

Die Bedeutung von Natürlichen Killerzellen für die Hepatitis C Virus Infektion

Kumulative Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Martin Benjamin Krämer

aus Freudenberg

Bonn, 2013

Angefertigt mit Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

des Universitätsklinikums Bonn

Direktor: Prof. Dr. Christian P. Strassburg

Tag der Mündlichen Prüfung:

17.10.2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Jacob Nattermann

2. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Koch

Erscheinungsjahr:

2013

Aus urheberrechtlichen Gründen sind die mit dieser Dissertation veröffentlichten Publikationen nicht eingefügt. Sie wurden in folgenden „Peer-to-Peer“ Zeitschriften veröffentlicht:

Krämer, B. et al. Regulation of NK cell trafficking by CD81. *Eur. J. Immunol.* 39, 3447–3458 (2009).

Krämer, B. et al. Natural killer p46^{High} expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatology*. Baltimore, Md 56, 1201–1213 (2012).

Krämer, B. et al. Do λ -IFNs IL28A and IL28B act on human natural killer cells? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E519–E520 (2011).

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
2	KAPITEL 2: EINFÜHRUNG	8
2.1	HEPATITIS C	8
2.1.1	HEPATITIS C VIRUS	8
2.1.2	ÜBERTRAGUNG UND TROPISMUS	8
2.1.3	EPIDEMIOLOGIE	8
2.1.4	VERLAUF	8
2.1.5	DIAGNOSE	9
2.1.6	THERAPIE	9
2.1.7	IMMUNANTWORT GEGEN HEPATITIS C	9
2.2	NK ZELLEN	10
2.3	NK ZELLEN BEI DER HCV INFEKTION	11
2.3.1	AKUTE HCV INFEKTION	11
2.3.2	CHRONISCHE HCV INFEKTION	12
2.3.3	ANTIFIBROTISCHE AKTIVITÄT VON NK ZELLEN	12
2.3.4	DIREKTE INTERAKTION MIT HCV PROTEINEN	13
2.3.5	HEPATISCHE REKRUTIERUNG VON NK ZELLEN IN DER HCV INFEKTION	13
2.4	ZIELE DER ARBEIT	14
3	KAPITEL 3: REGULIERUNG DER NK ZELLMIGRATION DURCH CD81	15
3.1	ZUSAMMENFASSUNG KAPITEL 3	15
4	KAPITEL 4: NKP46HIGH NK ZELLEN BEI DER HCV INFEKTION	17
4.1	ZUSAMMENFASSUNG KAPITEL 4	17
5	KAPITEL 5: VERÄNDERN DIE Λ-INTERFERONE IL28A UND IL28B FUNKTIONEN VON NK ZELLEN?	19
5.1	ZUSAMMENFASSUNG KAPITEL 5	19
6	DISKUSSION	20
7	VERZEICHNISSE	25
7.1	LITERATURVERZEICHNIS	25
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	29
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	30
8.1	PUBLIKATIONEN ALS ERSTAUTOR	30
8.2	WEITERE PUBLIKATIONEN ALS KOAUTOR:	30
8.3	VORTRÄGE AUF KONGRESSE	32
8.4	POSTER AUF KONGRESSE	32
9	ERKLÄRUNG	33

1 Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus verursacht eine chronische Entzündung der Leber, die nach langjährigem Verlauf zur Leberzirrhose und der Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) führen kann. Hierbei scheint ein dysreguliertes Immunsystem von zentraler Bedeutung zu sein. Vorangegangene immunogenetische Studien belegen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle der Natürlichen Killer Zellen (NK Zellen) für den Verlauf der HCV Infektion. Als Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind NK Zellen wichtige Effektorzellen in der frühen Bekämpfung von Tumoren und Virusinfektionen. Bisher wird kontrovers diskutiert, wie sich funktionelle sowie phänotypische Eigenschaften von NK Zellen bei der HCV Infektion verändern und welchen Einfluss dies auf Viruseliminierung und antifibrotische Aktivität hat.

Das Ziel dieser Dissertation war es, NK Zell-spezifische Mechanismen zu entschlüsseln, die im Zusammenhang mit der Immunpathogenese der Hepatitis C stehen. Dazu wurden NK Zellen hinsichtlich des Migrationsverhaltens (Kapitel 3), der antiviralen/antifibrotischen Eigenschaften (Kapitel 4) sowie der Interaktion mit dem Zytokin IL28B (Kapitel 5) untersucht, dessen Gen-Polymorphismus (rs12979860) ein starker Prädiktor für Therapieansprechen/ Spontanausheilung ist.

Eine effiziente Immunantwort ist von einer funktionierenden Migration von Immunzellen zum Inflammationsherd abhängig. Da dem HCV Hüllprotein E2 (HCV E2) Migrationsmodulierende Eigenschaften zugeschrieben werden, haben wir das Migrationspotential von NK Zellen nach Interaktion von HCV E2 und seinem Rezeptor CD81 untersucht. Interessanterweise konnten wir hierbei eine Steigerung des Migrationsverhaltens und eine damit verbundene erhöhte Anzahl polarisierter NK Zellen feststellen. Die Polarisierung von Aktinfilamenten und Adhäsionsmolekülen war mit einer gesteigerten Phosphorylierung von sogenannten ERM(Ezrin, Radixin und Moesin)-Proteinen assoziiert, denen bei der Polarisierung eine regulative Bedeutung zukommt. Damit beschrieben wir erstmals einen Zusammenhang zwischen CD81-Ligation und ERM-Phosphorylierung. Ebenso konnten in polarisierten NK Zellen phosphorylierte ERM-Proteine mit CD81 und dem Adhäsionsmolekül CD44 ko-lokalisiert werden. Die in unserer Studie gezeigten intrazellulären Mechanismen scheinen für die CD81 induzierte NK Zell-Migration verantwortlich zu sein. Der mögliche Einfluss dieses Phänomens auf die Immunpathogenese der HCV Infektion wird in aktuellen Studien analysiert.

Nach den Untersuchungen zum modulierten Migrationsverhalten beschreiben wir in Kapitel 4 den Immunphänotyp von intrahepatischen NK Zellen bei Hepatitis C. Mit unserer Arbeit

konnten wir erstmals zeigen, dass die intrahepatische Expression von NKp46 eine wesentliche Bedeutung bei der natürlichen Immunität gegen HCV einnimmt. Zunächst konnten wir *in vitro* in einem HCV-Replikationsmodell nachweisen, dass NK Zellen mit hoher NKp46 Expression (NKp46High) die Replikation stärker hemmen können als NK Zellen mit niedriger Expression (NKp46Dim). Ebenso zeigen NKp46High Zellen *in vitro* ein hohes antifibrotisches Potential, indem sie aktivierte hepatische Sternzellen effizienter abtöten als NKp46Dim NK Zellen. Nach bisher veröffentlichten Studien sind hepatische Sternzellen im aktivierten Zustand durch Deposition von Extrazellulärer Matrix (EZM) maßgeblich an der Fibrosebildung beteiligt. In Blockierungsexperimenten konnten wir die spezifische Rolle von NKp46 bei der antiviralen und antifibrotischen Aktivität von NK Zellen weiter bestätigen. Viel relevanter für die Bedeutung von NKp46 bei der HCV-spezifischen Immunität erscheinen die Befunde zur *ex vivo* Analyse von intrahepatischen NK Zellen bei HCV(+) Patienten. In unseren Untersuchungen war der Anteil intrahepatischer NKp46High NK Zellen negativ mit Viruslast und Fibrosegrad assoziiert. Somit wird NKp46 als interessantes Zielmolekül für neue, immunmodulierende Therapieansätze zukünftig von Interesse sein.

In Kapitel 5 wird der Einfluss von IL28B (Typ III-Interferon) auf die Funktion von NK Zellen diskutiert. Ein Polymorphismus in Nähe des IFNL3 Gens (rs12979860) konnte kürzlich von anderen Arbeitsgruppen als starker Prädiktor für den Verlauf der HCV Infektion identifiziert werden. In Folge-Studien wurde der Polymorphismus (rs12979860) mit dem Genotyp eines NK Zellrezeptors (KIR) kombiniert, wodurch sich der Verlauf besser vorhersagen ließ. Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass NK Zellen und Typ III Interferone synergistisch interagieren können. Dies wurde in unserer Studie genauer untersucht. Im Unterschied zu den Rezeptoren für Typ I und Typ II-Interferonen konnten wir nachweisen, dass NK Zellen den Rezeptor für Typ III-Interferone nicht exprimieren. Folglich hatte in unserer Studie rekombinantes IL28B keinen direkten Einfluss auf die Funktion von NK Zellen. Dies konnten wir sowohl für die zytolytische Aktivität als auch für die Sezernierung von IFN- γ belegen. Allerdings konnten indirekte Interaktionen über andere immunkompetente Zellen im peripheren Blut ausgeschlossen werden. Somit ist aktuell unklar, welchen Einfluss IL28B tatsächlich auf die HCV Infektion hat.

Zusammenfassend belegen die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde, dass NK Zellen eine zentrale Bedeutung bei antiviralen/antifibrotischen Aktivitäten bei der HCV Infektion zukommt und HCV-assoziierte Veränderungen dieser Zellpopulation an der Pathogenese der Hepatitis C beteiligt sind.

2 Kapitel 2: Einführung

2.1 Hepatitis C

2.1.1 Hepatitis C Virus

Das Virus wurde erstmals 1989 als Non-A-non-B Hepatitis beschrieben¹ und wird dem Genus der Familie der Flaviviridae zugeordnet². Es besitzt eine ca. 9,6 kb lange Einzelstrang-RNA in positiver Orientierung (+ssRNA) und infiziert ausschließlich Menschen und Schimpansen. Da die RNA-Polymerase keine Fehlerkorrektur aufweist, besteht eine hohe genetische Vielfalt zwischen einzelnen Isolaten und das Virus kommt beim Patienten als sogenannte Quasispezies vor. Insgesamt sind 6 Genotypen bekannt, die in weitere Subtypen unterteilt werden können. In Europa und Amerika sind vorwiegend die Subtypen 1a, 1b und 3a vertreten. In Afrika dominieren die Genotypen 4 und 5, in Asien 1b, 2, 3a, 5a und 6a, in Afrika 4a und 5a³.

2.1.2 Übertragung und Tropismus

Die Übertragung von HCV erfolgt fast ausschließlich auf parenteralem Wege über Blut, Spritzen, Blutprodukte und selten auch Organtransplantationen. Hepatitis C Viren replizieren überwiegend in Hepatozyten. Allerdings konnte HCV-RNA auch aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert werden³⁻⁵. Der Zelleintritt wird vorwiegend über das Tetraspanin CD81, den Scavenger receptor BI und die Tight-Junctions Moleküle Claudin und Occludin vermittelt⁶.

Das HCV Hüllprotein E2 bindet mit hoher Affinität an CD81. Dabei wurde *in vitro* gezeigt, dass die Interaktion von rekombinanten HCV E2-Glykoproteinen mit CD81 relevante Immunfunktionen verändert, u.a. die Aktivitäten von NK Zellen.

2.1.3 Epidemiologie

Weltweit sind über 150 Millionen Menschen infiziert (0,2 bis 1,5%) und 350000 Betroffene sterben jährlich an den Folgen einer chronischen Infektion^{7,8}. In Deutschland sieht die Situation relativ günstig aus. Es wird von einer Prävalenz von 0,5% ausgegangen.

2.1.4 Verlauf

Das Virus infiziert die Leberzellen und zeigt eine hohe Chronifizierungsrate, wobei die chronische Infektion zur Leberfibrose, Zirrhose und im terminalen Stadium zum hepatozellulärem Karzinom (HCC) führen kann⁹. Während der akuten Phase zeigt nur ein geringer Teil der Infizierten klinische Symptome (20 bis 50%). Dabei ist das Risiko bei nicht-

symptomatischen Patienten besonders groß, eine chronische Entzündung (80 bis 90%) zu entwickeln¹⁰.

2.1.5 Diagnose

Die Diagnose erfolgt durch Nachweis spezifischer Antikörper gegen HCV-Proteine sowie von konservierten Bereichen des Virusgenoms (HCV-RNA) nach Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Leberbiopsien können zuverlässige Informationen über das Stadium der Krankheit geben. Diese werden allerdings ohne weitere Besonderheiten heute nur noch selten durchgeführt, da das Fortschreiten zur Fibrose zunehmend besser auch ohne Biopsie z.B. mittels transienter Elastographie erstellt werden kann.

2.1.6 Therapie

Seit 2011 wird als Standardtherapie pegyliertes Interferon- α (IFN α) in Kombination mit Ribavirin und bei einer Genotyp 1 Infektion zusätzlich mit einem Proteaseinhibitor (Telaprevir oder Boceprevir) eingesetzt. Liegt in einem Zeitraum von mindestens 6 Monaten nach Therapieende eine negative PCR vor, so kann von einer anhaltenden Viruseliminierung (SVR, Sustained Virologic Response) ausgegangen werden¹¹. Die Erfolgsquoten für eine SVR betragen 75% bei therapienaiven Personen mit Genotyp 1 Infektion. Bei mehr als der Hälfte der therapienaiven Patienten, sowie bei Patienten mit einem Rückfall, kann die Therapie bei raschem Ansprechen sogar auf 24 Wochen verkürzt werden. Die Erfolgsraten bei Therapieversagern und Patienten mit Leberzirrhose sind geringer¹².

2.1.7 Immunantwort gegen Hepatitis C

Das HCV ist ein nicht zytopathisches Virus, das allerdings zu den Pathogenen gehört, die sehr erfolgreich das Immunsystem verändern können, um so eine persistierende Infektion zu etablieren. So wurden Fehlfunktionen bei regulatorischen T Zellen^{13,14}, CD4+ T Helferzellen sowie zytotoxischen CD8+ T Zellen beschrieben¹⁵⁻¹⁸. Darüber hinaus entdeckte man bei HCV Patienten eine klonale Expansion von B Zellen, deren Antikörper unwirksam gegen die Infektion sind^{19,20}. Folglich hat das Virus Strategien entwickeln können, um der adaptiven Immunantwort zu entgehen. Dies wird auch als Ursache für die hohen Chronifizierungsraten gesehen.

Indessen haben in den letzten Jahren neuere Studien belegt, dass eine effektive Immunantwort entscheidend von dem angeborenen Immunsystem mitbestimmt wird. Vor kurzem wurde der IL28B Polymorphismus (rs12979860) als wichtiger wirtsgenetischer Prädiktor für eine Hepatitis C Viruselimination identifiziert²¹. IL28B gehört zu den Typ III

Interferonen, auch λ -Interferone genannt. Diese wirken antiviral, können die Bildung von Typ I Interferonen induzieren und immunregulatorisch auf das adaptive Immunsystem wirken. λ -Interferone werden hauptsächlich von plasmazytoiden Dendritischen Zellen gebildet²². Der IL28B Polymorphismus (rs12979860) befindet sich in einer intergenischen Region zwischen dem IL28A und IL28B Genlocus. Bisher ist umstritten, ob eine Assoziation zur IL28B-Zytokin Expression besteht²³. Daher wird diskutiert, ob der Polymorphismus womöglich einen regulativen Einfluss auf andere Gene des angeborenen Immunsystems hat und dadurch den Verlauf der Infektion beeinflusst.

Auch die Regulation der Interferon stimulierenden Gene (ISG) scheint hierbei einen Einfluss zu nehmen²⁴. Bisher ist aber nicht exakt bekannt, welche Mechanismen dem zugrunde liegen. Für die effektive Viruseliminierung scheinen also weitere Faktoren relevant zu sein.

2.2 NK Zellen

NK Zellen entwickeln sich wie andere Lymphozyten aus Vorläuferzellen im Knochenmark und zirkulieren später im Blutkreislauf. Sie sind in der Lage, maligne und Virus-infizierte Zellen über invariante Rezeptoren zu erkennen und zu zerstören. Zielzellen werden mittels zytotoxischer Granula direkt lysiert oder durch sogenannte Todesliganden wie TRAIL und FasL in Apoptose geführt. NK Zellen können Zytokine wie Interferone sezernieren, die antiviral auf Zielzellen oder immunregulatorisch auf immunkompetente Zellen wirken. Humane NK Zellen machen 5 bis 15% des zirkulierenden Lymphozytenpools aus. Sie sind über die Expression CD56+CD3- definiert und können in die zwei CD56 Subpopulationen CD56BrightCD3- und CD56DimCD3- unterteilt werden. CD56DimCD3- NK Zellen sind bezüglich der Reifung weiter fortgeschritten und haben im peripheren Blut einen Anteil von ca. 90% der NK Zellen²⁵. Ohne Zytokin-Stimulus sind sie zytotoxisch aktiver als unreife CD56BrightCD3- NK Zellen, die im Gegensatz dazu als bessere Zytokin-Produzenten gelten^{26,27}. Die Aktivität der NK Zellen wird über die Balance zwischen inhibitorischen und aktivierenden Signalen reguliert, die von der Expression der NK Zell-Rezeptoren und ihrer korrespondierenden Liganden auf den Zielzellen abhängig sind. Zu den inhibitorischen Rezeptoren gehören NKG2A/CD94, bestimmte KIR (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor) sowie CD85j. Die beiden letzteren Moleküle erkennen MHC I-Komplexe. Nach der „missing-self“ Theorie werden diese auf Tumor- oder Virus-infizierten Zellen meist herunterreguliert, um der adaptiven Immunantwort zu entgehen. Aufgrund des fehlenden inhibitorischen

Signals können die Zielzellen dennoch lysiert werden. Zu den aktivierenden Rezeptoren der natürlichen Zytotoxizität (NCR) zählen NKp30, Nkp44 und Nkp46. Darüber hinaus gibt es noch eine Reihe weiterer aktivierender Rezeptoren²⁸. NCR sind direkt an der Erkennung von Pathogen-assoziierten Strukturen beteiligt. Dabei gehört Nkp46 zu dem wichtigsten Vertreter dieser Gruppe. So wurden Liganden von Nkp46 bisher auf Virus-infizierten Zellen, Tumorzellen und aktivierten hepatischen Sternzellen (HSC) nachgewiesen²⁹⁻³². Diese sind aber erst teilweise identifiziert. *In vitro* korrelierte die NKp46 Expression der NK Zellen mit dem Fähigkeit zur Lyse der Zielzellen³³.

2.3 NK Zellen bei der HCV Infektion

Immunogenetische Studien weisen auf einen möglicherweise entscheidenden Einfluss von NK Zellen auf den Verlauf einer HCV Infektion. Khakoo et al. zeigten erstmals eine Assoziation des KIR-Genotyps mit dem Verlauf einer HCV Infektion. Hierbei war die spontane Viruseliminierung bei Trägern des Genotyps für den inhibitorischen NK Zellrezeptor KIR2DL3 und seines Liganden HLA-C1 besonders hoch³⁴. In Bindungsstudien wurde für diese Paarung eine besonders schwache Interaktion festgestellt. Die Autoren vermuten, dass dadurch das inhibitorische Signal besonders leicht überwunden und Virus-infizierte Zellen effizienter abgetötet werden können. Allerdings galt diese Assoziation nur für Patienten, die sich über Nadelstichverletzungen mit geringen Dosen HCV infiziert hatten. Dennoch wurden auch in anderen Patientenkohorten Assoziationen von KIR/HLA Genotyppaarungen mit spontaner Ausheilung oder erfolgreichem Therapieansprechen festgestellt³⁵. Diese Studien haben die Bedeutung von NK Zellen bei der HCV-spezifischen Immunabwehr weiter hervorgehoben.

2.3.1 Akute HCV Infektion

In der akuten HCV Infektion wurden funktionelle und immunophänotypische Veränderungen von NK Zellen festgestellt. Einerseits nimmt der Anteil der CD56Bright Subpopulation im peripheren Blut zu. Es wird spekuliert, dass in der akuten Phase CD56Dim Zellen vermehrt aus der Peripherie in die Leber rekrutiert werden³⁶. Darüber hinaus konnte ein bestimmter Phänotyp mit Spontanausheilung assoziiert werden. Dabei zeigten NK Zellen der später

spontan ausgeheilten Patienten eine signifikant niedrigere Expression der Rezeptoren NKp46, NKp30 sowie NKG2D als Patienten, die nachfolgend eine chronische Infektion entwickelten³⁶. Die natürliche Zytotoxizität steigt nach akuter Infektion im Vergleich zur chronischen Infektion und gesunden Kontrollen an, wobei keine Unterschiede zwischen Patienten bestehen, die nach akuter Phase spontan ausheilten oder eine chronische Infektion entwickelten^{37,38}. Es ist aber wichtig in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass sich diese Daten nur auf periphere NK Zellen beziehen, da in der akuten Phase aus ethischen Gründen keine Leberbiopsien entnommen werden.

2.3.2 Chronische HCV Infektion

Auch bei der chronischen HCV Infektion basieren die meisten Studien auf Daten von NK Zellen aus dem peripheren Blut. Wie in der akuten Infektion nimmt der Anteil der CD56Dim Population in Relation zu den CD56Bright Zellen ab. Unsere Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus im Vergleich zu Gesunden eine verminderte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKp46 und NKp30 sowie eine erhöhte Expression des inhibitorischen Rezeptors NKG2A feststellen. Dieser Immunphänotyp war mit einer gestörten zytolytischen Aktivität assoziiert³⁹. Dagegen sehen andere Arbeitsgruppen eine Hochregulation der Expression von aktivierenden Rezeptoren wie NKp46⁴⁰⁻⁴². Diese divergenten Ergebnisse werden mit Unterschieden in der Kohortenzusammensetzung und verschiedenen methodischen Ansätzen erklärt^{42,43}.

Dennoch wurde in mehreren Studien bei peripheren NK Zellen eine höhere Zytotoxizität bei verminderter IFN- γ Antwort beobachtet. Diese Polarisierung steht offensichtlich mit der Entwicklung einer chronischen Infektion sowie den in der Folge auftretenden Leberzellschädigungen in Zusammenhang: durch die gestörte IFN- γ Sekretion kann das Virus nicht effizient eliminiert werden, während durch die fortwährende zytotoxische Aktivität der NK Zellen die Leber geschädigt wird⁴⁴.

2.3.3 Antifibrotische Aktivität von NK Zellen

Während der Fibrogenese kommt es zu einem starken Umbau der Leber, der hauptsächlich durch aktivierte Hepatische Sternzellen (HSC) vermittelt wird, die zu Myofibroblasten transdifferenzieren und große Mengen extrazellulärer Matrix produzieren. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass NK Zellen durch Abtöten aktivierter Sternzellen die Fibrose regulieren können⁴⁵. Unsere Arbeitsgruppe konnte hierzu *in vitro* nachweisen, dass auch

beim Mensch eine Apoptose-Induktion aktivierter HSC durch humane NK Zellen möglich ist⁴⁶. Dieser Befund wird durch die Beobachtung verstärkt, dass der aktivierende Rezeptor NKp46 anti-HSC Aktivität vermitteln kann, da Liganden auf aktivierten HSC exprimiert werden²⁹. Somit wirken sich Fehlfunktionen von NK Zellen bei Hepatitis C möglicherweise nicht nur auf die Viruseliminierung, sondern auch auf die antifibrotische Aktivität aus⁴⁵.

2.3.4 Direkte Interaktion mit HCV Proteinen

Das Virus repliziert hauptsächlich intrahepatisch in Hepatozyten⁴. Daher finden vor allem dort direkte Einflüsse auf immunkompetente Zellen statt. So wurde gezeigt, dass HCV Core Protein die Expression von MHC-I auf Hepatozyten hochreguliert⁴⁷. Dies könnte eine mögliche Evasionsstrategie sein, um der Lyse durch NK Zellen zu entgehen. Eine weitere Strategie stellt die HCV-induzierte Stabilisierung der Oberflächenexpression des nicht-klassischen MHC Klasse I Moleküls HLA-E auf der Oberfläche von infizierten Zellen dar, da hierdurch über einen NKG2A-vermittelten Mechanismus die NK Zell-Aktivität gehemmt wird⁴⁸.

Eine andere direkte Interaktion ist die Bindung des HCV E2 Hüllproteins an das Tetraspanin CD81. Tetraspanine sind Membranproteine, die Lipidrafts organisieren und großen Einfluss auf Aktivierung, Migration und Proliferation haben⁴⁹. Dementsprechend konnten hier nach HCV E2-CD81 Interaktion Effekte beobachtet werden. So wurden Aktivierung und Proliferation von NK Zellen gehemmt⁵⁰. Bezüglich der migratorischen Eigenschaften konnte unsere Arbeitsgruppe bei Dendritischen Zellen eine Dysregulation feststellen⁵¹. Auswirkungen auf die Migration von NK Zellen sind bisher nicht untersucht worden.

2.3.5 Hepatische Rekrutierung von NK Zellen in der HCV Infektion

Damit NK Zellen effizient Virus-infizierte Zellen bekämpfen und andere immunkompetente Zellen regulieren, müssen sie zuverlässig zum Infektionsherd migrieren können. Dieser Vorgang wird über proinflammatorische Chemokine und Adhäsionsmoleküle vermittelt. Dabei wandern NK Zellen hauptsächlich über die Chemokinrezeptoren CCR2 (welcher das Chemokin CCL2 bindet), CCR5(CCL5, CCL7, CCL8) und CXCR3(CXCL9-11) in die Leber⁵². Die intrahepatische Expression der Chemokine CXCL10 (IP10) und CCL5 (RANTES) konnte bereits mit dem Entzündungsgrad positiv korreliert werden^{53,54}. Allerdings nimmt insgesamt der Anteil der NK Zellen am intrahepatischen Lymphozytenpool während chronischen Infektion ab⁵⁵. Zudem kommt es in der chronischen Phase zu einer veränderten Verteilung der CD56

Subpopulationen, bei der die Anzahl der CD56Dim Zellen im peripheren Blut abnimmt^{37,38}. Interessanterweise wird dies bei der Hepatitis B Infektion nicht beobachtet⁵⁵⁻⁵⁸. Deshalb vermutet man, dass hier HCV-spezifische Effekte zu einer veränderten Verteilung der CD56Dim NK Zellen beitragen⁵⁵. Die hierbei zugrundeliegenden Mechanismen sind noch unerforscht.

2.4 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Studien war, NK Zell-spezifische Mechanismen aufzudecken, die mit der Immunpathogenese bei der HCV-Infektion in Zusammenhang stehen.

Die erste Frage beschäftigt sich mit den migratorischen Eigenschaften von NK Zellen bei der HCV Infektion. Eine funktionierende Lymphozytenmigration ist eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente Immunantwort. Vorarbeiten unserer Gruppe konnten zeigen, dass nach Interaktion mit dem HCV E2 Hüllprotein die Migration von Dendritischen Zellen gestört ist. Interessanterweise nimmt in der chronischen Infektion die Anzahl der NK Zellen in der Leber ab. Aus diesem Grund haben wir wie in Kapitel 3 beschrieben, die migratorische Kapazität von NK Zellen nach Interaktion mit dem HCV E2 Hüllprotein E2 analysiert.

Eine dysregulierte Rekrutierung hat möglicherweise einen erheblichen Einfluss auf Phänotyp und Funktion der intrahepatischen NK Zellen und infolgedessen auch auf die Immunpathogenese der Hepatitis C, da in der Leber entscheidende antivirale Prozesse stattfinden. Folglich sollten wie in Kapitel 4 beschrieben, intrahepatische NK Zellen bei der chronischen HCV Infektion eingehend untersucht werden. Hier lag der Fokus insbesondere auf dem aktivierenden Rezeptor NKp46. Bisher veröffentlichten Studien zeichnen ein uneinheitliches Bild und untersuchten den Rezeptor hauptsächlich auf peripheren NK Zellen. Im Detail sollte die intrahepatische NKp46 Expression in Hinblick auf antifibrotische und antivirale Eigenschaften analysiert werden.

Das Kapitel 5 behandelt einen bedeutsamen Faktor, der NK Zellen in der Hepatitis C beeinflussen könnte. Hier hat sich ein Polymorphismus im IFNL3 Gen (λ -Interferon) als guter Prädiktor für den Verlauf einer HCV Infektion herausgestellt. Wird allerdings dieser mit dem Genotyp eines NK Zellrezeptors (KIR) kombiniert, lässt sich der Infektionsverlauf noch besser vorhersagen. Das gab Grund zur Annahme, dass NK Zellen und IL28B synergistisch interagieren können und folglich Einfluss auf den Verlauf der Infektion nehmen. Daher sollte wie in diesem Kapitel beschrieben, überprüft werden, ob rekombinantes IL28B die Aktivität von NK Zellen modulieren kann.

3 Kapitel 3: Regulierung der NK Zellmigration durch CD81

Publikation:

Krämer B, Schulte D, Körner C, Zwank C, Hartmann A, Michalk M, Söhne J, Langhans B, Nischalke HD, Coenen M, Möhl C, Vogt A, Hennenberg M, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. Regulation of NK cell trafficking by CD81. 2009. European Journal of Immunology.

3.1 Zusammenfassung Kapitel 3

Das Hepatitis C Virus greift über verschiedene Mechanismen in die Regulation des Immunsystems des Wirts ein. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung des HCV Hüllproteins E2 (HCV E2) an das Tetraspanin CD81 auf immunkompetenten Zellen die zytotoxische Aktivität von NK Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten vermindert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Interaktion von HCV E2 mit CD81 die Migration von Dendritischen Zellen hemmt. Daher untersuchten wir den möglichen Einfluss von HCV E2 auf das Migrationsverhalten von NK Zellen.

Dazu wurde in der Boydenkammer die Migration von NK Zellen nach Stimulation mit immobilisiertem HCV E2 oder anti-CD81 analysiert. Zudem wurden die Expression und Verteilung des Adhäsionsmoleküls CD44 auf den NK Zellen mittels Durchflusszytometrie bzw. Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, nachdem die NK Zellen mit immobilisiertem HCV E2 oder CD81 Antikörper inkubiert wurden. Eine effiziente Lymphozyten-Migration bedingt eine Polarisierung von Aktinfilamenten und Adhäsionsmolekülen wie CD44. Diese werden in einer Membranvorstülpung, dem sogenannten Uropod, konzentriert. Sogenannte ERM (Ezrin, Radixin und Moesin)-Proteine können diese Umverteilung im phosphorylierten Zustand vermitteln und haben damit einen entscheidenden Einfluss auf die Migration von Lymphozyten. Daher wurden Expression und Phosphorylierungszustand der ERM-Proteine unter CD81-Stimulation durchflusszytometrisch und mittels Western Blot analysiert. Die Phosphorylierung der ERM-Proteine wird durch unterschiedliche Tyrosin-Kinasen vermittelt. Um deren Einfluss bei der CD81-Stimulation zu untersuchen, wurden Inhibitoren gegen die Kinasen ROCK und PKC verwendet.

Der Ligand von CD44 ist Hyaluronsäure, ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix (EM). Die Interaktion mit EM-Komponenten spielt bei der Transmigration durch Endothelzellen eine wichtige Rolle. Daher sollte in einem Adhäsions-Assay überprüft werden, ob die Interaktion mit HCV E2 die Bindung an Hyaluronsäure verändert.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine Stimulation der NK Zellen mit immobilisiertem HCV E2 deren Migration signifikant erhöht. In Blockierungsexperimenten konnte

nachgewiesen werden, dass dieser Effekt über das Tetraspanin CD81 vermittelt wurde. Zudem konnten wir nachweisen, dass die CD81/HCV E2-Interaktion zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERM-Proteinen (pERM) führte, wobei CD81 im Uropod mit pERM ko-lokalisiert war. Dies scheint für die HCV E2-induzierte NK Zell-Migration von Bedeutung, da die E2/CD81 vermittelte Chemotaxis mit spezifischen Inhibitoren gegen die Kinasen ROCK und PKC geblockt werden konnte.

Neben einer Steigerung der NK Zell-Motilität war nach CD81-Stimulation eine deutliche Zunahme der Adhäsion an Hyaluronsäure nachweisbar. Hierbei konnte eine CD81-vermittelte Umverteilung von CD44 mit höherer Expression im Uropod und Ko-Lokalisation mit pERM als zugrundeliegender Mechanismus identifiziert werden. Dies könnte die Transmigration durch Endothelzellen und damit die hepatische Rekrutierung von NK Zellen erhöhen.

Zusammengefasst konnten wir in unseren Experimente nachweisen, dass die Interaktion von HCV E2 mit CD81 die migratorische Kapazität von NK Zellen steigert. Dabei kommt es zu einer veränderten Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen, die mit CD81 interagieren und zu einer veränderten Phosphorylierung von Proteinen, die am Zustandekommen der Migration wesentlich beteiligt sind. Derartige Veränderungen migratorischer Eigenschaften von NK Zellen könnten die bei der HCV-Infektion beobachtete veränderte Kompartimentalisierung von NK Zellen mit verursachen.

4 Kapitel 4: NKp46High NK Zellen bei der HCV Infektion

Publikation:

Krämer B, Körner C, Keschull M, Glässner A, Eisenhardt M, Nischalke HD, Alexander M, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. 2012. Hepatology.

4.1 Zusammenfassung Kapitel 4

NK Zellen sind sowohl für den Verlauf der akuten als auch für die Immunpathogenese der chronischen HCV Infektion von zentraler Bedeutung.

Die Aktivität von NK Zellen wird durch das Zusammenspiel aktivierender und hemmender NK Zell-Rezeptoren reguliert. Hierbei spielt insbesondere der NK Zell Rezeptor NKp46 eine wichtige Rolle bei der NK Zellaktivierung. Daher untersuchten wir die Bedeutung dieses Rezeptors für die Modulation der antiviralen sowie der antifibrotischen Eigenschaften von NK Zellen in der chronischen HCV Infektion.

Bei extra- und intrahepatischen NK Zellen konnten Subpopulationen mit hoher (NKp46High) und niedriger NKp46 Expression (NKp46Dim) identifiziert werden. Hierbei war die Frequenz von NKp46High NK Zellen intrahepatisch signifikant höher als im peripheren Blut. In funktionellen Assays stellten sich NKp46High gegenüber NKp46Dim als die funktionell potenteren Zellen heraus. So konnte anhand des HCV Replikon-Modells nachgewiesen werden, dass NKp46High NK Zellen die Virusreplikation effektiver hemmen als NKp46Dim NK Zellen. Blockierungen mit spezifischen Antikörpern zeigten, dass diese Aktivität überwiegend über die Sezernierung von IFN- γ vermittelt wird. In weiteren Blockierungsexperimenten mit intra- und extrahepatischen NK Zellen konnten wir nachweisen, dass der NKp46-Rezeptor hierbei eine wichtige Rolle spielt.

Interessanterweise war die intrahepatische Frequenz von NKp46High Zellen negativ mit der Viruslast assoziiert, was die *in vivo* Relevanz unserer Befunde unterstreicht.

Die chronische HCV Infektion ist eine der Hauptursachen für den fibrotischen Umbau der Leber. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass NK Zellen antifibrotisch wirken, indem sie aktivierte Hepatische Sternzellen (HSC) abtöten. Folglich war die antifibrotische Aktivität der

beiden NKp46 Subpopulationen von besonderem Interesse. Hierbei fand sich in Leberproben HCV-infizierter Patienten eine inverse Korrelation zwischen der Häufigkeit intrahepatischer NKp46^{High} NK Zellen und dem Fibrosegrad. Passend dazu zeigten NKp46^{High} Zellen *in vitro* eine stärkere zytotoxische Aktivität gegen primäre HSC als NKp46^{Dim} Zellen. Blockierungsexperimente mit NKp46-spezifischen Antikörpern belegten, dass dieser Rezeptor auch an der Modulation der anti-fibrotischen NK Zell-Aktivität beteiligt ist.

Diese Ergebnisse weisen auf eine hohe antivirale und antifibrotische Aktivität von intrahepatischen NKp46^{High} Zellen hin und belegen die Bedeutung des NKp46 Rezeptors in der HCV-Infektion. NKp46 stellt somit ein mögliches Zielmolekül für zukünftige immunmodulierende Therapien der Hepatitis C dar.

5 Kapitel 5: Verändern die λ -Interferone IL28A und IL28B Funktionen von NK Zellen?

Publikation:

Krämer B, Eisenhardt M, Glässner A, Körner C, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. Do λ -interferons IL28A and IL28B act on human natural killer cells? 2011. PNAS.

5.1 Zusammenfassung Kapitel 5

Der IL28B Polymorphismus (rs12979860) ist einer der stärksten immungenetischen Prädiktoren für den Verlauf einer HCV Infektion und das Ansprechen auf eine Interferon-basierte HCV-Therapie. Dring et al. zeigten, dass die Kombination dieser genetischen Variante mit dem Genotyp eines NK Zellrezeptors den positiven Vorhersagewert (PPV) weiter steigert. Die Autoren vermuteten daher eine synergistische Interaktion zwischen IL28B und NK Zellen. In funktionellen Assays konnten sie scheinbar durch Inkubation von NK Zellen mit rekombinantem IL28B die Sekretion von IFN- γ hemmen. Basierend auf diesen Ergebnissen diskutierten die Autoren, dass die IL28B-induzierte Reduktion der IFN- γ Sekretion zu einer Verminderung der chronischen Entzündung führen könnte, was den Verlauf der Hepatitis C positiv beeinflussen könnte. Da der IL28B Rezeptor (IFN- λ R1) bisher nicht auf Lymphozyten nachgewiesen werden konnte, haben wir in dieser Studie untersucht, ob tatsächlich ein direkter Einfluss von λ -Interferonen auf NK Zellen vorliegt. Zuerst konnten wir zeigen, dass der IFN- λ R1 Rezeptor auf keiner der untersuchten peripheren Zell- Populationen (NK Zellen, B Zellen, NKT Zellen und CD4+/CD8+ T Zellen) exprimiert wird. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen hatte die Stimulation mit rekombinantem IL28A/B keinen Einfluss auf Zytotoxizität und IFN- γ Sekretion der isolierten NK Zellen. Um einen indirekten Effekt durch andere immunkompetente Zellen zu prüfen, wurden unter denselben Bedingungen mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) stimuliert. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen. Lediglich bei einem von 8 Probanden war nach Stimulation eine erhöhte IFN- γ Aktivität festzustellen.

Somit konnten wir eine direkte Interaktion zwischen IL28A/B und NK Zellen ausschließen.

6 Diskussion

Die Hepatitis C ist weltweit eine der Hauptursachen für chronische Lebererkrankungen. Im Verlauf der chronischen Infektion kann es hierbei zum fibrotischen Umbau der Leber und der Entwicklung einer Leber-Zirrhose sowie eines hepatozellulären Karzinoms kommen. Natürliche Killer (NK) Zellen sind Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, die maligne und Virus-infizierte Zellen direkt abtöten können. Immungenetische Studien belegen, dass ihnen bei der spontanen Ausheilung der HCV Infektion eine wesentliche Bedeutung zukommt³⁵. Ebenso sind NK Zellen wesentlich an antifibrotischen Prozessen beteiligt⁴⁵. Allerdings scheinen bei der HCV Infektion wichtige Funktionen der NK Zellen dysreguliert zu sein^{43,44,59}. In der vorliegenden Arbeit sollten Mechanismen der fehlgeleiteten NK Zellfunktionen in der HCV Infektion entschlüsselt werden. Dazu wurden NK Zellen hinsichtlich des Migrationsverhaltens, der antiviralen/antifibrotischen Eigenschaften sowie der potentiellen Interaktion mit dem Zytokin IL28B untersucht, dessen Gen-Polymorphismus (rs12979860) ein starker Prädiktor für die Viruseliminierung ist.

Für eine effiziente Immunantwort ist eine funktionierende Rekrutierung von Immunzellen unabdingbar. Daher untersuchten wir in Kapitel 3 den möglichen Einfluss der HCV Infektion auf die Migration von NK Zellen und hierbei insbesondere den Einfluss der Interaktion von HCV E2 mit CD81. Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war die Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, dass die hepatische Akkumulierung von Dendritischen Zellen bei der chronischen HCV Infektion möglicherweise durch eine HCV E2/CD81-induzierte Hemmung der DC-Migration bedingt ist⁵¹. Es stellte sich die Frage, ob die Migration von NK Zellen einer ähnlichen Modulation unterliegt und damit an der Immunpathogenese der Hepatitis C beteiligt ist. Interessanterweise wurde das migratorische Potential nach Interaktion mit HCV E2 deutlich erhöht. Hierbei konnten wir eine erhöhte Phosphorylierung der ERM Proteine, die eine Umverteilung von Aktinfilamenten und Adhäsionsmolekülen wie CD44 bedingte, als zugrundeliegenden Mechanismus identifizieren. Dieser Zusammenhang wurde zwischenzeitlich in anderen Studien bestätigt⁶⁰.

Aktuell wird kontrovers diskutiert, ob die Interaktion von HCV E2 mit CD81 von physiologischer Relevanz ist. Bis vor wenigen Jahren fehlten für HCV-Interaktionsexperimente geeignete Modelle mit Viruspartikeln. Daher wurden in den entsprechenden Versuchen rekombinante HCV Proteine verwendet. Die Kreuzvernetzung von CD81 mit immobilisiertem HCV E2 hemmte hierbei Zytotoxizität und Zytokinsekretion

von NK Zellen⁵⁰. Allerdings zeigten erste Experimente mit nicht-infektiösen HCV Pseudopartikeln (HCVpp) keinen Effekt⁶¹ oder sogar eine Aktivierung von NK Zellen⁶². Im Gegensatz dazu wurde im HCV-Zellkultur-System (HCVcc) mit infektiösen Viruspartikeln eine Inhibierung nachgewiesen⁶³. Anscheinend tritt diese auf, wenn eine großflächige Kreuzvernetzung von CD81 zustande kommt, wie die Experimente mit immobilisiertem HCV E2 bzw. CD81 spezifischen Antikörper nahelegen oder wenn, wie im HCVcc Modell, sehr viele Viruspartikel auf der Hepatozytenoberfläche binden. Lösliche HCV Pseudo-Partikel scheinen diesen Effekt nicht zu vermitteln.

Somit muss in zukünftigen Studien geklärt werden, ob es in der infizierten Leber zur flächendeckenden Kreuzvernetzung von CD81 kommt oder ob lediglich wenige lösliche Viruspartikel an NK Zellen binden.

Eine veränderte Verteilung von NK Subpopulationen in der chronischen HCV Infektion könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass die Rekrutierung von NK Zellen möglicherweise durch HCV E2 moduliert wird. So nimmt der Anteil der zirkulierenden CD56Dim Zellen in der Hepatitis C deutlich ab⁵⁵. Möglicherweise wandert diese Population vermehrt in die Leber. Passend dazu ist die CD81 Expression auf CD56Dim höher als auf CD56Bright Zellen⁶⁴. Da hepatische Kontrollen von Gesunden fehlen, lässt sich diese These nicht beweisen. Hier lohnt sich möglicherweise der Vergleich zur Hepatitis B Infektion, bei der sich der Anteil zirkulierender CD56Dim Zellen nicht verändert⁵⁵⁻⁵⁸. Dies spricht dafür, dass es jenseits der inflammatorischen Leber-Rekrutierung von NK Zellen einen HCV-spezifischen Einfluss auf die NK Zell-Kompartimentalisierung gibt. Die Veränderung der NK Zell-Migration durch die HCV E2/CD81 Interaktion könnten einen solchen HCV-spezifischen Mechanismus darstellen. Hierbei könnten Viruspartikel, die auf dem Sinusendothel gebunden sind⁶⁵, den hepatischen Influx ins Leberparenchym erhöhen. Davon betroffen wären vor allen Dingen CD56Dim Zellen, welche CD81 hoch exprimieren. In der chronischen Infektion nimmt allerdings der gesamte Anteil der NK Zellen am intrahepatischen Lymphozytenpool deutlich ab^{55,66}. Dies ist nicht einfach mit einer gesteigerten Migration in Einklang zu bringen. Neben den CD81 bedingten Effekten auf Aktivität und Migration wird eine deutlich hemmende Wirkung auf die Zellproliferation beschrieben⁵⁰. Hohe Konzentrationen von gebundenen Viruspartikeln könnten somit den Anteil der intrahepatischen NK Zellen stark dezimieren. Möglicherweise tritt die Proliferationshemmung primär in der Leber auf, da in der Peripherie weniger Viruspartikel gebunden sind, die CD81 kreuzvernetzen können. Inwieweit das modulierte Migrationsverhalten von NK Zellen *in vivo* eine Rolle spielt und Einfluss auf die Immunpathogenese der HCV Infektion nimmt, ist Inhalt aktueller Untersuchungen.

In Kapitel 4 war der Immunphänotyp intrahepatischer NK Zellen in der chronischen HCV Infektion von Interesse. Anhand dieser Studie stellten wir die These auf, dass die Expression von NKp46 eine wesentliche Bedeutung für die natürliche Immunität gegen HCV hat. Begründet haben wir dies mit dem Nachweis, dass der Anteil von intrahepatischen NK Zellen mit hoher NKp46 Expression (NKp46High) negativ mit der Viruslast assoziiert war. Passend dazu sezernierten NKp46High Zellen mehr IFN- γ und waren zytolytisch aktiver als NKp46Dim Zellen. Von besonderer Bedeutung war die Beobachtung, dass NKp46High Zellen eine höhere antivirale Aktivität besitzen als NKp46Dim NK Zellen. Blockierungsexperimente belegten hierbei einen überwiegend durch IFN- γ vermittelten Effekt. Interessanterweise war der Anteil der NKp46High Zellen mit dem Fibrosegrad negativ assoziiert. In Übereinstimmung hiermit konnten wir für NKp46High NK Zellen *in vitro* auch eine höhere Aktivität gegen primäre hepatische Sternzellen nachweisen.

Die Stärke unserer Studie ist die Analyse von intrahepatischen NK Zellen, denn ein Großteil der publizierten Arbeiten zu diesem Thema untersuchte ausschließlich zirkulierende Zellen⁵⁹. Dabei wurden hinsichtlich der NKp46 Expression widersprüchliche Daten gezeigt⁴³. In Übersichtsartikeln erklärte man dies mit unterschiedlichen Kohortenzusammensetzungen⁴³. Einheitliche Ergebnisse gibt es zu der gestörten IFN- γ Antwort bei peripheren NK Zellen. Dazu wurde von Mondelli und Mitarbeitern die These aufgestellt, dass bei der chronischen Infektion Hepatozyten und Dendritische Zellen große Mengen IFN- α sezernieren, das die Zytotoxizität steigert, aber die IFN- γ Sekretion hemmt⁴⁴. Verursacht wird diese Polarisierung durch eine Verschiebung von STAT1- zu STAT4-Aktivierung. Die Autoren sehen in einer dysregulierten IFN- γ Antwort bei NK Zellen den Grund für eine ineffiziente Viruseliminierung. Dieselbe Arbeitsgruppe hatte erstmals die funktionellen Eigenschaften von intrahepatischen NK Zellen aus HCV infizierten Lebern mit gesunden Kontrollen verglichen⁶⁷. Überraschenderweise war bei den intrahepatischen NK Zellen die Zytotoxizität gehemmt während die IFN- γ Antwort unverändert war. Sie erklärten die Diskrepanzen zur IFN- γ Antwort bei peripheren NK Zellen mit der Auswahl der Versuchsbedingungen.

Die zytolytisch inaktiven NK Zellen aus HCV infizierten Lebern zeigten in den Experimenten der Mondelli-Gruppe im Vergleich zu gesunden Kontrollen einen aktivierten Phänotyp mit höherer NKp46 Expression. Das scheint zunächst im Widerspruch zu unseren Ergebnissen zu stehen. Allerdings fehlt in unserer Studie der Vergleich zu intrahepatischen NK Zellen von Gesunden und in der Mondelli Studie eine Korrelation der NKp46 Expression zur HCV Viruslast bzw. zu funktionellen Eigenschaften. Somit lässt sich nicht eindeutig klären, ob sich

diese beiden Studien wirklich widersprechen. Darüber hinaus hat die Mondelli Studie ausschließlich die hämatopoetische K562 Leukämie-Zelllinie bzw. P815 Maus-Lymphoblasten als Zielzellen verwendet. Die von uns verwendeten HCV Replikonzellen dürften als Modell für die antivirale Aktivität bei Hepatitis C aber die bessere Wahl für die funktionelle Charakterisierung von intrahepatischen NK Zellen zu sein.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen deuten Arbeiten der Gruppe von Hugo Rosen auf eine wichtige Bedeutung des NKp46-Rezeptors für die antivirale Immunantwort³⁰. Hier konnte gezeigt werden, dass eine höhere NKp46-Expression bei Frauen im Vergleich zu Männern bzw. Kaukasiern im Vergleich zu Afro-Amerikanern mit einer höheren spontanen sowie Therapie-induzierten Ausheilung der Hepatitis C assoziiert ist. Außerdem konnte diese Arbeitsgruppe die hohe anti-HCV Aktivität von NKp46High Zellen im Replikon-Modell bestätigen. Zudem konnte hier auch gezeigt werden, dass im Gegensatz zu nicht-infizierten Zellen auf Virus-infizierten Hepatozyten ein NKp46 Ligand exprimiert wird. Interessanterweise gelang in einer kürzlich publizierten Studie auch der Nachweis von NKp46 Liganden auf humanen, aktivierten HSC²⁹. In Mausversuchen konnte zudem von derselben Arbeitsgruppe bestätigt werden, dass die Aktivierung von NK Zellfunktionen über NKp46 die Fibrogenese einschränkt²⁹.

Demnach unterstützen beide Arbeiten unsere These, dass die Expression von NKp46 auf intrahepatischen NK Zellen eine wichtige Bedeutung für die antivirale und antifibrotische Aktivität von NK Zellen bei der chronischen HCV Infektion hat.

In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte KIR NK Zell-Rezeptoren in Kombination mit einem spezifischen HLA-Klasse I Genotyp mit dem Therapieansprechen sowie dem spontanen Verlauf der Hepatitis C assoziiert sind, was die Bedeutung von NK Zellen weiter unterstreicht³⁵. Interessanterweise konnte in zwei Folgeuntersuchungen gezeigt werden, dass es hierbei einen synergistischen Zusammenhang mit einem IL28B Polymorphismus (rs12979860) gibt^{68,69}. Deshalb wurde vermutet, dass die antivirale Immunantwort von NK Zellen durch IL28B beeinflusst wird. Daher untersuchten wir in Kapitel 5 der vorliegenden Arbeit den direkten Einfluss von IL28B auf die Funktion von NK Zellen.

Im Gegensatz zur Studie von Dring et al. konnten wir durch rekombinantes IL28B keinen direkten Effekt auf Zytotoxizität und IFN- γ Sekretion feststellen. In Übereinstimmung hiermit ließ sich der λ -Interferon Rezeptor auf NK Zellen nicht nachweisen. Eine direkte Modulation von NK Zellen durch IL28B konnte somit ausgeschlossen werden. Zudem scheint die von Dring und Kollegen vorgeschlagene Hypothese, dass eine IL28B-vermittelte Hemmung der

IFN- γ Produktion die chronische Entzündung abmildert und somit das Ausheilen der Hepatitis C verbessert, als unwahrscheinlich. Wie in der Übersichtsarbeit von Mondelli diskutiert, scheint gerade eine gestörte IFN- γ Sekretion von NK Zellen ein wichtiger Grund für eine Chronifizierung zu sein, da das Virus hierdurch nicht effizient eliminiert werden kann⁴⁴.

Möglich wäre eine indirekte Interaktion mit IL28B über andere immunkompetente Zellen. Jedoch haben wir in PBMC Kultur keine signifikanten Effekte nachweisen können. Allerdings scheint dies im intrahepatischen Milieu denkbar zu sein, da Hepatozyten und Sinusendothelzellen den IL28 Rezeptor exprimieren⁷⁰.

Darüber hinaus gibt es keinen Nachweis über eine Assoziation zwischen IL28B Polymorphismus (rs12979860) und Funktion bzw. Menge des sezernierten Zytokins²³. Dies wirft die Frage auf, ob es vielleicht zwischen Polymorphismus (rs12979860) und anti-HCV Aktivität einen anderen Zusammenhang geben kann.

Der Polymorphismus (rs12979860) ist im nicht kodierenden Bereich zwischen dem *IL28A* und dem *IL28B* Gen lokalisiert. Bisher hat man vermutet, dass in dieser Region regulatorische Elemente vorkommen, die Interferon-stimulierende-Gene (ISG) modulieren und dadurch die Viruseliminierung beeinflussen⁷¹. Interessanterweise wurde erst kürzlich in einem anderen Leserahmen ein Insertions/Deletions-Polymorphismus (ss469415590) entdeckt, der mit dem IL28B Polymorphismus (rs12979860) im Kopplungsungleichgewicht (linkage Disequilibrium) steht⁷². Dieser soll ein besserer Prädiktor für das Therapieansprechen sein als der IL28B Polymorphismus (rs12979860). Die Deletion ΔG führt über eine Leserasterverschiebung zur Expression eines antiviral wirksamen Proteins, das als Ifn- $\lambda 4$ bezeichnet wird. In Transfektionsexperimenten wurde gezeigt, dass bei Ifn- $\lambda 4$ Expression die weitere Induktion Interferon-stimulierender-Gene durch Typ I- und Typ III-Interferone gehemmt ist. Das erklärt möglicherweise die starke Assoziation zwischen IFNL4 Genotyp und Therapieansprechen. In Zukunft wird von besonderem Interesse sein, inwieweit die IFN- γ Antwort von NK Zellen durch IFN- $\lambda 4$ moduliert werden kann.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

1. Choo, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359–362 (1989).
2. Han, J. H. et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1711–1715 (1991).
3. Dubois, F., Desenclos, J., Mariotte, N., Goudeau, A. & Group, T. C. S. Hepatitis C in a French population-based survey, 1994: Seroprevalence, frequency of viremia, genotype distribution, and risk factors. *Hepatology* 25, 1490–1496 (1997).
4. Nouri-Aria, K. T., Sallie, R., Mizokami, M., Portmann, B. C. & Williams, R. Intrahepatic expression of hepatitis C virus antigens in chronic liver disease. *J. Pathol.* 175, 77–83 (1995).
5. Lerat, H. et al. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 97, 845–851 (1996).
6. Pietschmann, T. Virology: Final entry key for hepatitis C. *Nature* 457, 797–798 (2009).
7. Shepard, C. W., Finelli, L. & Alter, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5, 558–567 (2005).
8. WHO | Hepatitis C. WHO at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
9. Davis, G. L., Alter, M. J., El-Serag, H., Poynard, T. & Jennings, L. W. Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. *Gastroenterology* 138, 513–521, 521.e1–6 (2010).
10. Moradpour, D., Wölk, B., Cerny, A., Heim, M. H. & Blum, H. E. Hepatitis C: a concise review. *Minerva Med.* 92, 329–339 (2001).
11. SVR. About.com Hepatitis at <http://hepatitis.about.com/od/stu/g/SVR.htm>
12. Manns, M. P. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* 55, 1350–1359 (2006).
13. Boettler, T. et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 79, 7860–7867 (2005).
14. Ebinuma, H. et al. Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 82, 5043–5053 (2008).
15. Bengsch, B. et al. 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.* 6, e1000947 (2010).
16. Schlaphoff, V. et al. Dual Function of the NK Cell Receptor 2B4 (CD244) in the Regulation of HCV-Specific CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* 7, (2011).
17. Nakamoto, N. et al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T-cells by PD1 blockade is defined by PD1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 134, 1927–1937.e2 (2008).
18. Urbani, S. et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J. Virol.* 80, 11398–11403 (2006).
19. Mondelli, M. U. Multifaceted functions of B cells in chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Res.* 60, 111–115 (2003).
20. von Hahn, T. et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 132, 667–678 (2007).
21. Ge, D. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral

clearance. *Nature* 461, 399–401 (2009).

22. Kelly, C., Klenerman, P. & Barnes, E. Interferon lambdas: the next cytokine storm. *Gut* 60, 1284–1293 (2011).

23. Urban, T. J. et al. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 52, 1888–1896 (2010).

24. Sarasin-Filipowicz, M. et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *PNAS* 105, 7034–7039 (2008).

25. Gao, B., Radaeva, S. & Park, O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol* 86, 513–528 (2009).

26. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469 (2008).

27. Poli, A. et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126, 458–465 (2009).

28. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503–510 (2008).

29. Gur, C. et al. NKp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis. *Gut* 61, 885–893 (2012).

30. Golden-Mason, L., Stone, A. E. L., Bambha, K. M., Cheng, L. & Rosen, H. R. Race- and gender-related variation in natural killer p46 expression associated with differential anti-hepatitis C virus immunity. *Hepatology* 56, 1214–1222 (2012).

31. Gur, C. et al. Recognition and killing of human and murine pancreatic beta cells by the NK receptor NKp46. *J. Immunol.* 187, 3096–3103 (2011).

32. Yutkin, V., Pode, D., Pikarsky, E. & Mandelboim, O. The expression level of ligands for natural killer cell receptors predicts response to bacillus Calmette-Guerin therapy: a pilot study. *J. Urol.* 178, 2660–2664 (2007).

33. Sivori, S. et al. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *European Journal of Immunology* 29, 1656–1666 (1999).

34. Khakoo, S. I. et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305, 872–874 (2004).

35. Jamil, K. M. & Khakoo, S. I. KIR/HLA Interactions and Pathogen Immunity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 1–9 (2011).

36. Alter, G. et al. Reduced frequencies of NKp30+ NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J. Hepatol.* 55, 278–288 (2011).

37. Amadei, B. et al. Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 138, 1536–1545 (2010).

38. Pelletier, S. et al. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J. Hepatol.* 53, 805–816 (2010).

39. Nattermann, J. et al. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 55, 869–877 (2006).

40. De Maria, A. et al. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur. J. Immunol* 37, 445–455 (2007).

41. Ahlenstiel, G. et al. Natural Killer Cells Are Polarized Toward Cytotoxicity in Chronic Hepatitis C in an Interferon-Alpha-Dependent Manner. *Gastroenterology* 138, 325–335.e2 (2010).

42. Bozzano, F. et al. Activating NK cell receptor expression/function (NKp30, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment. *European Journal of Immunology* 41, 2905–2914 (2011).

43. Bozzano, F., Marras, F., Biassoni, R. & De Maria, A. Natural killer cells in hepatitis C virus infection. *Expert Rev Clin Immunol* 8, 775–788 (2012).
44. Mondelli, M. U. et al. Natural killer cell functional dichotomy: a feature of chronic viral hepatitis? *Front. Immun.* 3, 351 (2012).
45. Tian, Z., Chen, Y. & Gao, B. Natural killer cells in liver disease. *Hepatology* (2012).doi:10.1002/hep.26115
46. Glässner, A. et al. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Laboratory Investigation* 92, 967–977 (2012).
47. Herzer, K. et al. Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J. Virol* 77, 8299–8309 (2003).
48. Nattermann, J. et al. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am. J. Pathol* 166, 443–453 (2005).
49. Jones, E. L., Demaria, M. C. & Wright, M. D. Tetraspanins in cellular immunity. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 506–511 (2011).
50. Crotta, S. et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J. Exp. Med* 195, 35–41 (2002).
51. Nattermann, J. et al. Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology* 44, 945–954 (2006).
52. Liaskou, E., Wilson, D. V. & Oo, Y. H. Innate Immune Cells in Liver Inflammation. *Mediators of Inflammation* 2012, 1–21 (2012).
53. Nischalke, H. D. et al. Semiquantitative analysis of intrahepatic CC-chemokine mRNAs in chronic hepatitis C. *Mediators Inflamm.* 13, 357–359 (2004).
54. Harvey, C. E. et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 74, 360–369 (2003).
55. Bonorino, P. et al. Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J. Hepatol* 51, 458–467 (2009).
56. Ratnam, D. T., Sievert, W. & Visvanathan, K. Natural killer cells display impaired responses to toll like receptor 9 that support viral persistence in chronic hepatitis B. *Cellular Immunology* 279, 109–115 (2012).
57. Oliviero, B. et al. Natural Killer Cell Functional Dichotomy in Chronic Hepatitis B and Chronic Hepatitis C Virus Infections. *Gastroenterology* 137, 1151–1160.e7 (2009).
58. Lunemann, S. et al. Comprehensive phenotyping of natural killer cells in acute and chronic viral hepatitis. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 51, (2013).
59. Lunemann, S., Schlaphoff, V., Cornberg, M. & Wedemeyer, H. NK Cells in Hepatitis C: Role in Disease Susceptibility and Therapy. *Digestive Diseases* 30, 48–54 (2012).
60. Coffey, G. P. et al. Engagement of CD81 induces ezrin tyrosine phosphorylation and its cellular redistribution with filamentous actin. *J Cell Sci* 122, 3137–3144 (2009).
61. Yoon, J. C., Shiina, M., Ahlenstiel, G. & Rehmann, B. Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* 49, 12–21 (2009).
62. Farag, M. M. S., Weigand, K., Encke, J. & Momburg, F. Activation of natural killer cells by hepatitis C virus particles in vitro. *Clin Exp Immunol* 165, 352–362 (2011).
63. Crotta, S., Brazzoli, M., Piccioli, D., Valiante, N. M. & Wack, A. Hepatitis C virions subvert natural killer cell activation to generate a cytokine environment permissive for infection. *Journal of Hepatology In Press, Corrected Proof*,
64. Gonzalez, V. D. et al. Expansion of Functionally Skewed CD56-Negative NK Cells in Chronic Hepatitis C Virus Infection: Correlation with Outcome of Pegylated IFN- α and

Ribavirin Treatment. *J Immunol* 183, 6612–6618 (2009).

65. Pöhlmann, S. et al. Hepatitis C Virus Glycoproteins Interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77, 4070–4080 (2003).

66. Kawarabayashi, N. et al. Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 32, 962–969 (2000).

67. Varchetta, S. et al. Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 56, 841–849 (2012).

68. Suppiah, V. et al. IL28B, HLA-C, and KIR Variants Additively Predict Response to Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection in a European Cohort: A Cross-Sectional Study. *PLoS Med* 8, e1001092 (2011).

69. Dring, M. M. et al. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *PNAS* 108, 5736–5741 (2011).

70. Diegelmann, J. et al. Comparative Analysis of the Lambda-Interferons IL-28A and IL-29 regarding Their Transcriptome and Their Antiviral Properties against Hepatitis C Virus. *PLoS ONE* 5, e15200 (2010).

71. Cieśla, A. et al. IL28B polymorphism as a predictor of antiviral response in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 18, 4892–4897 (2012).

72. Prokunina-Olsson, L. et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* (2013).doi:10.1038/ng.2521

7.2 Abkürzungsverzeichnis

CCR	CC Chemokine Receptor
FasL	FAS Ligand
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HCV E2	Hepatitis C Virus Hüllprotein E2
HCVpp	Hepatitis C Virus Pseudopartikel
HCVcc	Hepatitis C Virus Cell Culture
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSC	hepatischen Sternzellen
IFN	Interferon
ISG	Interferon stimulierenden Gene
K562	Leukämie-Zelllinie
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor
NCR	natural cytotoxicity receptor
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
P815	Murine Lymphoblasten-Zelllinie
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPV	positiver Vorhersagewerte
RANTES	Regulated Upon Activation Normal T Cell Expressed And Presumably Secreted
ROCK	Rho Kinase
SVR	Sustained Virologic Response
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand

8 Veröffentlichungen

8.1 Publikationen als Erstautor

1. **Krämer B***, Nischalke HD*, Boesecke C, Ingiliz P, Voigt E, Mauss S, Stellbrink HJ, Baumgarten A, Rockstroh JK, Spengler U, Nattermann J. Variation in IFNL4 genotype and response to interferon-based therapy of hepatitis C in HIV-positive patients with acute and chronic hepatitis C. 2013. **AIDS**.
2. **Krämer B***, Keschull M*, Nowak M, Demmer RT, Haupt M, Körner C, Perner S, Jepsen S, Nattermann J, Papapanou PN. Role of the NK cell-activating receptor CRACC in Periodontitis. 2012. **Infection and Immunity**.
3. **Krämer B***, Körner C*, Keschull M, Glässner A, Eisenhardt M, Nischalke HD, Alexander M, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. 2012. **Hepatology**.
4. **Krämer B**, Eisenhardt M, Glässner A, Körner C, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. Do λ -interferons IL28A and IL28B act on human natural killer cells? 2011. **PNAS**.
5. **Krämer B**, Schulte D, Körner C, Zwank C, Hartmann A, Michalk M, Söhne J, Langhans B, Nischalke HD, Coenen M, Möhl C, Vogt A, Hennenberg M, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. Regulation of NK cell trafficking by CD81. 2009. **European Journal of Immunology**.

* gleichberechtigte Erstautoren

8.2 Weitere Publikationen als Koautor:

6. Kokordelis P, **Krämer B**, Köerner C, Boesecke C, Voigt E, Ingiliz P, Glässner A, Eisenhardt M, Wolter F, Kaczmarek D, Nischalke HD, Rockstroh JK, Spengler U, Nattermann J. An effective IFN- γ mediated inhibition of HCV replication by NK cells is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C in HIV(+) patients. **Hepatology**.
7. Glässner A, Eisenhardt M, Kokordelis P, **Krämer B**, Wolter F, Nischalke HD, Boesecke C, Sauerbruch T, Rockstroh JK, Spengler U, Nattermann J. Impaired CD4+ T cell stimulation of NK cell anti-fibrotic activity may contribute to accelerated liver fibrosis progression in HIV/HCV patients. 2013. **Journal of Hepatology**.
8. Langhans B, **Krämer B**, Louis M, Nischalke HD, Hüneburg R, Staratschek-Jox A, Odenthal M, Manekeller S, Schepke M, Kalff J, Fischer HP, Schultze JL, Spengler U. Intrahepatic IL-8 producing Foxp3+CD4+ regulatory T cells AND fibrogenesis in chronic hepatitis C. 2013. **Journal of Hepatology**.
9. Nowak M, **Krämer B**, Keschull M, Demmer RT, Haupt M, Körner C, Perner S, Jepsen S, Papapanou PN. Activation of Invariant Natural Killer T-cells in Periodontitis Lesions. 2013. **Journal of Immunology**.
10. Eisenhardt M, Glässner A, **Krämer B**, Körner C, Sibbing B, Kokordelis P, Nischalke HD, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. The CXCR3(+)CD56Bright phenotype characterizes a distinct NK cell subset with anti-fibrotic potential that shows dys-

- regulated activity in hepatitis C. 2012. **Plos One**.
11. Glässner A, Eisenhardt M, **Krämer B**, Körner C, Coenen M, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. 2012. **Lab investigation**.
 12. Körner C, Riesner K, **Krämer B**, Eisenhardt M, Glässner A, Wolter F, Berg T, Müller T, Sauerbruch T, Nattermann J, Spengler U, Nischalke HD. TRAIL receptor I (DR4) polymorphisms C626G and A683C are associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma (HCC) in HCV-infected patients. 2012. **BMC Cancer**.
 13. Nischalke HD, Berger C, Luda C, Müller T, Berg T, Coenen M, **Krämer B**, Körner C, Trebicka J, Grünhage F, Lammert F, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U. The CXCL1 rs4074 A allele is associated with enhanced CXCL1 responses to TLR2 ligands and predisposes to cirrhosis in HCV genotype 1-infected Caucasian patients. 2012. **Journal of Hepatology**.
 14. Körner C, **Krämer B**, Schulte D, Coenen M, Mauss S, Fätkenheuer G, Oldenburg J, Nattermann J, Rockstroh JK, Spengler U. Effects of HCV co-infection on apoptosis of CD4+ T-cells in HIV-positive patients. **Clinical Science**.
 15. Coenen M, **Krämer B**, Langhans B, Glässner A, Körner C, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U, Nischalke HD. Hepatitis C virus core protein induces fibrogenic actions of hepatic stellate cells via toll-like receptor 2. **Lab Investigation**.
 16. Nischalke HD, Berger C, Berg T, Müller T, Berg T, Grünhage F, **Lammert F**, **Coenen M**, **Krämer B**, Körner C, Vidovic N, Oldenburg J, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U. The PNPLA3 rs738409 148M/M Genotype Is a Risk Factor for Liver Cancer in Alcoholic Cirrhosis but Shows No or Weak Association in Hepatitis C Cirrhosis. 2011. **Plos One**.
 17. Schulte D, Vogel M, Langhans B, **Krämer B**, Körner C, Nischalke HD, Steinberg V, Michalk M, Berg T, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV) infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells. **Journal of Infectious Diseases**.
 18. Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, Stark C, Nischalke HD, **Krämer B**, Körner C, Klein S, Granzow M, Fischer HP, Heller J, and Sauerbruch T. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. 2011. **Lab Invest**.
 19. Nischalke HD, Coenen M, Berger C, Aldenhoff K, Müller T, Berg T, **Krämer B**, Körner C, Odenthal M, Schulze F, Grünhage F, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U. The Tolllike receptor 2 (TLR2) -196 to -174 del/ins polymorphism influences viral loads and susceptibility for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. **Clinical Cancer Research**.
 20. Körner C, Tolksdorf F, Riesner K, **Krämer B**, Schulte D, Nattermann J, Rockstroh JK, Spengler U. Hepatitis C co-infection sensitizes CD4+ T cells towards Fas-induced apoptosis in HIV-positive patients. 2009. **Antiviral Therapy**.
 21. Nattermann J, Sherzada R, Iwan A, Bogen D, Niederle IM, Schulte D, Mertens E, Nischalke HD, **Krämer B**, Sauerbruch T, Leifeld L, Spengler U. Hepatitis C virus-induced secretion of inflammatory chemokines preferentially recruits NKG2A+CD8+ T cells. 2008. **J Infect Dis**.

8.3 Vorträge auf Kongresse

1. „Phänotypische *ex vivo* Charakterisierung intrahepatischer NK Zellen bei lebertransplantierten Patienten“.2013. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft.
2. „Die aktivierenden Rezeptoren NKp30 und NKp46 sind an der Regulation der anti-fibrotischen Aktivität von NK Zellen beteiligt“. 2012. Jahrestagung der „Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten“, DGVS in Hamburg.
3. „The activating NK cell receptor NKp46 may be involved in anti-fibrotic activity of NK cells in chronic hepatitis C“. 2012. International Liver Meeting from “European Association for the Study of the Liver”, EASL in Barcelona.

8.4 Poster auf Kongresse

- | | |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2013 | <ol style="list-style-type: none"> 1. “HIV-associated down-regulation of the activating NK cell receptor NKp46 might affect susceptibility to and natural course of HCV infection”, Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, CROI 2. “IFNL4 ss469415590 polymorphism and response to interferon-based therapy of hepatitis C in HIV-positive patients with acute and chronic hepatitis C”, International Liver Congress by “American Association for the Study of Liver Diseases”, AASLD |
| 2011 | <ol style="list-style-type: none"> 3. „Anti-HCV-Aktivität von NKp46High NK Zellen“, Jahrestagung der „Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten“,DGVS 4. „Der NKp46High Phänotyp definiert eine NK Zellpopulation mit hoher zytolytischer Aktivität, die möglicherweise in die Kontrolle der HCV-Replikation involviert ist“, Jahrestagung der „Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber“, GASL |
| 2010 | <ol style="list-style-type: none"> 5. „Veränderte Expression des SLAM Rezeptors CRACC und von CD48 auf NK-Zellen bei chronischer Hepatitis C“, Jahrestagung der „Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten“,DGVS 6. „Der NKp46High Phänotyp definiert eine NK Zellpopulation mit hoher zytolytischer Aktivität, die möglicherweise in die Kontrolle der HCV-Replikation involviert ist“, Jahrestagung der „Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber“, GASL 7. „Dys-regulated expression of the SLAM family receptor CRACC and CD48 on NK cells in chronic hepatitis C“, International Liver Meeting from “European Association for the Study of the Liver”, EASL 8. “NKp46high expression defines a specific NK cell subset with high cytotoxic activity that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication”, International Liver Congress by “American Association for the Study of Liver Diseases”, AASLD |
| 2009 | <ol style="list-style-type: none"> 9. „Unterschiedliche Effekte auf die Motilität von Natürlichen Killerzellen und Dendritischen Zellen nach HCV E2/CD81-Interaktion“, Jahrestagung der „Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten“,DGVS 10. „Regulation of Natural Killer Cell trafficking by CD81“, “European Congress of Immunology”, ECI 11. “Influence of the CTLA4 +49 A>G polymorphism on response to HCV-specific therapy in HIV(+) patients with acute hepatitis C”, International Liver Meeting from “European Association for the Study of the Liver”, EASL 12. “Influence of the CTLA4 +49 A>G polymorphism on response to HCV-specific therapy in HIV(+) patients with acute hepatitis C”, “Deutsch Österreichisch Schweizerische AIDS Kongress“, SÖDAK |
| 2008 | <ol style="list-style-type: none"> 13. „Die Adhäsion Natürlicher Killer (NK) Zellen an die Extrazelluläre Matrix Komponente Hyaluronsäure wird entscheidend durch HCV E2/CD81 Interaktion reguliert“, Jahrestagung der „Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten“,DGVS 14. „Adhesion of natural killer (NK) cells to hyaluronic acid is critically regulated by HCV E2/CD81 interactions“, International Liver Meeting from “European Association for the Study of the Liver”, EASL |
| 2007 | <ol style="list-style-type: none"> 15. “Cross-linking of CD81 with HCV E2 regulates migration of natural killer (NK) cells in a ROCK-dependent fashion”, “International Liver Congress by “American Association for the Study of Liver Diseases”, AASLD |

9 Erklärung

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

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

Bonn, den 26.06.2013

Benjamin Krämer