

Benedikt Fritzsching  
Dr. med.

## **Regulation der Oberflächenexpression des potentiellen Hepatitis C Virusrezeptors CD81**

Geboren am 30.11.1974 in Erlangen  
Reifeprüfung am 01.07.1994 in Gunzenhausen  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis SS 2002  
Physikum am 24.03.1997 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium an der Mayo Clinic in Rochester (MN, USA),  
Ruprecht-Karls Universität in Heidelberg  
Praktisches Jahr an der Harvard Medical School in Boston (MA, USA),  
am Inselspital in Bern (Schweiz),  
an der Ruprecht-Karls Universität in Heidelberg  
Staatsexamen am 29.11.2002 an der Ruprecht-Karls Universität in Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Harald zur Hausen

Auslöser dieser Arbeit war die Identifizierung des Tetraspanins CD81 als putativer Zellrezeptor auf der Suche nach dem unbekanntem Rezeptor für das Hepatitis C Virus (HCV). HCV infiziert Hepatozyten und Lymphozyten und löst in vielen infizierten Individuen lymphoproliferative Störungen aus. Da CD81 als stimulierender Korezeptor in die B- und T-Zellaktivierung eingreift, war es Ziel dieser Arbeit, die Expression, Funktion und Regulation von CD81 auf der Oberfläche von B- und T- Lymphozyten während der HCV- Infektion und während der Immunaktivierung zu untersuchen. Es gelang erstmals anhand von CD81 einen Zusammenhang zwischen Regulation der Oberflächenexpression und mikrovesikulärer Sekretion eines lymphozytären Rezeptormoleküls zu beschreiben.

HCV-positive und HCV-negative Individuen wurden für eine Paarstudie ausgewählt und lymphozytäre CD81-Oberflächenlevel mit einer in dieser Arbeit neu entwickelten kalibrierten Dreifarben-Durchflußzytometrie bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikante ( $p=0,01$ ) Reduktion der CD81-Oberflächenexpression auf B-Lymphozyten in HCV-positiven Individuen. Diese Reduktion war spezifisch, da der CD19-Korezeptor unbeeinflusst war. Ein nichtsignifikanter Trend zur verminderten CD81 Expression zeigte sich auch in T-Lymphozyten von HCV-infizierten Individuen. Da viele Viren nach Infektion die Expression ihres zellulären Oberflächenrezeptors herunterregulieren, könnten diese Ergebnisse für eine Rolle von CD81 als HCV-Rezeptor sprechen. Es ist ebenfalls anzunehmen, dass die verminderte CD81-Expression Einfluss auf die Funktion von B- und T- Lymphozyten nimmt. Um dies zu untersuchen, wurde mittels quantitativer Durchflußzytometrie die Menge an CD81 Oberflächenmolekülen pro Zelle in verschiedenen B- und T-Zelllinien bestimmt und die Reaktion dieser Zellen (Proliferation, Zytokinsekretion, Aktivierungsmarker) auf die Stimulierung mit anti-CD81 Antikörpern studiert. Es zeigte sich, dass in B-Zelllinien die Aktivierbarkeit invers mit der Menge an CD81-Oberflächenmolekülen korreliert. Es ist deshalb nahe liegend zu hypothesieren, dass CD81-Expressionslevel entscheidenden Einfluss auf die Funktion von CD81 als Aktivator oder Inhibitor nehmen. Die in der Paarstudie beobachtete Reduktion der CD81-Expression könnte zu einer gestörten B-Zellaktivierung in HCV-infizierten Individuen beitragen.

Inwieweit CD81 als modulierendes Molekül der B- und T-Zellaktivierung durch spezifische Mechanismen während der Lymphozytenaktivierung reguliert wird, war zu Beginn der Arbeit unklar und sollte durch weitere Experimente untersucht werden. Interessanterweise führte die Aktivierung tonsillärer B-Lymphozyten mit anti-IgM Antikörpern und Interleukin-4 zu einer dramatischen Abnahme der CD81-Oberflächenexpression. Das gleiche wurde in hochaufgereinigten T-Lymphozyten und der Jurkat T-Zelllinie nach Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beobachtet. Die Reduktion von

Oberflächen-CD81 trat innerhalb von 30 Minuten auf und ging mit einem Verlust von zellulärem CD81-Gesamtprotein einher. Der rapide Verlust des Rezeptors trat bei unveränderten CD81 mRNA Level und unveränderter Endozytoserate auf und war mit einer vermehrten Sekretion von CD81-positiven Mikrovesikeln verbunden. Nach Ergebnissen elektronenmikroskopischer und proteinchemischer Untersuchungen handelt es sich dabei am ehesten um Exosomen, welche nach Internalisierung in multivesikuläre Endosomen gebildet und sezerniert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass CD81-positive Exosomen den Übertrag von CD81 von CD81-positiven zu CD81-negativen Zellen vermitteln können.

Die hier beschriebene Sekretion CD81+ Mikrovesikel von humanen T-Lymphozyten erweitert und ergänzt das Verständnis von Mikrovesikel/Exosomen, die von antigen-präsentierenden Zellen (APCs) sezerniert werden. Während bei den APCs jedoch die immunmodulatorische Funktion der vesikulär sezernierten Moleküle für die Empfängerzelle im Vordergrund steht, hat die Abgabe von CD81-Molekülen eine unmittelbare Bedeutung für die CD81-Oberflächenexpression der sezernierenden T-Zelle. Dadurch wird ein neuer Zusammenhang zwischen Regulation der Oberflächenexpression und mikrovesikulärer Sekretion eines lymphozytären Rezeptormoleküls evident. Diese Ergebnisse führen außerdem zur Hypothese, dass CD81 auf Exosomen eine wichtige Rolle in der Übertragung, Sekretion und dem Transport von HCV-Partikeln spielt. Gleichzeitig könnten zirkulierende CD81-positive Mikrovesikel eine modulierende Rolle in der Immunaktivierung in HCV-infizierten Individuen einnehmen.