekt auf die Virusreplikation haben sollten.

Die Virusreplikation von Replikon-Zellen ohne Ko-Kultur wird als 100% Replikationsrate als Referenzwert angenommen. Im Vergleich dazu zeigen Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit B-Zellen aus IHL im Median eine Replikationsrate von 17,61% und nach Ko-Kultur mit IHL eine Replikationsrate von 2,64%. Wurden die Replikon-Zellen mit B-Zellen aus PBL bzw. PBL inkubiert, wurden Replikationsraten von im Median 40,45% bzw. 8,10% gemessen.

HCV-Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL bzw. IHL zeigten somit eine signifikante niedrigere Replikationsrate als Replikon-Zellen, die mit aus PBL isolierten B-Zellen inkubiert wurden. Dieser Effekt ist der Immunantwort der lymphatischen Zellen zuzuschreiben und das Modell scheint somit valide, um einen antiviralen Effekt durch lymphatische Zellen zu bestimmen. Jedoch zeigt sich insbesondere nach Inkubation von B-Zellen aus IHL mit im Median 17,61% eine im Vergleich zu 40,45% nach Inkubation mit B-Zellen aus PBL reduzierte Replikationsrate von HCV-infizierten Zellen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es durch die Isolation von intrahepatischen Lymphozyten aus dem Lebergewebe zu Beeinflussung der

Untersuchungsergebnisse führen könnte. Dennoch können verlässliche Aussagen zur Immunantwort von intrahepatischen Lymphozyten und Lymphozyten aus dem Blut gemacht werden.

4.6.2 MACS-Sorting

Als weitere mögliche Messfehlerquelle haben wir das MACS- Sorting ausgemacht, bei dem gezielt Zelltypen aus PBL und IHL eliminiert oder isoliert werden. Wie in „2.7 *MACS Sorting*“ beschrieben wurde, werden beim MACS-Sorting etwa 50nm große Magnetpartikel, welche an Antikörper gebunden sind, mit der Zellsuspension aus PL oder IHL in Lösung gebracht. Dieser Komplex aus Magneteilchen und Antikörpern wird auch *MicroBead* genannt. Die Antikörper erkennen spezifische Strukturen auf den Zelloberflächen und binden die MicroBeads an die gewünschte Zellpopulation. Die somit markierten Zellen durch den autoMACS SeparatorTM von den übrigen Zellen getrennt. In unseren Untersuchungen eliminierten wir auf diese Weise CD56⁺- NK-Zellen und CD14⁺- Monozyten aus vollständigen PBL und IHL Populationen. Auch die Isolation von B-Zellen aus PBL und IHL wurde mittels dieser Methode durchgeführt.

Bei der Durchführung der LDH Assays zur Quantifizierung der Zytotoxizität von NK-Zellen in PBL und IHL fiel auf, dass die Ergebnisse die Ergebnisse sich teilweise widersprüchlich zu denen der Durchflusszytometrie und der Luciferase-Messungen verhielten. Insbesondere stach hervor, dass nach Eliminierung von CD56⁺- NK-Zellen aus PBL und IHL im Vergleich zur vollständigen Lymphozytenpopulationen signifikant mehr LDH nachzuweisen war. Dies würde darauf hindeuten, dass die antivirale und zytotoxische Aktivität in PBL und IHL ohne NK-Zellen erhöht ist. In unseren Untersuchungen, in denen dieselben Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie und Luciferase-Messung analysiert wurden, zeigte sich jedoch, dass das Gegenteil der Fall ist. Wir gehen davon aus, dass der beim MACS- Sorting auf die Zellen ausgeübte Stress durch hydrodynamische Kräfte und Magnetfelder teilweise zur Zerstörung von Zellen der zu bearbeitenden Zellsuspension führen kann. Da LDH ein Enzym ist, welches sich in allen Körperzellen befindet, steigt die Quantität des zu messenden LDH durch die Zellbearbeitung an, und führt später zu einer fehlerhaften und beeinflussten Messung der LDH Werte.

5 Zusammenfassung

Die Hepatitis C ist eine Infektionserkrankung des Menschen, welche durch das HCV verursacht wird. Weltweit sind etwa 170 Millionen Menschen mit HCV infiziert. Die HCV-Infektion zeichnet sich durch eine hohe Rate der Chronifizierung aus (bis zu 80%), die im Verlauf zu schweren Folgeerkrankungen wie der Ausbildung einer Leberzirrhose oder eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) führen kann. Die genaue Ursache für das hohe Maß von Chronifizierungen ist nicht genau bekannt. Es wurde allerdings beschrieben, dass NK-Zellen - spezielle Immunzellen, welche virusbefallene Körperzellen bekämpfen können - bei HCV-Infektionen wesentlich weniger aktiv sind, als dies bei anderen Viruserkrankungen der Fall ist.

Bei den meisten Publikationen zur Untersuchung der Reaktion des Immunsystems auf das HCV wurden ausschließlich aus humanem Blut isolierte Lymphozyten (PBL) analysiert. Das Ziel dieser Arbeit war es die Immunantwort auf das HCV durch intrahepatische Lymphozyten (IHL) zu untersuchen, neue Erkenntnisse zum genauen Pathomechanismus der Immunantwort zu erlangen und die Replizierbarkeit der Ergebnisse von Untersuchungen mit PBL zu überprüfen. Dies ist insofern relevant, als dass das HCV nur in Hepatozyten repliziert und daher primär mit den lokalen IHL in Kontakt tritt. Außerdem unterscheiden sich IHL von PBL in ihrer Zusammensetzung.

In unseren Untersuchungen wurden PBL sowie IHL eines Patienten mit Lunet-Zellen, welche mit einem HCV-Replikon transfiziert wurden in Ko-Kultur gegeben. Die verbleibende HCV-RNA Replikation der Replikon-Zellen nach der Ko-Kultur wurde anschließend mittels einer Luciferase-Messung bestimmt. Hierbei zeigte sich die HCV-RNA Replikation nach Ko-Kultur mit IHL signifikant vermindert. IHL haben somit einen stärkeren antivirale Effekt auf das HCV als PBL.

In weiteren Versuchsreihen wurden zusätzlich CD56⁺- NK-Zellen sowie CD14⁺- mononukleäre Zellen aus PBL und IHL entfernt und mit HCV-Replikon-Zellen in Ko-Kultur gebracht. Die HCV-RNA Replikation der Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit vollständigen PBL- bzw. IHL- Populationen war am niedrigsten. Wurden CD56⁺- NK-Zellen oder CD14⁺- Zellen aus den PBL und IHL entfernt, war die HCV-RNA Replikation der Replikon-Zellen nach der Ko-Kultur höher, der antivirale Effekt der Zellen ließ also nach. Sowohl in PBL als in IHL haben CD56⁺- NK-Zellen als auch CD14⁺- Zellen somit Einfluss auf die antivirale Aktivität.

Um zu ermitteln, durch welche Zytokine und Mechanismen der antivirale Effekt von NK-Zellen in PBL und IHL vermittelt wird, wurde nach Beendigung der Ko-Kulturen zudem eine Durchflusszytometrie durchgeführt. In dieser wurde die Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IFN- γ als auch die Expression des Zytotoxizitäts-Markers TRAIL durch die NK-Zellen gemessen. Dabei konnten relevante Unterschiede zwischen PBL und IHL festgestellt werden.

Zum einen zeigte sich, dass NK-Zellen in IHL nach Kontakt mit HCV mehr TNF- α produzieren als nach Kontakt mit Lunet-Zellen ohne Replikon. Dies ließ sich für NK-Zellen in PBL nicht nachweisen und könnte damit eine mögliche Erklärung für die höhere antivirale Aktivität von IHL sein. Des Weiteren konnte bei NK-Zellen in PBL, jedoch nicht in IHL, eine Abhängigkeit der Produktion von TNF- α durch CD14⁺-Zellen nachgewiesen werden. Zum anderen zeigte sich eine Abhängigkeit der Expression des Zytotoxizitäts-Markers TRAIL von CD14⁺-Zellen in IHL. Ein relevanter Unterschied in der Expression dieses Markers nach Kontakt mit dem HCV-Replikon im Vergleich zur Ko-Kultur mit Lunet-Zellen ohne Replikon konnte weder für PBL noch für IHL festgestellt werden.

Vergleicht man jedoch die generelle Ausschüttung bzw. Expression von TNF- α , IFN- γ , TRAIL und CD107a unabhängig vom Kontakt mit dem HCV, zeigte sich, dass IHL signifikant mehr von allen untersuchten Zytokinen produzieren und Zytotoxizitätsmarker exprimieren als PBL.

6 Ausblick

Die meisten Erkenntnisse, die wir über die Immunantwort auf das HCV haben, wurden durch Untersuchungen mit mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut gewonnen. In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass es Unterschiede in der Immunreaktion zwischen Blut- und Leberlymphozyten, insbesondere von NK-Zellen und Monozyten auf das HCV gibt. Insofern muss die Übertragbarkeit dieser Publikationen auf die realen Verhältnisse bei der Bekämpfung des Virus durch unsere Immunsystem in der Leber neu überdacht werden.

Unsere Untersuchungen zeigten zum einen, dass NK-Zellen in IHL im Vergleich zu NK-Zellen in PBL nach Kontakt mit dem HCV eine höhere antivirale Aktivität aufweisen. Die vermehrte Ausschüttung des Zytokins TNF- α durch intrahepatische NK-Zellen nach Kontakt mit dem HCV könnte dafür eine Ursache sein. Dieser Sachverhalt sollte jedoch weiter untersucht werden. So wäre von Interesse, ob die vermehrte Aktivierung von NK-Zellen in IHL durch weitere Zytokine vermittelt wird, welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Außerdem sollte erforscht werden, ob auch direkte Zellkontakte von NK-Zellen in PBL und IHL mit HCV-infizierten Zellen einen Einfluss auf die Aktivierung und damit den antiviralen Effekt dieser Zellen haben. Von Interesse wären auch, ob intrahepatische NK-Zellen unterschiedliche Differenzierungen zu NK-Zellen im peripheren Blut aufweisen und inwieweit dies Einfluss auf die antivirale Aktivität der Zellen hat. Diese weiteren Untersuchungen wären notwendig, um ein besseres Verständnis von den Ursachen für die Unterschiede in der Immunantwort durch intrahepatischen NK-Zellen im Vergleich zu NK-Zellen aus dem Blut zu erlangen.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass bei intrahepatischen Lymphozyten NK-Zellen und Monozyten ein essentieller Bestandteil der antiviralen Aktivität sind. Für weitere Forschung wäre von großem Interesse, ob auch bei mononukleären Zellen aus der Leber CD14⁺- Monozyten NK-Zellen durch IL-18 stimulieren, wie es durch Serti und Werner et al. für PBL beschrieben wurde. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob auch andere Immunzellen wie T-Zellen oder B-Zellen Einfluss auf intrahepatische NK-Zellen haben. Es ist möglich, dass sich Zelleinflüsse bei der Aktivierung von intrahepatischen NK-Zellen zeigen, welche bei NK-Zellen in PBL nicht nachweisen ließen.

Für unsere Arbeit wurden ausschließlich PBL und IHL von Probanden verwendet, welche nicht mit dem HCV infiziert waren. In mehreren Veröffentlichungen wie von Ahlenstiel et al., Oliviero et al. oder Serti und Werner et al. wurde jedoch gezeigt, dass Immunzellen von Patienten mit chronischen HCV-Infektionen anders auf das Virus reagieren als mononukleäre Zellen von gesunden Probanden. ^(32,33,35) Insofern wäre es von großem Interesse, ob sich diese Ergebnisse auch mit Immunzellen von virusinfizierten Patienten reproduzieren lassen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
CD	Cluster of Differentiation
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMA	ethidium monoazide
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FMO	fluorescence minus one
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
IFN	Interferon
IHL	Intrahepatische Lymphozyten
IL	Interleukin
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MHC	major histocompatibility complex
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBL	Periphere Blutlymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	tumor necrosis factor–related apoptosis inducing ligand

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Farbstoffe bei Oberflächenfärbungen.....	39
Tabelle 2: Verwendete Farbstoffe für Intrazellulären Färbungen	40
Tabelle 3: Verwendete Farbstoffe für Kompensationen.....	42

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flussdiagramm zu den Verlaufsformen der HCV-Infektion.....	13
Abbildung 2: Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation von Blut und Lebergewebe.....	29
Abbildung 3: Überblick über den allgemeinen Versuchsaufbau und experimentellen Ablauf	45

Abbildung 4: Vergleich der Luciferase Aktivität von Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit B-Zellen sowie PBL bzw. IHL.....	47
Abbildung 5: Die virale Aktivität von Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL und IHL im Vergleich.....	48
Abbildung 6: Vergleich der viralen Aktivität von Replikon-Zellen nach Ko-Kultur mit PBL bzw. IHL und PBL/ IHL nach Depletion von CD56 ⁺ -Zellen.....	50
Abbildung 7 Durchführung der Analyse von Daten aus der Durchflusszytometrie...	53
Abbildung 8: Frequenz und Expression von TNF- α produzierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle	56
Abbildung 9 Frequenz und Expression von TNF- α produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL im Vergleich	57
Abbildung 10: Frequenz und Expression von TNF- α produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL im Vergleich zu PBL ohne CD14 ⁺ und IHL ohne CD14 ⁺ nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen stimuliert mit IL-12 und IL-15.....	59
Abbildung 11: Frequenz und Expression von TRAIL produzierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle	61
Abbildung 12: Frequenz und Expression von IFN- γ produzierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle	63
Abbildung 13 Vergleich von Frequenz und Expression von IFN- γ produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL.....	64
Abbildung 14: Frequenz und Expression von TRAIL produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL im Vergleich zu PBL ohne CD14 ⁺ und IHL ohne CD14 ⁺ nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen	66
Abbildung 15: Frequenz und Expression von IFN- γ produzierenden NK-Zellen in PBL und IHL im Vergleich zu PBL ohne CD14 ⁺ und IHL ohne CD14 ⁺ nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen.....	67
Abbildung 16 Überblick über den Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zytotoxizität von NK-Zellen.....	69
Abbildung 17: Frequenz und Expression von CD107a exprimierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle	70
Abbildung 18: Frequenz und Expression von CD107a- exprimierenden NK-Zellen nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle nach Stimulation mit K562-Zellen für 18 und 4 Stunden	72

Abbildung 19: Frequenz und Expression von CD107a produzierenden NK-Zellen in PBL im Vergleich zu IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon.....	73
Abbildung 20: Frequenz und Expression von CD107a produzierenden NK-Zellen in PBL im Vergleich zu IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen und Lunet-Zellen ohne Replikon nach Stimulation mit K562-Zellen für 18 und 4 Stunden.....	74
Abbildung 21: LDH-Quantität von PBL und IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Replikon	76
Abbildung 22: LDH-Quantität von PBL und IHL nach Ko-Kultur mit Replikon-Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Replikon mit Stimulation in Form von K562-Zellen für 18 und 4 Stunden	77
Abbildung 23 LDH-Quantität von PBL im Vergleich zu IHL nach Ko-Kultur mit Replikon- Zellen ohne Stimulation und nach Stimulation mit K562 für 18 und 4 Stunden	78

7.4 Literaturverzeichnis

1. Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Lukashev AN, Gmyl A, Coutard B, Adam A, Ritz D, Leijten LM, van Riel D, Kallies R, Klose SM, Gloza-Rausch F, Binger T, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Bourgarel M, Rupp D, Hoffmann B, Schlegel M, Kümmerer BM, Krüger DH, Schmidt-Chanasit J, Setién AA, Cottontail VM, Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Osterrieder K, Bartenschlager R, Matthee S, Beer M, Kuiken T, Reusken C, Leroy EM, Ulrich RG, Drosten C. Evidence for novel hepaciviruses in rodents. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):585. doi:10.1371/journal.ppat.1003438
2. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrisons Innere Medizin.* 19th ed. Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, editors. New York, Berlin, Stuttgart: McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; Thieme; 2016. 21193420 p. ger.
3. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989;244(4902):359–62.
4. Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 8th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. 954 p. (Springer-Lehrbuch). ger.
5. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014;59(1):318–27. doi:10.1002/hep.26744
6. PetruzzIELLO A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2016;22(34):7824–40. doi:10.3748/wjg.v22.i34.7824
7. Miao Z, Xie Z, Miao J, Ran J, Feng Y, Xia X. Regulated Entry of Hepatitis C Virus into Hepatocytes. *Viruses.* 2017;9(5). doi:10.3390/v9050100
8. Modrow S. *Molekulare Virologie.* 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2010. 730 p. ger.
9. Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K, Muchmore E, Hughes AL, Houghton M, Walker CM. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee

- is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(7):2755–9.
10. Schreier E, Höhne M. Hepatitis C - Epidemiologie und Prävention. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2001;44(6):554–61. doi:10.1007/s001030170002
 11. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, El Khoby T, Abdel-Wahab Y, Aly Ohn ES, Anwar W, Sallam I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000;355(9207):887–91.
 12. Strickland GT. Liver disease in Egypt: hepatitis C superseded schistosomiasis as a result of iatrogenic and biological factors. *Hepatology*. 2006;43(5):915–22. doi:10.1002/hep.21173
 13. Hof H, Dörries R. *Medizinische Mikrobiologie: 540 Abbildungen*. 6th ed. Stuttgart: Thieme; 2017. 752 p. (Duale Reihe). ger.
 14. Robert Koch-Institut. Hepatitis C RKI-Ratgeber für Ärzte: Infektionsweg [Internet]. 2018 [updated 2018 Jan 31]. Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisC.html#doc2389942bodyText5
 15. Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM. Hepatitis C. *The Lancet*. 2015;385(9973):1124–35. doi:10.1016/S0140-6736(14)62401-6
 16. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Charles Piette J, Opolon P. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. *Arthritis & Rheumatism*. 1999;42(10):2204–12. doi:10.1002/1529-0131(199910)42:10<2204:AID-ANR24>3.0.CO;2-D
 17. Ramos-Casals M, Zignego AL, Ferri C, Brito-Zerón P, Retamozo S, Casato M, Lamprecht P, Mangia A, Saadoun D, Tzioufas AG, Younossi ZM, Cacoub P. Evidence-based recommendations on the management of extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2017;66(6):1282–99. doi:10.1016/j.jhep.2017.02.010
 18. Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savey L, Desbois AC, Saadoun D. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Ther Adv Infect Dis*. 2016;3(1):3–14. doi:10.1177/2049936115585942

19. Puchner KP, Berg T. Extrahepatische Manifestationen der chronischen Hepatitis-C-Virus-Infektion [Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection]. *Z Gastroenterol.* 2009;47(5):446–56. ger. doi:10.1055/s-0028-1109296
20. Younossi Z, Park H, Henry L, Adeyemi A, Stepanova M. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. *Gastroenterology.* 2016;150(7):1599–608. doi:10.1053/j.gastro.2016.02.039
21. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S58-68. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.012
22. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996;334(11):693–9. doi:10.1056/NEJM199603143341104
23. Mazzaferro V, Bhoori S, Sposito C, Bongini M, Langer M, Miceli R, Mariani L. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: An evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transpl.* 2011;17 Suppl 2S44-57. doi:10.1002/lt.22365
24. European Medicines Agency. Epclusa [Internet]: European Medicines Agency. 2018 [updated 2018 Jun 4; cited 2018 Jun 5]. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004210/human_med_001997.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
25. Rink L, Kruse A, Haase H. Das Immunsystem: Ein Überblick. In: *Immunologie für Einsteiger.* 2nd ed. Berlin: Springer Spektrum; 2015. 130 p. ger.
26. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SLH, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology.* 2005;42(4):501–10. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.034
27. Rink L, Kruse A, Haase H. Das angeborene Immunsystem. In: *Immunologie für Einsteiger.* 2nd ed. Berlin: Springer Spektrum; 2015. 270 p. (Lehrbuch). ger.
28. Somanchi SS, McCulley KJ, Somanchi A, Chan LL, Lee DA. A Novel Method for Assessment of Natural Killer Cell Cytotoxicity Using Image Cytometry. *PLoS ONE.* 2015;10(10):e0141074. doi:10.1371/journal.pone.0141074

29. Frese M, Schwärzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology*. 2002;35(3):694–703. doi:10.1053/jhep.2002.31770
30. Vahedi F, Lee AJ, Collins SE, Chew MV, Lusty E, Chen B, Dubey A, Richards CD, Feld JJ, Russell RS, Mossman KL, Ashkar AA. IL-15 and IFN- γ signal through the ERK pathway to inhibit HCV replication, independent of type I IFN signaling. *Cytokine*. 2018. doi:10.1016/j.cyto.2018.06.006
31. Podhorzer A, Machicote A, Belén S, Lauferman L, Inventarza O, Montal S, Marciano S, Galdame O, Podesta LG, Fainboim L. Intrahepatic and peripheral blood phenotypes of natural killer and T cells: Differential surface expression of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Immunology*. 2018;154(2):261–73. doi:10.1111/imm.12880
32. Ahlenstiel G, Titerence RH, Koh C, Edlich B, Feld JJ, Rotman Y, Ghany MG, Hoofnagle JH, Liang TJ, Heller T, Rehermann B. Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon- α -dependent manner. *Gastroenterology*. 2010;(138):138:325–335. doi:10.1053/j.gastro.2009.08.066
33. Oliviero B, Varchetta S, Paudice E, Michelone G, Zaramella M, Mavilio D, Filippi F de, Bruno S, Mondelli MU. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology*. 2009;137(3):1151-60, 1160.e1-7. doi:10.1053/j.gastro.2009.05.047
34. Rehermann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: Differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med*. 2013;19(7):859–68. doi:10.1038/nm.3251
35. Serti E, Werner JM, Chattergoon M, Cox AL, Lohmann V, Rehermann B. Monocytes activate natural killer cells via inflammasome-induced interleukin 18 in response to hepatitis C virus replication. *Gastroenterology*. 2014;147(1):209-220.e3. doi:10.1053/j.gastro.2014.03.046
36. Schütt C, Bröker B. Was gehört zum Immunsystem. In: *Grundwissen Immunologie*. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011. 1 Online-Ressource.
37. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol*. 2014;61(3):660–71. doi:10.1016/j.jhep.2014.04.026

38. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 1982;42(9):3858–63.
39. Bartenschlager R, Pietschmann T. Efficient hepatitis C virus cell culture system: What a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(28):9739–40. doi:10.1073/pnas.0504296102
40. Meier V, Ramadori G. Hepatitis C virus virology and new treatment targets. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(3):329–50. doi:10.1586/eri.09.12
41. Drexler HG. The leukemia-lymphoma cell line factsbook. ScienceDirect (Online service). San Diego, CA: Academic Press; 2000. 733 p. (Factsbook series). eng.
42. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1975;45(3):321–34.
43. Park K-H, Park H, Kim M, Kim Y, Han K, Oh E-J. Evaluation of NK cell function by flowcytometric measurement and impedance based assay using real-time cell electronic sensing system. *Biomed Res Int.* 2013;2013210726. doi:10.1155/2013/210726
44. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 1990;11(2):231–8. doi:10.1002/cyto.990110203
45. Bánfalvi G, editor. Cell cycle synchronization: Methods and protocols. New York: Humana Press; 2017. 1 online resource (xv, 354. (Methods in molecular biology; vol. 1524).
46. Claus M, Greil J, Watzl C. Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples. *J Immunol Methods.* 2009;341(1-2):154–64. doi:10.1016/j.jim.2008.11.006
47. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:669–92. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557
48. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo J-L, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* 2009;325(5940):612–6. doi:10.1126/science.1175202

49. BD Bioscience. Technical Data Sheet Protein Transport Inhibitor (Containing Brefeldin A) [Internet] [cited 2019 Aug 21]. Available from: <https://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/555029.pdf>
50. Sack U. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: S. Karger; 2007. 1112 p. eng.
51. Ethidium monoazide (EMA) for exclusion of dead cells by FACS [Internet] [cited 2019 Aug 21]. Available from: <https://med.virginia.edu/flow-cytometry-facility/wp-content/uploads/sites/170/2015/10/EMA-Procedure.pdf>
52. Eskelinen E-L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med.* 2006;27(5-6):495–502. doi:10.1016/j.mam.2006.08.005
53. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods.* 2004;294(1-2):15–22. doi:10.1016/j.jim.2004.08.008
54. Varchetta S, Mele D, Mantovani S, Oliviero B, Cremonesi E, Ludovisi S, Michelone G, Alessiani M, Rosati R, Montorsi M, Mondelli MU. Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2012;56(3):841–9. doi:10.1002/hep.25723
55. Nattermann J. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut.* 2006;55(6):869–77. doi:10.1136/gut.2005.076463
56. Guidotti LG, Chisari FV. IMMUNOBIOLOGY AND PATHOGENESIS OF VIRAL HEPATITIS. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2006;1(1):23–61. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230
57. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: A tale of coevolution and coexistence. *J. Clin. Invest.* 2009;119(7):1745–54. doi:10.1172/JCI39133
58. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(3):215–29. doi:10.1038/nri1573
59. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, Walker CM. Memory CD8+ T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Experimental Medicine.* 2003;197(12):1645–55. doi:10.1084/jem.20030239

60. Lechner F, Wong DKH, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus. *Journal of Experimental Medicine*. 2000;191(9):1499–512. doi:10.1084/jem.191.9.1499
61. Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJM, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertolotti A. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8+ T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology*. 1999;117(6):1386–96. doi:10.1016/S0016-5085(99)70289-1
62. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med*. 1996;2(10):1104–8. doi:10.1038/nm1096-1104
63. Grakoui A. HCV Persistence and Immune Evasion in the Absence of Memory T Cell Help. *Science*. 2003;302(5645):659–62. doi:10.1126/science.1088774
64. Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertolotti A, Ferrari C. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *Journal of Virology*. 2007;81(8):4215–25. doi:10.1128/JVI.02844-06
65. McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahon BJ, Kemper M, Allen TM, Gretch DR, Rosen HR. Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J. Clin. Invest*. 2010;120(12):4546–57. doi:10.1172/JCI43127
66. Penna A, Pilli M, Zerbini A, Orlandini A, Mezzadri S, Sacchelli L, Missale G, Ferrari C. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2007;45(3):588–601. doi:10.1002/hep.21541
67. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, Hanson HL, Steinberg JP, Masopust D, Wherry EJ, Altman JD, Rouse BT, Freeman GJ, Ahmed R, Grakoui A. Liver-Infiltrating Lymphocytes in Chronic Human Hepatitis C Virus Infection Display an Exhausted Phenotype with High

- Levels of PD-1 and Low Levels of CD127 Expression. *Journal of Virology*. 2007;81(6):2545–53. doi:10.1128/JVI.02021-06
68. Schurich A, Khanna P, Lopes AR, Han KJ, Peppas D, Micco L, Nebbia G, Kennedy PTF, Geretti A-M, Dusheiko G, Maini MK. Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2011;53(5):1494–503. doi:10.1002/hep.24249
69. Wedemeyer H, He X-S, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired Effector Function of Hepatitis C Virus-Specific CD8 + T Cells in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2002;169(6):3447–58. doi:10.4049/jimmunol.169.6.3447
70. Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, Timm J, Kuntz M, Blum HE, Pircher H, Thimme R, Walker CM. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on Exhausted HCV-Specific CD8+ T Cells Is Linked to Antigen Recognition and T Cell Differentiation. *PLoS Pathog*. 2010;6(6):e1000947. doi:10.1371/journal.ppat.1000947
71. Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang K-M, Gale M. Synergistic Reversal of Intrahepatic HCV-Specific CD8 T Cell Exhaustion by Combined PD-1/CTLA-4 Blockade. *PLoS Pathog*. 2009;5(2):e1000313. doi:10.1371/journal.ppat.1000313
72. Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, Castelblanco N, Kuchroo V, Gretch DR, Rosen HR. Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4+ and CD8+ T Cells. *Journal of Virology*. 2009;83(18):9122–30. doi:10.1128/JVI.00639-09
73. Schlaphoff V, Lunemann S, Suneetha PV, Jaroszewicz J, Grabowski J, Dietz J, Helfritz F, Bektas H, Sarrazin C, Manns MP, Cornberg M, Wedemeyer H, Walker CM. Dual Function of the NK Cell Receptor 2B4 (CD244) in the Regulation of HCV-Specific CD8+ T Cells. *PLoS Pathog*. 2011;7(5):e1002045. doi:10.1371/journal.ppat.1002045
74. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DAA, Wherry EJ. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10(1):29–37. doi:10.1038/ni.1679

75. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJW, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HLA. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2005;41(4):771–8. doi:10.1002/hep.20649
76. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang K-M. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated in persistent HCV infection. *Hepatology*. 2003;38(6):1437–48. doi:10.1016/j.hep.2003.09.026
77. Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao J-M, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu Y-X, Wang F-S. Circulating and Liver Resident CD4 + CD25 + Regulatory T Cells Actively Influence the Antiviral Immune Response and Disease Progression in Patients with Hepatitis B. *J Immunol*. 2006;177(1):739–47. doi:10.4049/jimmunol.177.1.739
78. Das A, Hoare M, Davies N, Lopes AR, Dunn C, Kennedy PTF, Alexander G, Finney H, Lawson A, Plunkett FJ, Bertoletti A, Akbar AN, Maini MK. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(9):2111–24. doi:10.1084/jem.20072076
79. Radziejewicz H, Ibegbu CC, Hon H, Bédard N, Bruneau J, Workowski KA, Knechtle SJ, Kirk AD, Larsen CP, Shoukry NH, Grakoui A. Transient CD86 Expression on Hepatitis C Virus-Specific CD8 + T Cells in Acute Infection Is Linked to Sufficient IL-2 Signaling. *J Immunol*. 2010;184(5):2410–22. doi:10.4049/jimmunol.0902994
80. Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8+ T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J. Clin. Invest*. 2004;113(7):963–72. doi:10.1172/JCI200420515
81. Alatrakchi N, Graham CS, van der Vliet HJJ, Sherman KE, Exley MA, Koziel MJ. Hepatitis C Virus (HCV)-Specific CD8+ Cells Produce Transforming Growth Factor That Can Suppress HCV-Specific T-Cell Responses. *Journal of Virology*. 2007;81(11):5882–92. doi:10.1128/JVI.02202-06
82. Han S, Asoyan A, Rabenstein H, Nakano N, Obst R. Role of antigen persistence and dose for CD4+ T-cell exhaustion and recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(47):20453–8. doi:10.1073/pnas.1008437107

83. Aubert RD, Kamphorst AO, Sarkar S, Vezys V, Ha S-J, Barber DL, Ye L, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(52):21182–7. doi:10.1073/pnas.1118450109
84. Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O, Nolan N, Hegarty J, O'Farrelly C. Resident human hepatitis lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol*. 1998;28(1):84–90. doi:10.1016/S0168-8278(98)80206-7
85. Bonorino P, Ramzan M, Camous X, Dufeu-Duchesne T, Thélu M-A, Sturm N, Dariz A, Guillermet C, Pernollet M, Zarski J-P, Marche PN, Leroy V, Jouvin-Marche E. Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J Hepatol*. 2009;51(3):458–67. doi:10.1016/j.jhep.2009.05.030
86. Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AET, Emerson SS, Shuhart MC, Gretch DR. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect *ex vivo* cytolytic killing. *Hepatology*. 2006;43(3):573–80. doi:10.1002/hep.21073
87. Grégoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev*. 2007;220(1):169–82. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00563.x
88. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or Adaptive Immunity?: The Example of Natural Killer Cells. *Science*. 2011;331(6013):44–9. doi:10.1126/science.1198687
89. Chiu S, Bharat A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2016;21(3):239–45. doi:10.1097/MOT.0000000000000313
90. Douglas DN, Kneteman NM. Generation of improved mouse models for the study of hepatitis C virus. *European Journal of Pharmacology*. 2015;759:313–25. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.022
91. Bukh J. Animal Models for the Study of Hepatitis C Virus Infection and Related Liver Disease. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1279-1287.e3. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.016

92. Lohmann V. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science*. 1999;285(5424):110–3. doi:10.1126/science.285.5424.110
93. Blight KJ. Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture. *Science*. 2000;290(5498):1972–4. doi:10.1126/science.290.5498.1972
94. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(7):482–96. doi:10.1038/nrmicro3046
95. Zhang Z, Zhang S, Zou Z, Shi J, Zhao J, Fan R, Qin E, Li B, Li Z, Xu X, Fu J, Zhang J, Gao B, Tian Z, Wang F-S. Hypercytolytic activity of hepatic natural killer cells correlates with liver injury in chronic hepatitis B patients. *Hepatology*. 2011;53(1):73–85. doi:10.1002/hep.23977
96. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell*. 1997;91(5):661–72. doi:10.1016/S0092-8674(00)80453-5
97. Rosmaraki EE, Douagi I, Roth C, Colucci F, Cumano A, Di Santo JP. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur. J. Immunol*. 2001;31(6):1900–9. doi:10.1002/1521-4141(200106)31:6<1900:AID-IMMU1900>3.0.CO;2-M
98. Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: A question of balance. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:257–86. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090700
99. Takeda K, Cretney E, Hayakawa Y, Ota T, Akiba H, Ogasawara K, Yagita H, Kinoshita K, Okumura K, Smyth MJ. TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood*. 2005;105(5):2082–9. doi:10.1182/blood-2004-08-3262
100. Sung Jin Kim, Koho Iizuka, Hyun Seok P Kang, Ayontunde Dokun, Anthony R. French, Suellen Greco, Wayne M. Yokoyama. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nature immunology*. 2002;3(6):523–8. English (US). doi:10.1038/ni796
101. Kazuyoshi Takeda, Yoshihiro Hayakawa, Mark J. Smyth, Nobuhiko Kayagaki, Noriko Yamaguchi, Shigeru Kakuta, Yoichiro Iwakura, Hideo Yagita, Ko Okumura. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

- in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature medicine*. 2001;7(1):94–100. doi:10.1038/83416
102. Burt BM, Plitas G, Stableford JA, Nguyen HM, Bamboat ZM, Pillarisetty VG, DeMatteo RP. CD11c identifies a subset of murine liver natural killer cells that responds to adenoviral hepatitis. *J Leukoc Biol*. 2008;84(4):1039–46. doi:10.1189/jlb.0408256
 103. Wu X, Chen Y, Wei H, Sun R, Tian Z. Development of murine hepatic NK cells during ontogeny: Comparison with spleen NK cells. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012759765. doi:10.1155/2012/759765
 104. Ishiyama K, Ohdan H, Ohira M, Mitsuta H, Arihiro K, Asahara T. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology*. 2006;43(2):362–72. doi:10.1002/hep.21035
 105. Vermijlen D, Luo D, Froelich CJ, Medema JP, Kummer JA, Willems E, Braet F, Wisse E. Hepatic natural killer cells exclusively kill splenic/blood natural killer-resistant tumor cells by the perforin/granzyme pathway. *J Leukoc Biol*. 2002;72(4):668–76.
 106. Tu Z, Bozorgzadeh A, Crispe IN, Orloff MS. The activation state of human intrahepatic lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(1):186–93. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03415.x
 107. Zhang S, Saha B, Kodys K, Szabo G. IFN- γ production by human natural killer cells in response to HCV-infected hepatoma cells is dependent on accessory cells. *J Hepatol*. 2013;59(3):442–9. doi:10.1016/j.jhep.2013.04.022
 108. Pompili M. Tumor necrosis factor- α inhibitors and chronic hepatitis C: A comprehensive literature review. *WJG*. 2013;19(44):7867. doi:10.3748/wjg.v19.i44.7867
 109. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nölchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*. 1992;103(1):264–74. doi:10.1016/0016-5085(92)91122-K
 110. Zylberberg H, Rimaniol A-C, Pol S, Masson A, Groote DD, Berthelot P, Bach J-F, Bréchet C, Zavala F. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: A correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol*. 1999;30(2):185–91. doi:10.1016/S0168-8278(99)80060-9

111. Nelson DR, Lim HL, Marousis CG, Fang JWS, Davis GL, Shen L, Urdea MS, Kolberg JA, Lau JYN. Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus infection. *Digestive Diseases and Sciences*. 1997;42(12):2487–94. doi:10.1023/A:1018804426724
112. Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of Tumor Necrosis Factor (TNF- α)-mediated Apoptosis by Hepatitis C Virus Core Protein. *J. Biol. Chem*. 1998;273(4):2256–9. doi:10.1074/jbc.273.4.2256
113. Stegmann KA, Björkström NK, Veber H, Ciesek S, Riese P, Wiegand J, Hadem J, Suneetha PV, Jaroszewicz J, Wang C, Schlaphoff V, Fytilli P, Cornberg M, Manns MP, Geffers R, Pietschmann T, Guzmán CA, Ljunggren H–G, Wedemeyer H. Interferon- α -Induced TRAIL on Natural Killer Cells Is Associated With Control of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1885-1897.e10. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.051
114. Shin E-C, Seifert U, Kato T, Rice CM, Feinstone SM, Kloetzel P-M, Rehermann B. Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J. Clin. Invest*. 2006;116(11):3006–14. doi:10.1172/JCI29832
115. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV. Nonlinear partial differential equations and applications: Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(24):15669–74. doi:10.1073/pnas.202608199
116. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of Natural Killer Cells through Engagement of CD81 by the Major Hepatitis C Virus Envelope Protein. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;195(1):35–42. doi:10.1084/jem.20011124
117. Tseng C-TK, Klimpel GR. Binding of the Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 to CD81 Inhibits Natural Killer Cell Functions. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;195(1):43–50. doi:10.1084/jem.20011145
118. Crotta S, Brazzoli M, Piccioli D, Valiante NM, Wack A. Hepatitis C virions subvert natural killer cell activation to generate a cytokine environment permissive for infection. *J Hepatol*. 2010;52(2):183–90. doi:10.1016/j.jhep.2009.11.003

119. Yoon JC, Shiina M, Ahlenstiel G, Rehermann B. Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology*. 2009;49(1):12–21. doi:10.1002/hep.22624
120. Yoon JC, Lim J-B, Park JH, Lee JM. Cell-to-Cell Contact with Hepatitis C Virus-Infected Cells Reduces Functional Capacity of Natural Killer Cells. *Journal of Virology*. 2011;85(23):12557–69. doi:10.1128/JVI.00838-11
121. Newman KC, Korbel DS, Hafalla JC, Riley EM. Cross-Talk with Myeloid Accessory Cells Regulates Human Natural Killer Cell Interferon- γ Responses to Malaria. *PLoS Pathog*. 2006;2(12):e118. doi:10.1371/journal.ppat.0020118
122. Semmo N, Lucas M, Krashias G, Lauer G, Chapel H, Klenerman P. Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy. *Blood*. 2006;107(11):4570–1. doi:10.1182/blood-2005-11-4522
123. Hahn T v., Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C Virus Continuously Escapes From Neutralizing Antibody and T-Cell Responses During Chronic Infection In Vivo. *Gastroenterology*. 2007;132(2):667–78. doi:10.1053/j.gastro.2006.12.008

8 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn PD Dr. Jens Werner für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, sowie seine geduldige und stets unterstützende Betreuung danken. Unsere zahlreichen Gespräche werden mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben. Außerdem bin ich Herrn Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt, Herrn Prof. Dr. Edward Geissler sowie PD Dr. Matthias Hornung zu Dank verpflichtet, welche diese experimentelle Arbeit ermöglicht haben.

Zudem möchte ich Rita Brunner-Ploss und Anna Höhn für Ihre wertvolle und liebevolle Unterstützung sowie fachliche Beratung danken. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Meine besonderen Dank gilt meinen Eltern, Martin Hess und Margit Dobler-Hess sowie meinen Partner Mario Pfaller für die unermüdliche Unterstützung, Motivation, das Verständnis und das allzeit offene Ohr. Tief verbunden und dankbar bin ich außerdem meinem Bruder als auch meine Großeltern, die das stützende Rückgrat einer wunderbaren Familie komplettieren und mir jederzeit mit Rat und Tat beiseite standen.

