



Die in diesem Beitrag beschriebene immunologische Grundlagenforschung möchte dazu beitragen, ein besseres Verständnis der HCV-Infektion zu erlangen und die komplexen Mechanismen aufzuklären, die bei einigen Menschen zu einer spontanen Ausheilung einer HCV-Infektion führen beziehungsweise Individuen vor einer Infektion schützen. Ein besseres Verständnis der Rolle des angeborenen und erworbenen Immunsystems für den HCV-Infektionsverlauf könnte für die Entwicklung einer prophylaktischen Impfung helfen.

Erfolg durch körpereigene „Krieger*innen“

Natürliche Killerzellen im Kampf
gegen eine Hepatitis-C-Virus-Infektion
Von Tina Senff & Jörg Timm

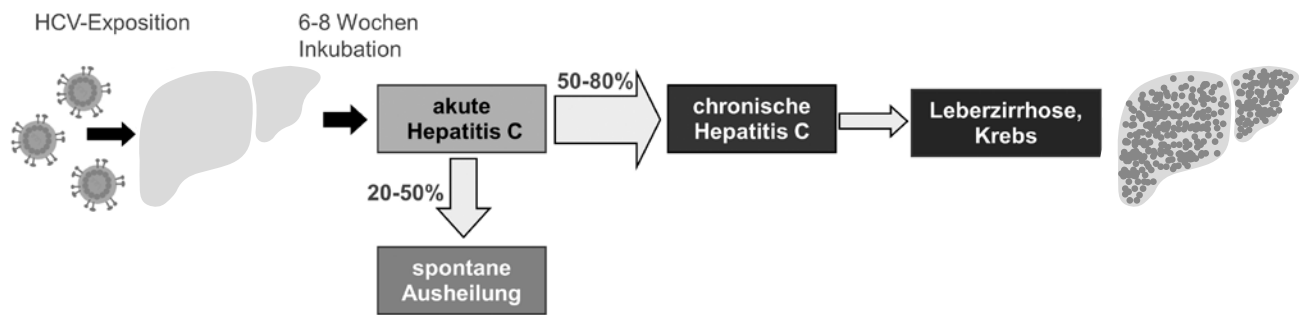
Nach Schätzungen der World Health Organisation (WHO) sind aktuell weltweit ein Prozent aller Menschen chronisch mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) infiziert, das entspricht 71 Millionen Menschen. Schätzungsweise infizieren sich jährlich etwa 1.750.000 Menschen neu mit HCV. Nach WHO-Angaben sind die Regionen mit der höchsten Prävalenz für HCV die östliche Mittelmeerregion und Teile der Region Europa. Dabei wird die hohe Prävalenz in der östlichen Mittelmeerregion (2,3 %) vor allem nosokomialen Infektionen in der Vergangenheit zugeschrieben. Das bedeutet, dass die Infektion durch eine medizinische Maßnahme verursacht wurde. Dagegen ist der Großteil der Infektionen in der Region

Europa auf intravenösen Drogenkonsum zurückzuführen¹.

HCV wird vor allem durch Blutkontakte übertragen. Bevor Anfang der 1990er Jahre zunächst serologische und später molekulare Tests zum Ausschluss von HCV-Infektionen bei Blutspender*innen eingeführt wurden, stellten Transfusionen von Blutprodukten den wichtigsten Risikofaktor für eine Hepatitis C dar. Seit der Einführung der generellen Spender*innentestung sind in Deutschland HCV-Übertragungen durch die Gabe von Blutprodukten äußerst selten und wurden in den letzten Jahren nicht mehr beschrieben. Heutzutage ist der häufigste Grund für eine Übertragung die Benutzung von nicht sterilisiertem, unsauberem Injektionsbesteck bei

intravenösem Drogengebrauch und dem oft einhergehenden Teilen des Injektionsequipments. Die Übertragung des Virus von einer infizierten Mutter auf ihr Neugeborenes und die sexuelle Transmission sind hingegen eher seltene Ereignisse, obwohl es in den letzten Jahren zu einer Zunahme der HCV-Inzidenz in Gruppen der HIV-positiven „Men having Sex with Men (MSM)“, am ehesten durch sexuelle Praktiken, die Blutkontakte ermöglichen, kam.

HCV kann sowohl eine akute als auch eine chronische Infektion auslösen. Die Mehrheit der Individuen, die akut mit HCV infiziert ist, entwickelt eine chronische Infektion (50–80 %), definiert als anhaltende Virusreplikation in der Leber für mehr als sechs Monate. Dagegen



(1) HCV-Infektionsverlauf: Sechs bis acht Wochen nach der Exposition mit HCV können Antikörper gegen HCV im peripheren Blut der Patient*innen detektiert werden. 20 bis 50 % der akut HCV-infizierten Patient*innen erfahren eine spontane Ausheilung des Virus, während 50 bis 80 % der Infektionen einen chronischen Verlauf nehmen. Als Spätfolge einer chronischen Infektion entwickeln etwa 20 % der Patient*innen eine Leberzirrhose, die wiederum mit einem erhöhten Risiko an einem Leberkarzinom zu erkranken, assoziiert ist.
Quelle: eigene Darstellung

erreichen nur 20 bis 50 Prozent eine spontane Ausheilung der Virusinfektion, so dass diese Patient*innen keine weitere Therapie benötigen. Die Inkubationszeit von HCV beträgt zwischen zwei Wochen bis zu sechs Monaten. Nach der Infektion zeigen etwa ein Fünftel aller infizierten Patient*innen Symptome wie zum Beispiel Fieber, Übelkeit, Appetitlosigkeit oder Gelbsucht, während der Großteil der akuten Infektionen asymptomatisch verläuft. Die chronische Infektion kann schwere Lebererkrankungen wie Leberfibrose, Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom verursachen. Etwa 5 bis 20 Prozent der chronisch mit HCV-Infizierten entwickeln eine Leberzirrhose, und diese Patient*innen haben ein hohes Risiko im weiteren Krankheitsverlauf an einem Leberzellkarzinom zu erkranken. An den Folgen der HCV-Infektion sterben nach Schätzungen der WHO jährlich ungefähr 400.000 Menschen. Da die akute HCV-Infektion in den meisten Individuen asymptomatisch oder mit nur milden, unspezifischen Symptomen verläuft, werden die meisten Infektionen nicht in der akuten Phase diagnostiziert. Auch die chronische Infektion wird oft erst spät erkannt, so dass das konsequente Screening von Risikogruppen auf eine HCV-Infektion aus epidemiologischer Sicht extrem wichtig ist¹.

Für die Diagnostik der Hepatitis C wird ein zweistufiges Screening angewendet. Zunächst wird ein HCV-Antikörpertest durchgeführt. Dieser Test gibt an, ob ein Individuum bereits Kontakt mit dem Virus hatte. Bei einem reaktiven Ergebnis schließt sich ein Test zum Nachweis von HCV-RNA an. Mit diesem Test kann die virale Nukleinsäure quantifiziert werden, und bei einem positiven Ergebnis ist eine replikative HCV-Infektion nachgewiesen. Mit der Kombination dieser beiden Testverfahren lässt sich differenzieren, ob der*die Patient*in eine abgelaufene oder eine replikative HCV-Infektion hat. Individuen mit einem positiven HCV-Antikörpertest und negativen HCV-RNA-Test haben das Virus spontan ausgeheilt oder wurden erfolgreich therapiert. Individuen, die sowohl Anti-HCV als auch HCV-RNA positiv sind, haben derzeit eine HCV-Infektion. In der erweiterten Diagnostik kann eine HCV-Genotypisierung ergänzt werden, die für die Therapieplanung von Bedeutung ist. Es werden insgesamt sieben HCV-Genotypen unterschieden, von denen die Genotypen 1 und 3 in Deutschland am häufigsten sind.

Aufgrund der hohen Fehlerrate bei der Virusreplikation weist HCV eine hohe genetische Variabilität auf. Neben den Virussequenzun-

terschieden zwischen Genotypen und Subtypen gibt es erhebliche Sequenzunterschiede zwischen einzelnen Isolaten des gleichen Subtyps. Selbst in einem*r Patient*in werden im Rahmen der Virusreplikation zahlreiche Varianten produziert, die zwar alle eng miteinander verwandt sind, aber doch Unterschiede aufweisen. Man bezeichnet diesen Schwarm von ähnlichen, aber verschiedenen Varianten als Quasispezies. Die Quasispeziesnatur des Virus ermöglicht schnelle Anpassungen an Änderungen des Replikationsumfelds, indem Varianten mit einer erhöhten Fitness aus dem Pool der Varianten selektiert werden. Dadurch kann sich HCV sehr schnell nach Übertragung auf eine*n neue*n Patient*in an das Immunsystem anpassen und persistieren.

Eine HCV-Infektion kann mit antiviralen Medikamenten erfolgreich behandelt werden. Ziel einer Therapie ist eine so genannte anhaltende Therapieantwort („sustained viral response“, SVR), definiert als fehlender Nachweis von HCV-RNA im Serum zwölf Wochen nach abgeschlossener Therapie. Da es kein Virusreservoir in der Zelle gibt, kommen spätere Reaktivierungen der Virusinfektion praktisch nicht vor. Lange Zeit basierte die Standardtherapie einer Hepatitis C auf Interferon alpha in Kombination mit

Ribavirin. Diese Therapie war mit starken Nebenwirkungen assoziiert und erreichte bei dem häufigsten HCV-Genotyp in nur etwa 40 bis 50 Prozent der Patient*innen eine anhaltende Therapieantwort. In den letzten Jahren wurden multiple antivirale Substanzen zur Behandlung der chronischen HCV-Infektion zugelassen, die zu einer sehr hohen Heilungsrate im Vergleich zur interferon-basierten Therapie führen. Die wichtigsten Ziele der Therapie sind die virale Protease und die virale RNA-abhängige-RNA-Polymerase sowie der virale Replikationsfaktor NS5A. Mit einer Kombination aus zwei oder drei Hemmstoffen dieser Targets können nahezu alle Patient*innen erfolgreich therapiert werden. Neben der effektiven Virusausheilung konnte zudem auch die Therapiezeit maßgeblich verringert werden.

Mittlerweile sind Therapien verfügbar, die gegen alle Genotypen mit hoher Wirksamkeit eingesetzt werden können. Dennoch stehen diese Therapiemöglichkeiten weltweit nur einem geringen Anteil der chronisch infizierten Patient*innen zur Verfügung, da diese Therapieoptionen sehr kostspielig sind und somit in Ländern mit niedrigem Einkommen selten eingesetzt werden. Obwohl sich die Therapieoptionen in der letzten Dekade stark verbessert haben und gut toleriert werden, bieten diese keinen Schutz vor erneuter Reinfektion. Des Weiteren wird die chronische Infektion aufgrund ihres langen asymptomatischen Verlaufs oft spät diagnostiziert, und Infizierte können somit unwissentlich Überträger des Virus sein. Aufgrund dessen ist eine HCV-Impfung von großem öffentlichem Interesse, um eine Verbreitung des Virus weiter einzudämmen. Für eine globale Ausrottung von HCV ist zu den bereits bestehenden Therapien eine prophylaktische Impfung unabdingbar.

Daher stellen sich die Fragen: Warum schafft das Immunsystem bei einigen Patient*innen mit

einer akuten HCV-Infektion eine spontane Ausheilung, ohne eine Therapie? Was unterscheidet diese Patient*innen von denen, die eine chronische Infektion entwickeln und behandelt werden müssen? Mit diesen Fragen beschäftigt sich unser Team von Wissenschaftler*innen des Universitätsklinikums Düsseldorf seit einigen Jahren.

Um diese Fragen eingehend zu erforschen, untersucht unsere Arbeitsgruppe eine große Kohorte von intravenös Drogen injizierenden Menschen („people who inject drugs“, PWID), die in Essen rekrutiert werden. Diese Kohorte umfasst aktuell etwa 1.000 Patient*innen, die sich entweder in einer Opioid-Substitutionstherapie („Methadontherapie“) befinden oder sich einem stationären Drogenentzug unterziehen. In der Substitutionstherapie können unter ärztlicher Kontrolle heroinabhängige Patient*innen mit Opiaterstattstoffen wie Methadon behandelt werden. Ziel der Substitutionsbehandlung ist es, über lange Sicht stabile Lebensverhältnisse zu ermöglichen. Die Prävalenz von HCV ist in dieser Patient*innengruppe von intravenösen Drogengebraucher*innen besonders hoch aufgrund des häufig praktizierten Teilens von Injektionsnadeln oder anderen Injektionsmaterialien mit anderen Drogengebraucher*innen. Durch dieses Risikoverhalten sind zwei Jahre nach dem ersten intravenösen Drogenmissbrauch etwa 30 Prozent der Individuen mit HCV infiziert. Diese Prävalenz steigt mit der Dauer des Drogenabusus weiter an, und das Robert Koch-Institut beziffert die Zahl der HCV-positiven Individuen, innerhalb der intravenösen Drogenkonsumierenden, nach zehn Jahren auf 72 Prozent. Schätzungsweise liegt die Zahl der intravenösen Drogengebraucher*innen weltweit bei etwa 16 Millionen, daher stellt der intravenöse Drogenmissbrauch ein großes Problem für das öffentliche Gesundheitssystem dar. Besonders in westlichen Ländern mit einem hohen Einkommen ist die Frequenz der

HCV-Transmissionen, die auf intravenösen Drogenkonsum zurückzuführen sind, besonders hoch. Dies zeigt sich auch in den Zahlen des Robert Koch-Instituts für Deutschland. Der Großteil aller gemeldeten HCV-Fälle des Jahres 2017, bei denen der Transmissionsweg bekannt war, wurden auf intravenösen Drogenkonsum zurückgeführt (78 %)².

Zur detaillierten Erforschung der Rolle des angeborenen und erworbenen Immunsystems bei der HCV-Infektion, stellt eine Kohortenanalyse ein sehr probates Mittel dar. Bezogen auf eine HCV-Infektion können wir die PWID-Kohorte in drei Gruppen einteilen. In der Gruppe der PWID in Essen sind 57 Prozent anti-HCV positiv und haben detektierbare HCV-RNA, sind also chronisch mit HCV infiziert. Dagegen sind 24 Prozent anti-HCV positiv ohne Nachweis von HCV-RNA. Diese Patient*innen haben also die HCV-Infektion spontan ausgeheilt. Die restlichen 19 Prozent sind trotz kontinuierlichen Hochrisikoverhaltens HCV-Antikörper negativ. Die hohe Bereitschaft dieses PWID-Kollektivs, sich Injektionsmaterialien untereinander zu teilen, legt nahe, dass zumindest ein Teil dieser Gruppe HCV-exponiert war, es aber nicht zu einer anhaltenden, aktiven Virusreplikation gekommen ist. Dementsprechend haben diese exponierten Anti-HCV negativen PWID das Virus entweder in der frühen Phase vor dem Einsetzen einer erworbenen Immunantwort kontrolliert oder sind resistent gegenüber einer HCV-Infektion. Untersuchungen der Immunantwort können Antworten liefern, warum diese Individuen vor einer Infektion geschützt sind.

Zelluläre Immunantwort bei Hepatitis C

Das Immunsystem besitzt die Fähigkeit, virusinfizierte Zellen zu erkennen und abzutöten. Multiple Veröffentlichungen zeigen, dass vor allem virusspezifische T-Zellen, die dem erworbenen Immunsystem zugeord-



(2) NK-Zell-Aktivierung: Ein Gleichgewicht an Signalen, welches durch inhibitorische und aktivierende Rezeptoren an die NK-Zelle übermittelt wird, sorgt für eine Toleranz gegenüber gesunden Zellen. Virusinfizierte oder Tumorzellen, die HLA-Moleküle auf der Oberfläche herunterregulieren, werden über „missing self“ erkannt. Das Wegfallen des inhibitorischen Signals führt zur Verschiebung des Signalgleichgewichts hin zu einer Aktivierung der NK-Zelle, die eine direkte Lyse der Zielzellen, aufgrund einer Ausschüttung von zytotoxischen Granula, zur Folge hat. Eine Hochregulation von Stressinduzierten Liganden, die durch aktivierende NK-Zell-Rezeptoren erkannt werden, führt zu einem verstärkten aktivierenden Signal, welches das inhibitorische Signal überlagert und folglich zu einer Abtötung der Zielzellen führt.

Quelle: eigene Darstellung

net werden, eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung der HCV-Infektion spielen³. Allerdings verdichten sich die Hinweise, dass auch Zellen des angeborenen Immunsystems in der frühen Phase der Infektion von großer Bedeutung für den Infektionsverlauf sind⁴.

Arbeiten unserer Gruppe und internationaler Kolleg*innen zeigten bereits, dass Natürliche Killer (NK)-Zellen den Verlauf einer HCV-Infektion beeinflussen. NK-Zellen sind ein Teil des angeborenen Immunsystems, das die erste Verteidigungslinie unseres Immunsystems gegen eindringende Pathogene darstellt. Sie spielen bei der Kontrolle von Tumoren aber auch von Virusinfektionen eine zentrale Rolle, da sie in der Lage sind, kranke Zellen zu töten, während sie gesunde Zellen unberührt lassen. NK-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie schnell und ohne vorangegangene Expansion ihre Effektorfunktion ausüben können. Neben dem direkten Abtöten von kranken Körperzellen durch die Ausschüttung lytischer Granula besteht ihre Aufgabe darin, andere Immunzellen zu aktivieren und anzulocken. Dies machen NK-Zellen, indem sie sogenannte Zytokine und Chemokine sekretieren.

Aktivierung der Natürlichen Killerzellen

Wie können NK-Zellen aktiviert werden? NK-Zellen detektieren unter anderem das sogenannte humane Leukozytenantigen (HLA), das sich auf der Zelloberfläche nahezu aller Zellen des menschlichen Körpers befindet. Durch die Interaktion von spezifischen Rezeptoren der NK-Zellen mit HLA-Molekülen auf anderen Körperzellen können NK-Zellen differenzieren, ob die Körperzelle krank ist und abgetötet werden soll, oder ob sie gesund ist. Dieser Prozess des Lernens, was gesund und was krank ist, wird als NK-Zell-Lizensierung bezeichnet. Ein Gleichgewicht von inhibitorischen und stimulatorischen Signalen, ausgelöst über eine Vielzahl an Rezeptoren, reguliert die NK-Zell-Funktion. Durch die Detektion einer geringen oder gar fehlenden HLA-Expression auf den Zielzellen, was ein Anzeichen für eine maligne oder infizierte Zelle sein kann, werden NK-Zellen aktiviert. Der Mechanismus ist unter dem Namen „missing self“ bekannt; demnach erkennen NK-Zellen die Abwesenheit von „Selbst-Strukturen“ auf der Zielzelle.

NK-Zellen exprimieren eine Vielzahl an Rezeptoren, die an HLA-Moleküle binden. Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem Killerzell-Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR), welche die NK-Zell-Aktivierung inhibieren und folglich die zytotoxischen Effektormechanismen unterbinden können. Bleibt jedoch das inhibitorische Signal aus, können NK-Zellen tumorös entartete oder Virus-infizierte Zellen abtöten, indem sie Zytokine und zytotoxische Granula ausschütten. Der Inhalt dieser ausgeschütteten Granula kann Poren in der Zellmembran der Zielzelle bilden und damit ermöglichen, dass sogenannte Granzyme in die Zelle eindringen und dort einen programmierten Zelltod der infizierten oder entarteten Zelle initiieren. Ein weiterer Mechanismus, durch den NK-Zellen aktiviert werden, ist die Hochregulation von Stressliganden auf den Zielzellen. Stressliganden können beispielsweise während einer Infektion hochreguliert und durch aktivierende Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen erkannt werden. Die Form der Aktivierung wird daher als „induced self“, als selbstinduzierte Aktivierung bezeichnet.

Killerzellen können zur frühen Immunkontrolle beitragen

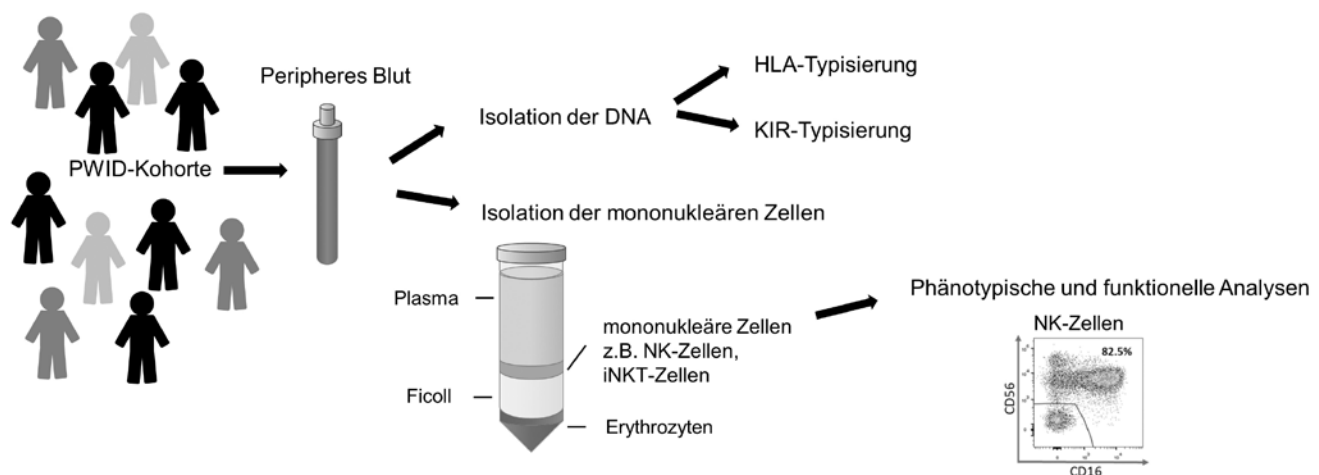
Dass NK-Zellen zu einer Immunkontrolle von HCV vor einer Seroconversion beitragen, wurde unter anderem in einer Studie gezeigt, bei der die NK-Zell-Funktion nach einer Nadelstichverletzung und Kontakt mit HCV-kontaminiertem Blut untersucht wurde. Die NK-Zellen zeichneten sich durch eine erhöhte Zytokinsekretion von Interferon gamma und gesteigerte Zytotoxizität aus. Neben der gesteigerten Funktionalität wurde eine erhöhte Expression von aktivierenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche der NK-Zellen beschrieben⁵. Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Anwesenheit von NK-Zellen, die den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor KIR2DL3 in Abwesenheit des inhibitorischen NK-Zell-Rezeptors NKG2A exprimieren, mit einem Schutz vor einer Infektion bei HCV-exponierten Individuen assoziiert ist. Zudem wird HLA-E, der Ligand für den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor NKG2A, während der Infektion hochreguliert. Da die KIR2DL3-positiven NKG2A-negativen Zellen nicht sensitiv für eine HLA-E-ver-

mittelte Inhibition sind, könnten diese Zellen helfen, HCV-exponierte Individuen vor einer HCV-Infektion zu schützen⁶.

Die NK-Zell-Aktivierung in der frühen Phase einer Infektion kann durch die Interaktion von HLA-Molekülen und KIRs auf NK-Zellen beeinflusst sein. Assoziationsstudien können hierbei helfen, Zusammenhänge zwischen genetischen Varianten und verschiedenen Verlaufsformen einer Infektion zu identifizieren. Daher wird bei diesen Assoziationsstudien das Patient*innenkollektiv im Hinblick auf spezifische genetische Merkmale charakterisiert und anschließend auf eine Assoziation mit dem Infektionsstatus untersucht. In einer solchen Studie konnten Khakoo und Kolleg*innen zeigen, dass die genetisch determinierte Kombination von KIR2DL3 und dem Liganden HLA-C-Gruppe 1 (HLA-C1) signifikant häufiger in Patient*innen mit einer spontan ausgeheilten HCV-Infektion vorkommt. Darüber hinaus war die Effektorfunktion der NK-Zellen von Patient*innen, die homozygot für HLA-C1 waren, besser als die von Patient*innen, die genetisch einen HLA-C2-Hintergrund haben⁷.

Genetische Analysen

Für die Analyse, ob bestimmte KIR/KIR-Liganden-Kombinationen einen Einfluss auf den HCV-Krankheitsverlauf in einer Hochrisikokohorte von PWID haben, wurden 266 therapie-naive, genau charakterisierte Patient*innen untersucht. Eingeschlossen wurden 151 chronisch infizierte PWID (HCV-RNA positiv), 64 Patient*innen, die eine spontane Ausheilung erfahren haben (HCV-RNA negativ) sowie 51 Anti-HCV-negative PWID, die am ehesten einen natürlichen Schutz vor einer persistierenden HCV-Infektion haben. Bei diesen Patient*innen wurden die HLA-Klasse-I-Antigene HLA-A, B und C hochauflösend typisiert. Die hohe Auflösung ermöglicht die genaue Charakterisierung, welche KIR-Liganden der*die jeweilige Patient*in trägt und darüber hinaus beispielsweise die Unterscheidung zwischen HLA-A und HLA-B-Allelen, die ein sogenanntes Bw6- oder Bw4-Motiv kodieren. Bw4 ist der Ligand für den inhibitorischen Rezeptor KIR3DL1 und wird über eine spezifische Region in HLA-A- und -B-Molekülen definiert. Die Aminosäureabfolge der HLA-Allele definiert, ob diese



(3) Schematischer Ablauf der PWID-Studie: Nach der Blutentnahme werden mononukleäre Zellen, welche beispielsweise NK-Zellen enthalten, durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die durchflusszytometrische Analyse dient anschließend der phänotypischen und funktionellen Analyse von NK-Zellen. Für die HLA- und KIR-Typisierung der Individuen wird zudem DNA aus dem peripheren Blut isoliert.

Quelle: eigene Darstellung

in der Lage sind, an KIR3DL1 zu binden. Allele, die keine Bindung zu KIR3DL1 eingehen können, tragen ein sogenanntes Bw6-Motiv. Dagegen sind Allele, die ein Bw4-Motiv tragen, fähig, mit KIR3DL1 zu interagieren. Zusätzlich können anhand der Sequenz zwei genetische Varianten von Bw4 unterschieden werden. Die genetische Variante mit einem „I“ (Bw4 80(I)) kann sehr gut an KIR3DL1 binden, wohingegen die „T“-Variante mit einer schwächeren Bindung an KIR3DL1 (Bw4 80(T)) assoziiert ist. Diese schwächere Bindung geht folglich mit einer geringeren Inhibition der NK-Zelle einher. Darüber hinaus wurde die Kohorte auch KIR-typisiert. Die KIR-Gene sind in einer hoch variablen Region im humanen Genom lokalisiert. Aktuell sind 17 KIRs beschrieben, die in unterschiedlichen Kombinationen in verschiedenen Individuen vorkommen können. Nach erfolgter HLA- und KIR-Typisierung der Kohorte kann durch statistische Tests berechnet werden, ob KIR-KIR-Liganden-Kombinationen mit dem HCV-Infektionsverlauf assoziiert sind.

Die genetische Analyse der PWID ergab, dass die Konstellation von KIR3DL1 in Kombination mit Bw4 80(T) mit einer spontanen Ausheilung von HCV assoziiert ist⁸. Da dies die erste Kohortenstudie war, die KIR3DL1/Bw4 80(T) mit einem HCV Infektionsausgang verknüpfte, wurde zur Verifizierung die Assoziation in einer unabhängigen Kohorte untersucht. Dafür wurden 342 PWID aus Nordamerika analysiert. Auch in dieser Kohorte war die genetische Kombination von KIR3DL1/HLA-Bw4 80(T) signifikant häufiger in Patient*innen, die eine spontane Ausheilung erfahren haben, im Vergleich zu chronisch HCV-Infizierten. Somit konnte die Assoziation zwischen dem NK-Zell-Rezeptor KIR3DL1 und seinem Liganden Bw4 80(T) mit einer spontanen Ausheilung einer HCV-Infektion in zwei unabhängigen Kohorten gezeigt werden. Pati-

ent*innen mit diesem genetischen Hintergrund heilen daher häufiger aus. Im weiteren Verlauf des Projekts wurde bestimmt, welchen funktionellen Einfluss dieser KIR3DL1/Bw4 80(T)-Genotyp hat⁸.

NK-Zellen schützen in der spät akuten Phase

Dafür wurde ein repräsentativer Anteil der Kohorte näher charakterisiert. Solche funktionellen und phänotypischen Analysen können beispielsweise mittels Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Mit dieser Methode können sowohl Oberflächenmoleküle auf verschiedenen Immunzell-Subtypen als auch intrazelluläre Proteine quantitativ bestimmt werden. Für die Analyse der zu untersuchenden Zielpopulation werden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper verwendet, die gegen hochspezifische Zelloberflächenantigene gerichtet sind. Mit einer Kombination an verschiedenen Antikörpern, die gegen sogenannte Cluster von Differenzierungsmarkern (CD) gerichtet sind, können beispielsweise NK-Zellen über ihre Expression von CD16 und CD56 und die fehlende Expression der T-Zell- und B-Zell-Marker CD3 und CD19 identifiziert werden. Auch Effektorfunktionen können durchflusszytometrisch bestimmt werden, indem Zytokine intrazellulär durch fluoreszenzmarkierte Antikörper angefärbt werden.

Für die Untersuchung der Funktion von KIR3DL1-positiven NK-Zellen im Kontext einer HCV-Infektion wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes mit einer Zelllinie, den sogenannten K562, stimuliert. K562 zeichnen sich durch ihre fehlende HLA-Expression auf der Oberfläche aus und führen somit zu einer Aktivierung von NK-Zellen über „missing self“. Neben der Zytokinproduktion wurde auch die Degranulationsfähigkeit der NK-Zellen untersucht. KIR3DL1-positive NK-Zellen von HCV infizierten

Individuen mit einem Bw4 80(T) genetischen Hintergrund zeigten sowohl eine erhöhte Zytokinsekretion als auch ein gesteigertes Degranulationsvermögen im Vergleich zu Bw4 80 (I)-positiven PWID. Die erhöhte Funktionalität von KIR3DL1-positiven NK-Zellen könnte während einer akuten HCV-Infektion von Vorteil sein, sodass Individuen, die ein Bw4 80 (T)-Motiv tragendes HLA-Allel exprimieren, HCV spontan eliminieren und folglich keine chronische HCV-Infektion entwickeln. Da Bw4 80 (T) als schwächerer Ligand für KIR3DL1 beschrieben ist, muss im Fall einer HCV-Infektion nur ein geringerer inhibitorischer Schwellenwert überwunden werden, um NK-Zellen zu aktivieren.

NK-Zellen schützen in der früh akuten Phase

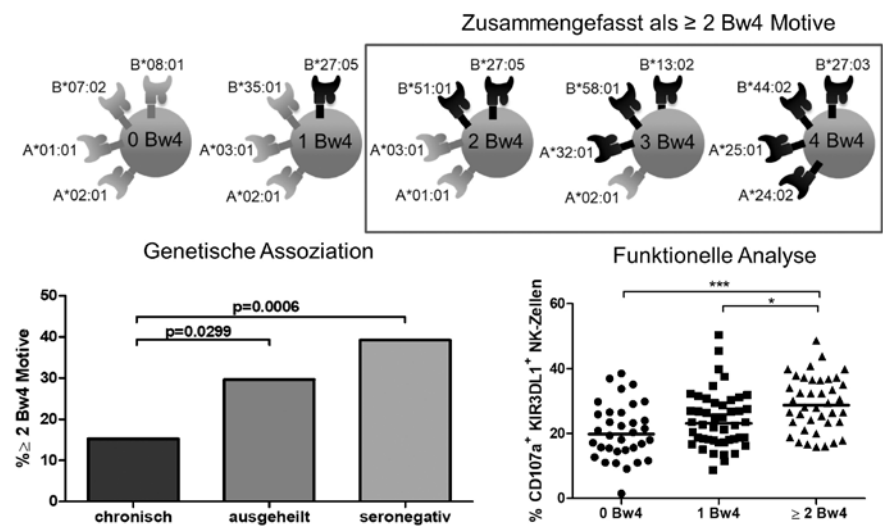
Auch ein zweiter unabhängiger Mechanismus konnte in der genetischen Analyse mit dem HCV-Infektionsverlauf assoziiert werden. Da jedes Individuum zwei HLA-A und zwei HLA-B Moleküle trägt, kann jeder maximal vier Bw4-Motive exprimieren. Auf genetischer Ebene konnten wir im Vergleich zu Individuen mit einem oder keinem Bw4-tragendem Allel zeigen, dass PWID die multiple Bw4-tragende Allele besitzen, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit HCV eliminieren, bevor es zu einer Serokonversion kommt. Eine ansteigende Anzahl an Bw4-Motiven konnte zudem mit einer schrittweisen Erhöhung der KIR3DL1-positiven NK-Zell-Funktion korreliert werden. Die daraus resultierende verbesserte Interferon gamma-Expression und erhöhte Degranulation im Kontext von multiplen Bw4-Motiven kann auf einen Prozess, der als Lizensierung bezeichnet wird und einen Lernprozess der NK-Zellen darstellt, zurückgeführt werden. Wenn KIR-positive NK-Zellen mehrmaligen Kontakt mit vielen

inhibitorischen Liganden durchlaufen haben, sind sie im toleranten Status hochgradig inhibiert. Beim Wegfall dieses starken inhibitorischen Signals können diese NK-Zellen stärker aktiviert werden und schütten mehr Zytokine und Granula aus als Zellen, die vorher nur über wenige Interaktionen gehemmt wurden und daher keinen effektiven Lernprozess durchlaufen haben⁸.

NKT-Zellen in der HCV-Infektion

Die Ausheilung einer HCV-Infektion ist sowohl mit der Aktivierung des angeborenen Immunsystems als auch mit der nachfolgenden Aktivierung des erworbenen Immunsystems assoziiert. Vor ungefähr 20 Jahren wurde eine neue Zellsubpopulation identifiziert, die eine Verbindung zwischen beiden Immunsystemen bildet. Natürliche Killer T (NKT)-Zellen weisen Eigenschaften von Zellen des angeborenen, aber auch des erworbenen Immunsystems auf. Sie besitzen analog zu T-Zellen einen T-Zellrezeptor, der im Gegensatz zu T-Zellen keine Peptide sondern Glykolipide erkennt. Diese werden über das nicht-klassische Haupthistokompatibilitätskomplex-ähnliche Molekül CD1d präsentiert. Zudem exprimieren NKT-Zellen neben dem klassischen T-Zellmarker CD3 auch NK-Zellrezeptoren auf der Oberfläche. Ihre Fähigkeit, ohne vorangegangene Sensibilisierung Zytokine und zytotoxische Granula auszuschütten, ist eine Eigenschaft von Zellen des angeborenen Immunsystems.

Die Rolle, die NKT-Zellen bei dem Verlauf einer HCV-Infektion spielen, ist jedoch unzulänglich definiert. Mit Hilfe unserer PWID-Kohorte konnten wir einen Subtyp der NKT-Zellen, die invarianten NKT (iNKT)-Zellen während einer HCV-Infektion näher charakterisieren. iNKT-Zellen zeichnen sich durch einen hoch konservierten semi-invarianten T-Zellrezeptor aus. Es konnte gezeigt werden, dass



(4) Erhöhte Wahrscheinlichkeit der HCV-Eliminierung in PWID mit multiplen Bw4-tragenden Allelen: Schematische Darstellung über die Einteilung der PWID anhand der HLA-Typisierungsergebnisse in 0 Bw4-, 1 Bw4- und ≥ 2Bw4-Motiv-tragende Individuen. Bw4-tragende HLA-A- und HLA-B-Allele sind in schwarz dargestellt. Die genetische Analyse zeigte, dass PWID mit multiplen ≥ 2 Bw4-Motiv-tragenden Allelen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit HCV eliminieren, bevor es zu einer Serokonversion kommt. Zusätzlich zeigten funktionelle NK-Zell-Analysen, dass die ansteigende Anzahl an Bw4-Motiven mit einer Steigerung der Degranulationsfähigkeit (CD107a) einhergeht.

Quelle: Thoens C, Senff T, Hydes TJ, Manser AR, Heinemann FM, Heindold A, Heilmann M, Kim AY, Uhrberg M, Scherbaum N, Lauer GM, Khakoo SI, Timm J. HLA-Bw4 80(T) and multiple HLA-Bw4 copies combined with KIR3DL1 associate with spontaneous clearance of HCV infection in people who inject drugs. *J Hepatol.* 2017;67(3):462-70

iNKT-Zellen in der chronischen Infektion aktiviert sind. Potenziell konnten wir zwei Mechanismen darlegen, die diesen Aktivierungsstatus erklären könnten. Zum einen wird in der HCV-infizierten Leber Interferon alpha produziert, das auf Zellen des peripheren Blutes eine leichte Hochregulation von CD1d, dem Liganden von iNKT-Zellen, auslösen kann. Interferon könnte somit indirekt die Aktivierung von NKT-Zellen vermitteln. Leberanalysen zeigten zudem eine signifikant erhöhte CD1d-Transkription in HCV-infizierten Lebern im Vergleich zu Hepatitis-B-infizierten Lebern. Zum anderen kann das proinflammatorische Zytokinmilieu für die Modulation des Aktivierungsstatus, von iNKT-Zellen verantwortlich sein. Eine Kombination an Zytokinen führte zu einer signifikanten Erhöhung des Aktivierungsmarkers CD38 auf iNKT-Zellen. Zur Iden-

tifizierung des Einflusses dieses erhöhten Aktivierungsstatus werden momentan ausführliche funktionelle Analysen durchgeführt.

Ausblick

Das Ziel dieser hier beschriebenen immunologischen Grundlagenforschung ist es, ein besseres Verständnis der HCV-Infektion zu erlangen und dazu beizutragen, die komplexen Mechanismen aufzuklären, die bei einigen Individuen zu einer spontanen Elimination des Virus führen beziehungsweise Individuen vor einer Infektion schützen. Ein besseres Verständnis der Rolle des angeborenen und erworbenen Immunsystems für den HCV-Infektionsverlauf könnte für die Entwicklung einer prophylaktischen Impfung helfen.

Summary

Worldwide, 71 million people are chronically infected with HCV, and the WHO estimates that 400,000 people die from HCV-associated liver diseases each year. While 15–45% of infected individuals are able to spontaneously clear the infection without the need for therapy, 55–85% develop a chronic infection. Since in western industrialized countries the most important risk factor to acquiring HCV is intravenous drug use, we use a cohort of people who inject drugs (PWID) to gain novel insight into the contribution of the innate as well as adaptive immune system to HCV infection outcome. We comparatively analyze patients that develop chronic infection, individuals with spontaneous immune control of HCV infection, and individuals that remain anti-HCV seronegative despite continuous high-risk behaviour.

There is growing evidence that natural killer (NK) cells, which are part of the innate immune system, contribute to HCV control. Genetic association studies linked certain combinations of NK cell receptors and their ligands with beneficial HCV infection outcome. We performed a cohort study to analyze how the combination of killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) that regulate NK cell function and their ligands impact the HCV infection outcome in PWID. The genetic combination of the NK cell receptor KIR3DL1 and its weaker ligand HLA Bw4 80(T) was associated with spontaneous clearance of HCV infection in two independent cohorts. Further functional characterization showed that KIR3DL1 positive NK cells from patients with that HLA-Bw4 80(T) genetic background showed superior functionality. Besides the analysis of NK cells, HCV cohort studies helped to characterize the impact of an immune cell type that

bridges the innate and the adaptive immune system, namely natural killer T cells, in HCV infection outcome. We could demonstrate that NKT cells are activated in chronically infected individuals, possibly driven by the cytokine milieu in these patients. The functional consequence is currently under further investigation. Even though HCV cure rates are nearly at 100%, HCV still poses a major healthcare problem, since infection could not yet be prevented. Immunological basic research could help to gain a better understanding of the causes that lead to spontaneous resolution or even which mechanisms protect individuals from infection. This knowledge could help to develop an HCV vaccination, which is needed for the global eradication of HCV.

Anmerkungen/Literatur

- 1) WHO. Hepatitis C Fact sheet 9 July 2019 [Retrieved July 24, 2019]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
- 2) Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin Nr. 29, Hepatitis C im Jahr 2017. 2018.
- 3) Timm J, Walker CM. Mutational escape of CD8+ T cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infections. *Med Microbiol Immunol.* 2015;204(1):29–38.
- 4) Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut.* 2011;60(2):268–78.
- 5) Werner JM, Heller T, Gordon AM, Sheets A, Sherker AH, Kessler E, Bean KS, Stevens M, Schmitt J, Rehermann B. Innate immune responses in hepatitis C virus-exposed healthcare workers who do not develop acute infection. *Hepatology.* 2013;58(5):1621–31.
- 6) Thoens C, Berger C, Trippler M, Siemann H, Lutterbeck M, Broering R, Schlaak J, Heinemann FM, Heinold A, Nattermann J, Scherbaum N, Alter G, Timm J. KIR2DL3(+) NKG2A(-) natural killer cells are associated with protection from productive hepatitis C virus infection in people who inject drugs. *J Hepatol.* 2014;61(3):475–81.
- 7) Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science.* 2004;305(5685):872–4.

- 8) Thoens C, Senff T, Hydes TJ, Manser AR, Heinemann FM, Heinold A, Heilmann M, Kim AY, Uhrberg M, Scherbaum N, Lauer GM, Khakoo SI, Timm J. HLA-Bw4 80(T) and multiple HLA-Bw4 copies combined with KIR3DL1 associate with spontaneous clearance of HCV infection in people who inject drugs. *J Hepatol.* 2017;67(3):462–70.

Der*die Autor*in

Tina Senff erlangte ihren Bachelorabschluss in Biomedizin 2011 an der Hogeschool Zuyd in den Niederlanden. Anschließend studierte sie von 2011 bis 2014 an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen und verfasste ihre Masterarbeit in Biologie am Institut für Immunologie. Sie promovierte von 2014 bis 2018 im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 1949 „Immunantworten in Infektionskrankheiten – Regulation zwischen angeborener und erworbener Immunität“ im Labor von Prof. Jörg Timm am Institut für Virologie in Essen und Düsseldorf. Während ihrer Promotionszeit absolvierte sie einen dreimonatigen Forschungsaufenthalt an der Universität von Southampton/Southampton General Hospital, im Labor von Prof. Salim Khakoo. 2018 erfolgte der Abschluss der Promotion an der Universität Duisburg-Essen mit dem Thema „The role of Natural Killer cells and Natural Killer T cells in HCV infection“. Seit 2018 arbeitet sie als Postdoc im Institut für Virologie in Düsseldorf.

Jörg Timm studierte von 1992 bis 1999 Medizin an den Universitäten Münster und Bonn. In dieser Zeit verfasste er auch seine Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie der Universität Bonn und wurde 2000 promoviert. Von 2000 bis 2002 arbeitete Timm zunächst als Arzt im Praktikum und dann als Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Knappschafts-Krankenhaus Bochum-Langendreer. Von 2002 bis 2005 folgte ein Forschungsaufenthalt in Boston am Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, im Labor von Bruce Walker, wo sich Jörg Timm zunehmend unter der Leitung von Todd Allen mit der Immunbiologie der Hepatitis-C-Virus-Infektion beschäftigte. Nach seiner Rückkehr nach Deutschland arbeitete Timm zunächst wieder als Assistenzarzt am Universitätsklinikum Bergmannsheil in Bochum, bevor er 2006 an das Institut für Virologie in Essen wechselte. Dort baute er eine eigene Arbeitsgruppe zur Immunbiologie der Virushepatitis auf. Es folgten die Habilitation im Jahr 2010 und die Anerkennung zum Facharzt für Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie im Jahr 2011. Im gleichen Jahr erhielt Jörg Timm einen Ruf auf die Professur für Virologie an der Universität Duisburg-Essen. 2014 folgte er dann einem Ruf auf die Professur für Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verbunden mit der Leitung des Instituts für Virologie am Universitätsklinikum Düsseldorf. Seit 2016 ist Jörg Timm Prodekan für Forschung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität.



Tina Senff. Foto: Vladimir Unkovic

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts-
bibliothek

Dieser Text wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt. Die hier veröffentlichte Version der E-Publikation kann von einer eventuell ebenfalls veröffentlichten Verlagsversion abweichen.

DOI: 10.17185/duepublico/71639

URN: urn:nbn:de:hbz:464-20200421-081215-1

Alle Rechte vorbehalten.