

Die zelluläre Immunantwort bei ausgeheilten und chronischen Hepatitis C Virus Infektionen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geographie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Tobias Christopher Hitziger

aus Essen-Werden

Dezember 2008

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Roggendorf

2. Gutachter: PD Dr. Elke Dopp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. Ludger Klein-Hitpass

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2009

Inhalt

1. Einleitung	7
1.1. Das Hepatitis C Virus	8
1.1.1. Die Morphologie des HCV	8
1.1.2. Das HCV Genom	8
1.1.3. Das Polyprotein	9
1.1.4. Der Replikationszyklus	11
1.2. Die Pathogenese der HCV Infektion.....	12
1.2.1. Der klinische Verlauf.....	12
1.2.2. Die Diagnostik.....	12
1.2.3. Die antivirale Therapie.....	13
1.3. Die Immunantwort bei einer HCV Infektion	15
1.3.1. Die angeborene Immunantwort	15
1.3.2. Die adaptive Immunantwort	16
1.3.2.1. Die humorale Immunantwort	16
1.3.2.2. Die zelluläre Immunantwort.....	17
1.3.3. Die Korezeptoren der CD28 Familie	19
1.4. Modellsysteme der HCV Infektion	21
1.4.1. In vivo Modelle	21
1.4.2. In vitro Modelle	22
1.5. Die Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
2. Material und Methoden	26
2.1. Material.....	26
2.1.1. Humane Proben.....	26
2.1.1.1. Blutproben von Spendern mit fraglichem HCV Befund	26
2.1.1.2. Blutproben chronisch infizierter HCV Patienten	26
2.1.1.3. RNA aus Lebermaterial chronisch infizierter HCV Patienten	27
2.1.2. Chemikalien	27
2.1.3. Geräte.....	29
2.1.4. Kommerzielle Kits	30
2.1.5. Verbrauchsmaterialien	30
2.1.6. Antikörper	31

2.1.7. Lösungen und Puffer	32
2.1.8. Oligonukleotide	34
2.1.9. Proteine, Peptide und Tetramere.....	35
2.1.10. Humane Hepatomazelllinie Huh7	36
2.1.11. Jurkat Zelllinie	36
2.1.12. Reagenzien für die Molekularbiologie.....	36
2.1.13. Computerprogramme und Internetseiten.....	37
2.2. Methoden	37
2.2.1. Isolierung der PBMC aus peripherem Vollblut.....	37
2.2.2. Zellkulturtechniken.....	37
2.2.2.1. Kryokonservierung von Zellen.....	37
2.2.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl	38
2.2.2.3. Kultivierung von PBMC	38
2.2.2.4. Kultivierung von Jurkat Zellen	38
2.2.2.5. Kultivierung von Huh7 Zellen	38
2.2.2.6. Transfektion von Huh7 Zellen durch Elektroporation	39
2.2.2.7. Behandlung von Huh7 Zellen mit IFN α / γ	39
2.2.2.8. Aktivierung von Jurkat Zellen	39
2.2.2.9. Kultur von Jurkat Zellen mit löslicher PD-L1/Fc Chimäre.....	40
2.2.2.10. Kokultur von Jurkat und Huh7 Zellen	40
2.2.2.11. Beladen von HLA-A2 Molekülen mit Peptiden	40
2.2.2.12. Kokultur von PBMC und Huh7 Zellen	41
2.2.3. Immunologische Analysen.....	41
2.2.3.1. Proliferationsassay.....	41
2.2.3.2. ELISpot Assay.....	41
2.2.3.3. Durchflusszytometrie.....	42
2.2.3.3.1. Bestimmung von HLA-A2 auf Zellen	42
2.2.3.3.2. Phänotypisierung von Zellen	42
2.2.3.3.3. Intrazelluläre Zytokinfärbung	43
2.2.3.3.4. Detektion HCV spezifischer CD8+ T Zellen.....	43
2.2.3.3.5. Analyse der Apoptose	44
2.2.3.4. IL-10 ELISA.....	44
2.2.4. Molekularbiologische Analysen	44
2.2.4.1. DNA Agarosegelelektrophorese.....	44
2.2.4.2. Isolation von RNA	45
2.2.4.2.1. PBMC	45
2.2.4.2.2. Plasma.....	45

2.2.4.2.3. Huh7 Zellen	45
2.2.4.3. Qualitative RT-PCR.....	45
2.2.4.3.1. Analyse von NS3 Fragmenten.....	45
2.2.4.3.2. Diagnostischer Nachweis von HCV Core RNA	47
2.2.4.3.3. TMA	48
2.2.4.4. Quantitative RT-PCR	48
2.2.4.5. Southern Blot	49
2.2.4.6. Sequenzierungen	49
2.2.5. Serologische Untersuchungen.....	50
2.2.5.1. Anti-HCV Suchtest	50
2.2.5.2. Anti-HCV Bestätigungstest.....	50
3. Ergebnisse	52
3.1. Analyse der zellulären Immunantwort bei Blutspendern mit fraglichem HCV Befund.....	52
3.1.1. Serologische Untersuchungen der Blutproben	52
3.1.2. Analyse der zellulären Immunantwort.....	55
3.1.2.1. Proliferation der PBMC	55
3.1.2.2. IFN γ Produktion der PBMC	56
3.1.3. Analyse viraler RNA in PBMC	57
3.2. PD-1 Expression bei chronisch infizierten HCV Patienten	58
3.2.1. Die Expression auf T Zellen.....	58
3.2.2. Die Expression von PD-1 auf CD4+ und CD8+ T Zellen unter Therapie	59
3.2.3. Analyse der PD-1 Expression auf HCV spezifischen CD8+ T Zellen vor und während der antiviralen Therapie	60
3.3. Expression von PD-L1 auf Hepatozyten.....	66
3.3.1. Expression auf Huh7 Zellen.....	66
3.3.2. Effekt von IFN α auf die PD-L1 Expression	68
3.3.3. Effekt von IFN γ auf die PD-L1 Expression	69
3.3.4. Expression von PD-L1 mRNA im Lebergewebe	70
3.4. Effekt der PD-1/PD-L1 Interaktion auf T Zellen.....	71
3.4.1. Induktion der PD-1 Expression auf Jurkat Zellen	71
3.4.2. Kultur PD-1 exprimierender Jurkat Zellen mit rekombinanter PD-L1/Fc Chimäre	72
3.4.3. Kokultur von Jurkat Zellen und PD-L1 exprimierenden Huh7 Zellen.....	73

3.4.4. Kokultur von HCV spezifischen T Zellen und PD-L1 exprimierenden HLA-A2+ Con1 Zellen.....	74
4. Diskussion	77
4.1. Fraglicher HCV Befund.....	77
4.1.1. Analyse der humoralen Immunantwort bei Blutspendern mit fraglichem HCV Befund.....	77
4.1.2. Analyse der zellulären Immunantwort bei Blutspendern mit fraglichem HCV Befund.....	79
4.1.3. Die Möglichkeit einer okkulten HCV Infektion.....	80
4.2. PD-1	81
4.2.1. Expression von PD-1 auf T Zellen bei chronischer HCV Infektion	81
4.2.2. Longitudinale Analyse der PD-1 Expression auf T Zellen unter Therapie.....	82
4.3. PD-L1	85
4.3.1. Expression von PD-L1 auf Hepatozyten.....	85
4.3.2. Modulation der PD-L1 Expression durch Interferone.....	86
4.3.3. Effekt der PD-1/PD-L1 Interaktion auf T Zellen	88
5. Zusammenfassung.....	90
6. Literatur	92
7. Abkürzungen	105
8. Anhang	108
8.1. Sequenzen	108
8.2. Alignments.....	109
8.3. Publikationsverzeichnis	116
8.4. Danksagung	117
8.5. Lebenslauf.....	118
8.6. Erklärungen	119

1. Einleitung

Geschätzte 120-170 Millionen Menschen sind mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert, was in etwa 2-3% der Weltbevölkerung entspricht. Somit ist die HCV Infektion ein großes, weltweites Gesundheitsproblem. Bei bis zu 80% der Infizierten entwickelt sich ein chronischer Verlauf, was zu Leberzirrhose führen und in einem hepatozellulären Karzinom enden kann. Aufgrund dieser Entwicklung stellt die Infektion eine der Hauptursachen für Lebertransplantationen dar.

Obwohl das Virus vor fast 20 Jahren identifiziert wurde, ist das Wissen immer noch sehr lückenhaft. Die Tatsache, dass noch kein geeignetes Tiermodell außer dem Schimpanse entwickelt wurde, erschwert die Gewinnung wichtiger Erkenntnisse. Auch trotz wichtiger Fortschritte bei den Zellkultursystemen in den letzten Jahren sind diese noch für viele Fragestellungen unzureichend. Das verdeutlicht auch, warum die Entwicklung neuer und effizienter Arzneistoffe langsam von statten geht. Schon vor der Identifizierung des Virus wurde die Therapie mit Interferon alpha (IFN α) durchgeführt, die später mit dem Nukleosidanalogen Ribavirin kombiniert wurde. Allerdings wird eine dauerhafte Ausheilung durch diese Kombinationstherapie abhängig von Genotyp nur bei 50-80% der Patienten erreicht.

Das macht deutlich, dass weitere Anstrengungen unternommen werden müssen, um prophylaktische und/oder therapeutische Wege zur Prävention oder Heilung dieser Krankheit zu finden. Ein Ansatz liegt dabei in der zellulären Immunantwort. Sie ist ein Merkmal, in dem sich spontan ausgeheilte und chronisch infizierte Patienten gravierend unterscheiden. Während sich bei ausgeheilten Individuen starke HCV spezifische Immunantworten detektieren lassen, können bei vielen chronischen Patienten spezifische T Zellen entweder gar nicht oder nur sehr schwer nachgewiesen werden. Sollte es gelingen, den Grund für diese T Zell Anergie nachzuweisen, würde es neue Möglichkeiten im Bereich der Entwicklung neuer Therapeutika oder Vakzine eröffnen. Dadurch könnte man in den physiologischen Prozess der Anergienentwicklung unterstützend eingreifen, wodurch das Immunsystem das Virus selbstständig eliminieren kann und eine andauernde Ausheilung gewährleistet ist.

Die folgende Einleitung soll einen kurzen Überblick über den momentanen Wissensstand bezüglich des Virus, der Infektion und der Therapie geben.

1.1. Das Hepatitis C Virus

1.1.1. Die Morphologie des HCV

Das HCV ist ein umhülltes, ikosaedrisches Virus mit einem Durchmesser von etwa 40 bis 70 nm (Kaito et al., 1994; Li et al., 1995; Shimizu et al., 1996) und gehört zu Gattung Hepacivirus der Familie der Flaviviridae. Aufgrund der Ähnlichkeit zu anderen bekannten Flaviviren geht man davon aus, dass die Hülle des Virus die Glykoproteine E1 und E2 enthält. Dabei bilden E2 Proteine Homodimere, die längliche, flache Struktur haben und von dem E1 Protein flankiert werden. Davon umschlossen wird das sphärische Nucleokapsid, das durch die Core Proteine gebildet wird und wiederum die RNA enthält (Penin et al., 2003).

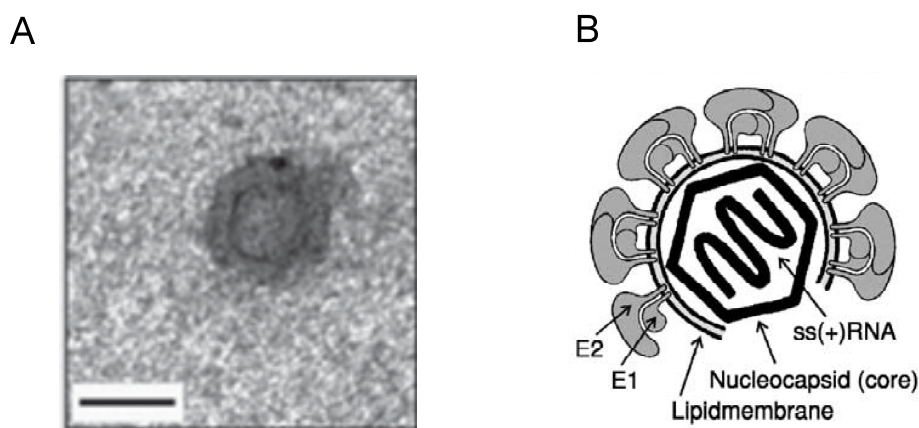


Abb. 1.1 Das Hepatitis C Virus. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines rekombinanten Viruspartikels. Die Größenskala entspricht 50 nm (Wakita et al., 2005). B) Schematische Abbildung eines HCV Partikels (Bartenschlager et al., 2004).

1.1.2. Das HCV Genom

HCV besitzt ein RNA Genom mit positiver Polarität und einer ungefähren Länge von 9600 bp. Es kodiert einen einzigen offenen Leserahmen (ORF) von etwa 3000 Aminosäuren, der von zwei untranslatierten Regionen (UTR) flankiert wird. Die 5'-UTR besteht aus etwa 342 Nukleotiden und sowohl die Sequenz als auch die Sekundärstruktur sind hoch konserviert. Innerhalb dieser UTR befindet sich eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), wodurch die Translation des Polyproteins vermittelt wird (Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993). Die etwa 200 bp lange 3'-UTR kann in drei Regionen unterteilt werden: Einen variablen Teil von etwa 40 Nukleotiden, einen Poly-Uracil-Trakt von variabler Länge und eine hoch konservierte Region (Kolykhalov et al., 1996; Tanaka et al., 1995, 1996; Yamada et al.,

1996). Während die Funktion des variablen Abschnitts nicht bekannt ist, sind die beiden anderen wichtig für die virale Replikation (Cheng et al., 1999; Yanagi et al., 1999).

Aufgrund der hohen genetischen Variabilität kann das Virus in mindestens sechs Genotypen unterteilt werden, die sich aktuell in 76 bestätigte und vorgeschlagene Suptypen weiter einteilen lassen (Simmonds et al., 2005). Zusätzlich zirkuliert HCV in vivo als ein heterogener, Schwarm von eng verwandten Varianten, den so genannten Quasispezies. Die Ursache dafür liegt in der geringen Transkriptionsgenauigkeit und dem Fehlen eines Korrekturlesemechanismus der RNA abhängigen RNA Polymerase, wodurch es zu einer Mutationsrate von 10^{-3} Nukleotiden pro Generation kommt. Die Selektion der einzelnen Spezies hängt von Replikationskompetenz und der Immunselektion ab.

1.1.3. Das Polyprotein

Das Genom kodiert ein Polyprotein mit einer Länge von etwa 3000 Aminosäuren (Abb. 1.2). Dieses Protein wird sowohl während als auch nach der Translation durch zelluläre und virale Proteinasen in mindestens 10 individuelle Proteine prozessiert. Dabei befinden sich die strukturellen Proteine in dem N-terminalen Drittel des Polyproteins, während der restliche Teil die nicht strukturellen (NS) Proteine enthält.

Direkt am N-Terminus befindet sich Core als erstes Strukturprotein. Die Hauptfunktion des RNA bindenden Proteins liegt in dem Einschluss der synthetisierten viralen RNA und somit in der Bildung des Nukleokapsids. Dem Core folgen die Hüllproteine E1 und E2. Dabei handelt es sich um Glykoproteine, die in Form von Heterodimeren (Deleersnyder et al., 1997) transmembran in die Doppellipidschicht integriert werden, die das Kapsid umhüllt, und die für die Rezeptorbindung an die Zielzelle und die folgende Fusion entscheidend sind (Grakoui et al., 1993; Bartosch et al., 2003). Direkt dahinter folgt das Membranprotein p7, das sich genau zwischen den Struktur- und den Nichtstrukturproteinen befindet. Es wurde der Gruppe der Viroporine zugeordnet, die über die Bildung von Ionenkanälen für die letzten Schritte der Virusreplikation wichtig sind (Carrere-Kremer et al., 2002; Griffin et al., 2003; Pavlovic et al., 2003).

Die folgenden Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B koordinieren den intrazellulären Prozess der Virusreplikation. Im Gegensatz zu den Strukturproteinen werden sie nicht durch die Proteasen der Wirtszelle, sondern durch virale Enzyme prozessiert. Bei NS2 handelt es sich um ein Membranprotein, das selber nicht essentiell für die Replikation ist (Lohmann et al., 1999; Blight et al., 2000). Allerdings ist es entscheidend für die proteolytische Spaltung des Polyproteins zwischen NS2 und NS3. Zusätzlich wurde gezeigt, dass NS2 möglicherweise eine wichtige Rolle in der Produktion infektiöser Viruspartikel spielt (Yi et al., 2007). NS3 ist ein multifunktionales Protein, das zum einen eine

N-terminale Serin Protease und zum anderen eine C-terminale RNA Helikase/NTPase Domäne besitzt. Durch die Bildung eines Heterodimers mit NS4A als Kofaktor wird die Proteaseaktivität weiter gesteigert (Bartenschlager et al., 1994; Failla et al., 1994). Der so gebildete NS3-4A Proteasekomplex ist für alle Spaltungen der C-terminal zu NS3 lokalisierten Proteine verantwortlich. Die Helikase- und NTPase-Aktivität ist dagegen für die Translation und RNA-Replikation essentiell (Bartenschlager et al., 1993; Eckart et al., 1993). Bei NS4B handelt es sich um ein Membranprotein, das vermutlich Membranstrukturen bildet, die die RNA Replikation unterstützen (Egger et al., 2002). Außerdem wurde eine Nukleotid bindende Eigenschaft nachgewiesen (Einav et al., 2004). NS5A ist ein Membran assoziiertes Protein, das essentiell für die Genomreplikation ist (Appel et al., 2006; Seeger et al., 2005). Zusätzlich wurde in vitro gezeigt, dass eine Interaktion von NS5A mit NS5B entscheidend für die Aufrechterhaltung des subgenomischen Replikons ist (Shimakami et al., 2004; Shirota et al., 2002). Bei NS5B handelt es sich um die RNA-abhängige RNA Polymerase für die Transkription der HCV RNA. Das ebenfalls Membran assoziierte Protein kann die de novo Synthese von RNA in vitro und vermutlich auch in vivo einleiten (Bartenschlager et al., 2004), wobei die Aktivität offensichtlich durch Interaktion mit anderen viralen Proteinen wie NS3 und NS5A moduliert werden kann.

Zusätzlich zu diesem ORF besitzt HCV noch einen überlappenden +1 Leserahmen, dessen Sequenz sich im Core Protein überschneidet (Branch et al., 2005) und somit einen alternativen Leserahmen bildet (ARF). Allerdings ist die Funktion des daraus resultierenden ARF Proteins für den Lebenszyklus und/oder die Pathogenese noch nicht bekannt. Für die HCV RNA Replikation spielt es aber keine Rolle.

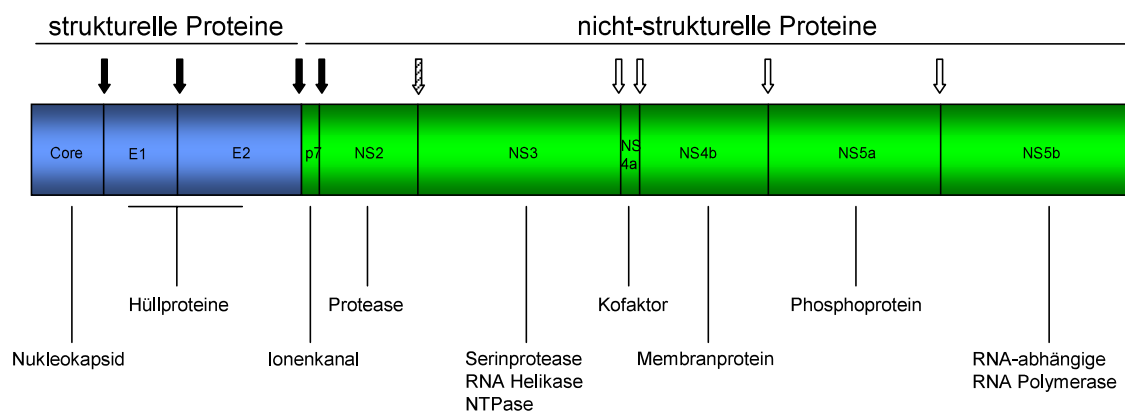


Abb. 1.2 Die Proteinorganisation des offenen Leserahmens mit den strukturellen und nicht-strukturellen Proteinen. Die jeweils bekannten Funktionen der einzelnen Proteine sind angegeben. Außerdem zeigt die Grafik die Schnittstellen der zellulären Proteasen (schwarze Pfeile), die NS2 Protease (gestrichelter Pfeil) und der NS3/4A Proteasekomplex (weiße Pfeile).

1.1.4. Der Replikationszyklus

Der erste Schritt des Replikationszyklus besteht in dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle. Der genaue Ablauf dieses Prozesses ist allerdings unbekannt. Es wurde gezeigt, dass CD81 ein potentieller Rezeptor für E2 ist (Pileri et al., 1998). Aber die Tatsache, dass dieser Rezeptor auf vielen weiteren Zellen neben Hepatozyten exprimiert wird, lässt vermuten, dass es noch weitere Korezeptoren geben muss. Ein weiterer Rezeptor für E2 – der *human scavenger receptor class B type I* (SR-BI) - wird sehr stark auf Hepatozyten exprimiert und könnte den Hepatotropismus erklären (Scarselli et al., 2002). Des Weiteren wurde postuliert, dass das Virus durch Bindung mit Lipoproteinen über den LDL Rezeptor in die Zelle gelangt (Molina et al., 2007). Kürzlich wurde zusätzlich die Rolle von Claudin-1 als Korezeptor für das Eindringen von HCV in Hepatozyten beschrieben (Evans et al., 2007). Somit scheint ein Zusammenspiel dieser Rezeptoren entscheidend für die Infektion der Zellen zu sein. Nach dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle wird die RNA in das Zytoplasma freigesetzt und dient direkt als mRNA für die Synthese von viralen Proteinen. Nach der Prozessierung des Polyproteins wird ein Replikationskomplex gebildet, der an die Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden ist. Bei der Replikation durch die virale RNA abhängige RNA Polymerase dient die RNA mit positiver Polarität als Matrize für die Synthese der RNA negativer Polarität. Über die daraus resultierende doppelsträngige RNA wird einzelsträngige RNA positiver Polarität vervielfältigt und in neue Viruspartikel verpackt (Abb. 1.3). Wahrscheinlich verlassen diese Partikel die Zellen wieder über Exozytose (Bartenschlager et al., 2000). Durch diesen Zyklus produziert HCV beim Menschen etwa 10^{12} Virionen pro Tag (Neumann et al., 1998).

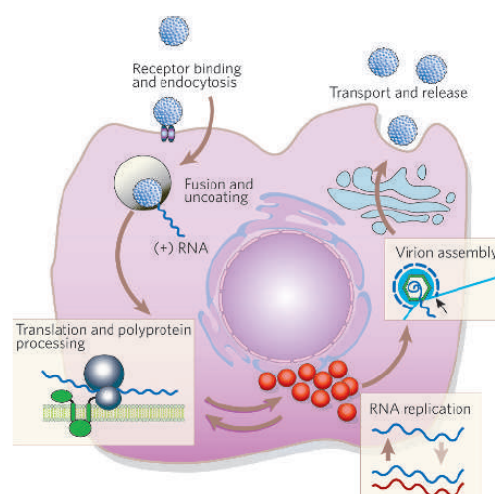


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HCV (Lindenbach et al., 2005). Nach der Infektion der Zellen wird die virale RNA in das Zytoplasma gegeben und translatiert. Nach der Prozessierung der Proteine wird im Replikationskomplex, der an die Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden ist, die RNA repliziert und diese in neue Virionen verpackt.

1.2. Die Pathogenese der HCV Infektion

1.2.1. Der klinische Verlauf

Das HCV wird parenteral übertragen. Daher war vor der Entdeckung des Virus die Transfusion kontaminierten Blutes beziehungsweise Blutprodukte der wichtigste Transmissionsfaktor. Seit der Entdeckung des Virus im Jahr 1989 wurden sensitive diagnostische Tests entwickelt und so die Gefahr der Ansteckung über Blutprodukte in den Industrieländern minimiert. Seitdem sind vor allem intravenös Drogenabhängige durch das Teilen von Spritzbesteck die wichtigste Risikogruppe für Neuinfektionen. Obwohl weniger effizient, kann das Virus auch sexuell, iatrogen oder perinatal übertragen werden (Alter et al., 2002). In 50-80% der infizierten Patienten entwickelt sich eine chronische Infektion, die bei etwa 20% nach 20-30 Jahren eine Zirrhose induziert. Diese Patienten haben ein hohes Risiko, als Folge ein Leberkarzinom zu entwickeln (jährliche Rate 1-5%).

Die akute Hepatitis C ist häufig eine milde Erkrankung, die bei den meisten Patienten asymptomatisch oder mit unspezifischen Symptomen verläuft. Nur gelegentlich zeigt sich das typische Bild einer Hepatitis mit deutlich erhöhten Transaminasen und Ikterus.

Wenn nach einer akuten Infektion die virale RNA länger als sechs Monate im Blut nachweisbar ist, spricht man von einer chronischen Infektion. Auch in der folgenden Phase bleibt die Erkrankung weitgehend asymptomatisch, wobei die Patienten häufig über Müdigkeit klagen. Die Transaminasen sind in dieser Phase allenfalls diskret erhöht wobei auch unauffällige Leberwerte bei einer progressiven Lebererkrankung beobachtet werden. Mit fortschreitender Erkrankung und Leberfibrose nehmen dann Symptome wie abdominale Schmerzen, Anorexie, Gewichtsverlust und Ikterus zu.

1.2.2. Die Diagnostik

Der erste Schritt der HCV Diagnostik beruht auf dem Nachweis HCV spezifischer Antikörper. Diese Antikörper sind in der Regel sieben bis acht Wochen nach der Infektion im Serum nachweisbar (Pawlotsky et al., 1999). Mit Hilfe des Suchtests, einem Enzym Immuno Assay (EIA) der dritten Generation, können die Antikörper gegen Core, NS3, NS4 und NS5 mit einer Nachweisrate von mehr als 90% nachgewiesen. Mittlerweile wird der Test nicht mehr als klassischer ELISA sondern maschinell, zum Beispiel mit dem Architect System (Abbott) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Chemilumineszenztest (CMIA), der als eine Abwandlung des klassischen EIA am Ende acridinylierte Konjugate bindet und dadurch ein Chemilumineszenzsignal abgibt. Durch dieses verbesserte System können Antikörper gegen Core, NS3 und NS4 bei mehr als 99% aller chronisch infizierten HCV Patienten

nachgewiesen werden. Weil trotz der neuen Immunoassays vor allem in Kollektiven mit niedriger HCV Prävalenz eine erhebliche Rate an falsch reaktiven Ergebnissen zu finden ist, wird nach internationalen Konsensus Empfehlungen des *National Institutes of Health* (USA) im Anschluss zu einem reaktiven CMIA ein Bestätigungsblot durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Immunoblot, auf dessen Membran die elektrophoretisch aufgetrennten viralen Proteine aufgetragen sind. Durch diese Auftrennung wird eine höhere Spezifität des Tests erreicht. Je nach Hersteller muss im Immunoblot eine Mindestreaktivität bestimmt werden, um eine Probe wirklich als anti-HCV positiv beurteilen zu können. Liegt sie unterhalb dieser Grenze, wird der Status der Probe bezüglich anti-HCV als fraglich eingestuft. Wie eine Studie mit Blutspendern belegte, kommt dieser Befund bei etwa 0,04% der Bevölkerung vor (LeMaire et al., 2000).

Während sowohl chronische als auch ausgeheilte Patienten Antikörper gegen HCV besitzen können, stellt der Nachweis von viraler RNA einen eindeutigen Beweis für eine chronische sowie auch für eine akute Infektion dar, weil RNA schon innerhalb der ersten Woche nach der Infektion im Blut nachweisbar ist (Farci et al., 1991; Shindo et al., 1992). Dabei wird zwischen qualitativen und quantitativen Nachweismethoden unterschieden, die beide auf dem Prinzip der RT-PCR beruhen. Durch die Einführung von standardisierten und teilautomatischen Systemen kann die Virämie qualitativ bis zu einer Grenze von 10 IU/ml (TMA, Bayer) nachgewiesen werden. Die Detektionsgrenze der quantitativen Tests liegt mittlerweile bei 12 IU/ml (RealTime HCV Assay, Abbott). Produkte aus einer RT-PCR können auch sequenziert und somit der HCV Genotyp bestimmt werden, was eine wichtige Information für die Prognose und die Strategie einer antiviralen Therapie ist.

2004 wurde zum ersten Mal das Phänomen der okkulten HCV Infektion beschrieben (Castillo et al., 2004). Diese Art der Infektion äußert sich in zwei möglichen klinischen Bildern. Entweder sind die Patienten anti-HCV negativ und nicht virämisch, zeigen aber abnormale Leberfunktionstests. Oder sie besitzen HCV spezifische Antikörper, sind aber im Serum HCV RNA negativ und weisen keine Erhöhung der Leberenzyme auf (Carreno et al., 2006). In Anbetracht des zweiten klinischen Bildes entsprechen sie serologisch etwa den Spendern mit fraglichem HCV Befund. Die einzige Möglichkeit einer Differenzierung liegt in dem Nachweis viraler RNA in mononuklären Zellen des peripheren Bluts (PBMC). Denn bei 50% der Patienten mit okkulten HCV kann virale RNA in den Zellen nachgewiesen werden (Carreno et al., 2006).

1.2.3. Die antivirale Therapie

Schon vor der Identifikation des HCV wurde die nicht-A nicht-B Hepatitis mit IFN α behandelt. Allerdings lag die Erfolgsrate nur bei 6-20%, abhängig von der Dauer der Behandlung (Di

Bisceglie et al., 2002). Durch die Pegylierung des IFN α und der Kombination mit dem Guanosinanalogen Ribavirin konnte die Rate der erfolgreichen Behandlungen auf 54-56% erhöht werden (Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004). Bezogen auf den Ausgang der Therapie kann man die Patienten in drei Gruppen einteilen. Neben den erfolgreich Therapierten gibt es Patienten (10-25%), bei denen zwar während der Behandlung keine RNA nachgewiesen werden kann, es aber nach Abschluss der Therapie zu einem Rückfall kommt. Die letzte Gruppe wird von den Patienten gebildet, bei denen keine Wirkung der Therapie zu beobachten ist. Bei diesen Individuen wird meistens die Therapie nach der zwölften Woche abgebrochen, da keine Aussicht auf ein späteres Ansprechen besteht.

Entscheidend für den Erfolg einer Therapie ist der Genotyp des Virus. Nur etwas 40% der Patienten, die mit dem Genotyp 1 infiziert sind, zeigen eine dauerhafte Eradikation des HCV. Die Erfolgsrate steigt allerdings auf etwa 80% an, wenn der Patient mit dem Genotyp 2 oder 3 infiziert ist (Manns et al., 2007).

Bei einer erfolgreichen Therapie kann der Verlauf in zwei Phasen eingeteilt werden. In der ersten nimmt die Viruslast innerhalb von 1-2 Tagen um 90-99% ab. Diese starke Reduktion wird der Suppression der Virusreplikation zugeschrieben. In der zweiten Phase nimmt die Menge an RNA deutlich langsamer ab. In diesem Zeitraum kommt es wahrscheinlich zur Eradikation infizierter Zellen.

Zusätzlich zu den direkten antiviralen Wirkungen der Therapie hat IFN auch einen wichtigen Effekt auf die adaptive angeborene Immunantwort. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Typ I IFN die Proliferation von Gedächtnis T Zellen fördert, die Apoptose von T Zellen verhindert und die Entwicklung von dendritischen Zellen (DC) stimuliert (Tilg et al., 1997). Die Analyse der Immunantwort unter Therapie lieferte allerdings widersprüchliche Ergebnisse. Während einige eine Erhöhung der HCV spezifischen CD4+ T Zellantwort bei erfolgreicher Therapie nachweisen konnten (Kamal et al., 2002), zeigten andere Gruppen, dass es zu einer Abnahme der T Zellantwort unter erfolgreicher Therapie kam, während bei einem Misserfolg eine starke Immunantwort aufrechterhalten blieb (Rahman et al., 2004).

Auch ein Effekt von Ribavirin auf die zelluläre Immunantwort wird diskutiert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass das Nukleosidanalogen das Verhältnis von Th1 und Th2 Zellen in Richtung der Th1 Zellen verschieben kann, die für die Ausheilung der viralen Infektion wichtig sind (Rehermann et al., 2005). Inwieweit diese Modulation für den Therapieerfolg wichtig ist, muss allerdings erst noch gezeigt werden.

1.3. Die Immunantwort bei einer HCV Infektion

1.3.1. Die angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort wird sowohl durch infizierte Zellen selbst als auch durch patrouillierende Immunzellen nach der Infektion eingeleitet. Eine Gruppe von Rezeptoren, die für Pathogene typische molekulare Muster (PAMPs) erkennt, ist für Koordinierung der angeborenen Immunantwort verantwortlich. In der HCV-Infektion wird virale doppelsträngige RNA (dsRNA) in infizierten Zellen über die Rezeptoren TLR-3 und RIG-I gebunden und ein Signaltransduktionsweg induziert, wodurch die Bildung von Typ I Interferonen induziert wird. Durch IFN wiederum wird die Transkription IFN-stimulierter Gene eingeleitet, was durch eine positive Rückkopplung zu einer weiter gesteigerten IFN Bildung führt. Zusätzlich werden Effektorproteine gebildet, die zum Beispiel die Translation inhibieren (PKR) oder die Degradierung sowohl von zellulärer als auch viraler mRNA einleiten (OAS) (Bode et al., 2007). Somit wird ein Schutz der infizierten und auch der angrenzenden Zellen aufgebaut. Es konnte gezeigt werden, dass diese Signalwege schon innerhalb der ersten zwei Tage nach der Infektion nachweisbar sind (Bigger et al., 2001).

Allerdings kann das Virus trotz zellulärer IFN Produktion und auch IFN Therapie in der Leber persistieren. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Virus Strategien entwickelt hat, um der Wirkung des IFN zu entgehen. Es konnte nachgewiesen werden, dass virale Proteine hemmend in die Signaltransduktionswege eingreifen können. Zum Beispiel kann NS3/4A wichtige Adapterproteine in der Signalkaskade (TRIF, CARDIF) enzymatisch spalten, die beide ein Teil des TLR-3- und RIG-I Signalweges darstellen. HCV Core dagegen kann erfolgreich den IFN induzierten JAK-STAT Weg unterbrechen, und NS5A inhibiert die Aktivität der PKR und OAS. Aber trotz dieser Mechanismen können Replikon tragende Huh7 Hepatomazelllinien durch IFN Behandlung ‚geheilt‘ werden, was nahe legt, dass eine Wirkung der Zytokine nicht vollkommen verhindert wird.

Neben diesen Mechanismen über Typ I IFN spielen auch Zellen der angeborenen Immunantwort eine entscheidende Rolle bei Infektionen in der Leber, wie zum Beispiel die natürlichen Killerzellen (NK), die natürlichen Killer-T-Zellen (NKT) und myeloide Zellen wie Kupffer-Zellen (Crispe et al., 2003; Racanelli et al., 2006).

Dabei handelt es sich bei den Kupffer-Zellen um Makrophagen, die apoptotische Zellen und Mikroorganismen phagozytieren können. Zusätzlich können sie über die Sekretion von IL-12 und IL-18 die NK Zelldifferenzierung beeinflussen und die Ausbildung der Subpopulation der zytotoxischen NK Zellen induzieren, die große Mengen an IFN γ bilden (Lauwerys et al., 2000). Die NK Zellen selber werden durch Typ I IFN und Typ I IFN-induziertes CCL3 aktiviert und lysieren infizierte Zellen oder produzieren IFN γ . Das wiederum regt Hepatozyten und

LSEC dazu an, das Chemokin CXCL9 zu bilden, was eine Rekrutierung von T Zellen zur Folge hat. NKT Zellen erkennen Epitope, bei denen es sich nicht um Peptide handelt und die über das Glykoprotein CD1 präsentiert werden. CD1 wird unter anderem auf Hepatozyten und APC exprimiert. Aktiviert werden die NKT Zellen durch IL-12, das von den Kupffer- oder dendritischen Zellen sezerniert wird, und induzieren Fas-vermittelte Zellyse.

1.3.2. Die adaptive Immunantwort

1.3.2.1. Die humorale Immunantwort

Die Rolle der humoralen Immunantwort bei HCV Infektionen ist immer noch relativ unklar. Antikörper treten erst recht spät im Verlauf der Infektion auf (Rehermann et al., 2005; Thimme et al., 2001; Major et al., 2004), scheinen für die Eliminierung des Virus in der akuten Phase nicht relevant zu sein (Thimme et al., 2002; Cooper et al., 1999; Logvinoff et al., 2004) und können nach einer ausgeheilten Infektion wieder abnehmen (Takaki et al., 2000). Eine Studie mit Schimpansen zeigte, dass ein Auftreten von Antikörpern gegen die hypervariable Region von E2 während der akuten Infektion wahrscheinlich auf einen chronischen Krankheitsverlauf hinweist (Major et al. 2004).

Bei chronisch erkrankten Patienten konnte mit Hilfe von HCV Pseudopartikeln gezeigt werden, dass neutralisierende Antikörper (nAk) vor allem gegen die viralen Proteine E1 und E2 im Serum nachweisbar sind (Logvinoff et al., 2004; Bartosch et al., 2003). Aber die Tatsache, dass HCV trotzdem persistiert, zeigt, dass das Virus zum Beispiel durch die Selektion von Mutationen, die eine Neutralisation durch Antikörper verhindert, der Immunantwort entgehen kann. Es wurde beobachtet, dass sowohl die Aminosäuresequenz des Hüllproteins als auch die Spezifität der nAk sich im Verlauf der Infektion ändert, was vermuten lässt, dass durch die Antikörper ein Selektionsdruck auf das Virus ausgeübt wird. Aber aufgrund der mangelnden Effizienz der humoralen Immunantwort scheint das Virus der durch die nAk vermittelten Immunantwort immer einen Schritt voraus zu sein.

Trotzdem kann durch Vakzinierung mit einem nAk gegen E2 ein partieller Schutz induziert werden, denn bei entsprechenden Versuchen mit Schimpansen konnte nach der Immunisierung eine verminderte Viruslast festgestellt werden (Youn et al., 2005; Choo et al., 1994; Farci et al., 1996). Genauso wurde in Menschen gezeigt, dass spontan ausgeheilte Patienten bei einer zweiten Infektion eine geringere Viruslast aufweisen (Mehta et al., 2002).

1.3.2.2. Die zelluläre Immunantwort

Obwohl die angeborene Immunantwort schon sehr früh während der Infektion beobachtet werden kann, entscheidet die erworbene und vor allem die zelluläre Immunantwort über die Ausheilung der Krankheit.

Als akute Phase der Erkrankung gelten die ersten sechs Monate nach der Infektion. Während sich die Viruslast im Serum innerhalb der ersten Wochen exponentiell vermehrt, können die ersten T Zellen erst nach vier bis acht Wochen in der Peripherie detektiert werden (Thimme et al., 2001; Woollard et al., 2003; Cox et al., 2005). Die Bedeutung der T Zellimmunantwort für die Kontrolle der akuten HCV-Infektion konnte überzeugend im Schimpansenmodell gezeigt werden. Nach Depletion von CD4+ oder CD8+ Zellen waren die Tiere nicht in der Lage, die Virusreplikation zu kontrollieren (Shoukry et al., 2003; Grakoui et al., 2003). Die spontane Ausheilung in der akuten Phase der Infektion ist dabei mit einer starken und anhaltenden T Zellantwort verbunden, die gegen viele HCV Epitope gerichtet ist und mit einer intrahepatischen Produktion von Zytokinen einhergeht (Cooper et al., 1999; Lechner et al., 2000). Dabei sind es gerade die CD8+ T Zellen, die sowohl im Blut wie auch in der Leber nach Antigenkontakt IFN γ und TNF α produzieren und eine zytolytische Aktivität entwickeln, bei der mittels Perforin und Granzym die Fas-vermittelte Apoptose induziert wird. Durch die CTL Aktivität werden die infizierten Zellen lysiert, was die Erhöhung der Transaminasen erklären könnte. Durch das IFN γ wird dagegen eine nicht-zytolytische Kontrolle der Infektion erreicht, wie zum Beispiel ein Proliferationsstop, Aktivierung von Makrophagen und Hochregulierung der MHC Expression. Parallel zu einer starken CD8+ T Zellantwort erscheint bei der spontanen Ausheilung auch eine starke CD4+ T Zellantwort notwendig zu sein. Die Rolle dieser Zellen liegt in der Einleitung und Aufrechterhaltung der CD8+ T Zellantwort.

Im Menschen konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass in der chronischen Phase die CD4+ und CD8+ T Zellantwort generell schwach oder nicht nachweisbar ist und sich nur gegen wenige Epitope richtet. Falls Zellen detektierbar sind, besitzen sie eingeschränkte Funktionen wie verminderte Zytotoxizität, Zytokinsekretion und Proliferation (Ulsenheimer et al., 2003; Semmo et al., 2005). Allerdings ist nicht klar, ob die T Zellantwort bereits in der frühen Phase der Infektion fehlt beziehungsweise dysfunktionell ist oder ob eine zunehmende Hemmung oder Erschöpfung der HCV spezifischen T Zellen in Anwesenheit einer hohen Viruslast eintritt. Während einige Gruppen eine signifikant schwächere Antwort bei chronischen Verläufen bereits in der akuten Infektion beschrieben haben, die nur gegen wenige Epitope gerichtet ist (Gruner et al., 2000; Thimme et al., 2001), konnte dieser Zusammenhang bei späteren Studien nicht bestätigt werden (Cox et al., 2005; Urbani et al., 2006a).

Verschiedene Mechanismen sind untersucht worden, die das Versagen der T Zellantwort verursachen könnten.

1. *Immune escape* durch Selektion von Mutationen

Aufgrund der hohen Replikationsrate von HCV und der RNA Polymerase, die keine Korrekturmechanismen besitzt, kommt es zu vielen verschiedenen Quasiespezies. Dadurch kann es unter dem Selektionsdruck von CD8⁺ T Zellen zu einer Selektion von Sequenzvarianten kommen, die von spezifischen T Zellen nicht mehr erkannt werden. Bei chronischen Patienten konnte schon früh die daraus resultierende Umgehung der funktionierenden CD8⁺ T Zellantwort nachgewiesen werden (Chang et al., 1997). Bei longitudinalen Untersuchungen zeigte sich, dass die Selektion von Mutationen in wichtigen Zielepitopen der CD8⁺ T Zellantwort mit einem chronischen Verlauf der HCV Infektion assoziiert ist (Timm et al., 2004; Cox et al., 2005b; Tester et al., 2005; Erickson et al., 2001). Dabei sind diese Mutationen häufig auf den Ankerpositionen im Epitop zu finden, die die Bindung zum HLA Molekül vermitteln, wodurch die Präsentation verhindert wird. Sind sie an anderen Stellen des Peptids zu finden, ist die Bindung zum T Zellrezeptor beeinflusst (Soderholm et al., 2006). Zusätzlich können auch Veränderungen außerhalb des Epitops zu veränderten Prozessierungsmustern durch Proteasomen führen, die eine HLA Präsentation unmöglich machen (Seifert et al., 2004; Timm et al., 2004; Kimura et al., 2005).

Die Tatsache, dass es bei Abwesenheit dieser HLA Moleküle zu einer Reversion kommt, zeigt, dass dabei einige Fluchtmutationen auf Kosten der viralen Fitness entstanden sind (Ray et al., 2005; Timm et al., 2004). Ob diese Fluchtmechanismen durch eine mangelnde Unterstützung durch CD4⁺ T Helferzellen oder ein zu stark fokussiertes T Zellrezeptorrepertoire - wie im Schimpansenmodell beschrieben (Grakoui et al., 2003) - unterstützt werden, wird weiterhin untersucht.

2. Regulatorische T Zellen

Eine weitere diskutierte Möglichkeit für das Versagen der zellulären Immunantwort sind die regulatorischen T Zellen. Einige Studien konnten zeigen, dass die Frequenz an CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T Zellen bei chronischen Patienten im Vergleich zu spontan ausgeheilten Patienten erhöht ist (Sugimoto et al., 2003; Boettler et al., 2005). Diese Zellen unterdrücken die Proliferation und die IFN γ Produktion der Virus spezifischen CD8⁺ T Zellen in vitro. Zusätzlich wurden Virus spezifische CD8⁺ T Zellen beschrieben, die eine regulatorische Funktion durch die Sekretion von IL-10 ausübten (Accapezzato et al., 2004) oder die Induktion von regulatorischen CD8⁺ T Zellen, die FoxP3 und CD25 exprimieren (Billerbeck et al., 2007). Da allerdings viele diese Ergebnisse auf in vitro Experimenten beruhen, müssen die Effekte erst in vivo bestätigt werden, um daraus einen konkreten Nutzen für eine mögliche Reaktivierung der T Zellen zu ziehen.

3. Programmed Death 1

Viel Aufmerksamkeit hat in der letzten Zeit auch die Rolle von Korezeptoren auf den T Zellen für die Chronifizierung der HCV Infektion bekommen. Es wurde gezeigt, dass bei chronischen HCV Infektionen der inhibitorische Rezeptor PD-1 vermehrt auf den HCV spezifischen Zellen exprimiert wird. Die Rolle von PD-1 wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.3.3. Die Korezeptoren der CD28 Familie

Die Rolle der Korezeptoren für die Aktivierung von T Zellen wird vereinfacht durch die Zwei-Signal-Hypothese beschrieben. Bei diesem Modell wird das erste Signal durch die Bindung des TCR mit dem Epitop vermittelt, welches über das MHC Molekül präsentiert wird. Das zweite Signal wird dagegen durch den Korezeptor übertragen und erst dadurch kommt es zur optimalen Aktivierung der T Zelle. In Abwesenheit des kostimulatorischen Signals kommt es zur verminderten Immunantwort und es kann zur Toleranz und T Zellanergie führen.

Die Kostimulation wird über die Ligation von CD28 auf der T Zelle mit B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86) auf der Antigen präsentierenden Zellen vermittelt. Dabei wird CD28 ständig auf T Zellen exprimiert, während seine Liganden hauptsächlich nach Aktivierung auf den APC gebildet werden. Durch die Interaktion wird die durch die TCR induzierte Antwort der T Zellen erhöht und aufrechterhalten. Außerdem regt sie die Bildung von IL-2 an.

Ein weiterer Korezeptor aus dieser Familie ist der *Inducible T cell co-stimulator* (ICOS), der entsprechende Ligand ist ICOSL (B7h, B7-H2). Im Gegensatz zu CD28 wird ICOS auf T Zellen erst nach Interaktion des TCR exprimiert. Zusätzlich kann die Expression durch ein CD28-Signal erhöht werden. Somit scheint über ICOS ein kostimulatorisches Signal auf bereits aktivierte T Zellen vermittelt zu werden. ICOSL wird dagegen nicht nur auf hämatopoetischen sondern auch auf anderen Zellen gebildet, wobei die Regulation noch nicht geklärt werden konnte. Sie unterscheidet sich auf jeden Fall zu der Regulierung von B7-1 und B7-2. Aber die Tatsache, dass je nach Zelltyp die Expression durch IFN γ , GM-CSF oder TNF α induziert werden kann, legt eine Regulation durch Entzündungssignale in der Peripherie nahe. Der Effekt der Ligation mit ICOS auf T Zellen liegt nicht in der Aktivierung naiver T Zellen sondern eher in der Differenzierung der T Helferzellen und der Effektorfunktion.

Neben diesen stimulierenden Signalen gibt es aber auch Korezeptoren, die ein inhibitorisches Signal vermitteln. Schon kurz nach der Aktivierung von T Zellen bilden sie den Rezeptor *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4, CD152), der ebenfalls zur Familie der CD28 Rezeptoren gehört (Linsley et al., 1996). CTLA-4 bindet an die gleichen Liganden wie CD28, allerdings ist die Bindungsaffinität höher (Linsley et al., 1994). Die Konsequenz ist

eine Inhibition der IL-2 Produktion und der Proliferation, wodurch es zu einer Anergie der T Zellen kommt. Somit ist CTLA-4 ein regulierender Faktor der zelluläre Immunantwort, bei dessen Abwesenheit es zu schweren Autoimmunerkrankungen kommt (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995).

Der Rezeptor *B and T cell attenuator* (BTLA) wird ebenfalls nur auf aktivierten T Zellen exprimiert (Watanabe et al., 2003). Der am stärksten auf Th1 Zellen gebildete Rezeptor weist eindeutig eine ähnlich inhibierende Funktion wie CTLA-4 auf. Dabei ist die Frage, mit welchem Liganden diese Signale zu Stande kommen, noch nicht eindeutig geklärt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei dem Liganden um B7-H4 handelt, was allerdings erst noch bestätigt werden muss. Die Expression dieses Liganden konnte in vitro auf induzierten T und B Zellen, Monozyten und DC gezeigt werden.

Ein kürzlich populär gewordener Rezeptor ist *Programmed Death 1* (PD-1). Dieser Rezeptor wurde ursprünglich auf T Hybridomazellen identifiziert, die einen programmierten Zelltod durchliefen. Im späteren Verlauf konnte die Expression von PD-1 auf aktivierten T-, B- und NKT Zellen und auf Monozyten nachgewiesen werden. Die beiden bekannten Liganden von PD-1 sind PD-L1 (B7-H1) und PD-L2 (B7-DC). PD-L1 wird zum einen auf T und B Zellen, DC und Makrophagen exprimiert und durch Aktivierung kann die Expression noch weiter hochreguliert werden. Zum anderen wird er auch auf vielen nicht-hämatopoetischen Zellen in verschiedenen Geweben gebildet, wie zum Beispiel auf Endothelzellen, Pankreasinseln oder auch in der Plazenta und im Auge. Dem gegenüber wird PD-L2 ausschließlich auf professionellen APC nach Induktion exprimiert.

Über die Ligation mit PD-1 wird nur bei gleichzeitiger Bindung des TCR ein inhibitorisches Signal an die T Zelle vermittelt, was in einer T Zell Anergie resultiert (Latchman et al., 2001).

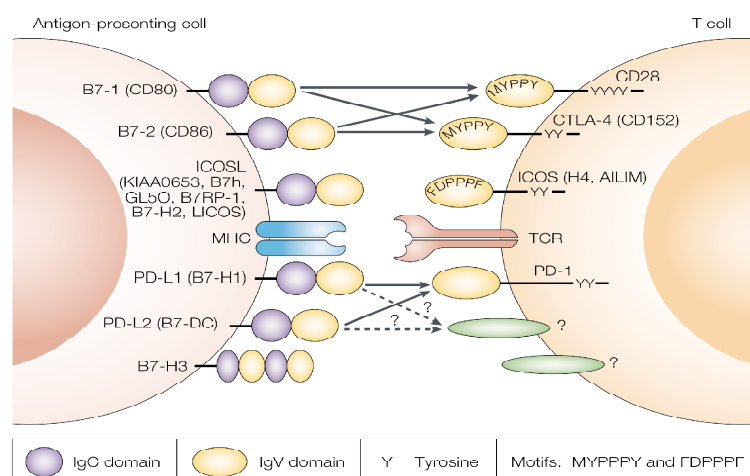


Abb. 1.4 Strukturen der Mitglieder aus der B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4 Familie (Sharpe et al., 2002). Das Schema zeigt die bisher bekannten Interaktionen zwischen den Rezeptoren und Liganden. Bei PD-L1 und PD-L2 ist noch nicht klar, ob es noch einen weiteren Rezeptor gibt, da sie sowohl mit stimulatorischen wie auch inhibitorischen Funktionen assoziiert sind.

Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Ligation die Apoptose der T Zellen einleiten kann (Dong et al., 1999/2002; Mühlbauer et al., 2006; Petrovas et al., 2007). Während somit die inhibitorische Funktion von PD-1 dargestellt werden konnte, ist die Rolle der beiden Liganden noch nicht eindeutig geklärt. Neben der Vermittlung des inhibitorischen Signals über PD-1 haben einige Arbeiten gezeigt, dass es auch zu einer Stimulation von T Zellen kommen kann. Wegen dieser kontroversen Beobachtungen wird diskutiert, ob es möglicherweise noch einen zweiten Rezeptor gibt, der bis jetzt noch nicht identifiziert werden konnte (Wang et al., 2003).

Der inhibitorische Mechanismus ist allerdings entscheidend für immunologische Prozesse. Zum einen ist seine Bedeutung im Bereich der Toleranz und Autoimmunität beschrieben worden, indem eine Anergie der T Zellen in der Peripherie erzeugt wird. Zum anderen steuert die Ligation von PD-1 und PD-L den immuninduzierten Gewebeschaden bei viralen Infektionen (Isogawa et al., 2005). Allerdings wirft es auch die Frage auf, inwieweit diese Regulation der T Zellantwort eine mögliche Ursache für die Chronifizierung viraler Infektionen sein kann.

1.4. Modellsysteme der HCV Infektion

1.4.1. In vivo Modelle

Das einzige Tier, das eine HCV Replikation unterstützt und einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie der Mensch aufzeigt, ist der Schimpanse. Daher ist dieses Tiermodell ideal, um neue Erkenntnisse über den Verlauf von Infektionen, die akute Phase, die Entwicklung der Immunantwort und die Spätfolgen der Erkrankung zu gewinnen. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen Menschen und Schimpansen gibt es auch praktische Vorteile, da die Methoden und Reagenzien bei beiden Spezies gleich angewendet werden können. Allerdings hat die Arbeit mit den Primaten auch Nachteile. Sie sind kosten- und arbeitsintensiv und die räumlichen Gegebenheiten müssen vorhanden sein.

Daher kamen die Bestrebungen auf, ein geeignetes Kleintiermodell zu finden. Besondere Beachtung fanden dabei die Tupajas (*T. belangeri chinensis*) (Xie et al., 1998), da vorher schon gezeigt wurde, dass diese Tiere als Modell für HBV Infektionen eingesetzt werden können (Walter et al., 1996; Yan et al., 1996). Allerdings zeigten die Versuche, dass nur ein viertel der Tiere mit HCV infiziert werden kann, und auch dann entwickeln sie nur eine transiente Virämie mit relativ geringen Titern.

In einem weiteren Ansatz wurde transgenen SCID Mäusen humane Hepatozyten eingepflanzt (Mercer et al., 2001). Dadurch konnten die Mäuse mit HCV infiziert werden und es entwickelte sich ein geeignetes Kleintiermodell, um besonders Fragen des

Infektionszyklus zu untersuchen. Der Nachteil dieses Modells ist, dass es besondere Erfahrung erfordert, die Transplantation durchzuführen und die Mortalität der Mäuse ist relativ hoch.

1.4.2. In vitro Modelle

Für die Erforschung des HCV war ein geeignetes in vitro Modell unabdingbar. Zu Beginn standen den Forschern aber nur Systeme zur Verfügung, bei denen mit Hilfe von Plasmiden bestimmte HCV Proteine in der Zelle überexprimiert wurden (MacDonald et al., 2004). Das später entwickelte subgenomische Replikonmodell war ein großer Fortschritt, um das Virus unter physiologischen und intrazellulären Bedingungen zu untersuchen (Lohmann et al., 1999). Dabei handelte es sich um eine Konsensussequenz des Genotyps 1b, die die strukturellen Gene des Virus enthielt. Um eine Selektion möglich zu machen, wurde an der Stelle der Strukturproteine das Gen für die Neomycin Phosphotransferase eingefügt. Durch den zusätzlichen Einbau einer internen Ribosomeneintrittsstelle und einem T7 RNA

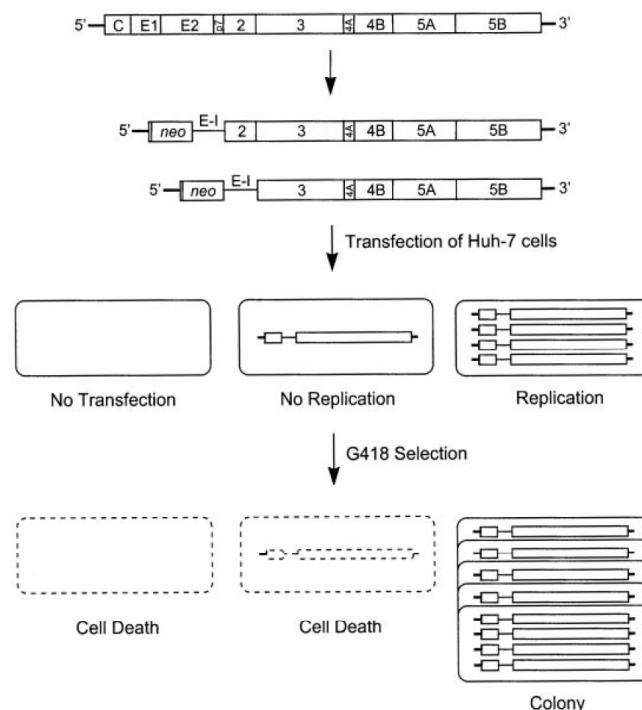


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Transfektion von Huh7 Zellen mit einem HCV Replikon (Bartenschlager et al., 2000). Sie zeigt den Aufbau des Replikons verglichen mit dem viralen Genom. Nach der Transfektion der Huh7 Zellen können nur replizierende HCV RNA das neo-Gen amplifizieren und somit eine Resistenz gegen G418 aufbauen. Daher können nur diese Zellen Kolonien bilden, während nicht transfizierte Zellen absterben.

Polymerasepromoter wurde die Replikation ermöglicht. Nach der Transfektion der Huh7 Zellen wurden die Zellen mit Hilfe von Neomycin (G418) selektiert, in denen das Konstrukt translatiert wurde. Nur Zellen, die eine große Menge an replizierender RNA enthielten, konnten sowohl die virale RNA als auch das Neomycin Gen entsprechend amplifizieren und somit überleben (Abb. 1.5). Im weiteren Verlauf war es möglich, die Replikation durch adaptive Mutationen wesentlich zu verbessern (Blight et al., 2002; Lohmann et al., 2003). Es wurde auch möglich, Replikons auf Basis des Genotyps 1a (Blight et al., 2003; Liang et al., 2005) und 2a (Kato et al., 2005) herzustellen. Aber aufgrund der Tatsache, dass keine Strukturproteine in dem Replikon vorhanden waren, konnte das Virus keine Partikel bilden und somit konnten einige Aspekte in diesem Modell nicht adressiert werden. Auch durch die Herstellung von Kompletengenomen konnte keine Partikelbildung beobachtet werden (Blight et al., 2002; Pietschmann et al., 2002; Ikeda et al., 2005).

Erst ein kürzlich entwickeltes Genotyp 2a Replikon, das aus einem Patienten mit einer fulminanten HCV Infektion gewonnen wurde, kann in Huh7 Zellen replizieren. Durch weitere Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass dieses Konstrukt mit dem Namen JFH-1 (*Japanese fulminant hepatitis-1*) Viruspartikel produzieren und naive Huh7 Zellen infizieren kann (Wakita et al., 2005). Außerdem konnten mit diesen Partikeln Schimpansen infiziert werden. Somit eröffnet dieses Modell ein Zellkultursystem, das eher den physiologischen Bedingungen entspricht.

1.5. Die Zielsetzung dieser Arbeit

Die akute Infektion mit HCV nimmt in bis zu 80% aller Fälle einen chronischen Verlauf. Ein entscheidender Faktor für die Elimination des Virus ist eine adäquate, zelluläre Immunantwort. Im Gegensatz zu chronisch infizierten Patienten ist bei ausgeheilten Individuen eine starke und multi-spezifische T Zellantwort nachweisbar. Ob ein Patient chronisch infiziert ist oder die Infektion ausgeheilt ist, kann mit Hilfe des Nachweises viraler RNA in den meisten Fällen eindeutig identifiziert werden. Allerdings ist bei einigen Patienten eine eindeutige Diagnosestellung nicht möglich ist. Das ist der Fall, wenn im Rahmen von serologischen Testungen ein reaktives Ergebnis im EIA und eine schwache Antikörperreaktion im Bestätigungsblot nachgewiesen wird und keine Virämie im Serum vorliegt. Die Ursache für diese Konstellation kann entweder eine unspezifische Antikörperreaktion oder eine ausgeheilte Infektion sein, die schon Jahre zurückliegt. Da eine abgelaufene Infektion durch eine starke T Zellantwort charakterisiert ist, besteht die Möglichkeit, über den Nachweis von HCV spezifischen T Zellen zwischen Personen mit unspezifischen Antikörperreaktionen und Patienten mit ausgeheilten Infektionen differenzieren zu können.

Beim chronischen Verlauf der HCV Infektion ist die zelluläre Immunantwort sehr schwach ausgeprägt. Die Ursachen dafür sind immer noch nicht geklärt. In den letzten Jahren ist die hohe Expression des Rezeptor PD-1 auf T Zellen mit der Anergie in Verbindung gebracht worden. Zusätzlich scheint eine Infektion von Hepatozyten Einfluss auf die Expression des Liganden PD-L1 zu nehmen. Daher besteht die Möglichkeit, dass dieses Rezeptor-Liganden-System eine entscheidende Rolle bei dem chronischen Verlauf der HCV Infektion spielt. Es ist möglich, dass die antivirale Interferontherapie Einfluss auf das Expressionsmuster dieser beiden Oberflächenproteine nimmt und somit regulierend in die zelluläre Immunantwort eingreift.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, eine ausgeheilte HCV Infektion von einer unspezifischen Reaktivität der HCV Serologie mit Hilfe der zellulären Immunantwort zu unterscheiden.

1. Im ersten Schritt sollen aktuelle Plasmaproben von Blutspendern, die aufgrund eines fraglichen Befundes in der Vergangenheit von der Blutspende ausgeschlossen wurden, wiederholt auf Antikörper gegen das Virus getestet werden.
2. Im Anschluss wird die zelluläre Immunantwort der Spender analysiert. Dazu soll sowohl die Proliferation als auch die IFN γ Sekretion der T Zellen nach Stimulation mit viralen Proteinen untersucht werden.

Als weiteres Ziel soll die Rolle des Rezeptors PD-1 und des Liganden PD-L1 bei der chronischen HCV Infektion und im Verlauf einer Interferontherapie analysiert werden.

1. Zunächst soll die Expression des Rezeptors auf den gesamten T Zellen chronisch infizierter Patienten untersucht werden und inwieweit sie sich unter antiviraler Therapie verändert
2. Des Weiteren sollen HCV spezifische CD8+ T Zellen in die Analyse der PD-1 Expression einbezogen werden und ob die Therapie das Expressionsmuster moduliert
3. Im weiteren Verlauf soll Expression des Liganden PD-L1 auf infizierten Hepatozyten analysiert werden und eine Behandlung mit Interferonen modulierend eingreift.
4. Im letzten Schritt soll die Interaktion von PD-1 und PD-L1 in zellulären Systemen charakterisiert werden und welchen Einfluss sie auf die T Zellen hat.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Humane Proben

2.1.1.1. Blutproben von Spendern mit fraglichem HCV Befund

Blutproben von insgesamt 72 Blutspendern wurden in dieser Studie einbezogen, die aufgrund eines fraglichen HCV Befundes zwischen 1998 und 2007 von einer Blutspende ausgeschlossen wurden. Sie waren also alle reaktiv im EIA, HCV RNA negativ und zeigten mindestens eine Bande im rekombinanten Immunoblot Test. Die für die erste Diagnose benutzten Testsysteme unterschieden sich je nach den teilnehmenden Institutionen und den Zeitpunkten der Untersuchungen. Der Großteil der Spender war initial mit dem anti-HCV Suchtest Abbott Prism/Architect (Abbott Diagnostics) getestet und die Ergebnisse mit dem Inno-Lia HCV (Innogenetics) bestätigt worden. Elf Spender waren mit der Kombination aus Ortho HCV (Ortho Clinical Diagnostics) und Inno-Lia, fünf mit Ortho HCV und Ortho RIBA und ein weiterer mit Architect und recomBlot (Mikrogen) getestet worden.

Als Negativkontrollen dienten die Blutproben von 16 anti-HCV negativen freiwilligen Teilnehmern. Um die Möglichkeit eines früheren Kontaktes mit HCV auszuschließen, wurden nur junge Individuen für die Studie rekrutiert.

2.1.1.2. Blutproben chronisch infizierter HCV Patienten

Für die Analyse der PD-1 Expression wurden die Blutproben von chronisch mit HCV infizierten Patienten von der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt. Für longitudinale Untersuchungen wurden bei insgesamt 32 Patienten, die im Rahmen einer HCV Studie therapiert wurden, in regelmäßigen Zeitabständen Blutproben entnommen und entsprechende Analysen durchgeführt oder die aufgereinigten PBMC eingefroren. Die klinischen Daten der Patienten sind in Tab. 2.1 angegeben.

Als Negativkontrollen für diese Untersuchungen wurden die Proben von 19 Freiwilligen unterschiedlichen Alters und Geschlechts einbezogen.

Tab. 2.1 Die klinischen Daten von 32 chronisch infizierten HCV Patienten, bei denen die Expression von PD-1 auf T Zellen im Verlauf der Therapie analysiert wurde. Bei Patienten, deren Laborwerte aus der Woche 12 nicht zur Verfügung standen, wurden die Werte aus anderen Wochen angegeben und die entsprechende Woche in Klammern dahinter vermerkt. Wenn gar keine Informationen verfügbar waren, ist es in der Tabelle mit ‚keine Angaben‘ (k.A.) gekennzeichnet. (n.n.: nicht nachweisbar)

Geschlecht	Alter	HLA-A2	GT	Quelle	Viruslast [IU/ml]	ALT [IU/l]	AST [IU/l]	Viruslast Wo 12 [IU/ml]	ALT Wo 12 [IU/l]	AST Wo 12 [IU/l]	
Pt01	m	51	positiv	3a	Drogenabusus	9820000	162	83	k.A.	32	23
Pt02	w	40	positiv	1b	k.A.	210000	81	64	< 43	36 (16)	43 (16)
Pt03	w	17	positiv	1a	k.A.	46000	39	31	1055	21	22
Pt04	w	37	positiv	1a	k.A.	797000	k.A.	28	n.n.	11	18
Pt05	m	39	positiv	3a	Drogenabusus	27530	17	14	3043	17	12
Pt06	w	68	positiv	1b	Bluttransfusion	105000	k.A.	36	< 43	51	46
Pt07	m	59	positiv	1b	Bluttransfusion	1230000	129	124	< 43	36	53
Pt08	m	35	positiv	3a	Drogenabusus	324700	57	38	n.n.	35	24
Pt09	m	41	positiv	3a	k.A.	1067000	145	91	< 615 (4)	25	24
Pt10	m	48	positiv	1a	Drogenabusus	180600	91	86	< 615	80	90
Pt11	m	47	positiv	1a	OP	1122000	36	24	< 615	k.A.	k.A.
Pt12	m	49	positiv	3a	Drogenabusus	1342000	91	62	< 615 (2)	k.A.	k.A.
Pt13	w	37	positiv	3a	Drogenabusus	7810000	99	71	n.n.	19	32
Pt14	w	32	positiv	3a	k.A.	231100	58	42	n.n.	29	25
Pt15	m	36	positiv	3a	k.A.	3580000	147	65	n.n. (16)	25	32
Pt16	m	39	positiv	4	Drogenabusus	711700	58	33	n.n.	18 (8)	15 (8)
Pt17	w	50	positiv	2a	Bluttransfusion	5650000	122	121	n.n.	17	20
Pt18	m	39	positiv	1b	k.A.	1287000	144	87	n.n.	17	23
Pt19	m	41	positiv	1a	k.A.	1068000	49	50	n.n.	35	44
Pt20	m	39	positiv	3a	Drogenabusus	1320000	150	98	< 615 (4)	57	42
Pt21	w	60	positiv	1b	Bluttransfusion	1100000	64	82	k.A.	51 (6)	52 (6)
Pt22	m	29	positiv	1b	Drogenabusus	83420	105	47	n.n.	56 (4)	30 (4)
Pt23	m	46	negativ	1b	Drogenabusus	25100000	75	70	n.n.	29	42
Pt24	w	67	negativ	1b	Bluttransfusion	9210000	25	26	188	15	23
Pt25	w	50	negativ	1b	k.A.	717000	98	76	n.n.	27	28
Pt26	m	51	negativ	3a	Drogenabusus	1590000	122	74	n.n.	24	29
Pt27	w	32	negativ	3a	k.A.	660000	66	52	n.n.	17	29
Pt28	w	66	negativ	1b	k.A.	4380000	62	55	n.n.	18	30
Pt29	w	32	negativ	1a	Sexualkontakt	125700	34	20	n.n.	37	28
Pt30	w	32	negativ	3a	Drogenabusus	43500	26	24	n.n.	22	32
Pt31	m	59	negativ	1b	k.A.	52050	118	142	< 615	67	107
Pt32	m	28	negativ	1a	Drogenabusus	3258000	44	36	< 615	19	19

2.1.1.3. RNA aus Lebermaterial transplantiertes Patienten

Die RNA aus Lebergewebe transplantiertes Patienten wurde von Frau PD Dr. Beckebaum (Institut für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Material von vier chronischen Hepatitis C Patienten und von zwei weiteren Patienten, die nicht wegen einer viralen Hepatitis transplantiert worden waren.

2.1.2. Chemikalien

[³ H]-Thymidin	Amersham
7-AAD	Becton Dickenson
AEC	Sigma-Aldrich
Agarose	Eurogentec
Annexin V	Becton Dickenson
Annexin V Bindungspuffer	Becton Dickenson
Aqua-Roti-Phenol	Roth

Ficoll	Biochrom
Blasticidin	PAA Laboratories
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
Chloroform	J.T. Baker
D-PBS	Invitrogen
Dimethylsulfoxid	Roth
DMEM	PAA Laboratories
DEPC	Sigma-Aldrich
EDTA Lösung pH8,0	Applichem
Erythrozyten Lyse Puffer	Qiagen
Essigsäure	Applichem
Ethidiumbromid	Roth
Ethanol	Sigma-Aldrich
FACS Clean	Becton Dickenson
FACS Flow	Becton Dickenson
FACS Rinse	Becton Dickenson
FBS Gibco	Invitrogen
Formaldehydlösung	Merck
Geneticin (G418)	Biochrom
HEPES	PAA Laboratories
Interferon Alpha (Roferon)	Roche
Interferon Gamma	Roche
Interleukin-2	Roche
Isopropanol	Roth
L-Glutamin	PAA Laboratories
Microscint 20	Perkin Elmer
Natrium Acetat	Merck
Natrium Acetat 3M pH5,5	Ambion
Natrium Chlorid	Merck
OPD	Sigma-Aldrich
Orange G	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
PHA-P	Sigma-Aldrich
Rapid-hyb Puffer	Amersham
RPMI 1640	PAA Laboratories
Saccharose	Applichem
Salzsäure	Merck

Streptavidin-poly-HRP	Immunotools
Schwefelsäure (0,5N)	Dade Behring
SSC ultrapure 20x	Invitrogen
SSPE ultrapure 20x	Invitrogen
TBE ultrapure 10x	Invitrogen
Tetanustoxoid	Merieux
Trizol	Invitrogen
Trypanblau Gibco	Invitrogen
Trypsin-EDTA Gibco	Invitrogen
Tween 20	Applichem
Wasserstoffperoxid	Merck

2.1.3. Geräte

Architect i2000SR	Abbott
Auto-LiPa	Innogenetics
Bioimaging System (Gene genius)	Syngene
Bioreader 2000	Biosys
Captair Filtersystem	Captair
Cyclone Storage Phosphor Screen	Packard
Elektrophoresekammern	Medizintechnik, Uniklinikum Essen
Elektrophorese-Netzgerät	Biometra
ELISA Reader Asys Expert Plus	Asys Hiteck
FACS Calibur	Becton Dickenson
GeneAmp PCRSys 2400	Applied Biosystems
Gene Pulser II	BioRad Laboratories
Hera Safe Sterilbank	Kendro GmbH
Heraeus CO ₂ Inkubator	Kendro GmbH
Heraeus Megafuge 1.0 R	Kendro GmbH
Heraeus Multifuge 3 LR	Kendro GmbH
Hybridisierungsöfen	Amersham
Inversionsmikroskop Nikon TMS	Nikon
Light Cycler PCR System	Roche Diagnostics
Luminometer	Siemens
Mikroskop Carl Zeiss	Zeiss
Mikrowellenherd	Panasonic
Mr. Frosty	Nalgene

pH-Meter MP 220	Toledo
Photometer Gene Quant Pro	Amersham
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Thermocycler	Eppendorf
Thoma Zählkammer	Hecht-Assistent
Topcount NXT	Packard
UV Transluminator FLX-20M	MWG-Bio Tech
Vakuum Blotter	BioRad Laboratories
Vibra AJ-2200CE Waage	Shinko Denshi
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5804	Eppendorf

2.1.4. Kommerzielle Kits

Cytofix/Cytoperm	Becton Dickenson
DNase Set	Qiagen
HCV RNA Qualitativer Assay	Gen-Probe
Inno-Lia HCV Score	Innogenetics
Interleukin-10 ELISA Set	Immunotools
PCR Purification Kit	Qiagen
Qiamp Viral RNA Kit	Qiagen
Qiashredder	Qiagen
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
recomBlot HCV IgG 2.0	Mikrogen
Rediprime II DNA Labelling System	Amersham
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Vectastatin Elite ABC-Kit	Linaris Alexis

2.1.5. Verbrauchsmaterialien

EDTA Monovetten	Sarstedt
Elektroporationsküvette	BioRad Laboratories
Filterplatten	Millipore
FACS-Röhrchen	Falcon/Becton Dickenson

Hybond N+ Membran	Amersham
Leucosep Separationsröhrchen	Greiner Bio-One
Light Cycler Kapillaren	Roche
Petrischalen	Greiner Bio-One
Pipetten	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Spitzbodenröhrchen	Falcon/Becton Dickenson
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One

2.1.6. Antikörper

Abgesehen von den Isotypenkontrollen sind nur monoklonale Antikörper von dem Typ Maus anti-Human eingesetzt worden. Die Antikörper für die Durchflusszytometrie sind mit den unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert, wodurch sie über die Absorption von Licht bestimmter Wellenlängen und folgender Emission im Durchflusszytometer detektiert werden können. Die Antikörper mit den entsprechenden Konjugaten sind in Tab. 2.2 dargestellt. Die aufgereinigten und biotinylierten Antikörper wurden für Zellkulturen oder beim ELISpot eingesetzt.

Tab. 2.2 Verwendete Antikörper mit den konjugierten Fluorochromen, dem jeweiligen Klon und den Herstellern

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Hersteller
α-CD3	gereinigt	UCHT1	Becton Dickenson
α-CD4	PerCP	SK3	Becton Dickenson
α-CD4	APC	RPA-T4	Becton Dickenson
α-CD8	FITC	MEM-31	Immunotools
α-CD8	PE	MEM-31	Immunotools
α-CD8	APC	MEM-31	Immunotools
α-CD28	gereinigt	CD28.2	Becton Dickenson
α-CD28/49	gereinigt	L293/L25	Becton Dickenson
α-CD95	gereinigt	UT-1	Immunotools
α-PD-1	PE	MIH4	Becton Dickenson
α-PD-L1	PE	MIH1	Becton Dickenson
α-PD-L2	APC	MIH18	Becton Dickenson
α-HLA-A2	FITC	BB7.2	Acris
α-IFNγ	FITC	4S.B3	Becton Dickenson
α-IFNγ	gereinigt	1-D1K	Mabtech
α-IFNγ	biotinyliert	7-B6-1	Mabtech
Isotypenkontrolle	PE	MOPC-21	Becton Dickenson
Isotypenkontrolle	APC	TÜ145	Becton Dickenson

2.1.7. Lösungen und Puffer

AEC Substratlösung (sterilfiltriert)	AEC (1 Tablette) 50 ml PBS 25 µl H ₂ O ₂
Annexin V Bindungspuffer 10x (sterilfiltriert)	0,1 M HEPES 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂ pH 7,4
Blockierungspuffer	PBS 1% (m/v) BSA
Carbonatpuffer	30 mM Na ₂ CO ₃ 70 mM NaHCO ₃ pH 9,6
Cytomix (sterilfiltriert)	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 25 mM HEPES 2 mM EGTA 5 mM MgCl ₂ 2 mM ATP 5 mM Glutathion pH 7,6
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
DNA-Ladepuffer	5,5 mM Orange G 1,2 M Saccharose
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl 1,5 M NaCl

OPD-Substratlösung	OPD (1 Tablette) 10 ml PBS 10 µl H ₂ O ₂
PBS	155 mM NaCl 3 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
SSC Puffer (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natrium Citrat pH 7,0
SSPE Puffer (20x)	3 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 0,02 M EDTA pH 7,4
Stopplösung	0,5 N H ₂ SO ₄
TBE-Puffer (1x)	100 mM Tris 90 mM Borsäure 1 mM EDTA pH 8,4
Waschpuffer (ELISA)	PBS 0,5% (v/v) Tween20
Waschpuffer (ELISpot)	PBS 0,05% (v/v) Tween 20
Waschpuffer (FACS)	PBS 10% (v/v) FCS
Waschpuffer 1 (Southern Blot)	1x SSC 0,1% SDS

Waschpuffer 2 (Southern Blot)	0,1x SSC
	0,1% SDS

2.1.8. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden kommerziell bezogen. Die Namen, Sequenzen und Herstellerfirmen sind in der Tabelle 2.3 angegeben.

Tab. 2.3 Verwendete Primer mit den Sequenzen in 5'→3'Richtung und den Herstellerfirmen. A: Adenosin, C: Cytosin, G: Guanodin, T: Thymin, B: Cytosin + Guanodin + Thymin, K: Guanodin + Thymin, N: Adenosin + Cytosin + Guanodin + Thymin, R: Adenosin + Guanodin, W: Adenosin + Thymin, Y: Cytosin + Thymin

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Hersteller
HCV Core		
p1AS	ATRTACCCCATGAGRTCAGG	Biomers
p417S	GGYGGYGGNCAGATCGTTGG	Biomers
p439S	GAGTWTACBTGYTGCCGCGCA	Biomers
p874A	ARGAAGATAGARAARGAGCAACC	Biomers
HCV NS3		
<u>HCV GT1a</u>		
HCV1a 3b-F	TGGRTTCCCCCCTCAACG	Invitrogen
HCV1a 3c-F	TCCRAATGGAGACCAAGC	Invitrogen
HCV1a 3c-R	AATGACATCGGCRTGCCTCG	Invitrogen
HCV1a 4a-F	AGTGCCCCAGAGCTTCCAGG	Invitrogen
HCV1a 4a-R	TCTCCGGTGGTGGACAGAGC	Invitrogen
HCV1a 4b-F	GTAARAGCACCAAGGTYCC	Invitrogen
HCV1a 4b-R	GCAGTCTATCACCGAGTCG	Invitrogen
HCV1a 4c-F	CGAGGAGGTTGCTCTGTCC	Invitrogen
HCV1a 4d-R	ACCCAGGTGCTCGTGACG	Invitrogen
HCV1a 4e-R	GGGCCCTTCTGCTTGAAGTGC	Invitrogen
<u>HCV GT1b</u>		
HCV1b 3c-R	CCAARTAAAGGTCCGAGCTGCC	Invitrogen
HCV1b 4c-F	CTATGGCAAAGCCATCCC	Invitrogen
HCV1b 913-F	ACRGTCTGGACCAAGCR	Invitrogen
HCV1b 1058-R	GCYTTRCCATAGAAGGGRA	Invitrogen
HCV1b 1113-R	CTTGGAGTGRCAGAAAATGAG	Invitrogen
HCV1b 1598-R	TCCCAGAACTCCARAYGGTC	Invitrogen
HCV1b 1622-R	TGRGTGAGGCCTGTRAAGAC	Invitrogen
HCV1b 3404S-neu	AGGGTGGCGACTCCTYGCK	Invitrogen
HCV1b SV693S-neu	CTACCCGTCTCCGCCCGVAGR	Biomers
HCV1b SV694AS-neu	ATCCTRCCCACAATGACCACR	Biomers
HCV1b SV696AS	GCCACAATGACCACGCTGCC	Biomers
HCV1b SV697S	TGCCACTCAACTGACTCGACC	Biomers
<u>HCV GT3a</u>		
HCV3a 3256-F	CTAGCAGTGGCCACTGAACC	Invitrogen
HCV3a 3341-F	ATATTCTTTGCGGGCTGC	Invitrogen
HCV3a 4294-F	ATTATCTGTGATGARTGYCATGC	Invitrogen

HCV3a 4328-F	CTAGCATAYTGGGYATAGGCAC	Invitrogen
HCV3a 4460-R	GGGATCTCACCTTCRGARC	Invitrogen
HCV3a 4577-R	GTTGAGCCCCATRCCTCTRA	Invitrogen
HCV3a 4768-R	AGTGCGGGTCTCGATGGA	Invitrogen
HCV3a 4885-R	ACAACYGAGTCAAACATBCC	Invitrogen
HCV3a 5439-R	CACCTCYTTRTCTGGAACG	Invitrogen
HCV3a 5452-R	TATTGTTGRTACARCACCTC	Invitrogen
Weitere		
β-Actin-F	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	Biomers
β-Actin-R	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	Biomers
QuantiTect Primer Assay IP10	nicht angegeben	Qiagen
QuantiTect Primer Assay MxA	nicht angegeben	Qiagen
QuantiTect Primer Assay PD-L1	nicht angegeben	Qiagen
QuantiTect Primer Assay PD-L2	nicht angegeben	Qiagen

2.1.9. Proteine, Peptide und Tetramere

Die HCV Proteine Core (aa 1 bis 115), NS3 (aa 1007 bis 1534) und NS4 (aa 1617-1864) wurden kommerziell von der Firma Mikrogen erworben. Dabei handelte es sich um rekombinante Proteine, die aus einem Patientenisolat (GT 1b) gewonnen wurden.

Desweiteren wurden in der Studie HCV Peptide eingesetzt. Dabei handelte es sich um Peptide mit der Länge von 20 Aminosäuren, die jeweils 10 Aminosäuren überlappend das komplette Core Protein (GT1a) abdeckten. Diese Peptide wurden in drei Pools mit jeweils fünf Peptiden und in einen Pool mit drei Peptiden vereinigt. In einem fünften Pool wurden sechs weitere Peptide (20 aa) eingesetzt (NS3: 1241-1260, 1531-1550, 1581-1600; NS4b: 1771-1790; NS5b: 2571-2590, 2941-2960; GT1a), die eine starke Immunantwort von CD4+ T Zellen bei ausgeheilten HCV Patienten gezeigt hatten (Schulze zur Wiesch et al., 2005). Alle verwendeten Peptide wurden von der Firma emc microcollections synthetisiert.

Zusätzlich wurden für die Analyse HCV spezifischer CD8+ T Zellen Tetramere verwendet. Die dafür verwendeten HLA-A2 Peptide sind in der Tabelle (Tab. 2.4) dargestellt, hergestellt wurden die Tetramere von der NIH Tetramer Core Facility. Als Kontrolle für die Analyse spezifischer Zellen wurde ein Influenza Pentamer von der Firma Prolimmune eingesetzt (Tab. 2.4).

Tab. 2.4 HLA-A2 Peptide für die Analyse spezifischer CD8+ T Zellen. Die HCV Peptide wurden von der Firma emc microcollections und die Tetramere von der NIH Tetramer Core Facility synthetisiert. Das Influenza Pentamer wurde von der Firma Prolimmune bezogen.

Virus	Genotyp	AA Position	AA Sequenz
HCV	1a	NS3 1073	CINGVCWTV
HCV	1a	NS3 1406	KLVALGINAV
HCV	1a	NS5b 2594	ALYDVVTKL
Influenza A	---	MP 58	GILGFVFTL

Eine rekombinante PD-L1/Fc Chimäre wurde von der Firma R&D Systems bezogen. Dabei waren die Aminosäuren 1-239 der extrazellulären Domäne mit der Fc Region des humanen IgG₁ über einen Polypeptid Linker verbunden.

Die Sequenzen der Proteine und Peptide sind in dem Anhang aufgelistet.

2.1.10. Humane Hepatomzelllinie Huh7

Die humane Hepatomzelllinie Huh7 stammt ursprünglich aus einem Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom und wächst adhärent (Nakabayashi et al., 1982). In der vorliegenden Arbeit wurden die Huh7 Con1 und die Huh7 Lunet Zelllinie verwendet. Bei der Linie Con1 handelt es sich um Zellen, die mit subgenomischer HCV Replikon-RNA stabil transfiziert wurden. Über das neo-Gen und der damit verbundenen G418 Resistenz können Zellen selektiert werden, in denen sich die RNA autonom repliziert und die nicht-strukturellen HCV Proteine nachweisbar sind.

Lunet Zellen dagegen sind Con1 Zellen, die erfolgreich mit Interferonen behandelt wurden und somit kein subgenomisches HCV Replikon mehr enthalten. Diese Zellen wurden bei Analysen als Negativkontrollen eingesetzt. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit noch Lunet Zellen verwendet, die nach stabiler Transfektion HLA-A2 bilden und auf der Zelloberfläche exprimieren. Diese Zellen wurden von Volker Lohmann (Hygiene Insitut, Abteilung Molekulare Virologie, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.1.11. Jurkat Zelllinie

Die humane T Zelllinie wurde ursprünglich aus dem Blut eines Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukemie gewonnen (Schneider et al., 1977). Die Zelllinie wurde vom Intitut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt.

2.1.12. Reagenzien für die Molekularbiologie

123 Ladder	Invitrogen
dNTP (10 mM)	Promega
Go-Taq Polymerase	Promega
Reaktionspuffer 5x (Go-Taq)	Promega
Reaktionspuffer 5x (RT-Taq)	Invitrogen
RT-Taq Polymerase	Invitrogen
SmartLadder	Eurogentec

2.1.13. Computerprogramme und Internetseiten

CellQuest Pro	Becton Dickenson
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Software
FlowJo 7.2	Treestar
HCV Sequence Data Base	http://hcv.lanl.gov
Light Cycler Software 3.5	Roche
Microsoft Office	Microsoft
NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
VectorNTI 9.0	Informax

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung der PBMC aus peripherem Vollblut

15 ml Ficoll wurde auf die Membran eines Leucosep Röhrchens gegeben und kurz zentrifugiert. Das venöse Blut wurde anschließend aus der EDTA Monovette direkt auf die Membran gebracht und 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde 2 ml Plasma entnommen und bei -20°C eingefroren, der Rest wurde in ein 50 ml Röhrchen umgeschüttet, bis auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und für 10 min mit 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal mit je 50 ml PBS gewaschen (10 min, 1500 rpm). Nach dem Waschen wurden die Zellen entweder eingefroren oder die Lebendzellzahl bestimmt und die entsprechenden Analysen durchgeführt.

2.2.2. Zellkulturtechniken

2.2.2.1. Kryokonservierung von Zellen

Das Zellpellet wurde im Einfriermedium (10% DMSO in 90% FCS) resuspendiert und je nach Zellzahl in Kryoröhrchen aliquotiert. Mittels eines Mr. Frosty Einfrierbehälters wurden die Zellen über Nacht bei -80°C eingefroren und am folgenden Tag in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen der Proben wurde der Inhalt eines Kryoröhrchen in 5 ml kaltes FCS gegeben, resuspendiert und bis auf 13 ml mit kaltem Medium aufgefüllt. Danach wurde für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet ein weiteres Mal

gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Lebendzellzahl zu bestimmen, wurden 10µl der Zellsuspension mit 90µl PBS verdünnt. Im nächsten Schritt wurden 20 µl davon mit 20 µl Trypanblau gemischt, um eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen zu gewährleisten. 10 µl wurden auf Thoma-Zählkammer gebracht und unter dem Mikroskop die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt.

2.2.2.3. Kultivierung von PBMC

PBMC wurden immer in RPMI 1640 Medium mit den Zusätzen 100 IU Penicillin, 100 µg Streptomycin und 10% FCS kultiviert.

Bei den Assays der fraglichen HCV Spender war das Medium statt mit FCS mit humanem Serum versetzt, da dadurch der Hintergrund bei dem Proliferationstest reduziert werden konnte.

2.2.2.4. Kultivierung von Jurkat Zellen

Jurkat Zellen wurden mit dem gleichen Medium wie die PBMC kultiviert. Die Zellen wurden alle drei Tage in dem Verhältnis 1:2 gesplittet.

2.2.2.5. Kultivierung von Huh7 Zellen

Die adhärennten Huh7 Zellen wuchsen in *Dulbecco's modified minimal essential medium* (DMEM), das zusätzlich mit 2 mM L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% FCS versetzt war. Bei den Zellen, die das HCV Replikon enthielten, wurde noch 500 µg/ml G418 hinzugegeben. Huh7 Zellen, die dagegen das Gen für das HLA-A2 Molekül beinhalten, wurden mit DMEM kultiviert, das das Selektionsantibiotikum Blasticidin (3 µg/ml) beinhaltet.

Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 passagiert, jeweils abhängig von der Konfluenz. Dazu wurden das Medium abgegossen, die Zellen mit 20 ml PBS gewaschen und dann 2 ml Trypsin-EDTA zu den Zellen gegeben. Der Zellrasen wurde komplett benetzt, anschließend das Trypsin-EDTA abgegossen und das Ablösen der

Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Dann wurden 10 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben und das Volumen auf neuen Flaschen verteilt.

2.2.2.6. Transfektion von Huh7 Zellen durch Elektroporation

Im ersten Schritt wurden Zelllysate von HCV Replikon RNA enthaltenden Huh7 Zellen hergestellt und die gesamte RNA daraus gewonnen. Im nächsten Schritt wurden Huh7 Zellen, die ca. 70-90% konfluent waren, mit Trypsin-EDTA abgelöst und in komplettem DMEM aufgenommen. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 8 min abzentrifugiert und das Pellet mit 20 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 400 µl Cytomix mit einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml aufgenommen, mit 5 µl RNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde durch einen elektrischen Impuls von 270 mV und 975 µF mit der Gene Pulsar II Apparatur durchgeführt.

Nach der Prozedur wurden die Zellen direkt in DMEM aufgenommen und auf einer 6-well Platte ausplattiert. Nach 48 Stunden wurde frisches DMEM mit dem Selektionsmarker G418 auf die Zellen gegeben und dann das Medium zweimal pro Woche gewechselt. Drei bis vier Wochen nach der Transfektion wurden resistente Kolonien sichtbar und Zelllinien mit replizierender subgenomischer HCV RNA für weitere Analysen etabliert.

2.2.2.7. Behandlung von Huh7 Zellen mit IFN α / γ

Um die Expression von PD-L1 auf Huh7 Zellen nach Behandlung mit IFN α / γ zu untersuchen, wurden 5×10^5 Zellen auf einer 6-well Platte ausplattiert. Am folgenden Tag wurde bei einer Konfluenz der Zellen von 60-80% 3 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben und IFN α / γ in den Konzentrationen 0; 10; 100; 1000 IU/ml zugefügt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die Expression bestimmt.

2.2.2.8. Aktivierung von Jurkat Zellen

Für die Aktivierung von Jurkat Zellen wurde der Inhalt einer Kulturflasche zentrifugiert (1500 rpm, 5 min), einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen / ml auf eine 6-well Platte ausplattiert und mit 100 ng/ml anti-CD3 und mit 5 µg/ml anti-CD28 stimuliert. Als Negativkontrollen wurden zusätzlich nicht-stimulierte Zellen mitgeführt. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden Zellen entnommen und die PD-1 Expression im Durchflusszytometer bestimmt.

2.2.2.9. Kultur von Jurkat Zellen mit löslicher PD-L1/Fc Chimäre

Um den Effekt von PD-L1 auf PD-1 exprimierende Jurkat Zellen zu untersuchen, wurden die Jurkat Zellen wie oben beschrieben aktiviert. Nach vier Stunden wurden die Kostimulatoren anti-CD28 (5 µg/ml), PD-L1/Fc (10 µg/ml) und als Kontrolle anti-CD95 (0,5 µg/ml) hinzugegeben und die Apoptose in regelmäßigen Abständen im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.2.10. Kokultur von Jurkat und Huh7 Zellen

Für die Kokultur beider Zelllinien wurden zuerst $0,5 \times 10^6$ Huh7 Zellen auf 6-well Platten ausplattiert und teilweise mit IFN γ (1000 IU/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden wurden Jurkat Zellen, die bis zu dem Zeitpunkt für vier Stunden mit und ohne anti-CD3 (100 ng/ml) behandelt worden waren, zu den Huh7 Zellen gegeben (Abb. 2.1). Je nach Ansatz wurde noch anti-CD28 (5 µg/ml) in die Kultur gegeben und die Apoptose in regelmäßigen Abständen im Durchflusszytometer analysiert.

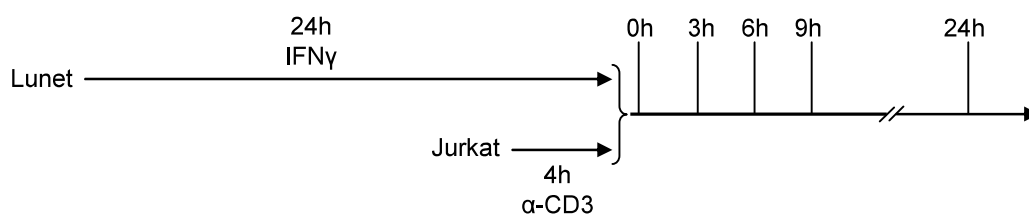


Abb. 2.1 Versuchsablauf zur Analyse der Apoptoseinduktion durch die Kokultur von Huh7 und Jurkat Zellen. Durch die Behandlung der Lunet Zellen mit IFN γ für 24h wurde die Expression von PD-L1 induziert. In den letzten vier Stunden wurden Jurkat Zellen mit anti-CD3 behandelt, was in der Bildung von PD-1 resultiert. Zu dem Zeitpunkt 0h wurden die Zellen zusammengegeben und in regelmäßigen Zeitintervallen die Apoptose analysiert.

2.2.2.11. Beladen von HLA-A2 Molekülen auf Huh7 Zellen mit Peptiden

Zum Beladen von HLA-A2 Molekülen auf Huh7 Zellen wurden die Zellen auf einer 24-well Platte ausplattiert ($0,2 \times 10^6$ / well). Zusätzlich wurde das entsprechende Peptid in die Kultur gegeben (10 µg/ml) und 12 Stunden kultiviert. Dann wurde der Überstand abgeschüttet und die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen, um nicht gebundenes Peptid zu entfernen. Dann wurden die Kokulturen angesetzt.

2.2.2.12. Kokultur von PBMC und Huh7 Zellen

Die Kokultur von beladenen HLA-A2+ Huh7 Zellen mit expandierten PBMC wurde wie die Restimulation bei der intrazellulären Zytokinfärbung durchgeführt.

2.2.3. Immunologische Analysen

2.2.3.1. Proliferationsassay

Für die Analyse der Proliferation HCV spezifischer CD4+ T Zellen wurden $2,5 \times 10^5$ PBMC in 200 μ l Medium auf eine 96-well Rundbodenplatte gegeben und für sechs Tage in Anwesenheit von den HCV Antigenen Core, NS3 und NS4 (1 μ g/ml) inkubiert. Zusätzlich wurden als Kontrollen unstimulierte sowie mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) (5 μ g/ml) oder Tetanustoxoid (40×10^{-3} I.E./ml) stimulierte Zellen mitgeführt. Dabei wurden alle Analysen in Triplets angesetzt.

Während der letzten 16 Stunden der Inkubation wurde radiomarkiertes [³H]-Thymidin (2 μ Ci) in die Kultur gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen auf einer Membran gesammelt und die Menge an eingebautem Thymidin analysiert. Dazu wurden 50 μ l flüssiger Szintillator zugegeben und über den Zerfall des Tritiums mit einem Flüssigszintillationszähler die Menge an eingebautem [³H]-Thymidin bestimmt. Die Ergebnisse wurden als durchschnittlicher Zerfall pro Minute (CPM) angegeben. Der Stimulationsindex (SI) wird wiederum aus dem Verhältnis des CPM der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle berechnet. Die Grenze für eine positive Proliferation wurde durch Stimulation von PBMC einer anti-HCV negativen Kontrollgruppe ermittelt. Dabei wurde ein SI größer als der durchschnittliche SI der Kontrollgruppe plus drei Standardabweichungen als signifikant gewertet.

2.2.3.2. ELISpot Assay

Die Funktionalität HCV spezifischer CD4 T Zellen wurde über die IFN γ Produktion und Sekretion mittels ELISpot analysiert. Dazu wurden 4×10^5 PBMC in 200 μ l Medium auf eine 96-well Rundbodenplatte gegeben und zum einen mit HCV Proteinen (1 μ g/ml) und zum anderen mit HCV Peptidgemischen (10 μ g/ml) stimuliert. Als Kontrollen dienten - wie bei dem Proliferationstest - unstimulierte und mit PHA (5 μ g/ml) und TT (40×10^{-3} I.E./ml) stimulierte Zellen. Jeder Ansatz wurde in Dupletts durchgeführt.

Nach 24 Stunden wurden Filterplatten mit primären Antikörpern gegen humanes IFN γ (1:100 verdünnt in PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet. Im Anschluss wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und für 1 Stunde bei 37°C mit FCS-haltigem Medium (10%) geblockt.

Nach einer Vorinkubation der Zellen für 48 Stunden wurden die Suspensionen auf die Filterplatten übertragen und für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die kompletten Zellsuspensionen verworfen, die Platte dreimal mit PBS, dann dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C mit 60 µl biotinylierten Zweitantikörper (1:500 verdünnt in PBS/BSA 0,5%) inkubiert.

Nach ausgiebigem Waschen der Platte mit Waschpuffer wurde der Boden der Platte entfernt und 1 Stunde bei 37°C in Anwesenheit von ABC-Komplex-Lösung gelagert. Anschließend wurden die Platten noch dreimal mit Waschpuffer und dann mit PBS gewaschen und das IFN γ durch eine 10 minütige Inkubation mit AEC-Substratlösung bei RT in Form von Punkten sichtbar gemacht. Nach abschließendem Waschen mit Leitungswasser und Trocknen bei Raumtemperatur wurde die Menge an IFN γ mit dem Bioreader 2000 bestimmt.

Eine zelluläre Immunantwort wurde als positiv gewertet, wenn die Anzahl an Punkten größer war als die durchschnittliche Antwort der Kontrollgruppe plus drei Standardabweichungen.

Drei Blutspender und eine Kontrollperson mussten von der Analyse ausgeschlossen werden, da der Hintergrund der unstimulierten Kontrolle zu groß und somit eine Auswertung nicht möglich war.

2.2.3.3. Durchflusszytometrie

2.2.3.3.1. Bestimmung von HLA-A2 auf Zellen

Das in den EDTA Röhrchen verbliebene Blut wurde in 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer aufgenommen und zwei Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Das Volumen wurde auf zwei FACS Röhrchen aufgeteilt, mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min). Anschließend wurde der Antikörper anti-HLA-A2 mit PBS verdünnt, zu einer Probe gegeben und die Suspension bei 4°C für 15 min inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal gewaschen, in 200 µl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

Die Analyse der HLA-A2 Expression von Huh7 Zellen wurde wie bei den PBMC durchgeführt. Nach dem Ablösen der Zellen wurden sie einmal mit Medium gewaschen, um das Trypsin zu inaktivieren, und anschließend - wie oben beschrieben - die Färbung durchgeführt und ausgewertet.

2.2.3.3.2. Phänotypisierung von Zellen

Soweit nicht anders beschrieben wurden für phänotypische Analysen die Zellen mit PBS gewaschen (1500 rpm, 5min), der Überstand abgekippt und die in Tab. 2.5 angegebenen

Verdünnungen der Antikörper eingesetzt. Der Lebend-Tod-Farbstoff 7AAD wurde immer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Inkubation lief bei 4°C für 30 Minuten ab, danach wurden die Zellen gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert.

Tab. 2.5 Die eingesetzten Verdünnungen der Antikörper für die Phänotypisierung von Zellen. Soweit nicht anders angegeben wurden bei allen Analysen diese Verdünnungen eingesetzt.

Antikörper	Verdünnung	Antikörper	Verdünnung
α-CD4-PerCP	1:20	α-PD-L1-PE	1:5
α-CD4-APC	1:25	α-PD-L2-APC	1:5
α-CD8-FITC	1:25	α-HLA-A2-FITC	1:50
α-CD8-PE	1:50	α-IFNγ-FITC	1:100
α-CD8-APC	1:25	Isotypenkontrolle-PE	1:5
α-PD-1-PE	1:5	Isotypenkontrolle-APC	1:5

2.2.3.3.3. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Im ersten Schritt wurden 4×10^6 PBMC in 1 ml Medium auf einer 24-well Platte ausplattiert und in Anwesenheit von HCV Peptiden (1 µg/ml), IL-2 (50 IU/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) beziehungsweise anti-CD28/49 (2,5µl) für acht bis zwölf Tage expandiert.

Im zweiten Schritt wurden etwa $0,4 \times 10^6$ Zellen in 100 µl Medium auf eine 96-well Rundbodenplatte gebracht und mit Antigen (10 µg/ml) in Anwesenheit von Brefeldin A (5 µg/ml) für sechs Stunden restimuliert. Als Positivkontrolle wurden Zellen parallel mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) stimuliert.

Im Anschluss wurde zentrifugiert (1700 rpm, 7 min), der Überstand verworfen und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Die Oberflächenmarker in PBS wurden hinzugegeben und die Zellen für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden 100 µl Fix/Perm Lösung hinzugegeben und wiederum für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Wash/Perm Lösung wurden die Zellen zentrifugiert (1700 rpm, 7 min) und wiederholt mit der gleichen Lösung gewaschen. Für die intrazelluläre Färbung wurde der verdünnte anti-IFNγ in die Suspension gegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden danach einmal mit der Wash/Perm Lösung gewaschen, in PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.3.4. Detektion HCV spezifischer CD8+ T Zellen

Auf einer 96-well Rundbodenplatte wurden 2×10^6 PBMC pro well ausplattiert und einmal mit Waschpuffer gewaschen (1500 rpm, 5 min). Die Tetramere wurden in 50 µl Waschpuffer verdünnt (1073: 1:100; 1406: 1:1000; 2594: 1:200 µl; Infuenza: 1:20) und das Zellpellet mit dem Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von zehn Minuten bei 37°C wurden 100 µl

Waschpuffer in jedes well gegeben, zentrifugiert (1500 rpm, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen noch zwei weitere Male mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand abgesaugt, die restlichen Antikörper wurden wie in Tabelle 2.6 angegeben in 50 µl Waschpuffer verdünnt und die Zellen in der Lösung resuspendiert.

Tab. 2.6 Verdünnung der Antikörper zur Bestimmung der Oberflächenmarker Virus spezifischer Zellen

Antikörper	Verdünnung
α-CD8-FITC	1:500
α-PD-1-PE / Isotypenkontrolle-PE	1:5
7AAD	1:10

Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 4°C wurden die Zellen zentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Für die Messung wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.3.5. Analyse der Apoptose

Etwa $0,2 \times 10^6$ Zellen wurden in FACS-Röhrchen einmal mit PBS gewaschen (1700 rpm, 7 min), die Antikörper anti-PD-1-PE und anti-CD4-APC in 50 µl PBS zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 µl Annexin V - Bindungspuffer aufgenommen. Durch Zugabe von 7AAD und Annexin V-FITC (1:50) wurden die Zellen für 15 Minuten bei RT im Dunkeln weiter gefärbt. Danach wurden das Volumen durch 200 µl Annexin V - Bindungspuffer vergrößert und die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.4. IL-10 ELISA

Der ELISA gegen das Zytokin IL-10 wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Standard in verschiedenen Verdünnungen (300; 100; 50; 10; 2; 0,1 pg/ml) eingesetzt. Dadurch war es möglich, die Konzentration an IL-10 zu bestimmen.

2.2.4. Molekularbiologische Techniken

2.2.4.1. DNA Agarosegelelektrophorese

Die DNA Agarosegelelektrophorese wurde mit 1,2%igen Agarosegelen in TBE-Puffer bei 100 V für 45-60 Minuten durchgeführt. Die Gele enthielten den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid, um eine anschließenden Auswertung unter UV-Licht zu ermöglichen. Für

eine Einschätzung der Größe von Fragmenten wurden unterschiedliche DNA-Leitern in den Gelen eingesetzt.

2.2.4.2. Isolation von RNA

2.2.4.2.1. PBMC

Für die Isolation der RNA aus PBMC wurde zuerst die Zellstruktur mit dem Qiashreder nach Herstellerangaben zerstört und die RNA mit dem RNeasy Kit isoliert. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren.

2.2.4.2.2. Plasma

Virale RNA aus humanem Plasma wurde mit dem Qiamp Viral RNA Kit nach Herstellerangaben isoliert und bei -80°C eingefroren.

2.2.4.2.3. Huh7 Zellen

Zuerst wurden die Zellen in 1 ml Trizol lysiert. Dann wurden 200 µl Chloroform zugegeben, für 15 Sekunden geschüttelt und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 15 Minuten bei 12.000 g und 4°C wurde die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und einer Inkubation von zehn Minuten bei RT ausgefällt. Nach weiterem Zentrifugieren (12.000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1 ml Ethanol 75% gewaschen. Das Pellet wurde geschüttelt, ein weiteres Mal zentrifugiert (12.000 g, 5 min), der Überstand abgeschüttelt und das Pellet für zehn Minuten getrocknet.

Anschließend wurde das Pellet mit dem DNase Set nach Herstellerangaben behandelt, die RNA mit dem RNeasy Clean Up weiter aufgereinigt und zum Schluss bei -80°C eingefroren.

2.2.4.3. Qualitative RT-PCR

2.2.4.3.1. Analyse von NS3 Fragmenten

Die RT-PCR war zum einen essentiell, um NS3 Fragmente aus Patientenserum gewinnen und mittels Sequenzierung analysieren zu können. Zum anderen konnte mit Hilfe der RT-PCR kontrolliert werden, ob Zelllinien erfolgreich mit dem subgenomischen RNA Replikon transfiziert worden waren.

Dazu wurde eine Kombination aus RT und *nested* PCR durchgeführt. In dem ersten Schritt wurde die RNA in cDNA transkribiert und gleichzeitig amplifiziert. Im zweiten Schritt wurde durch eine PCR mit anderen Primern die cDNA weiter amplifiziert, wodurch genug Material für die Sequenzierung zur Verfügung stand.

Die entsprechenden Gemische und Programme sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tab. 2.7 Die Mischverhältnisse und Programme der Reversen Transkription und der PCR.

Reverse Transkription und 1. PCR				
<u>Mix</u>		<u>Programm</u>		
			Temperatur	Zeit
Wasser	9 µl	Reverse Transkription	50°C	30 min
5x Puffer	5 µl	Denaturierung	95°C	15 min
dNTPs	1 µl			
Primer 1 (10 pmol/µl)	2 µl	Denaturierung	94°C	1 min
Primer 2 (10 pmol/µl)	2 µl	Annealing	56°C	1 min
RT-Taq	1 µl	Elongation	72°C	2 min
RNA-Probe	5 µl			
		finale Elongation	72°C	10 min
2. PCR				
<u>Mix</u>		<u>Programm</u>		
			Temperatur	Zeit
Wasser	32 µl	Denaturierung	94°C	2 min
5x Puffer	10 µl			
dNTPs	2 µl	Denaturierung	94°C	1 min
Primer 1 (10 pmol/µl)	2 µl	Annealing	55°C	1 min
Primer 2 (10 pmol/µl)	2 µl	Elongation	72°C	2 min
Go-Taq	1 µl			
cDNA	1 µl	finale Elongation	72°C	15 min

Somit kamen für die Analyse jedes Fragmentes mindestens zwei Primerpaare zum Einsatz (Tab. 2.8)

Tab. 2.8 Die Primerkombinationen für die reverse Transkription und Amplifikation viraler RNA. Die Paare sind nach den Genotypen aufgeteilt und zusätzlich ist das jeweils zu untersuchende Fragment angegeben.

Primer 1. PCR	Primer 2. PCR	Fragment
<u>GT1a</u>		
3b-F/4a-R	3c-F/3c-R	NS3 1073
4a-F/4e-R	4b-F/4d-R	NS3 1406
<u>GT1b</u>		
SV693S-neu/1113R	3404S-neu/1058-R	NS3 1073
SV967S/SV694AS-neu	913-F/696AS	NS3 1406
913-F/1622-R	4c-F/1598-R	NS3 Replikon

<u>GT3a</u>		
3256-F/4577-R	3341-F/4460-R	NS3 1073
4294-F/4885-R	4328-F/4768-R	NS3 1406
4294-F/5452-R	4328-F/5439-R	NS3 1406

2.2.4.3.2. Diagnostischer Nachweis von HCV Core RNA

Der diagnostische Nachweis von HCV Core RNA mittels RT-PCR wurde für die Analyse von RNA aus PBMC eingesetzt. Dafür wurde die RNA im ersten Schritt in cDNA revers transkribiert. Um eine hohe Sensitivität zu erreichen, wurde bei diesem Ansatz eine recht hohe RNA- und RT-Konzentration eingesetzt. Im Anschluss wurde das Produkt für eine halbe Stunde bei -20°C eingefroren, dann wieder bei 4°C aufgetaut. In zwei folgenden PCR wurde nach dem Prinzip der *nested* PCR die DNA amplifiziert. In der ersten PCR wurden 10 µl des Produktes mit den Primern p417S/p874A eingesetzt, in der zweiten PCR nur 5 µl mit den Primern p439S/p1AS. Die Programme waren identisch (Tab. 2.9).

Tab. 2.9 Nachweis von HCV Core RNA in PBMC. Die RNA wurde erst durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend durch eine *nested* PCR amplifiziert.

Reverse Transkription

<u>Mix</u>		<u>Programm</u>
5x Puffer	4 µl	1h, 37°C
dNTPs	0,5 µl	
874A (50 pmol/µl)	0,2 µl	
DTT	1,8 µl	
RT	7,5 µl	
RNA-Probe	12,5 µl	

PCR

<u>Mix</u>		<u>Programm</u>	Temperatur	Zeit	
Wasser	23,75 µl	Denaturierung	94°C	2 min	35 Zyklen
5x Puffer	10 µl	Denaturierung	94°C	1 min	
dNTPs	1 µl	Annealing	55°C	1 min	
Primer 1 (10 pmol/µl)	5 µl	Elongation	72°C	2 min	
Primer 2 (10 pmol/µl)	5 µl				
Go-Taq	0,25 µl				
cDNA	10µl / 5 µl	finale Elongation	72°C	7 min	

2.2.4.3.3. TMA

Die qualitative Analyse viraler RNA in Plasma wurde mit Hilfe des Kits HCV RNA Qualitativer Assay nach Herstellerangaben durchgeführt und mit einem Luminometer ausgewertet.

2.2.4.4. Quantitative RT-PCR

Zum quantitativen Nachweis von mRNA verschiedener Proteine wurden genspezifische Primerpaare in Kombination mit dem QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit verwendet. Der im Reaktionsmix des Kits enthaltene Farbstoff SYBR Green I bindet an doppelsträngige DNA und emittiert dabei Fluoreszenz. Die gemessene Intensität ist proportional zu der Menge der amplifizierten DNA und zu der Zahl der mRNA Moleküle in der Probe. Die relativen mRNA Kopien wurden über eine Standardkurve mit verschiedenen Verdünnungen korrespondierender PCR Fragmente ermittelt. Die Expression von β -Actin diente dabei als externe Kontrolle.

Bei der PCR wurden verschieden Arten von Mischungen und Programmen je nach der Art der eingesetzten Primer genutzt. Die kommerziell erworbenen Primer für PD-L1, PD-L2, MxA und IP10 wurden - wie im oberen Teil der Tab. 2.10 dargestellt - eingesetzt. Die RT-PCR für β -Actin dagegen ist im unteren Teil beschrieben.

Tab. 2.10 Mischverhältnisse und Programme der quantitativen RT-PCR. Im oberen Teil sind die Beschreibungen für die Nutzung der kommerziellen Primer von Qiagen angegeben, im unteren Teil die für selber hergestellte Primer.

Quantitative RT-PCR (QuantiTect Primer Assay)

<u>Mix</u>		<u>Programm</u>		Temperatur	Zeit	
2x QuantiFast Master Mix	10 μ l	reverse Transkription	50°C		10 min	
QuantiFast RT Mix	0,2 μ l	Aktivierung	95°C		5 min	
Quantitect Primer	2 μ l					
Wasser	7 μ l	Denaturierung	95°C		10 s	45 Zyklen
RNA (100 ng/ μ l)	1 μ l	Annealing/Elongation	60°C		30 s	

Quantitative RT-PCR (β -Actin)

<u>Mix</u>		<u>Programm</u>		Temperatur	Zeit	
2x QuantiFast Master Mix	10 μ l	reverse Transkription	50°C		10 min	
QuantiFast RT Mix	0,2 μ l	Aktivierung	95°C		5 min	
β -Actin-F (5 μ M)	4 μ l					
β -Actin-R (5 μ M)	4 μ l	Denaturierung	95°C		10 s	45 Zyklen
Wasser	1 μ l	Annealing/Elongation	60°C		30 s	
RNA (100 ng/ μ l)	1 μ l	Ent-Dimerisierung	80°C		5 s	

2.2.4.5. Southern Blot

Zur Analyse der DNA im Southern Blot wurden zunächst die Proben auf ein Agarosegel (1,2%) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde für 30 Minuten in 0,25 M HCl gegeben und bewegt, anschließend wurde die DNA durch eine 30-minütige Inkubation in Denaturierungslösung denaturiert und dann 30 Minuten in Neutralisierungslösung neutralisiert. Nach einer weiteren 30-minütigen Behandlung des Gels mit SSPE Puffer wurde die DNA in Anwesenheit von 20x SSC Puffer in einem Vakuumblotter 2 Stunden lang auf die Hybond Nylonmembran geblottet. Mittels cross-linking, einer Bestrahlung mit UV-Licht, wurde die DNA kovalent an die Membran gebunden.

Durch eine anschließende Prähybridisierung wurde die Membran zuerst geblockt, indem sie für 30 Minuten bei 65° C in Anwesenheit des Hybridisierungspuffers Rapid-hyb inkubiert wurde. Für die eigentliche Hybridisierung wurde der Puffer verworfen, frischer Puffer mit der entsprechenden Sonde zu der Membran gegeben und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Diese Sonde war zuvor mit dem Rediprime II DNA labelling System und 2 µl des PCR Produktes der Positivkontrolle nach Herstellerangaben hergestellt worden. Im Anschluss wurde die Membran zweimal für 15 Minuten mit dem Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur, dann für 20 Minuten mit dem Waschpuffer 2 bei 65° C gewaschen, in Klarsichtfolie eingeschlagen und im Phosphoimager ausgewertet.

2.2.4.6. Sequenzierungen

DNA Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA durchgeführt. Die mittels PCR gewonnene DNA wurde zuerst mit Hilfe des PCR Purification Kits aufgereinigt und anschließend nach den von dem Labor geforderten Vorgaben eingesendet. Die Primer, die für die Sequenzierung der jeweiligen Abschnitte zum Einsatz kamen, sind in Tab. 2.11 aufgelistet.

Tab. 2.11 Die für die Sequenzierung eingesetzten Primer mit den jeweiligen zu analysierenden Fragmenten.

Primer	NS3 Fragment	Primer	NS3 Fragment	Primer	NS3 Fragment
<u>GT1a</u>		<u>GT1b</u>		<u>GT3a</u>	
3c-R	1073	3c-R	1073	3341-F	1073
3c-F	1073	3404S-neu	1073	4460-R	1073
4c-F	1406	4c-F	1406	4328-F	1406
4b-R	1406	913-F	1406		
4b-F	1406				

2.2.5. Serologische Untersuchungen

2.2.5.1. Anti-HCV Suchtest

Mit Hilfe des Architects i2000SR wurde die anti-HCV Reaktivität bestimmt. Dabei handelt es sich um einen Chemilumineszenzassay, der auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays beruht. Als Antigene werden Proteine verwendet, die einem Teil des HCV Core-, NS3-Proteins und dem NS3/4-Polyprotein entsprechen. Das Ergebnis der zu untersuchenden Probe wird ins Verhältnis zu dem Grenzwert der Kontrollen gesetzt und in Form des S/CO (sample/cutoff) wiedergegeben. Dabei wird eine S/CO von eins oder größer als reaktiv gewertet.

Zur Analyse wurden die Plasmaproben aufgetaut und in entsprechenden Probenröhrchen direkt in den Automaten gegeben.

2.2.5.2. Anti-HCV Bestätigungstest

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Immunoblots als Bestätigungstests eingesetzt, der recomBlot HCV IgG 2.0 (Mikrogen) und der Inno-Lia HCV Score (Innogenetics). Bei dem recomBlot HCV sind die gereinigten, rekombinanten HCV Proteine Core, NS3, Helikase, NS4 und NS5 aufgetrennt auf einer Membran aufgetragen, wodurch eine höhere Spezifität als bei dem Suchtest erreicht wird (Abb. 2.2 A). Bei entsprechender Reaktion sind die Antikörper in Form von Banden sichtbar.

Für die Auswertung besitzen die Antikörperreaktionen gegen unterschiedliche Antigene verschiedene Wertigkeiten. Je nach der Intensität der Core-Bande besitzt sie einen Wert von fünf oder acht. Die NS4-Bande hat einen Wert von vier, NS3- und Helikase- einen Wert von drei und NS5- von zwei. Bei einer Summe von fünf oder kleiner ist das Ergebnis negativ, bei sechs bis neun fraglich und bei zehn oder größer positiv. Die Analyse der Plasmaproben wurde nach Vorschrift des Herstellers mit Hilfe des Automaten Auto-LiPA durchgeführt.

Wie bei dem recomBlot sind bei dem Inno-Lia die HCV-Antigene in Form von Banden auf einen Nylonstreifen aufgetragen (Abb. 2.2 B). Allerdings werden bei diesem Test zwei Antigene aus der Core-Region verwendet. Zusätzlich ist ein Antigen aus der hypervariablen Region E2, eins aus der Helikase-Region NS3 sowie aus NS4a, NS4b und NS5a vorhanden. Als weiteres gibt es drei Positivkontrollen verschiedener Intensität, die zur Quantifizierung und als untere Grenze der Antikörperreaktion genutzt werden. Zusätzlich liegt eine Streptavidin-Kontrolle vor, die bei dem Test negativ sein muss, um eine fehlerfreie Interpretation des Blots zu gewährleisten. In diesem Test besitzt die NS3-Bande eine höhere Wertigkeit als andere Proteine. Ist ihre Intensität äquivalent zu der schwächsten

Positivkontrolle, liegt ein fraglicher Befund vor. Der gleiche Befund liegt vor, wenn eine Reaktion gegen ein anderes Antigen mit höherer Intensität vorliegt. Wenn zwei HCV-Antigenbanden eine Reaktivität von mindestens der schwächsten Positivkontrolle aufweisen, ist die Probe positiv.

Die Plasmaproben wurden nach dem Herstellerprotokoll für eine Inkubationszeit von drei Stunden mit Hilfe des Auto-LiPA durchgeführt.

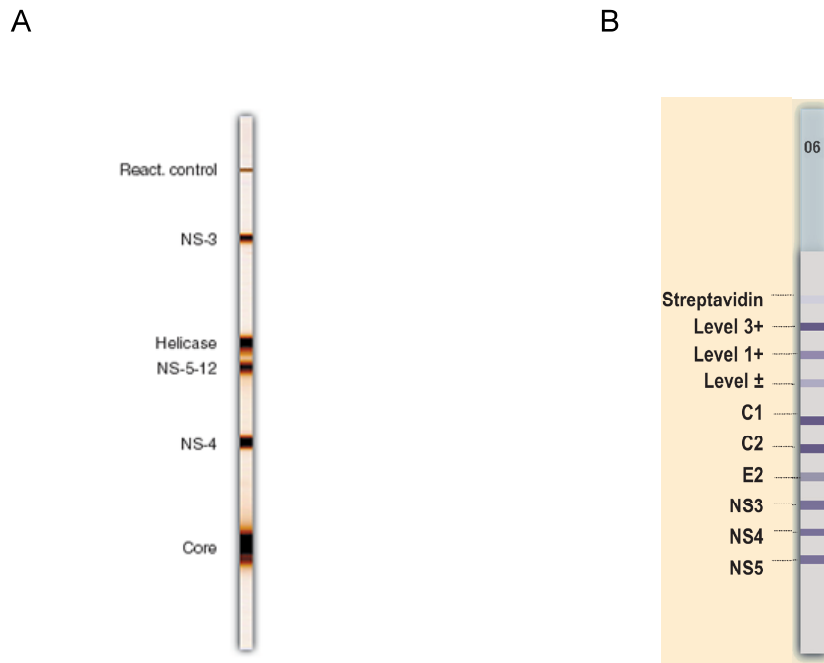


Abb. 2.2 Bandenverteilung auf den eingesetzten rekombinanten Immunoblots: (A) recomBlott HCV IgG 2.0 von Mikrogen und (B) Inno-Lia HCV Score von Innogenetics

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der zellulären Immunantwort bei Blutspendern mit fraglichen HCV Infektionen

3.1.1. Serologische Untersuchungen der Blutproben

Für diese Studie wurden Blutproben von 72 Blutspendern akquiriert, die innerhalb der letzten neun Jahre aufgrund eines fraglichen anti-HCV Befundes von der Blutspende ausgeschlossen wurden. Diese Personen waren also zum Zeitpunkt der Blutspende im Suchtest reaktiv getestet worden, während im Immunblot eine schwache Reaktion detektiert worden war.

Die Analyse der aktuellen Plasmen mit dem CMIA als Suchtest zeigte, dass bei insgesamt 40 der 72 Spender (56%) Antikörper nachweisbar waren (durchschnittliche Intensität: 2,6 S/CO), während bei 32 Spendern die Reaktivität unterhalb der Grenze von 1 S/CO lag und somit nach Herstellerangaben als nicht reaktiv einzustufen war (Abb. 3.2).

Aufgrund dieser abweichenden Ergebnisse von den initialen Befunden der Blutspendedienste stellte sich die Frage, ob die Ursache in der Abnahme der Antikörperkonzentration oder an den eingesetzten Tests liegt. Natürlich bestand die Möglichkeit, dass die verschiedenen Messverfahren unterschiedliche Antikörpermengen detektieren. Allerdings kann nach einer ausgeheilten HCV Infektion die Konzentration über die Zeit abnehmen, was sowohl die fraglichen Befunde beim Blutspendedienst als auch die durchschnittlich noch geringeren Antikörperkonzentrationen in der vorliegende Studie erklären könnte. Um einen solchen Verlauf nachverfolgen zu können, wurden die ermittelten Reaktivitäten in Relation zum Zeitpunkt gesetzt, an dem der erste Befund bei dem Blutspendedienst gemacht wurde. Für einen direkten Vergleich wurden EIA Ergebnisse der Spender, die innerhalb der letzten zwei Jahre anti-HCV reaktiv (Gruppe 1) befundet wurden,

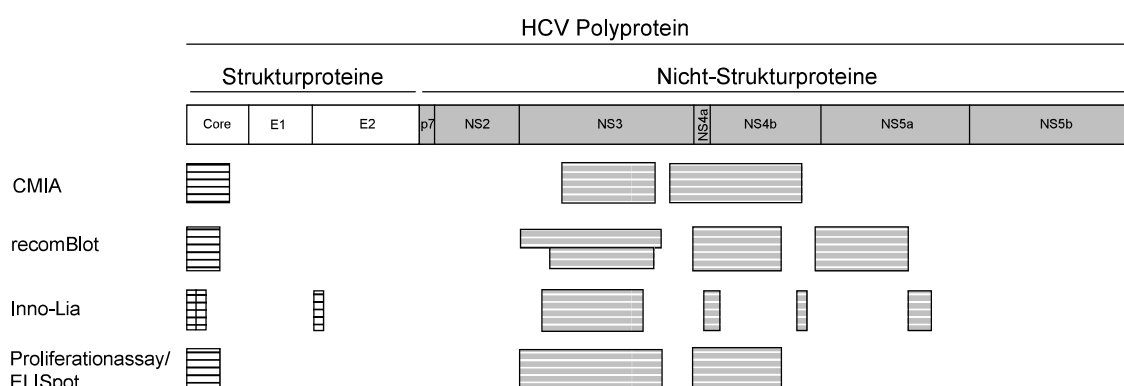


Abb. 3.1 Die Organisation des HCV Polyproteins. Darunter sind die rekombinanten Proteine angegeben, die in den verschiedenen diagnostischen Testsystemen und Analysen dieser Studie eingesetzt wurden.

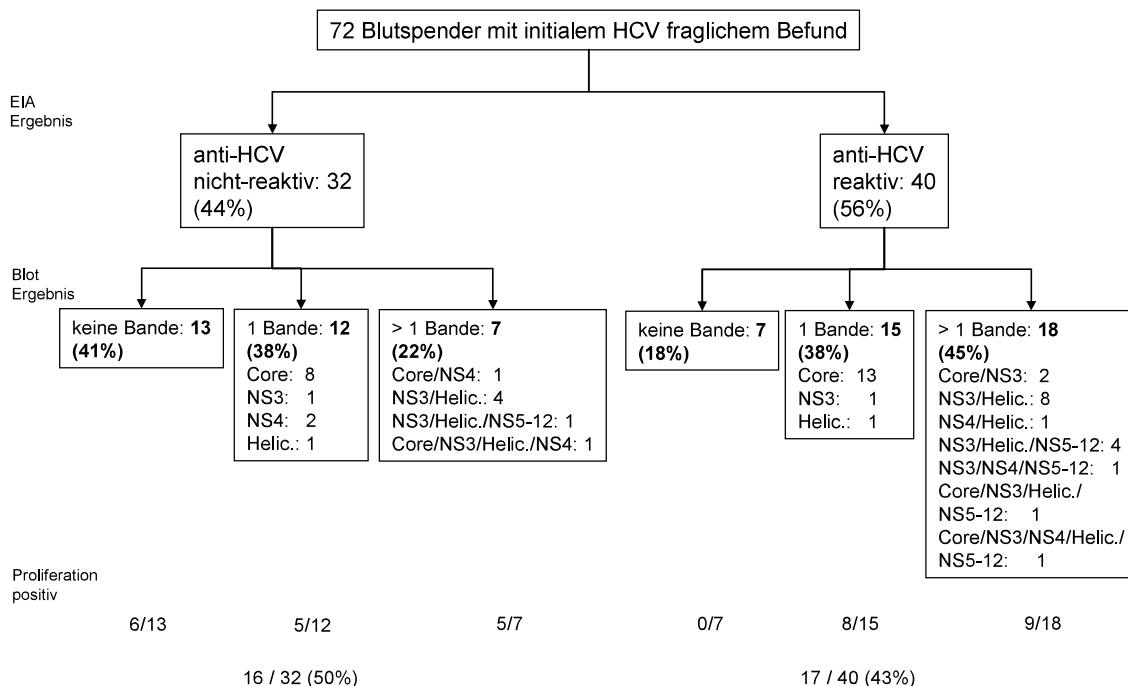


Abb. 3.2 Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen und der Analyse der zellulären Immunantwort der 72 Spender, die ursprünglich anti-HCV fraglich diagnostiziert worden waren. Die Proben wurden zunächst mittels EIA auf anti-HCV Reaktivität getestet. Reaktive und nicht-reaktive Spender wurden im Anschluss im Immunoblot auf Antikörper gegen bestimmte virale Proteine (recomBlot: Core, NS3, NS4) und in Abhängigkeit von der Anzahl der detektierten Banden weiter unterteilt. Die Anzahl der Spender, die gegen ein Protein beziehungsweise gegen Proteinkombinationen reagierten, ist in den Kästen angegeben. Jeweils darunter ist die Anzahl der Spender angeführt, bei denen eine Proliferation der PBMC nach Stimulation mit mindestens einem Protein detektiert wurde.

mit denen verglichen, deren Befund schon mehr als fünf Jahre zurück lag (Gruppe 2; Abb. 3.3). Während in Gruppe 1 noch 65% der Spender reaktiv waren (durchschnittlicher S/CO: 2,5), konnte bei Gruppe 2 nur noch bei 48% der Spender Antikörper gegen HCV nachgewiesen werden (durchschnittlicher S/CO: 1). Diese signifikante Verminderung der anti-HCV Reaktivität ($p < 0,05$) bestätigte, dass möglicherweise die Menge der Antikörper abnimmt, je länger der ursprüngliche Befund zurückliegt.

Neben dem EIA wurden die Proben im Anschluss mit dem Immunoblot (recomBlot) auf Antikörper gegen einzelne HCV Proteine untersucht. Durch die Auftrennung der viralen Proteine besitzt dieser Test im Vergleich zu dem CMIA eine höhere Spezifität. Daher wird nach einem reaktiven Befund im sensitiveren CMIA mit Hilfe des Blots unterschieden, ob es sich um Antikörper gegen spezifische Proteine oder um unspezifische Reaktionen handelt. Mittels Immunoblot konnten bei 52 Spendern (72%) Antikörper gegen mindestens ein Antigen detektiert werden.

Außerdem kann durch die aufgetrennten Proteine der Umfang der humoralen Immunantwort dargestellt werden. In der Gruppe der EIA nicht reaktiven Spender zeigten 13 (41%) im Blot keine Reaktion, zwölf (38%) reagierten mit einem und sieben (22%) mit mehr als einem Antigen. In der Gruppe der EIA reaktiven Spender zeigte sich eher ein entgegengesetztes

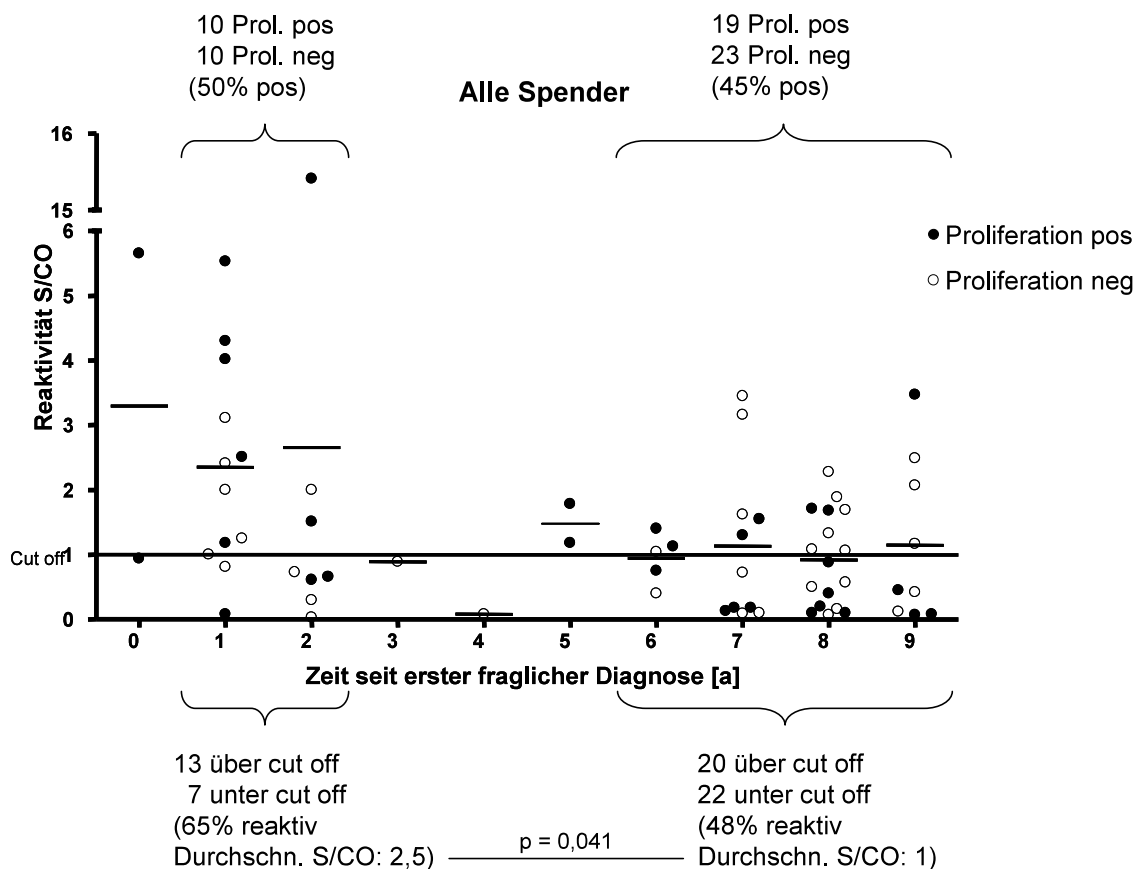


Abb. 3.3 Die anti-HCV Reaktivität von Blutspendern ermittelt durch den CMA bezogen auf die vergangene Zeit seit dem ersten fraglichen Befund. Der cut-off des Assays liegt bei einer S/CO von eins. Spender, die innerhalb der letzten zwei Jahre als fraglich getestet worden waren, zeigten eine Antikörperreaktivität in 65% der Individuen. Im Gegensatz dazu konnte nur in 48% der Spender, deren Befund mehr als fünf Jahre zurücklag, eine Reaktivität detektiert werden ($p = 0,041$). Die Anzahl an Spendern mit zellulärer Immunantwort war in beiden Gruppen ähnlich. Der statistische Vergleich wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

Verhältnis. Während sieben (18%) im Blot negativ waren, wurden bei 15 (38%) Spendern Reaktionen mit einem und bei 18 (45%) Spendern mit mehr als einem Antigen festgestellt. Zusätzlich zeigte die Auswertung der detektierten Antigene, dass die HCV Proteine nicht alle in gleichen Maßen von den Antikörpern erkannt wurden. Bezogen auf alle Spender (72) in dieser Studie wurden Antikörper gegen das Core-Protein (27) am häufigsten detektiert, gefolgt von NS3 (25) und der Helikase (23). Bei weitem seltener konnten Reaktionen mit NS4 (6) und NS5-12 (8) beobachtet werden.

Die Proben wurden zusätzlich mit einem zweiten Immunoblot (Inno-Lia) getestet. Da sich die Blots in den Antigenen unterscheiden, sollte somit eine maximale Sensitivität erreicht werden. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Blots zeigte, dass Antikörper gegen Core und NS3 in beiden Tests am häufigsten nachgewiesen wurden (Abb. 3.4). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Detektion von Antikörpern

		Core		NS3 und Helikase		NS4		NS5	
		Inno-Lia		Inno-Lia		Inno-Lia		Inno-Lia	
		+	-	+	-	+	-	+	-
recomBlot	+	20	7	18	7	2	5	1	7
	-	6	32	5	35	3	55	1	56

Abb. 3.4 Der Vergleich der serologischen Ergebnisse, die mit den verschiedenen Immunoblots gewonnen wurden. Die Tabellen zeigen die Anzahl der Proben, die entweder in beiden Tests (+/+) oder nur in einem Test (+/-) reaktiv waren oder keine Reaktion zeigten (-/-). NS3 und Helikase wurden zusammengefasst, weil die Helikase innerhalb des NS3 Proteins liegt. Während kein signifikanter Unterschied in der Detektion von Antikörpern gegen Core, NS3 und NS4 zwischen den beiden Tests beobachtet werden konnte, war die Detektion von Antikörpern gegen NS5 mit dem recomBlot erhöht.

Sieben Proben wurden nicht in dem Vergleich berücksichtigt, da sie aufgrund einer positiven Reaktion gegen Streptavidin im Inno-Lia nicht auswertbar waren. Der statistische Vergleich wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt.

gegen Core, NS3 oder NS4 zwischen den beiden Tests gab. Im Gegensatz dazu war die Detektion von NS5 spezifischen Antikörpern im recomBlot höher als im Inno-Lia. Zusammengefasst zeigt die Analyse der humoralen Immunantwort von Blutspendern in vielen Individuen einen Unterschied zu dem ursprünglichen Befund. Während alle Spender beim DRK als anti-HCV fraglich diagnostiziert worden waren, wurde im Rahmen dieser Studie nur bei 56% (EIA) beziehungsweise 72% (Immunoblot) Antikörper detektiert.

3.1.2. Analyse der zellulären Immunantwort

3.1.2.1. Proliferation der PBMC

Zum Nachweis der zellulären Immunantwort wurde die Proliferation von PBMC analysiert. Bei 33 Spendern (46%) konnte eine Proliferation der Zellen nach Stimulation mit einem oder mehreren Proteinen detektiert werden. Dabei zeigten zwölf Spender (17%) eine Immunantwort nach Stimulation mit dem Core-Protein, die Zellen von 27 Spendern (38%) proliferierten nach Stimulation mit dem NS3- und die von 26 Spendern (36%) nach der Kultur mit dem NS4-Protein. Die stärkste Proliferation war nach Stimulation mit NS3 zu beobachten (Abb. 3.5 A).

Insgesamt reagierten von den 33 positiven Spendern elf nach der Stimulation mit einem Protein, 13 mit zwei und neun mit drei Antigenen.

Wie auch schon bei der Analyse der humoralen Immunantwort wurde untersucht, inwieweit die zelluläre Immunreaktion von dem Zeitpunkt des ersten fraglichen Befundes abhängig ist. Die Ergebnisse des Proliferationstests wurden wieder in die vorher beschriebenen zwei Gruppen eingeteilt, je nachdem, ob der initiale Befund weniger als zwei oder mehr als fünf Jahre zurücklag (Abb. 3.3). Der Vergleich zeigte, dass kein signifikanter Unterschied

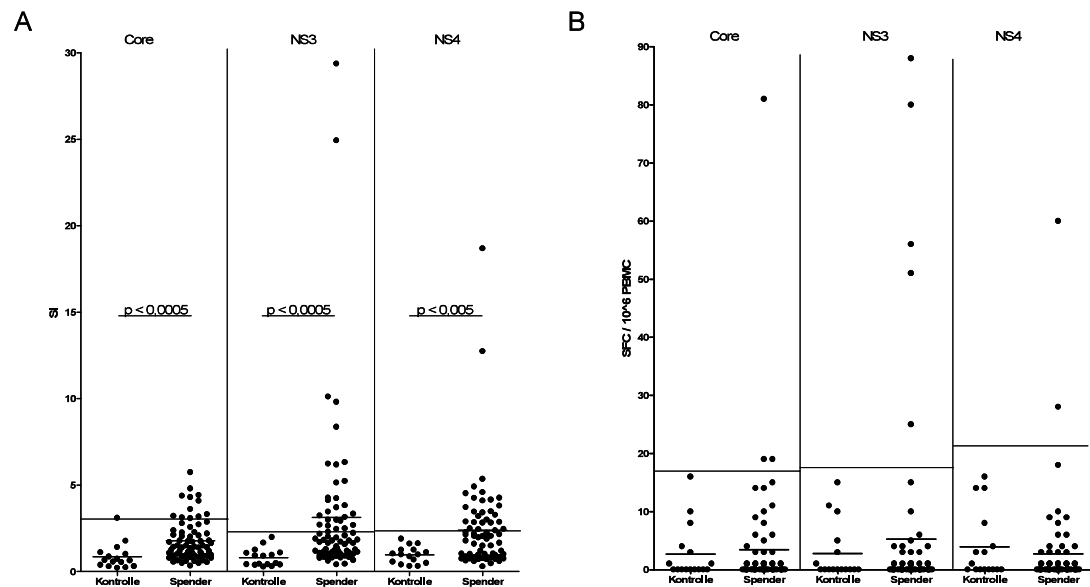


Abb. 3.5 Die Analyse der zellulären Immunantwort der anti-HCV fraglichen Spender. (A) Bestimmung der T Zell Proliferation nach Stimulation der PBMC mit HCV Antigenen. Die Proliferation ist in Form des Stimulationsindex (SI) angegeben. (B) Detektion der IFN γ produzierenden T Zellen nach Stimulation im ELISpot Assay. Die Ergebnisse zeigen die *Spot Forming Cells* (SFC) pro 10⁶ PBMC. Der statistische Vergleich wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

zwischen diesen beiden Gruppen vorlag, da in 50% der ersten Gruppe und in 45% der zweiten Gruppe Proliferation nachgewiesen werden konnte.

Somit konnte die Proliferation in fast der Hälfte der Spender nachgewiesen werden; eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt des initialen Befundes konnte nicht nachgewiesen werden.

3.1.2.2. IFN γ Produktion der PBMC

Neben der Proliferation ist die Sekretion von IFN γ ein wichtiger Marker für die antivirale Funktionalität spezifischer T Zellen. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Zellen in fast der Hälfte der Spender proliferierten, allerdings ergab das nur bedingt Aufschluss über die Funktionalität. Daher wurde die Produktion des Zytokins nach Stimulation der PBMC mit HCV Proteinen im ELISpot analysiert (Abb. 3.5 B). In insgesamt sieben Spendern konnte IFN γ nachgewiesen werden, wobei die Stimulation mit NS3 bei fünf Individuen zu einer Immunantwort führte. Drei Patienten reagierten zusätzlich noch mit Core und/oder NS4. Zwei Spender reagierten nur schwach nach Stimulation mit dem Core Protein.

Übereinstimmend war bei diesen Spendern auch eine Proliferation der PBMC nach Stimulation mit HCV Proteinen nachgewiesen worden. Die ELISpot Analyse bestätigte somit die vorausgegangen Ergebnisse bei diesen Spendern.

Zusätzlich wurden die Zellen mit vier Peptidgemischen bestehend aus überlappenden Peptiden der Core-Region und einem Gemisch aus sechs immundominanten Peptiden des nicht-strukturellen Bereichs stimuliert. Bei der Analyse der Negativkontrollgruppe induzierten diese Peptide allerdings so starke zelluläre Immunantworten, so dass eine weitere Analyse der Proben fraglicher Spender nicht möglich war und die Untersuchungen eingestellt wurden.

3.1.3. Analyse viraler RNA in PBMC

Da sich Patienten mit einer okkulten HCV Infektion und Spender mit fraglichen anti-HCV Befunden serologisch sehr ähneln, sollte untersucht werden, ob die Spender möglicherweise immer noch okkult mit dem Virus infiziert sind. Denn auch bei diesen Patienten konnte eine T Zellantwort nachgewiesen werden. Im Unterschied zu ausgeheilten Patienten kann allerdings bei 70% der Patienten virale RNA in den PBMC detektiert werden.

Daher wurde die RNA der PBMC von 22 Spendern, bei denen eine Immunantwort im Proliferationstest nachweisbar war, und von zwei Spendern, deren Nachweis spezifischer T Zellen negativ ausgefallen war, extrahiert und mittels PCR auf HCV Core getestet. Nur bei einem Spender war eine deutliche Bande der theoretischen Größe von etwa 312 bp zu erkennen, die der Positivkontrolle entsprach. Bei drei weiteren Proben waren schwächere Banden entsprechender Größe auf dem Gel sichtbar (Abb. 3.6 A).

Vorhergegangene Analysen mit Proben chronischer HCV Patienten hatten gezeigt, dass durch virale RNA im Plasma das Ergebnis dieses Tests falsch positiv beeinflusst werden kann. Daher wurde die Virämie entsprechender Spender qualitativ mit dem hoch sensitiven TMA wiederholt getestet und fiel bei allen vier Proben negativ aus. Virämie im Plasma konnte somit als Ursache für dieses Ergebnis ausgeschlossen werden.

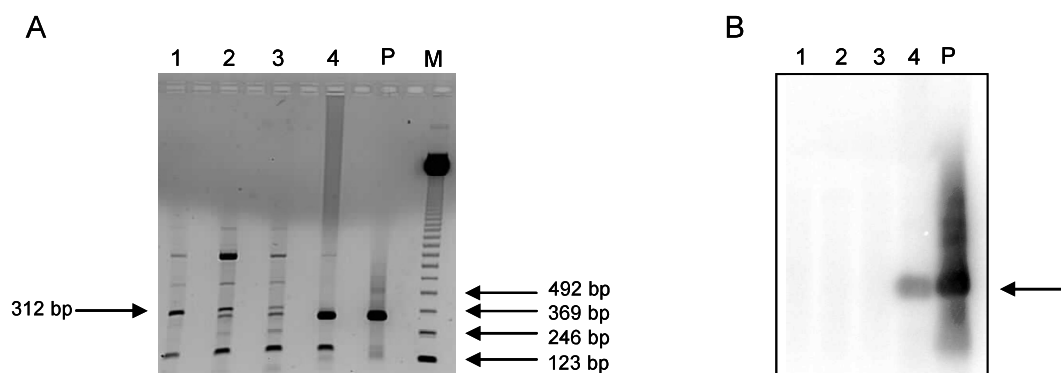


Abb. 3.6 Analyse viraler RNA in PBMC von anti-HCV fraglichen Blutspendern. (A) Das Ergebnis der RT-PCR zeigte bei vier Spendern Banden auf dem Niveau der Positivkontrolle, einer Serumprobe eines chronischen HCV Patienten. (B) Die Analyse im Southern Blot bestätigte das Vorhandensein viraler RNA in einem Spender. (P: Positivkontrolle; M: Größenmarker; 1-4: Spendermaterial)

Da die Banden im Gel zum Teil schwach waren, wurde eine weitere Analyse mittels Southern Blot durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass effektiv nur bei einem Spender virale RNA in den PBMC vorhanden war (Abb. 3.6 B).

Um eine Kontamination mit der Positivkontrolle auszuschließen, wurden die beiden Proben sequenziert und mit bekannten Sequenzen verglichen. Während die Positivkontrolle dem Genotyp 2b entsprach, lag bei dem fraglichen Spender der Genotyp 1b vor. Durch den Nachweis der verschiedenen Genotypen konnte eine Verunreinigung ausgeschlossen werden.

Dieser Spender war auch schon in den zellulären Analysen positiv getestet worden. Daher bestätigt das Ergebnis die Vermutung einer ausgeheilten HCV Infektion. Interessanterweise war dieser Spender in beiden serologischen Tests nicht reaktiv.

3.2. PD-1 Expression bei chronisch infizierten HCV Patienten

3.2.1. Die Expression auf T Zellen

Der Rezeptor PD-1 wird auf aktivierten T Zellen exprimiert und kann unter anderem mit einer Anergie der T Zellen assoziiert werden. Es wurde gezeigt, dass bei dem chronischen Verlauf einer Virusinfektion die Expression auf Virus spezifischen T Zellen permanent erhöht bleibt und diese Zellen verminderte Effektorfunktionen aufweisen.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde zuerst die Expression des Rezeptors bei chronisch infizierten HCV Patienten untersucht, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht in Therapie befanden. Dabei wurden alle CD4+ und CD8+ T Zellen in die Analyse mit einbezogen und mit der Expression von PD-1 bei gesunden Kontrollindividuen verglichen.

Die Ergebnisse zeigten, dass der Anteil an PD-1 positiven Zellen auf CD4+ T Zellen höher war als auf CD8+ T Zellen.

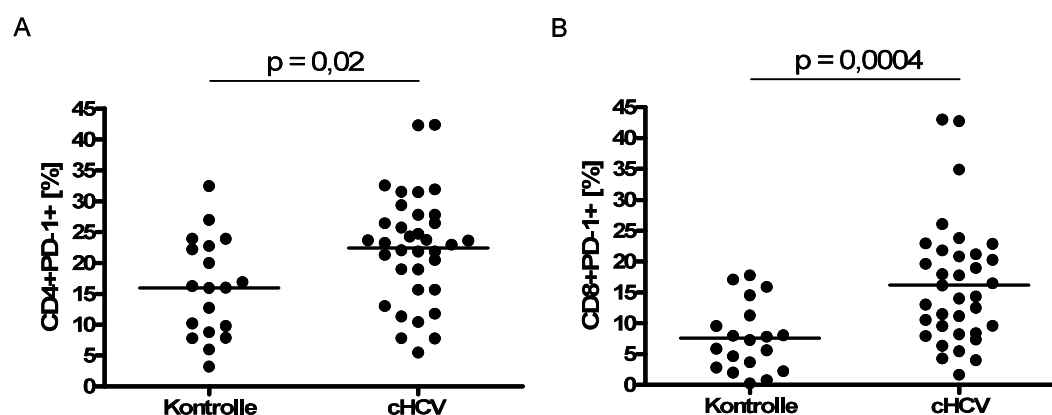


Abb. 3.7 Der Anteil von PD-1 positiven Zellen der A) CD4+ und der B) CD8+ Populationen. Verglichen wurden die Zellen von gesunden Freiwilligen als Kontrolle und chronischen HCV Patienten, die sich nicht in Therapie befanden. Die statistischen Vergleiche wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

Bei dem Vergleich der Patienten mit der Kontrollgruppe wurde deutlich, dass sowohl in der CD4+ als auch in der CD8+ Population die Expression von PD-1 signifikant erhöht war (CD4+: $p = 0,02$; CD8+: $p = 0,0004$) (Abb. 3.7).

Eine chronische HCV Infektion resultierte also in einer erhöhten PD-1 Expression. Allerdings konnte keine Korrelation zwischen der Expression und der Viruslast nachgewiesen werden (Abb. 3.8).

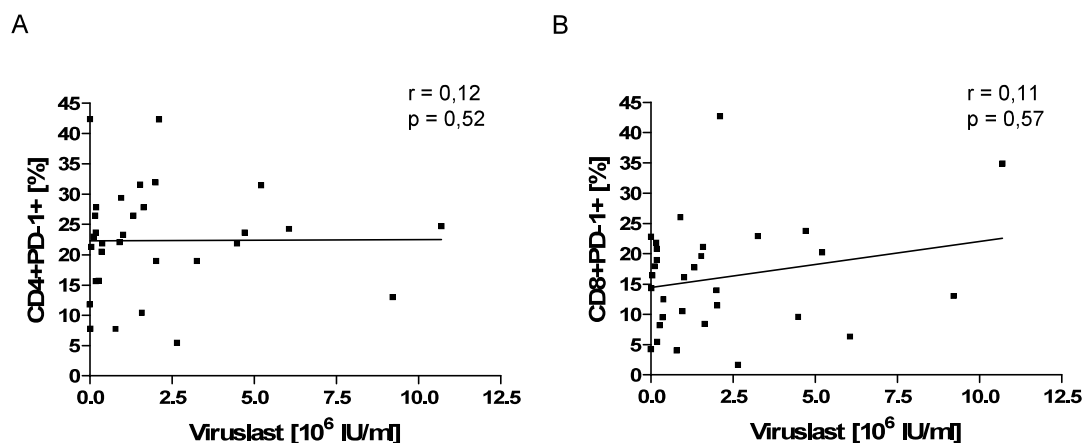


Abb. 3.8 Die Expression von PD-1 auf CD4+ (A) und CD8+ (B) Zellen in Abhängigkeit von der Viruslast. Für die Berechnung der Statistik wurde die Spearman-Korrelation eingesetzt.

3.2.2. Die Expression von PD-1 auf CD4+ und CD8+ T Zellen unter Therapie

Da eine chronische HCV Infektion als Ursache für eine erhöhte PD-1 Expression nachgewiesen werden konnte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, wie sich eine erfolgreiche Therapie auf die Expression auswirkt. Auch wenn eine direkte Korrelation von PD-1 und der Viruslast nicht gezeigt werden konnte, bestand die Möglichkeit, dass die Therapie einen Einfluss auf die Aktivierung von T Zellen nehmen kann. Daher wurde bei zehn Patienten die ersten zwölf Wochen der Therapie mitverfolgt und zu verschiedenen Zeitpunkten die PD-1 Expression bestimmt (Tab. 2.1, S. 27).

Die longitudinale Analyse zeigte allerdings, dass die Therapie keinen Einfluss auf die Expression von PD-1 auf T Zellen hat (Abb. 3.9). Während bei sieben Individuen nach zwölf Wochen keine virale RNA nachweisbar war, nahm - bezogen auf CD4+ Zellen - der Anteil an PD-1 positiven Zellen im Verlauf der zwölf Wochen nur bei vier Patienten ab (Pt25, Pt28, Pt29, Pt31), während bei den restlichen die Menge an CD4+PD-1+ Zellen relativ konstant blieb oder sogar anstieg.

Ähnlich verhielt es sich bei den CD8+ T Zellen. Nur bei fünf Patienten konnte eine kontinuierliche Abnahme beobachtet werden (Pt23, Pt24, Pt25, Pt28, Pt29).

Zusammengenommen wurde also bei drei Patienten (Pt25, Pt28, Pt29) im Verlauf der Therapie eine Abnahme von PD-1 Expression sowohl auf CD4+ als auch CD8+ T Zellen nachgewiesen.

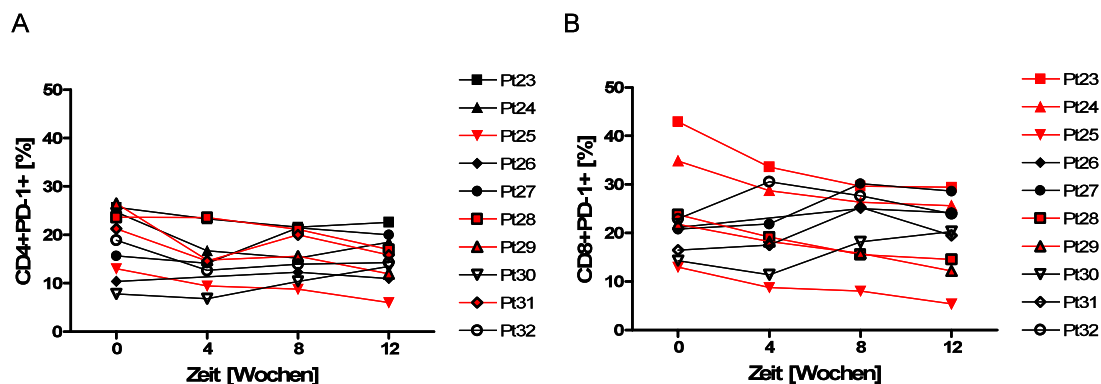


Abb. 3.9 Der longitudinale Verlauf der CD4+PD-1+ (A) und der CD8+PD-1+ (B) T Zellen im Verlauf der ersten zwölf Wochen der HCV Therapie. Das Blut wurde den Patienten zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen, aufgereinigt und eingefroren. Zur Analyse wurden die Proben von allen Zeitpunkten aufgetaut und die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

3.2.3. Analyse der PD-1 Expression auf HCV spezifischen CD8+ T Zellen vor und während der antiviralen Therapie

Eine Reduktion der PD-1 Expression auf allen CD4+ und CD8+ T Zellen wurde während der ersten zwölf Wochen einer HCV Therapie nur bei vier Patienten beobachtet. Es war jedoch gezeigt worden, dass gerade auf Virus spezifischen CD8+ T Zellen die PD-1 Expression erhöht ist. Daher bestand die Möglichkeit, dass speziell auf diesen Zellen das Expressionsmuster durch die Therapie moduliert wird. Aufgrund dieser Annahme wurde der longitudinale Verlauf der Proteinexpression auf den CTL analysiert.

Zur Detektion HCV spezifischer CD8+ T Zellen wurden drei verschiedene Tetramere eingesetzt. Da es sich bei den Peptiden um HLA-A2 restringierte Epitope handelte (1073, 1406, 2594), wurden im ersten Schritt die Studienteilnehmer ermittelt, die den entsprechenden HLA-A Typ aufwiesen. Insgesamt konnten somit 22 Patienten in die Analyse einbezogen werden (Tab. 2.1, S. 27).

Die für die Herstellung der Tetramere genutzten Peptide entsprachen den Sequenzen des HCV Genotypen 1a. Laut der Diagnostik waren die Patienten aber mit verschiedenen Genotypen des Virus infiziert. Daher wurde die virale RNA aus dem Plasma zum Zeitpunkt vor der Therapie extrahiert und die entsprechenden Bereiche aus NS3 sequenziert. Für die Sequenzen der Genotypen 2a und 4 beziehungsweise des NS5 Bereiches wurden die Konsensussequenzen aus HCV Datenbanken ermittelt und angegeben (Abb. 3.10).

1073 Tetramer	C I N G V C W T V	1406 Tetramer	K L V A L G I N A V	2594 Tetramer	A L Y D V V T K L
Pt03 GT1a	Pt03 GT1a	. . . G . . V . . .	GT1a Konsensus 2594 S . .
Pt10 GT1a	Pt10 GT1a V	GT1b Konsensus 2594 S T .
Pt11 GT1a	Pt11 GT1a V	GT2a Konsensus 2594 T Q . .
Pt19 GT1a	Pt19 GT1a V	GT3a Konsensus 2594 I Q . .
Pt02 GT1b	. V	Pt02 GT1b	. . S G . . L . . .	GT4 Konsensus 2594	. . H . . I N Q .
Pt06 GT1b A	Pt06 GT1b	. . S S . . L . . .		
Pt07 GT1b	. V	Pt07 GT1b	. . S S . . L . . .		
Pt18 GT1b	. V . . T	Pt18 GT1b	. . S S . . L . . .		
Pt21 GT1b	. V	Pt21 GT1b	. . S S . . L . . .		
Pt22 GT1b	Pt22 GT1b	. . S G . . L . . .		
Pt17 GT2a	S . S . . L . . .	Pt17 GT2a	A . R G M . L . . .		
Pt01 GT3a	T V G . . M . . .	Pt01 GT3a	. . R G M . L . . .		
Pt05 GT3a	T V G . . M . . .	Pt05 GT3a	. . R G M . L . . .		
Pt08 GT3a	T V G . . M . . .	Pt08 GT3a	. . R G M . L . . .		
Pt09 GT3a	T V G . . M . . .	Pt09 GT3a	. . R G M . L . . .		
Pt12 GT3a	T V G . . M . . .	Pt12 GT3a	. . R G M . L . . .		
Pt13 GT3a	T V G . . M . . .	Pt13 GT3a	. . R C M . L . . .		
Pt14 GT3a	T V C . . M . . .	Pt14 GT3a	. . R C M . L . . .		
Pt15 GT3a	T V G . . M . . .	Pt15 GT3a	. . R G M . L . . .		
Pt20 GT3a	T V G . . M . . .	Pt20 GT3a	. . R G M . L . . .		
Pt16 GT4	A V . . . M . . .	Pt16 GT4	Q . T S . . L . . .		

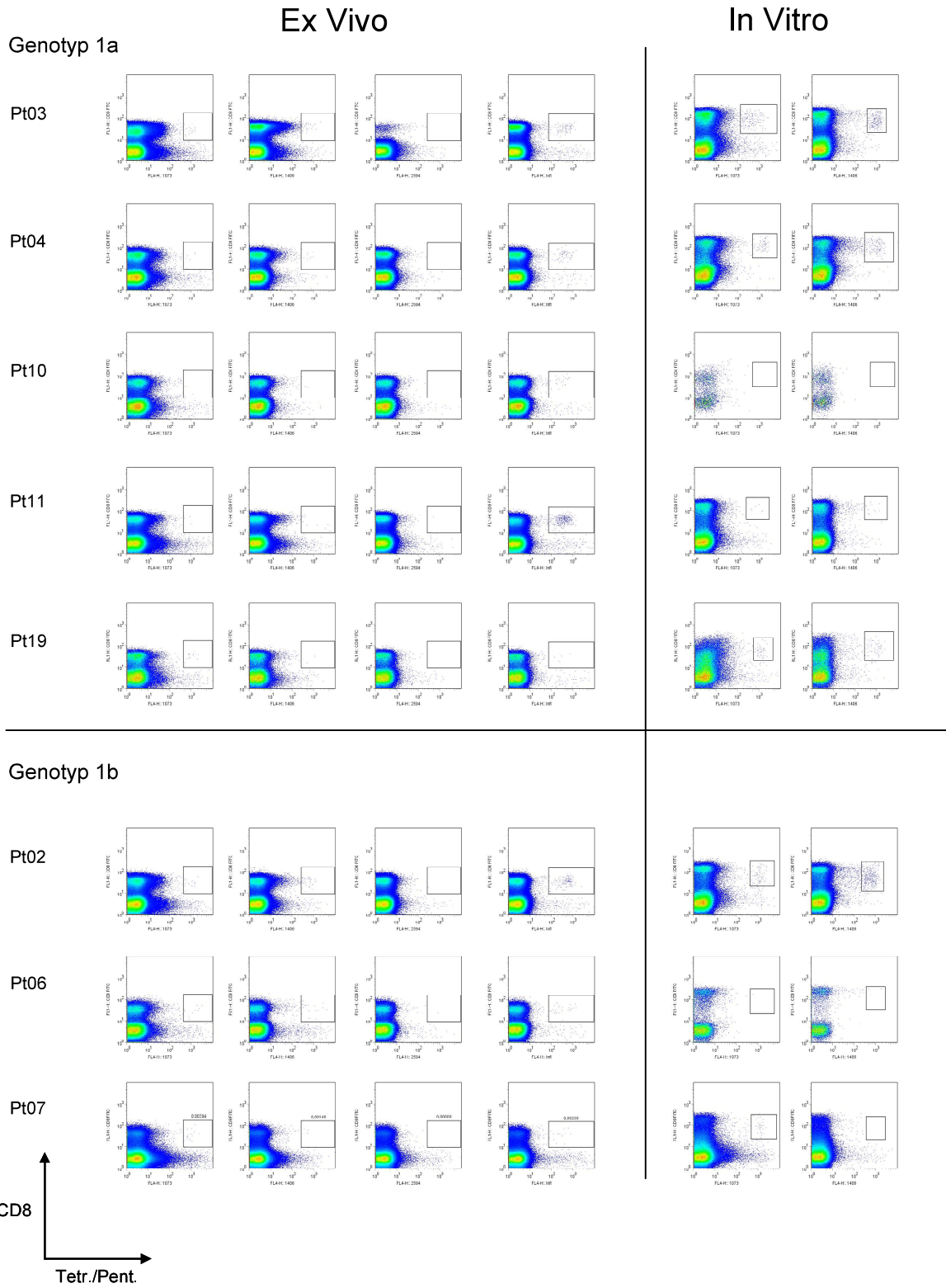
Abb. 3.10 Die für die Tetramerherstellung eingesetzten Peptidsequenzen im Vergleich zu den viralen Sequenzen aus den jeweiligen Patienten. Die virale RNA wurde aus dem Plasma isoliert, Teile des NS3 Bereichs durch RT-PCR revers transkribiert, amplifiziert und sequenziert. Sowohl die Sequenzen für GT2a und 4 als auch die Sequenzen für den NS5 Bereich wurden durch das Erstellen von Konsensussequenzen mit Hilfe von HCV Datenbanken erstellt. Die Patienten sind nach den jeweiligen Genotypen geordnet.

Obwohl sich die autologen Sequenzen von denen der Tetramere unterschieden, wurde untersucht, inwieweit bei den Patienten spezifische Zellen nachweisbar waren. Von 18 Individuen (Pt 01-03, 05, 07, 09, 11-22) wurden die Proben von dem Zeitpunkt vor der Therapie aufgetaut und die ex vivo Bestimmung durchgeführt. Von drei weiteren Patienten (Pt 04, 06, 10) stand kein Material zum Zeitpunkt vor der Therapie zur Verfügung. Daher wurden Proben, die unter Therapie entnommen wurden, in die Analyse einbezogen. Ein weiterer Patient konnte aufgrund von zu wenig Probenmaterial nicht initial getestet werden (Pt 08).

Insgesamt wurden in elf Patienten spezifische Zellen gegen das Epitop 1073 (Pt 02, 03, 05, 06, 13-19) und in zehn Patienten gegen das Epitop 1406 (Pt 02-06, 13-17) detektiert. Gegen das Epitop 2594 waren ex vivo in keinem Patienten spezifische Zellen nachweisbar (Abb. 3.11).

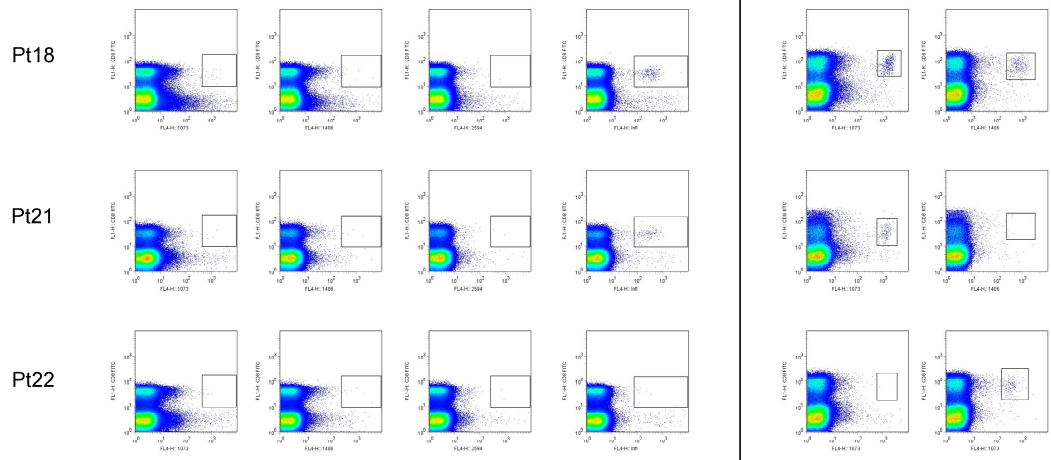
Da die Menge an spezifischen Zellen bei chronischen HCV Patienten sehr gering ist, wurde zur Bestätigung der Ergebnisse ein Teil der Zellen in vitro durch Stimulation mit den entsprechenden GT1a Peptiden expandiert und wiederum die spezifischen Zellen bestimmt. Nach einer Kultur von acht Tagen konnten spezifische Zellen gegen 1073 in zehn Patienten (Pt 02, 03, 05, 13-19) und gegen 1406 in acht Patienten (Pt 02-05, 14-17) bestätigt werden. Zusätzlich konnte bei einigen Patienten, bei denen ex vivo keine spezifischen Zellen nachgewiesen wurden, nach der Expansion Zellen gegen 1073 (Pt 04, 07, 09, 11, 21) und 1406 (Pt 06, 09, 11, 18-20, 22) detektiert werden (Abb. 3.11).

Als Kontrolle wurden Influenza spezifische T Zellen mit Ausnahme von zwei Patienten bei allen Teilnehmern mit Hilfe des Influenza Pentamers nachgewiesen.

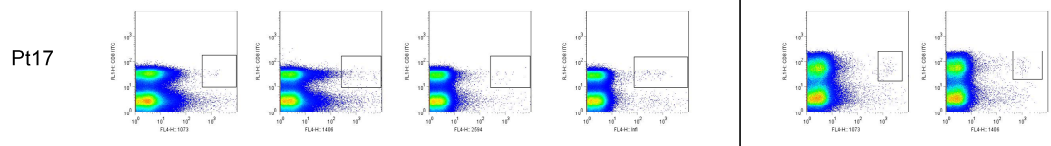


Ex Vivo

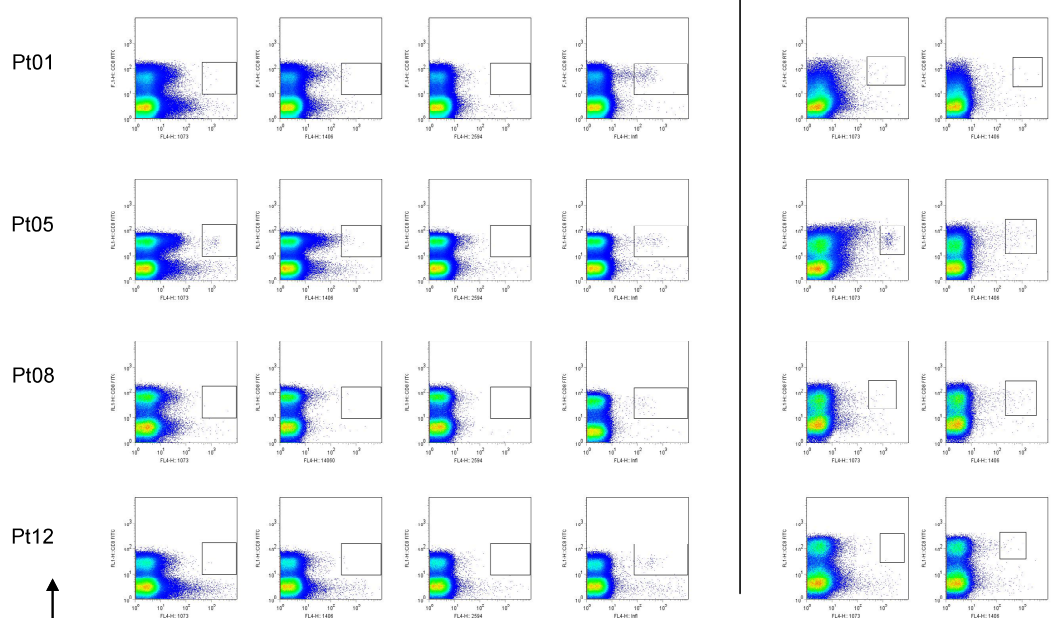
In Vitro



Genotyp 2a



Genotyp 3a



CD8 ↑
Tetr./Pent. →

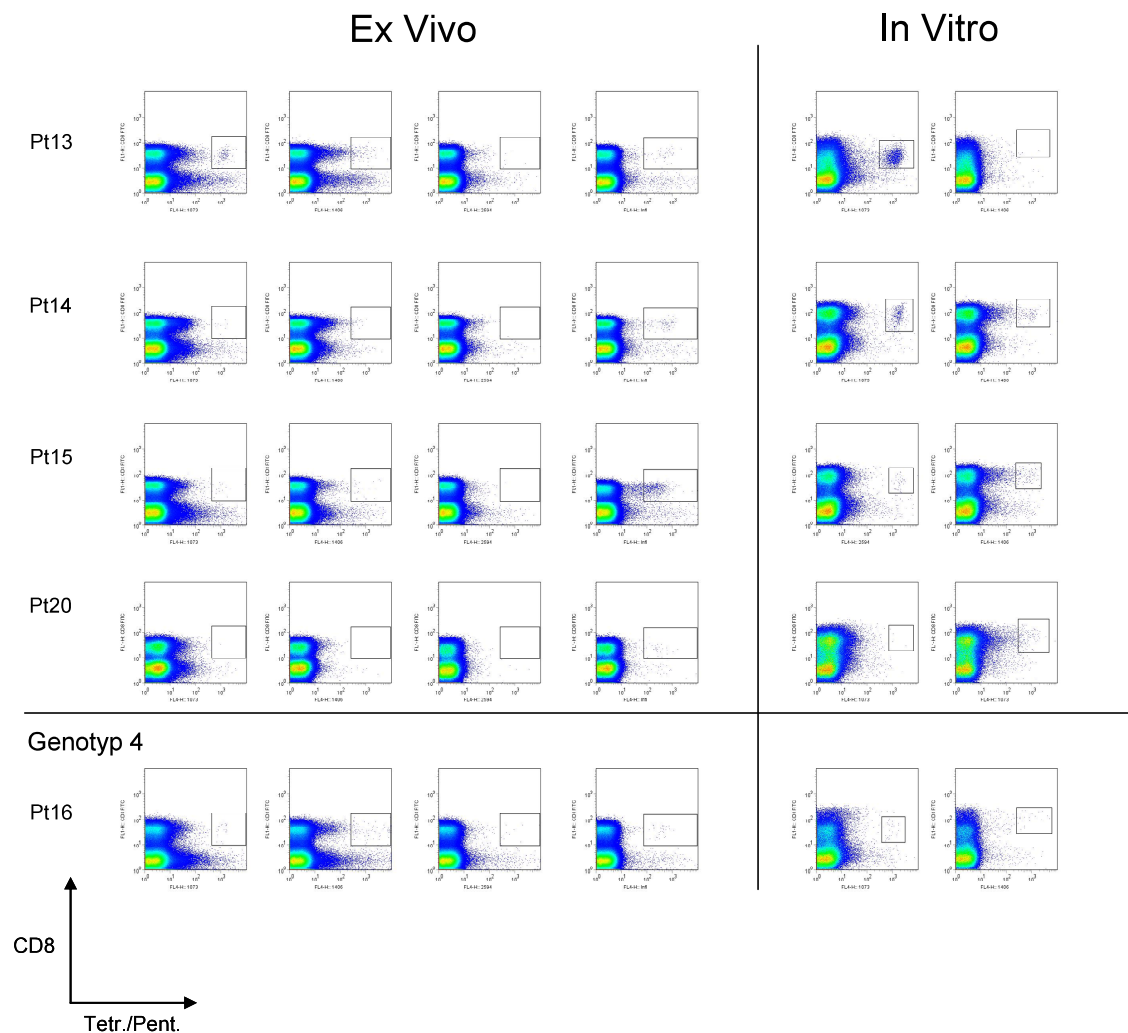


Abb. 3.11 Die Analyse HCV spezifischer Zellen von chronischen Hepatitis C Patienten. Die Proben wurden aufgetaut und die spezifischen Zellen mittels drei verschiedener Tetramere ex vivo bestimmt. Zusätzlich wurden Zellen in vitro durch Stimulation mit entsprechenden Peptiden expandiert und die spezifischen Zellen nach acht Tagen bestimmt. Die Patienten wurden nach Genotyp sortiert aufgelistet.

Um möglicherweise das Kollektiv an Spendern mit HCV spezifischen Zellen zu vergrößern, wurden - soweit vorhanden - Proben von Patienten unter Therapie aufgetaut, um sie wiederholt mit Tetrameren zu analysieren. Diesem Vorgehen lag die diskutierte Hypothese zu Grunde, dass die zelluläre Immunantwort unter Therapie zunimmt. Also wurden von insgesamt sechs Patienten (Pt 01, 07, 18-21) PBMC aus den Therapiewochen 2 bis 24 aufgetaut und mit den Tetrameren 1073 und 1406 untersucht. Allerdings war kein Unterschied zu der initialen Analyse feststellbar. Somit standen zuzüglich von Pt08, der aufgrund von zu wenig Probenmaterial nicht initial auf spezifische Zellen getestet werden konnte, für die longitudinale Analyse 13 Patienten zur Verfügung.

Alle Proben eines Patienten wurden gleichzeitig aufgetaut und analysiert. Obwohl bei zwölf Patienten in den Vortestungen HCV spezifische CTL nachgewiesen worden waren, war bei fünf Patienten die Anzahl an gemessenen Tetramer positiven Zellen zu anderen Zeitpunkten

so gering, dass eine Analyse nicht möglich war. Ebenso konnten bei Pt08 keine entsprechenden Zellen nachgewiesen werden, so dass insgesamt sieben Patienten (Pt02-05, 13, 17, 19) in die eigentliche Analyse einbezogen werden konnten.

Zunächst wurde untersucht, ob PD-1 auf Virus spezifischen Zellen stärker exprimiert wird. Dafür wurde die Expression auf diesen Zellen mit der auf allen CD8+ T Zellen dieser sieben Individuen und der vorher beschriebenen gesunden Kontrollgruppe verglichen (Abb. 3.12 A). Es wurde deutlich, dass der durchschnittliche Anteil PD-1+ Zellen höher war als bei den beiden anderen Gruppen. Eine direkte Abhängigkeit der Expression von der Viruslast konnte allerdings auch nicht bei den spezifischen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.12 B).

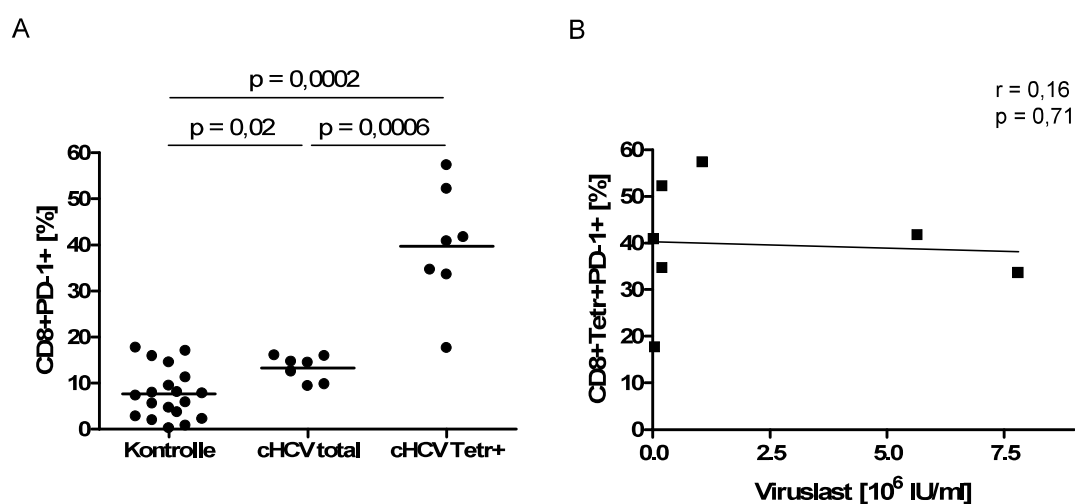


Abb. 3.12 A) Der Vergleich der PD-1 Expression auf CD8+ T Zellen von der gesunden Kontrollgruppe, auf CD8+ T Zellen der chronischen HCV Patienten, bei denen Tetramere nachgewiesen werden konnten, und auf den CD8+ HCV spezifischen T Zellen. B) Die Expression von PD-1 auf HCV spezifischen CD8+ T Zellen in Abhängigkeit von der Viruslast. Die statistischen Vergleiche wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests und die Abhängigkeit mit der Spearmen-Korrelation berechnet.

Die Auswertung der longitudinalen Analyse ergab, dass die Expression von PD-1 im Verlauf der Therapie relativ konstant bleibt (Abb. 3.13). Nur in zwei Patienten (Pt02, 05) war eine Abnahme zu erkennen. Generell war auch kein starker Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen zu erkennen. Nur bei GT1a Patienten schien die durchschnittliche Expression von PD-1 auf 1073 spezifischen Zellen bei über 50% zu liegen, während bei nicht-GT1 infizierten die Expression geringer war.

Somit scheint die antivirale Therapie im untersuchten Zeitraum keinen Einfluss auf die PD-1 Expression zu haben.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zusätzlich die PD-L1 mRNA mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Expression von PD-L1 mRNA bei Con1 im Vergleich zu Lunet Zellen erhöht war. Allerdings lagen keine signifikanten Unterschiede vor (Abb. 3.14 B). Somit bestätigt dieses Experiment die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse.

Im longitudinalen Verlauf nahm die durchschnittliche Expression bei beiden Zelllinien zu, obwohl auch bezogen auf den jeweiligen 0h-Wert der entsprechenden Zelllinie ein signifikanter Unterschied nicht nachzuweisen war.

Somit zeigten die Analysen, dass die viralen Proteine NS3, NS4 und NS5 keinen stimulierenden Einfluss auf die PD-L1 Expression der Huh7 Zellen haben.

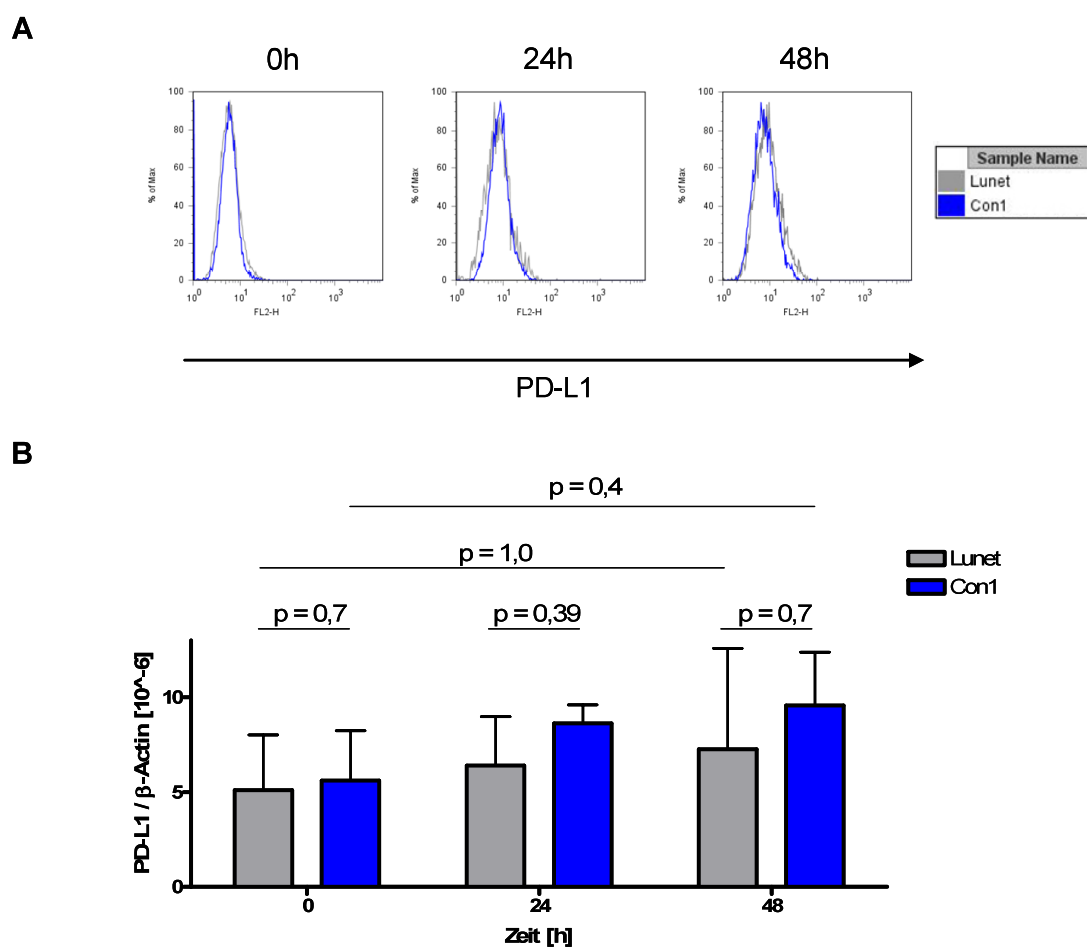


Abb. 3.14 Die Expression von A) PD-L1 Protein auf der Zelloberfläche und B) der PD-L1 mRNA in Lunet (grau) und Con1 (blau) Zellen. Die Zellen wurden ausplattiert, nach den angegebenen Zeitintervallen geerntet und die entsprechenden Analysen durchgeführt. Die statistischen Vergleiche wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

3.3.2. Effekt von IFN α auf die PD-L1 Expression

Es war also gezeigt worden, dass Zelllinien, die die HCV Proteine NS3, NS4 und NS5 produzieren, keine erhöhte PD-L1 Expression aufweisen. Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit IFN α einen Einfluss auf die Expression des Oberflächenproteins hat. Das Zytokin wird als Standardtherapeutikum in Kombination mit Ribavirin bei chronischen HCV Infektionen eingesetzt und könnte somit einen Einfluss auf die Immunantwort haben.

Für diese Analyse wurden wiederum Con1 und Lunet Zellen eingesetzt, um einen möglichen Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen beobachten zu können. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN α (10-1000 IU/ml) behandelt und die Expression des PD-L1 Proteins durchflusszytometrisch und der mRNA quantitativ mittels RT-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Beide Analysen zeigten, dass nur recht hohe IFN α Konzentrationen einen Einfluss hatten. Auf Lunet Zellen konnte eine Expression an der Zelloberfläche nur nach einer Behandlung mit 1000 IU/ml induziert werden. Dabei stieg die Expression nach sechs Stunden an, erreichte den Höhepunkt nach zwölf Stunden und nach 48 Stunden war kein Protein mehr nachzuweisen (Abb. 3.15 A). Der Verlauf bei den Con1 Zellen verlief ähnlich, wobei lediglich

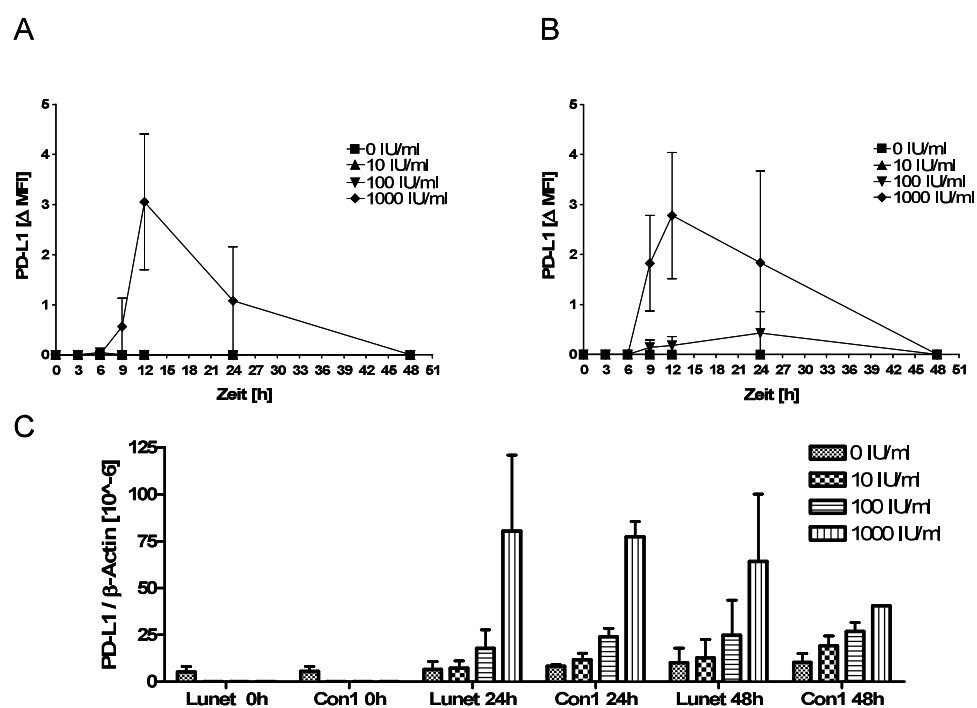


Abb. 3.15 Einfluss von IFN α Behandlung auf die Expression von PD-L1 auf Huh7 Zellen. Die Oberflächenexpression des Liganden ist in Form des Δ MFI auf A) Lunet und B) Con1 Zellen im longitudinalen Verlauf angegeben. C) Die Expression der PD-L1 mRNA ist im direkten Vergleich der Zelllinien zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

der Anstieg der Expression in den ersten 12 Stunden schneller verlief. Im Gegensatz zu Lunet Zellen konnte bei Con1 Zellen auch bei der Behandlung mit 100 IU/ml eine wenn auch geringe Steigerung der PD-L1 Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.15 B).

Die Analyse der mRNA lieferte ähnliche Ergebnisse wie die Durchflusszytometrie. Es war deutlich zu erkennen, dass bei beiden Zelllinien die Behandlung mit 1000 IU/ml IFN α den stärksten Effekt auf die Bildung der mRNA hatte (Abb. 3.15 C). Der Verlauf entsprach dem der Proteinexpression; nach 24 Stunden war die Produktion von mRNA am höchsten. Im Gegensatz zu der Proteinanalyse konnte mittels RT-PCR auch ein ähnlicher Effekt von 100 IU/ml IFN α auf beide Zelllinien nachgewiesen werden. Die im Vergleich zu 1000 IU/ml relativ geringe Menge an mRNA stieg sowohl bei Lunet als auch bei Con1 Zellen bis zum Zeitpunkt von 48h an. Beide Analysen zeigten also, dass durch IFN α eine Induktion von PD-L1 Expression möglich ist.

3.3.3. Effekt von IFN γ auf die PD-L1 Expression

IFN α zeigte einen stimulierenden Effekt auf die Expression von PD-L1. Konsequenterweise ergab sich die Frage, ob Interferon vom Typ 2, also IFN γ , einen ähnlichen Effekt auf Zellen hat. Im Gegensatz zu IFN α wird es nicht als Therapeutikum eingesetzt, es spielt aber bei der Vermittlung zellulärer Immunreaktionen eine entscheidende Rolle. Daher wurden die Analysen mit IFN γ als Stimulans wiederholt.

Die Ergebnisse zeigten, dass IFN γ im Vergleich zu IFN α um ein Vielfaches potenter war, die Expression von PD-L1 zu stimulieren (Abb. 3.16). Schon bei Behandlungen ab einer Konzentration von 10 IU/ml konnte PD-L1 auf den Zellen detektiert werden. Je nach Konzentration wurde PD-L1 nach drei oder sechs Stunden auf der Oberfläche exprimiert und die maximale Expression war nach 24 Stunden erreicht, gefolgt von einer leichten Abnahme bis zum Zeitpunkt von 48 Stunden. Der Vergleich der beiden Zelllinien ergab, dass die durchschnittliche Expression bei ähnlicher Kinetik auf Lunet Zellen höher war als auf den Con1 Zellen.

Die Analyse der PD-L1 mRNA bestätigte die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Die maximale Expression war nach 24 Stunden erreicht und nahm danach wieder ab. Konzentrationen ab 10 IU/ml induzierten die Bildung der mRNA, allerdings konnte ein Unterschied zwischen den Zelllinien in der mRNA Expression nicht nachgewiesen werden.

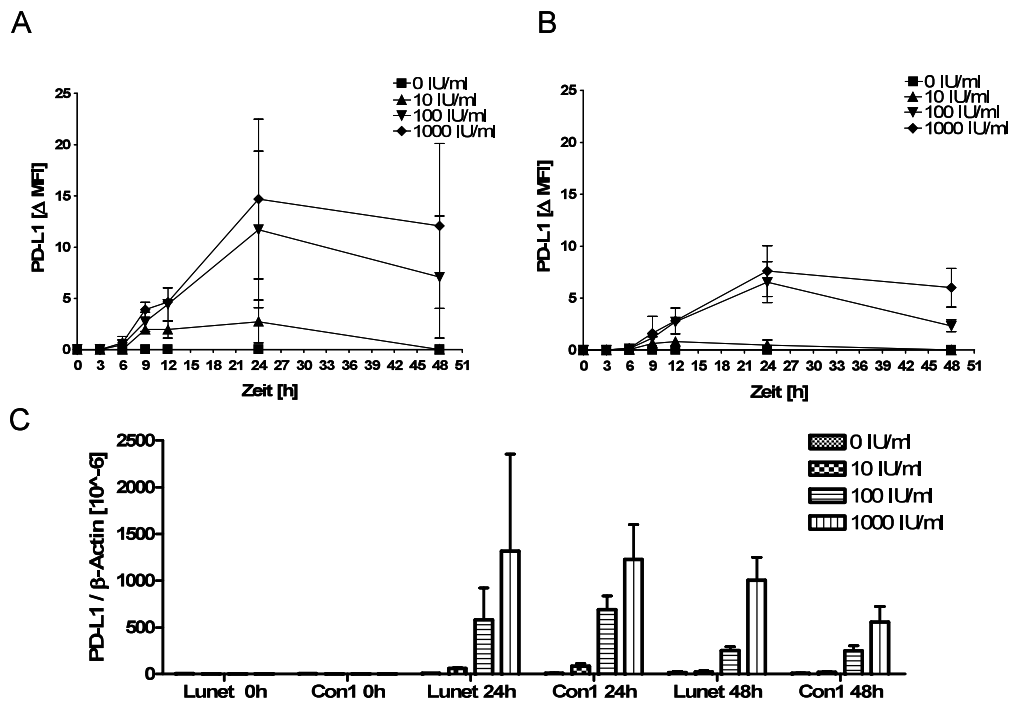


Abb. 3.16 Einfluss von IFN γ Behandlung auf die Expression von PD-L1 auf Huh7 Zellen. Die Oberflächenexpression des Liganden ist in Form des Δ MFI auf A) Lunet und B) Con1 Zellen im longitudinalen Verlauf angegeben. C) Die Expression der PD-L1 mRNA ist im direkten Vergleich der Zelllinien zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

3.3.4. Expression von PD-L1 mRNA im Lebergewebe

Im Zellkultursystem konnte eine erhöhte Bildung von PD-L1 in infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Um dieses Ergebnis ex vivo bestätigen zu können, wurden RNA Extrakte aus Lebern von vier HCV Patienten auf PD-L1 mRNA untersucht und mit Material von zwei nicht mit HCV infizierten Patienten verglichen. Zusätzlich wurde die mRNA von PD-L2 und der Interferon-stimulierten Gene (ISG) IP10 und MxA bestimmt.

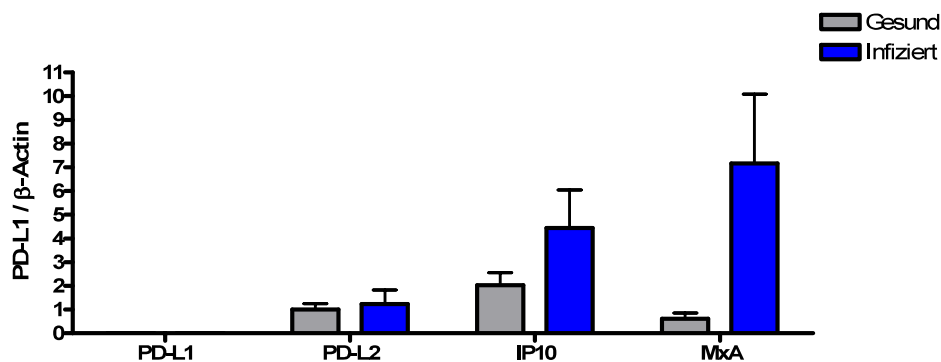


Abb. 3.17 Die Expression der mRNA von PD-L1, PD-L2 und der ISG IP10 und MxA in RNA Extrakten aus Lebergeweben HCV infizierter und nicht-infizierter Patienten.

Die Analyse zeigte, dass weder im gesunden noch im HCV infiziertem Lebermaterial PD-L1 mRNA nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.17). Im Gegensatz dazu war bei beiden Gruppen PD-L2 mRNA in gleicher Konzentration nachweisbar. Unterschiede waren dagegen bei der Analyse der ISG feststellbar. Sowohl IP10 als auch MxA wurde in infiziertem Gewebe in höherem Maße exprimiert.

3.4. Effekt der PD-1/PD-L1 Interaktion auf T Zellen

3.4.1. Induktion der PD-1 Expression auf Jurkat Zellen

In den letzten Teilen der Arbeit wurde der Effekt der Ligation von PD-1 auf T Zellen und PD-L1 der Hepatozyten untersucht. Durch die vorausgegangenen Versuche war bekannt, dass die Expression von PD-L1 auf den Huh7 Zellen durch Behandlung mit IFN γ gesteuert werden kann. In dem nächsten Schritt wurde getestet, inwieweit PD-1 auf T Zellen exprimiert wird und somit durch Stimulation reguliert werden kann. Aufgrund der einfacheren Handhabung von Zelllinien wurden die ersten Analysen nicht mit primären T Zellen, sondern mit der Jurkat T Zelllinie durchgeführt.

Da es sich bei PD-1 auch um einen Aktivierungsmarker handelt, wurden die Zellen mit der Kombination aus anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert und PD-1 nach bestimmten Zeitintervallen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.18).

Die maximale Expression des Proteins war bereits nach 24 Stunden erreicht. Um diesen schnellen Anstieg besser charakterisieren zu können, wurde der Versuch wiederholt und die Expression alle drei Stunden analysiert.

Dadurch wurde deutlich, dass bereits nach drei Stunden das Protein auf der Zelloberfläche nachweisbar ist. Der Höhepunkt der Expression war nach neun Stunden erreicht, danach reduzierte sich die Expression bis zwölf Stunden und darauf folgte ein weiter leichter Anstieg bis 24 Stunden nach Stimulationsbeginn.

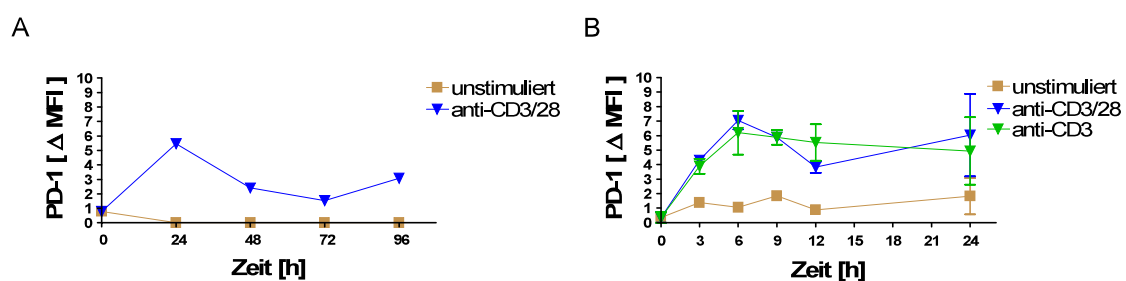


Abb. 3.18 Die Expression von PD-1 auf Jurkat Zellen innerhalb von A) 98 Stunden und B) 24 Stunden mit und ohne Aktivierung durch Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28.

Da für spätere Versuche die initiale Stimulation ohne Kostimulatoren durchgeführt werden sollte, wurden Zellen zusätzlich nur mit anti-CD3 behandelt. Die dadurch induzierte Expression von PD-1 verlief genauso wie in Anwesenheit von anti-CD28. Da durch diese Ergebnisse die maximale Expression von PD-1 nach Stimulation bekannt war, konnte in den folgenden Versuchen der Effekt von PD-L1 auf diese T Zellen analysiert werden.

3.4.2. Kultur PD-1 exprimierender Jurkat Zellen mit rekombinanter PD-L1/Fc Chimäre

Es wurde beschrieben, dass die Ligation von PD-1 und seinem Liganden einerseits in einer Anergie, aber andererseits auch in der Apoptose der T Zelle resultieren kann. Daher wurde untersucht, ob lösliches rekombinantes PD-L1 bei aktivierten Jurkat Zellen den Zelltod auslöst. Dazu wurden die Zellen mit anti-CD3 aktiviert und im Anschluss mit den Kostimulatoren anti-CD28 oder PD-L1 und zur Kontrolle mit anti-CD95 kokultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen entnommen und der Anteil an apoptotischen Zellen analysiert. Dazu wurde die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin analysiert, das auf sterbenden Zellen exprimiert wird. Um Zellen im frühen Stadium des Zelltods von toten Zellen differenzieren zu können, wurde 7AAD hinzugegeben, das bei bereits zerstörter Zellstruktur in die DNA interkalieren kann.

Während mit der Positivkontrolle anti-CD95, einem Antikörper, der über den Fas-Rezeptor Apoptose induziert, schon innerhalb der ersten drei Stunden kontrollierter Zelltod nachzuweisen war, blieb bei den restlichen Kulturen die Rate an apoptotischen Zellen relativ

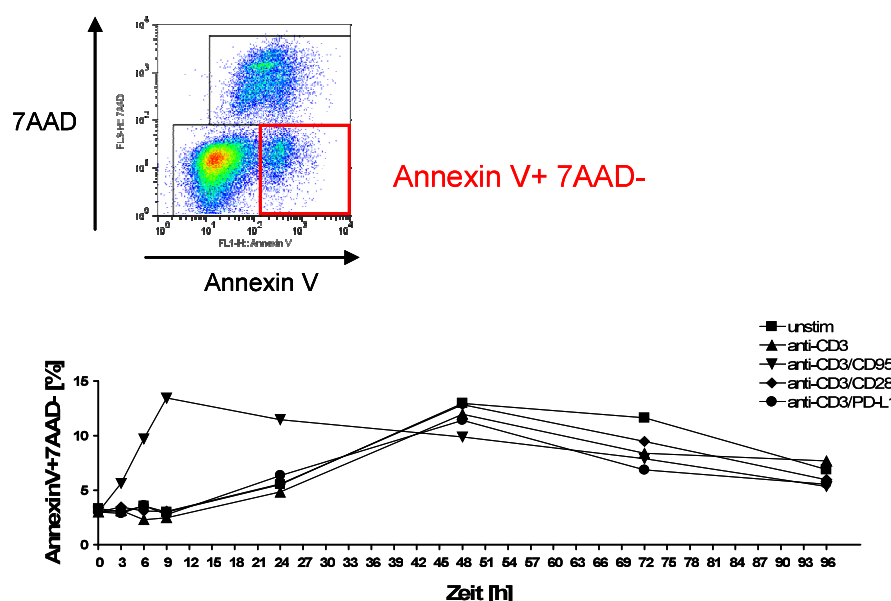


Abb. 3.19 Die Bindung von Annexin V an aktivierte Jurkat Zellen nach Kultivierung mit anti-CD95, anti-CD28 und PD-L1. Der Dot-plot zeigt die im Graphen wiedergegebene Population.

konstant (Abb. 3.19). Nach neun Stunden war mit anti-CD95 die maximale Apoptoserate erreicht, gefolgt von einer kontinuierlichen Abnahme. Bei den restlichen Proben nahm der Anteil an sterbenden Zellen ab diesem Zeitpunkt langsam zu und nach 48 Stunden wieder ab. Während des ganzen Verlaufs war nur ein marginaler Unterschied zwischen den verschiedenen Kostimulatoren und der Negativkontrolle festzustellen. Die Behandlung von Jurkat Zellen mit löslichem PD-L1 resultierte also nicht in der erhöhten Apoptose der Zellen.

3.4.3. Kokultur von Jurkat Zellen und PD-L1 exprimierenden Huh7 Zellen

Da eine Bindung des rekombinanten PD-L1 keine Apoptose in den Jurkat Zellen induzierte, wurde das Experiment mit PD-L1 exprimierenden Zellen wiederholt. Nach Induktion der PD-L1 Expression auf den Huh7 Zellen durch IFN γ Behandlung wurden mit anti-CD3 aktivierte und nicht aktivierte Jurkat Zellen zu den Hepatomazellen gegeben und die Apoptose in An- und Abwesenheit von anti-CD28 analysiert.

Die Ergebnisse des Versuches lieferten ähnliche Ergebnisse wie die Behandlung von PD-1 positiven Zellen mit rekombinatem PD-L1 (Abb. 3.20). Abgesehen von der Positivkontrolle mit anti-CD95 blieb die Menge an apoptotischen Zellen relativ konstant auf einem geringen Niveau, unabhängig von der Behandlung der beiden Zelllinien. Eine Ausnahme bildeten dabei die Jurkat Zellen, die ohne Aktivierung mit PD-L1 negativen Lunet Zellen kultiviert wurden. Bei diesen Zellen war nach drei Stunden eine geringe Abnahme, nach 24 Stunden allerdings der höchste prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen nachweisbar. Eine weitere Ausnahme bildeten die Jurkat Zellen, deren Behandlung mit anti-CD3 und anti-CD28 in einer leicht erhöhten Apoptoserate resultierte, obwohl in diesem Fall keine Behandlung der Lunet Zellen mit IFN γ erfolgt worden war und sie somit kein PD-L1 exprimierten.

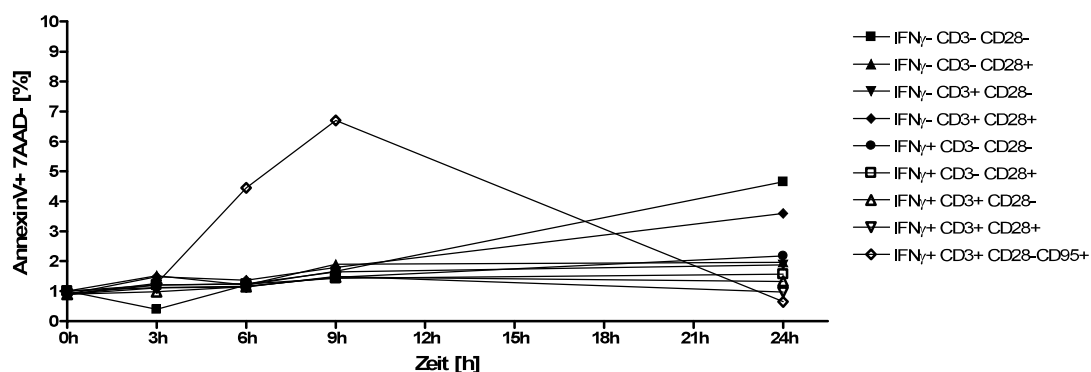


Abb. 3.20 Die Expression von Annexin V auf aktivierten Jurkat Zellen nach Kokultivierung mit Huh7 Zellen. Auf den Hepatomazellen war die PD-L1 Expression durch Behandlung mit IFN γ gesteuert worden, zusätzlich wurde in einige Kulturen anti-CD28 zugegeben.

Neben der Theorie der Apoptoseinduktion durch die Ligation von PD-1 und PD-L1 ist auch die Möglichkeit beschrieben worden, dass eine generelle Anergie der T Zellen daraus resultieren kann. Eine dafür entscheidende Rolle ist dem Zytokin IL-10 zugeschrieben worden. Daher wurde der Überstand der Zellkultur nach 24 Stunden gesammelt und mittels ELISA die Menge des Zytokins bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten auch in dieser Analyse keinen Unterschied zwischen den verschiedenen behandelten Zellen (Abb. 3.21). Die Menge an detektiertem IL-10 lag zwischen 140 und 160 pg/ml. Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationsarten waren nicht zu beobachten. Eine erhöhte IL-10 Sekretion nach Ligation von PD-1 und PD-L1 konnte somit in diesem in vitro Modell ausgeschlossen werden.

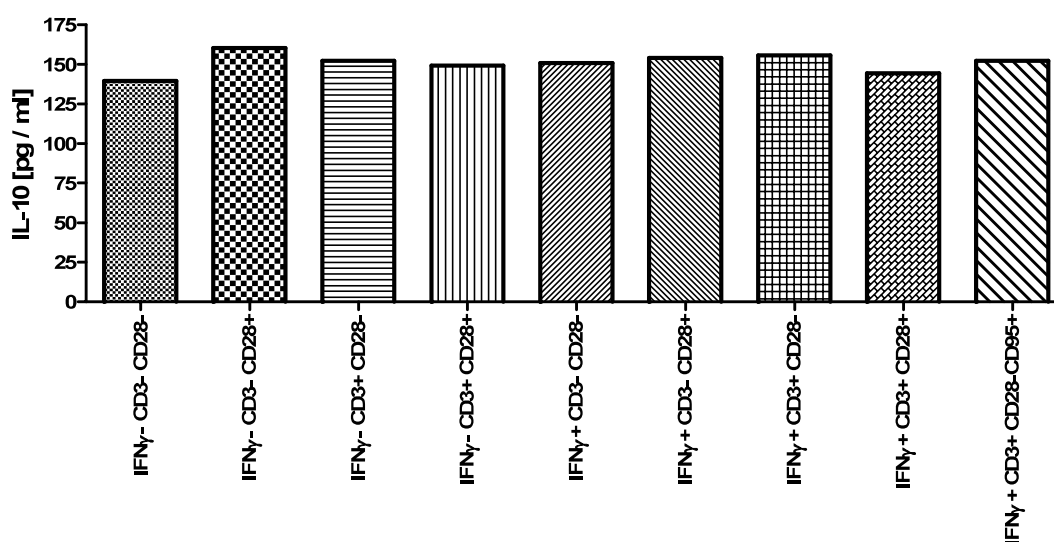


Abb. 3.21 Die IL-10 Produktion von Jurkat Zellen nach der 24 stündigen Kokultur mit Huh7 Zellen. Die PD-1 Expression auf Jurkat Zellen wurde durch Aktivierung mit anti-CD3 gesteuert, die PD-L1 Expression auf Huh7 Zellen mit IFN γ . Zusätzlich wurde der Kostimulator anti-CD28 zu einigen Kulturen gegeben und die IL-10 Konzentration mittels ELISA im Überstand bestimmt.

3.4.4. Kokultur von HCV spezifischen T Zellen und PD-L1 exprimierenden HLA-A2+ Con1 Zellen

In dem oben beschriebenen in vitro Modell konnte weder Apoptose noch IL-10 Sekretion als Modulator der Immunantwort nach PD-1/PD-L1-Ligation nachgewiesen werden. Allerdings wurde auch die Reaktion auf einer CD4+ T Zelllinie untersucht, die PD-1 Expression bei chronischen Virusinfektionen ist dagegen auf Virus spezifischen CTL beschrieben worden. Daher sollte der Effekt der Ligation auf CD8 T Zellen analysiert werden.

Für dieses Modell eigneten sich Huh7 Zellen, die ein entsprechendes HCV Epitop präsentieren. Daher wurden HLA-A2 exprimierende Hepatomazellen mit Con1 RNA stabil

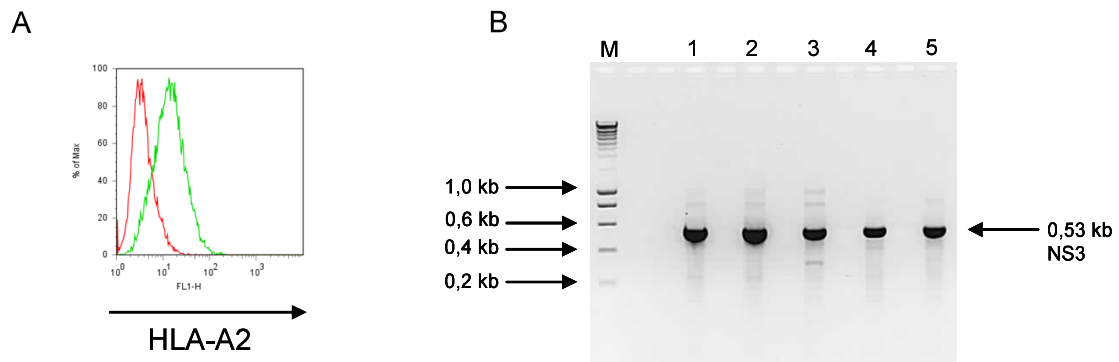


Abb. 3.22 Die Expression von HLA-A2 auf Huh7 Zellen (A). Die Zellen wurden geerntet und HLA-A2 im Durchflusszytometer bestimmt. Diese Zellen wurden stabil mit Con1 transfiziert und in insgesamt fünf verschiedenen Ansätzen NS3 mittels RT-PCR nachgewiesen (B).

transfiziert. In fünf verschiedenen Ansätzen konnte HCV NS3 mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 3.22).

Somit lag ein Modell für eine mit HCV infizierte Zelle vor, die HLA-A2 auf der Oberfläche exprimiert. Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob die Huh7 Zellen auch immundominante Antigene auf den HLA-A2 Molekülen präsentierten. Dazu wurden mit dem HCV Peptid 1073 expandierte CD8+ T Zellen mit den transfizierten Huh7 Zellen kokultiviert und die IFN γ Produktion in den CTL analysiert. Um auszuschließen, dass das HLA-A2 Molekül keine Peptide präsentieren kann, wurden zusätzlich nicht transfizierte HLA-A2+ Huh7 Zellen mit 1073 beladen und ebenfalls mit T Zellen kultiviert. Als Kontrolle wurden CTL mit Peptid

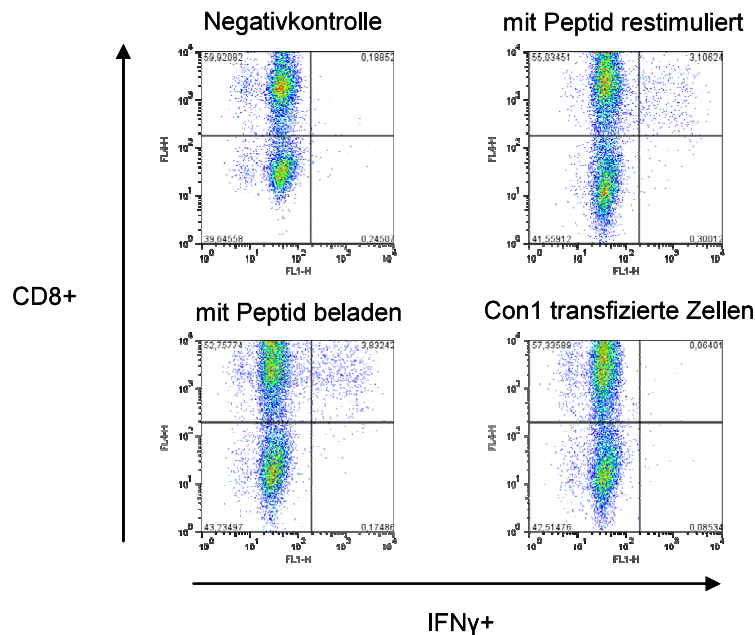


Abb. 3.23 Die IFN γ Produktion spezifischer CD8+ T Zellen. Mit dem Peptid 1073 expandierte CTL wurden zur Kontrolle mit 1073 restimuliert und die IFN γ Produktion gemessen. Zusätzlich wurden HLA-A2+ Huh7 Zellen mit dem Peptid beladen und wie die mit Con1 transfizierten Zellen mit den CTL kokultiviert. Das Zytokin wurde im Durchflusszytometer nachgewiesen.

restimuliert. Diese Kontrolle zeigte, dass durch das Peptid die IFN γ Produktion in 5,64% der CD8+ T Zellen stimuliert wurde (Abb. 3.23). Die Präsentation von 1073 durch Beladen des HLA-A2 Moleküls resultierte in einer Zytokinproduktion bei 7,26% der CD8+ T Zellen. In der Kokultur mit Con1 transfizierten Huh7 konnte allerdings keine Immunreaktion beobachtet werden. Daher zeigte die Analyse, dass mit Con1 transfizierte Huh7 Zellen das Peptid 1073 nicht über HLA-A2 auf der Oberfläche präsentieren.

4. Diskussion

4.1. Fraglicher HCV Befund

4.1.1. Analyse der humoralen Immunantwort bei Blutspendern mit fraglichem HCV Befund

Durch die Entdeckung des HCV 1989 bestand die Möglichkeit, geeignete diagnostische Methoden zu entwickeln und stetig zu verbessern. Heute beruht die HCV Diagnostik auf drei Testsystemen, die über den Nachweis von spezifischen Antikörpern und viraler RNA den Status eines jeweiligen Patienten meistens gut definieren können.

Die vorliegende Studie befasste sich dem gegenüber mit Blutspendern, die durch diese Testsystem nicht eindeutig einzuordnen waren, da die HCV Diagnostik weder positiv noch negativ und somit einen fraglichen Befund ergab. Bei diesen Spendern, die durchweg negativ auf HCV RNA getestet worden waren, konnten Antikörper gegen das Virus im Suchtest nachgewiesen werden. Die Bestätigung mittels Immunoblot fiel dagegen so schwach aus, dass die Kriterien der Hersteller keine eindeutig positive Aussage zuließen. Weil die Spender im Verlauf der letzten neun Jahre als fraglich diagnostiziert und dabei verschiedene Testsysteme eingesetzt worden waren, wurden im ersten Schritt dieser Studie die serologische Analyse der von den Spendern zu Verfügung gestellten Blutproben wiederholt.

Dabei wurde das Plasma im allgemeinen Suchtest auf Antikörper gegen HCV getestet. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu der initialen Testung nur noch bei 56% der Spender Antikörper detektierbar waren. Somit war bei fast der Hälfte keine Reaktion mehr zu beobachten. Für diese Beobachtung können zwei Gründe verantwortlich sein. Zum einen ist es möglich, dass der Wiederholungstest in der neueren Generation eine höhere Spezifität hat, wodurch die Anzahl an falsch positiven reaktiven Spendern kleiner ausfällt. Allerdings muss gerade der Suchtest statt einer hohen Spezifität in erster Linie eine hohe Sensitivität aufweisen, um die Rate an falsch negativen Ergebnissen zu minimieren. Und gerade eine höhere Sensitivität ist es, was die neuen Testsysteme gegenüber den älteren auszeichnet. Die Differenzierung, ob die aufgrund der hohen Sensitivität erlangten Ergebnisse falsch positiv sind oder tatsächlich spezifische Antikörper repräsentieren, wird mit dem spezifischeren Immunoblot durchgeführt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die moderneren Testsysteme für die seltenere Detektion von Antikörpern verantwortlich sind.

Der zweite mögliche Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der humoralen Immunantwort der Spender begründet gewesen sein. Es wurde in mehreren Arbeiten beschrieben, dass nach einer ausgeheilten Infektion mit HCV die Konzentration spezifischer

Antikörper über die Zeit abnimmt (Zibert et al., 1997; Takaki et al., 2000). Diese Ursache wird auch durch die Beobachtung in der vorliegenden Studie bestätigt, dass in Individuen, deren initialer reaktiver Befund innerhalb der letzten zwei Jahre durchgeführt wurde, häufiger spezifische Antikörper detektiert werden konnten als in Spendern, deren reaktiver Befund mehr als fünf Jahre zurücklag.

Diese Ergebnisse des Suchtests deuten darauf hin, dass bei einigen Spendern eine abgelaufene Infektion gefolgt von einer Abnahme des Antikörpertiters die schwache Antikörperreaktion verursacht hat.

Als Bestätigungstest ist in dieser Studie der recomBlot von Mikrogen eingesetzt worden. Bei diesem Test befinden sich fünf virale Proteine aufgetrennt auf Membranstreifen, die mit dem Serum von Spendern inkubiert. Antikörperreaktionen mit diesen Proteinen besitzen eine unterschiedliche Wertigkeiten und die Summe aus einem Punktesystem entscheidet über ein negatives, positives oder fragliches Ergebnis. Durch dieses Verfahren ist die Spezifität des Tests gegenüber dem Suchtest deutlich erhöht.

In 72% aller teilnehmenden Spender konnten Antikörperreaktionen ermittelt werden, unabhängig von den Ergebnissen des Suchtests, der nur bei 56% der Spender reaktiv ausfiel. Diese Diskrepanz war allerdings unerwartet, da der Immunoblot eigentlich eine geringere Sensitivität als der Suchtest aufweist. Die Tatsache, dass in 59% der Spender, die im Suchtest nicht reaktiv gewesen waren, im Immunoblot eine Antikörperreaktion detektiert werden konnte, eröffnet weitere Fragen zur Diagnostik. Denn in der Routine wird ein nichtreaktives Ergebnis des Suchtests ohne weitere Folgetests als anti-HCV negativ eingestuft. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass durch den Immunoblot Antikörper detektiert werden, die dem allgemeinen Suchtest entgehen und unterstreichen somit die Bedeutung des Immunoblot für den Nachweis einer abgelaufenen Infektion ist.

Da die meisten Spender initial mit dem Immunoblot von Innogenetics (Inno-Lia) getestet worden waren, bestand die Möglichkeit, dass es Unterschiede zwischen diesem Testsystem und dem eingesetzten recomBlot gibt. Um solche Unterschied ausschließen zu können, wurden die Plasmen zusätzlich mit dem Inno-Lia getestet.

Der Vergleich der beiden Immunoblots zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Detektion der Antikörper gegen Core, NS3 und NS4. Nur bei der Detektion von NS5 spezifischer Antikörper gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tests. Allerdings wurden Antikörper gegen NS5 relativ selten detektiert (8/72) und immer in Kombination mit Antikörpern gegen weitere Proteine. Daher wurde dieser Unterschied als vernachlässigbar angesehen.

4.1.2. Analyse der zellulären Immunantwort bei Blut Spendern mit fraglichem HCV Befund

Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, die Ursache für die schwach reaktiven serologischen Ergebnisse zu analysieren. Mögliche Ursachen könnten zum einen unspezifische Antikörperreaktionen in der Diagnostik sein, zum anderen aber auch zurückliegende, ausgeheilte Infektionen. Während die Analyse der humoralen Immunantwort auf ausgeheilte Infektionen hinwies, sollte über den Nachweis der zellulären Immunantwort diese Beobachtung bestätigt werden, weil spezifische T Zellen länger nachweisbar sind als Antikörper.

Es konnte gezeigt werden, dass bei 47% der Spender eine Proliferation der T Zellen nach Stimulation mit HCV Antigenen nachweisbar war. Dieses Ergebnis stimmt ungefähr mit den Resultaten einer Gruppe aus England überein, die gleichfalls die zelluläre Immunantwort bei entsprechenden Spendern in Form der IFN γ Produktion im ELISpot analysiert hat (Semmo et al., 2005). Allerdings lag ein entscheidender Unterschied vor. Die Gruppe konnte zeigen, dass die Zellen durch die Kultur mit überlappenden Peptidpools des Core Proteins stimuliert wurden. Dabei war vor allem die Region 50-100 aa immunogen, während die Stimulation mit den Proteinen NS3-NS5 nur geringe Immunantworten hervorriefen. Allerdings war aber in früheren Studien gezeigt worden, dass gerade diese Immunantworten mit einer Ausheilung einer akuten Infektion in Verbindung gebracht werden können (Diepolder et al., 1995; Gerlach et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Studie Immunantworten gegen die Proteine NS3, NS4 und - im geringeren Umfang - gegen Core nachgewiesen werden. Somit lag es näher, diese Antworten mit dem Status einer ausgeheilten Infektion in Verbindung zu bringen.

IFN γ Sekretion nach Proteinstimulation konnte nur bei sieben Spendern beobachtet werden. Diese relative geringe Anzahl korreliert wiederum mit den von Semmo et al. beschriebenen Beobachtungen. Allerdings zeigten alle sieben Spender auch eine starke Antwort im Proliferationstest. Daher scheint der ELISpot nicht die geeignete Methode zu sein, die zelluläre Immunantwort nach Stimulation mit HCV Proteinen zu analysieren. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Proliferationstest gegenüber dem ELISpot Vorteile bei der Analyse schwacher T Zell Antworten besitzt (Goodell et al., 2007).

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Analyse der IFN γ Sekretion im ELISpot nach HCV Proteinstimulation als zusätzliches Messverfahren zum Nachweis starker Immunantworten beiträgt, allerdings zur Analyse schwacher Antworten nicht überzeugende Ergebnisse liefert.

Der Vergleich der Ergebnisse, die aus den Analysen der zellulären und humoralen Immunantworten hervorgegangen waren, zeigte keine Korrelation der beiden Bereiche des

adaptiven Immunsystems. Unabhängig davon, wie die Konstellation der serologischen Testungen ausfiel (EIA/Immunoblot), lag der Anteil an Spendern mit detektierbarer Proliferation zwischen 42% und 71%. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass die Analyse der humoralen Immunantwort keinen sicheren Aufschluss über eine abgelaufene Infektion geben kann. Nur in einer Gruppe (EIA reakt./Immunoblot nichtreakt.) war bei keinem Spender eine zelluläre Immunantwort nachzuweisen. Daher ist es möglich, dass gerade diese Konstellation der serologischen Ergebnisse eine prädiktive Aussage besitzt und der fragliche Befund tatsächlich nur durch unspezifische Antikörperbindungen im EIA zu Stande gekommen ist. Allerdings zeigten nur sieben Individuen dieses Ergebnis und somit bleibt die Aussagekraft aufgrund der geringen Größe kontrovers.

Noch deutlicher zeigte die zeitabhängige Untersuchung der Immunantworten, dass keine Abhängigkeit bestand. Während der Nachweis reaktiver Antikörper über die Zeit abnahm, blieb der Anteil an Spendern mit nachweisbarer Proliferation relativ konstant. Eine tatsächliche Korrelation konnte nur bei Spendern beobachtet werden, die im EIA ein S/CO größer als vier hatten, denn bei diesen Personen war immer eine Proliferation von PBMC nachzuweisen.

Generell zeigt diese Studie, dass fragliche Befunde häufig auf eine abgelaufene Infektion mit HCV hinweisen. Zusätzlich zeigt sie die Überlegenheit der Analyse der zellulären Immunantwort gegenüber der Serologie für den Nachweis einer abgelaufenen HCV Infektion.

4.1.3. Die Möglichkeit einer okkulten HCV Infektion

Das Phänomen der okkulten HCV Infektion beschreibt den Nachweis von HCV RNA in Geweben oder Zellen, in Abwesenheit einer nachweisbaren Virämie im Serum. Es wurde gezeigt, dass bei dieser Art der Infektion sowohl in der Leber (Castillo et al., 2004) als auch in PBMC (Castillo et al., 2004; Carreno et al., 2006) virale RNA vorhanden ist. Da bei 52% der Patienten mit einer okkulten HCV Infektion ebenfalls nur eine schwache humorale Immunantwort und gleichzeitig HCV spezifische T Zellen nachweisbar waren (Quiroga et al., 2006), erschien es möglich, dass auch in der vorliegenden Studie nicht eine abgelaufene und komplett ausgeheilte Infektion sondern eine persistierende okkulte Hepatitis C die Ursache für den Nachweis der zellulären Immunantwort ist.

Wie oben erwähnt, kann eine okkulte Infektion über den Nachweis von HCV RNA in der Leber (83%) oder in PBMC (50%) identifiziert werden. Da für diese Studie kein Lebermaterial zur Verfügung stand, wurde die RNA aus PBMC von 22 Spendern isoliert, bei denen eine zelluläre Immunantwort nachweisbar gewesen war. Zusätzlich wurden Zellen von zwei Spendern in die Analyse mit einbezogen, deren Proliferationstests negativ ausgefallen waren.

Durch diese Methode konnte bei einem Spender entsprechende RNA in den PBMC nachgewiesen werden, was möglicherweise für eine okkulte Infektion spricht. Da allerdings bei allen anderen Spendern HCV RNA nicht nachweisbar war, scheint die okkulte HCV Infektion insgesamt selten zu sein und die Mehrzahl der fraglichen Befunde in dieser Studie auf eine tatsächlich ausgeheilte Infektion mit HCV hinzuweisen

4.2. PD-1

4.2.1. Expression von PD-1 auf T Zellen bei chronischer HCV Infektion

Der Rezeptor PD-1 aus der Familie der Immunglobuline G wird unter anderem auf aktivierten T Zellen exprimiert. Im Verlauf der letzten Jahre ist das Interesse an der Rolle dieses Rezeptors bei viralen Infektionen kontinuierlich gestiegen. Zunächst wurde im Tiermodell gezeigt, dass bei chronisch verlaufenden Infektionen PD-1 auf CD8+ T Zellen hochreguliert bleibt, während bei akuten selbst-limitierenden Infektionsverläufen die Expression wieder abnimmt (Barber et al., 2006). Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der T Zellanergie und der erhöhten Expression des Rezeptors nachgewiesen werden, so dass PD-1 als möglicher Marker für die häufig bei chronischen Virusinfektionen beobachtete T Zellerschöpfung galt. Es folgten weitere Arbeiten, die diese Korrelation zwischen PD-1 Expression und T Zelldysfunktion bei anderen Virusinfektionen wie SIV (Velu et al., 2007; Petrovas et al., 2007), CMV (Sester et al., 2008), HIV (Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006), HBV (Boni et al., 2007; Peng et al., 2008) und HCV (Urbani et al., 2006; Penna et al., 2007; Golden-Mason et al., 2007) bestätigen konnten. Zusätzlich konnte bei einigen Studien gezeigt werden, dass die Expression von PD-1 auf Virus spezifischen CD8 T Zellen mit der Viruslast korreliert (Day et al., 2006; Urbani et al., 2008).

Während einer Therapie mit IFN α und Ribavirin sinkt die Menge an HCV RNA häufig unter die Nachweisgrenze ab. Aufgrund dieser Tatsache und der vorher beschriebenen Korrelation aus Viruslast und PD-1 Expression ergab sich die Frage, ob unter Therapie parallel dazu auch die PD-1 Expression abnimmt. Die Folge wäre möglicherweise eine Wiederherstellung der Funktion spezifischer T Zellen und bietet damit einen Erklärungsansatz für die unzureichend verstandene Wirkung von IFN α .

Daher sollte eine mögliche Reduktion der PD-1 Expression im Verlauf der Therapie und mögliche Abhängigkeiten zur Viruslast oder Leberschädigung analysiert werden.

Im ersten Schritt wurde die PD-1 Expression auf allen CD4+ und CD8+ T Zellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Während bei beiden Gruppen PD-1+ Zellen nachgewiesen wurden, war die Expression bei den Patienten mit einer chronischen HCV Infektion signifikant erhöht. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von kürzlich

veröffentlichten Studien überein (Golden-Mason, 2007; Jeong et al., 2008). Es gibt allerdings auch eine Arbeit, die keine Erhöhung der PD-1 Expression auf CD8+ T Zellen chronisch infizierter HCV Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe belegen kann (Radziewicz et al., 2007). Allerdings ist das Patientenkollektiv in dieser Studie sehr klein, was eine mögliche Ursache für dieses abweichende Ergebnis sein kann. Denn gerade die Studie von Golden-Mason et al. (2007) oder von Day et al. (2006), die bei HIV Infektionen ebenso signifikante Unterschiede konnten, zeichnen sich durch große Patientenkollektive aus.

Die Analyse der HCV spezifischen T Zellen vor der Therapie zeigte, dass in dieser Population der durchschnittliche Anteil PD-1 exprimierender Zellen bei weitem höher ist als bei der Kontrollgruppe und auch bei der kompletten CD8+ T Zellpopulation der chronisch Infizierten. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen überein, die virusübergreifend auch von anderen Gruppen beschrieben wurden.

Allerdings konnte keine Korrelation zwischen der Menge an PD-1 positiven T Zellen und der entsprechenden Viruslast im Plasma nachgewiesen werden, weder mit den kompletten T Zellpopulationen noch mit den Virus spezifischen T Zellen. Also ergibt sich trotz der erhöhten Expression von PD-1 bei HCV infizierten Individuen kein Hinweis für eine direkte Abhängigkeit von der Viruslast im Blut obwohl die Fallzahl in dieser Studie möglicherweise für den Nachweis einer Korrelation nicht ausreicht. Das kann auch der Grund sein, warum sich diese Ergebnisse von kürzlich veröffentlichten Arbeiten unterscheiden, die eine Korrelationen zwischen der PD-1 Expression auf HCV spezifische CD8+ T Zellen und der Virämie zeigen konnten (Urbani et al., 2008). Alternativ kann die fehlende Korrelation auch durch eine Diskrepanz der Viruslast im Blut im Vergleich zur Leber als Ort der Infektion verursacht werden.

Zusammenfassend kann man aus den Analysen zu diesem Zeitpunkt nur schließen, dass offensichtlich die PD-1 Expression bei chronischen HCV Patienten erhöht ist, allerdings kein Zusammenhang mit der Viruslast zu bestehen scheint.

4.2.2. Longitudinale Analyse der PD-1 Expression auf T Zellen unter Therapie

Die longitudinale Analyse der PD-1 Expression auf allen T Zellen ergab, dass bei drei Patienten eine Abnahme auf CD4+ und CD8+ T Zellen zu beobachten war, während bei den übrigen die Expression konstant war oder sogar zunahm. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Verläufe könnte natürlich in dem Ansprechen der Patienten auf die Therapie begründet sein. Allerdings zeigte ein Vergleich der Virämien und Transaminasen, dass innerhalb der ersten zwölf Wochen bei allen Teilnehmern die Therapie erfolgreich verlief und somit ein Schluss von der erfolgreichen Therapie auf die reduzierte PD-1 Expression nicht möglich war. Ob aber die reduzierte Expression eine Vorhersage zum

dauerhaften Erfolg der Therapie ermöglicht, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden, da der Therapieerfolg erst sechs Monate nach Beendigung abschließend beurteilt werden kann.

Wie schon erwähnt konnte in jüngeren Studien dagegen eine Korrelation der PD-1 Expression auf HCV spezifischen CD8+ T Zellen und der Viruslast im Serum nachgewiesen werden. Da die Analyse der PD-1 Expression auf der Gesamtpopulation von CD4+ und CD8+ T Zellen im Verlauf einer Therapie keine klaren Ergebnisse geliefert hatte, wurde zusätzlich die gleiche Analyse mit HCV spezifischen CD8+ T Zellen durchgeführt.

Mit Ausnahme eines Patienten war der Anteil an spezifischen PD-1+CD8+ T Zellen über den Zeitraum der Therapie bis Woche 12 relativ konstant. Also liegt der Schluss nahe, dass eine HCV Therapie zumindest in der frühen Phase bis zum virologischen Therapieansprechen keinen Einfluss auf die Expression von PD-1 auf HCV spezifischen CD8+ T Zellen hat. Dieses Ergebnis deckt sich auf den ersten Blick nicht mit den Ergebnissen, die im Tiermodell bei einer akuten LCMV Infektion gezeigt wurden (Barber et al., 2006). In diesem Fall nimmt die Expression von PD-1 nach der Eliminierung des Virus wieder ab. Allerdings handelt es sich dabei um eine spontane Ausheilung und nicht - wie in diesem Fall - um eine Eradikation des Virus durch antivirale Therapie. Dies scheint von entscheidender Bedeutung für das Ausmaß der T Zelldysfunktion zu sein. Auch in der HIV Infektion zeigte sich, dass es erst nach mehr als zwei Jahren antiretroviraler Therapie zu einer graduellen Verbesserung der Funktion von HIV spezifischen T Zellen zusammen mit einer Abnahme der PD-1 Expression kam (Rehr et al., 2008). Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Zeitraum dieser Studie mit zwölf Wochen zu kurz war, um eine signifikante Abnahme der PD-1 Expression nachweisen zu können. Um diese Frage zu klären, müsste eine Studie die Patienten über den gesamten Zeitraum der Therapie und einer entsprechenden *follow-up* Zeit begleiten, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Allerdings hat eine aktuelle Studie auch gezeigt, dass eine spontane Ausheilung der Hepatitis C Infektion nicht unbedingt mit einer Abnahme von PD-1 auf HCV spezifischen T Zellen in der Peripherie verbunden sein muss (Kasprowicz et al., 2008). Darum müssen weitere Studien zeigen, wie sich die Expression von PD-1 sowohl nach selbstlimitierten als auch nach erfolgreich therapierten Infektionen auf spezifischen T Zellen entwickelt. Die Ergebnisse dieser Studie weisen jedoch darauf hin, dass möglicherweise eine Reduktion von PD-1 für eine erfolgreiche Therapie gar nicht notwendig ist.

Interessant war in der Untersuchung der HCV spezifischen CD8+ T Zellen die Beobachtung, dass bei Patienten mit einer Infektion mit einem nicht-Genotyp 1 Isolat spezifische T Zellen gegen eine Genotyp 1 Epitopsequenz detektiert werden konnten. Das Genotyp 1 Peptid in dem Tetramer 1073 unterscheidet sich in drei Aminosäuren von der Genotyp 2 oder Genotyp 3 Sequenz. Eine Kreuzreaktion von spezifischen T Zellen mit verschiedenen genotyp-

spezifischen Sequenzvarianten als Ursache kann zumindest für das Peptid 1073 ausgeschlossen werden, da in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt wurde, dass GT1a spezifische T Zellen keine GT2 und GT3 Sequenzen dieses Epitops erkennen (Fytili et al., 2008). Ein ähnliches Phänomen wurde bei der HCV Infektionen für CD4+ T Zellen schon früher beschrieben und weiter analysiert (Harcourt et al., 2003; Sugimoto et al., 2005; Schulze zur Wiesch et al., 2008). Dabei kam man zu der Schlussfolgerung, dass es sich am ehesten um eine spontan ausgeheilte Genotyp 1 Infektion handelt, an die sich eine chronisch verlaufende Re-Infektion mit einem nicht-Genotyp 1 angeschlossen hat. Für CD8+ T Zellen wurden ähnliche Beobachtungen in Einzelfällen beschrieben, aber nicht weiter analysiert (Lauer et al., 2002, 2004). Die Hälfte der nicht-GT1a Patienten in der vorliegenden Studie, bei denen GT1a spezifische T Zellen nachweisbar waren, sind drogenabhängig. Das Risikoprofil dieser Patientengruppe macht wiederholte Expositionen für HCV wahrscheinlich und kann so zumindest theoretisch multiple Infektionen ermöglichen.

Somit sprechen diese Ergebnisse für eine vorangegangene HCV Exposition und ausgeheilte HCV Infektionen in einigen Patienten. Allerdings bleibt die Frage, warum die Expression von PD-1 nicht der von T Zellen entspricht, die spezifisch für andere spontan ausgeheilte Virusinfektionen wie zum Beispiel Influenza sind. An dem Beispiel von HBV wurde entsprechend gezeigt, dass nach einer ausgeheilten Infektion die Expression von PD-1 auf ein Niveau der Influenza Kontrolle abnimmt (Boettler et al., 2006). Aber, wie oben schon angeführt handelt, es sich bei der vorliegenden Studie nicht um spontan ausgeheilte, sondern um behandelte Individuen, womit Unterschiede in der Immunologie der Patienten erklärt werden können. Die Re-Infektion vermag auch Einfluss auf HCV spezifische T Zellen haben, die nicht gegen das aktuell zirkulierende Virus gerichtet sind. Ähnlich werden bei der Analyse der zellulären Immunantwort bei ausgeheilten und erfolgreich behandelten Patienten werden Unterschiede deutlich. Während bei spontan ausgeheilten immer zelluläre Immunantworten detektiert werden können, bleibt es bei der Therapie immer noch umstritten, ob sie einen stimulierenden (Kamal et al., 2002) oder inhibierenden (Rahman et al., 2004) Einfluss auf die T Zellen hat.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Therapie von HCV mit IFN α und Ribavirin kurzfristig keinen Einfluss auf die PD-1 Expression auf Virus spezifischen CD8+ T Zellen innerhalb der ersten zwölf Wochen hat. Damit kann die Stärke der PD-1 Expression auch nicht als Prädiktionsmarker für mögliche Erfolge oder Misserfolge eingesetzt werden. Inwieweit der Verlauf der Expression zu späteren Zeitpunkten der Therapie oder sogar im *follow-up* einen Vorhersagewert besitzt, bleibt nachzuweisen.

4.3. PD-L1

4.3.1. Expression von PD-L1 auf Hepatozyten

PD-L1 und PD-L2 sind die beiden einzigen bisher bekannten Liganden von PD-1. Während PD-L2 nur auf der Oberfläche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird, ist die Bildung von PD-L1 sowohl auf aktivierten T und B Zellen und Makrophagen als auch auf vielen nichthämatopoetischen Zellen beschrieben worden. Unter anderem wurde auch die Expression des Liganden auf primären humanen Hepatozyten gezeigt (Mühlbauer et al., 2006). Zusätzlich konnte in der gleichen Arbeit gezeigt werden, dass HepG2 Zellen, die mit einem HBV Genom transfiziert wurden, eine erhöhte Expression von PD-L1 aufweisen. Die Autoren zogen daraus die Schlussfolgerung, dass es sich um einen Fluchtmechanismus des Virus handelt, durch den die T Zellen über die PD-1/PD-L1-Interaktion in eine Anergie getrieben werden.

Daher sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, inwieweit eine simulierte Infektion von Huh7 mit dem nichtstrukturellen Bereich von HCV einen ähnlichen Einfluss auf die Expression in Hepatomazelllinien hat.

Der Vergleich der PD-L1 Expression auf Lunet und den HCV-Replikon-tragenden Con1 Zellen zeigte, dass kein signifikanter Unterschied in der Expression des Proteins auf der Zelloberfläche zwischen den beiden Linien vorhanden war. Bezüglich der mRNA schien die Expression in den Con1 Zellen etwas erhöht zu sein, ein signifikanter Unterschied lag aber ebenfalls nicht vor.

Dieses Ergebnis überrascht zunächst, denn es war schon am Beispiel von dendritischen Zellen gezeigt worden, dass durch dsRNA über TLR3 die Expression von PD-L1 erhöht wird (Gröschel et al., 2008). Somit sollte bei den Con1 Zellen mehr PD-L1 nachweisbar sein. Allerdings sind auch die Möglichkeiten von HCV, in zelluläre Signalwege einzugreifen, umfangreich analysiert worden (Bode et al., 2007). Unter anderem kann NS3/4A durch spezifische proteolytische Spaltung von TRIF den TLR3 Transduktionsweg blockieren. Diese Tatsache würde erklären, warum die Con1 Zellen keine erhöhte Expression aufweisen. Einen Beweis, ob der Umfang der Blockade die Expression wirklich bis auf das Niveau der nicht infizierten Zellen reduziert, muss erst die Analyse des Transduktionswegs bei Con1 Zellen liefern.

Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass der Untersuchungszeitraum zu kurz war. Wie man bei der Analyse der mRNA erkennen kann, liegt ein Unterschied zwischen den Linien vor, auch wenn er nicht signifikant ist. Ein längeres Intervall könnte vielleicht größere Differenzen aufdecken, denn die Replikation der RNA steigt bis zum vierten Tag nach der Ausplattierung an (Pietschmann et al., 2001). Vielleicht könnte durch die beschriebene

Verlängerung der Analyse auch ein Unterschied auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Die Analyse humaner Leberproben zeigt aber auch, dass kein Unterschied in der Expression von PD-L1 bei HCV infizierten und nicht infizierten Patienten vorliegt. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass eine Differenzierung der Zelltypen bei dieser Analyse nicht erfolgte. Das erklärt auch, warum PD-L2 nachweisbar war, der nicht auf Hepatozyten sondern nur auch professionellen APC, in diesem Fall Kupffer- und Lebersinusoiden Endothelzellen, exprimiert wird (Mühlbauer et al., 2006; Oikawa et al., 2007).

Der Nachweis von IP10 und MxA zeigte, dass tatsächlich eine Entzündung in dem untersuchten Gewebe vorlag. Dennoch induziert sie nicht eine erhöhte Expression der Liganden.

4.3.2. Modulation der PD-L1 Expression durch Interferone

Interferone spielen eine wichtige Rolle bei der viralen Infektion. IFN α wird von vielen Zellen direkt nach dem Kontakt mit dem Virus gebildet. Dadurch wird die Expression von Proteinen induziert, die unter anderem einer erhöhte Degradierung von viraler RNA und eine Inhibition der Translation zur Folge haben (Janeway, 6. Auflage). IFN γ wird dagegen nur von einigen Immunzellen, unter anderem auch von T Zellen, gebildet und eine Funktion liegt in der Koordination der zellulären Immunantwort (Schroder et al., 2004).

Sowohl wegen dieser physiologischen Eigenschaften als auch wegen der therapeutischen Bedeutung von IFN α bei HCV Infektionen sollte analysiert werden, welchen Effekt eine Behandlung mit Interferonen auf die Expression von PD-L1 hat und ob virale Proteine Einfluss darauf nehmen können.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung von Huh7 Zellen mit diesen Zytokinen die Expression von PD-L1 induziert wird. Während IFN α allerdings erst in recht hohen Konzentrationen eine relativ moderate Expression induzierte, war der Effekt von IFN γ um ein Vielfaches stärker. Dieser Effekt war schon früher auf anderen Zellen gezeigt worden (Eppihimer et al., 2002; Mühlbauer et al., 2006; Wackerle-Men et al., 2007), und auch erste Versuche zur Klärung des genauen Signaltransduktionswegs wurden bereits veröffentlicht (Liu et al., 2007). Ein Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen, wie er bei HBV infizierten HepG2 Zellen nachgewiesen worden war (Mühlbauer et al., 2006), konnte allerdings für HCV infizierte Zellen in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse sind zum einen im Hinblick auf die IFN α Therapie interessant, denn es würde bedeuten, dass durch eine Therapie in der Leber eine erhöhte Expression von PD-L1 verursacht wird. In Kombination mit der erhöhten Expression von PD-1 auf HCV spezifischen T Zellen, die durch eine Therapie nicht moduliert wird, würde es zu einer verstärkten

Inhibition der zellulären Immunantwort kommen. Danach erscheint ein Beitrag der HCV spezifischen T Zellen zu einer erfolgreichen Therapie sehr unwahrscheinlich. Allerdings ist die Expression des Liganden im Vergleich zur IFN γ induzierten Expression relativ gering und die notwendigen Konzentrationen so hoch, so dass es fraglich erscheint, ob in der in vivo eingesetzten Dosierung von IFN α das Ausmaß der erhöhten Oberflächenexpression von PD-L1 einen inhibierenden Effekt auf die T Zellantwort hat.

Die starke Wirkung von IFN γ auf die PD-L1 Expression unterstreicht die Rolle des Zytokins bei der adaptiven Immunantwort. Denn viele Studien haben durch die Blockade der PD-1-PD-L1 Interaktion eine inhibierende Funktion auf T Zellen nachgewiesen (Nishimura et al., 1999; Dong et al., 2004; Keir et al., 2006). Somit könnte die erhöhte Expression des Liganden bei Anwesenheit von IFN γ eine überschießende T Zellantwort unterdrücken und somit größere Gewebeschäden vermeiden. Eine solche Situation konnte im Tiermodell dargestellt werden. PD-1 *knock-out* Mäuse, die mit Adenovirus infiziert worden waren, heilten schneller aus, entwickelten aber schwere hepatozelluläre Schäden verglichen mit den Mäusen vom Wildtyp (Iwai et al., 2003).

Allerdings gibt es auch Studien, die einen stimulatorischen Effekt von PD-L1 nachweisen konnten (Dong et al., 1999; Subudhi et al., 2004). Vor allem eine Arbeit zeigte eine Stimulation von naiven CD8 T Zellen durch PD-L1 exprimierende Hepatozyten, während Effektorzellen inhibiert wurden (Wahl et al., 2008). In Anbetracht dieser Ergebnisse würde die Modulation der PD-L1 Expression durch Interferone doch zu einer verstärkten und auch regulierten CD8+ T Zellantwort beitragen. Welche Effekt wirklich in vivo eintritt, muss sicherlich mit weiteren Studien untersucht werden.

Die Tatsache, dass kein Unterschied zwischen HCV infizierten und naiven Zellen hinsichtlich der PD-L1 Expression gezeigt werden konnte, lässt vermuten, dass die HCV Proteine keinen oder nur sehr geringen Einfluss auf die Regulierung der PD-L1 Expression haben. In früheren Studien ist vor allem der inhibierende Einfluss von HCV Proteinen auf den IFN α induzierten JAK-STAT Signaltransduktionsweg nachgewiesen worden (Bode et al., 2007). Bezüglich der hemmenden Interaktion bei dem IFN γ Regulationsweg liegen keine genauen Daten vor. Aber aufgrund der Tatsache, dass beide Interferone über JAK und STAT agieren, liegt ein hemmender Effekt in beiden Fällen nahe. Allerdings zeigen diese Arbeiten auch, dass gerade das Core Protein die Aktivierung von STAT1 (Bode et al., 2003; Lin et al., 2006) oder die Bindung von ISGF3 an die ISRE behindert (de Lucas et al., 2004). Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten Model handelte es sich allerdings um ein subgenomisches Replikon, das nur die Nichtstrukturproteine von HCV beinhaltet und nicht das Core Protein exprimiert. Diese Tatsache kann natürlich auch begründen, warum kein inhibierender Effekt der viralen Proteine zu beobachten war. Als Konsequenz müsste diese Analyse mit Huh7

Zellen wiederholt durchgeführt werden, die das komplette HCV Genom enthalten, was allerdings ein Labor der Sicherheitsstufe drei voraussetzt.

4.3.3. Effekt der PD-1/PD-L1 Interaktion auf T Zellen

Der Effekt der Ligation von PD-1 und PD-L1 ist unterschiedlich beschrieben worden. Während ursprünglich die Apoptose der T Zellen als Konsequenz beschrieben wurde und einige Studien entsprechende Ergebnisse präsentierten (Dong et al., 1999/2002; Mühlbauer et al., 2006; Petrovas et al., 2007), deuteten andere Arbeiten eher auf eine generelle Anergie der T Zellen hin (Latchman et al., 2001).

Um diese Frage genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Ansätzen der Effekt der Ligation auf Jurkat T Zellen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass keine erhöhte Apoptose bei PD-1 exprimierenden T Zellen nachzuweisen war. Somit ist das Ergebnis konkordant mit der mehrheitlichen Meinung, dass die Ligation von PD-1 und PD-L1 in einer Anergie der Zelle und nicht in Apoptose resultiert.

Allerdings kann man auch diskutieren, ob man von dem in der Arbeit genutzten Modell uneingeschränkt Rückschlüsse auf physiologische Prozesse ziehen kann. Denn zum einen handelt es sich um eine T Zelllinie, die im Vergleich zu primären T Zellen unterschiedlich reagieren kann. Des Weiteren wurde mit dem Modell die reine Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 simuliert. Die Einflussnahme des TCR auf der einen und der Antigenpräsentation auf der anderen Seite wurden dabei nicht mit einbezogen. Demgegenüber sind die Studien, die einen apoptotischen Effekt auf CD8+ T Zellen zeigen konnten, mit antigenspezifischen T Zellen durchgeführt worden, die mit dem entsprechenden Epitop auf PD-L1 exprimierenden Zellen reagierten (Dong et al., 2002). Somit besteht die Möglichkeit, dass dem artifiziellen System entscheidende Faktoren in Form von Rezeptoren fehlten, um ein entsprechendes Ergebnis zu reproduzieren.

Um das System zu optimieren, wurden HLA-A2 exprimierende Huh7 Zellen mit Con1 transfiziert, um eine Präsentation von HCV Peptiden zu gewährleisten. Allerdings konnte eine Präsentation des Epitops 1073 auf den Zellen nicht nachgewiesen werden. Der Grund dafür kann an der Prozessierung von Proteinen in den Huh7 Zellen gelegen haben. Es wurde gezeigt, dass die Sequenz der Konstruktes entscheidend dafür ist, wie ein Peptid prozessiert und folglich präsentiert wird (Seifert et al., 2004).

Somit könnte eine genaue Analyse der Con1 Sequenz Aufschluss über mögliche Mutationen bringen, die die Prozessierung und Antigenpräsentation beeinflussen könnten. Die Konsequenz wäre die Transformation von Huh7 Zellen mit modifizierten Con1 Konstrukten, die eine effiziente Prozessierung und Präsentation des Peptids zu garantieren. Mit einem solchen Modell könnte man durch IFN γ die PD-L1 Expression auf den Hepatozyten

regulieren und mit spezifischen T Zellen kokultivieren. Folglich hätte man ein geeignetes in vitro System zur Funktionsanalyse des Korezeptoren PD-1.

5. Zusammenfassung

Hepatitis C ist eine der Viren, die in hohem Maße persistierende Infektionen verursachen. In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte der zellulären Immunantwort bei HCV Infektionen bearbeitet. Im ersten Teil wurde die HCV spezifische, zelluläre Immunantwort nach abgelaufener Infektion in Bezug zu der humoralen Immunantwort untersucht, um unspezifischen Reaktionen im diagnostischen Suchtest auszuschließen. Im zweiten Teil wurden die Expression und die Funktion des Rezeptors PD-1 auf T Zellen und PD-L1 auf Hepatozyten bei chronischen HCV Infektionen analysiert.

Obwohl die Diagnostik für HCV seit der Entdeckung des Virus stetig verbessert wurde, kommt es bei einigen Individuen immer noch zu serologischen Befunden, aus denen nicht eindeutig hervorgeht, ob sie in der Vergangenheit mit HCV infiziert waren. Die Tatsache, dass diese Ergebnisse zu persönlichen und sozialen Konsequenzen haben können und zum anderen bis zum Verlust der Arbeitsstelle bei einigen Berufsgruppen führen kann, zeigt, wie notwendig die Klärung solcher fraglichen HCV Befunde ist. Mit Blutproben von Blut Spendern, die einen fraglichen anti-HCV Befund hatten, wurde sowohl die humorale Immunantwort in Form von Antikörpertestungen als auch die zelluläre Immunantwort in Form von Proliferation und IFN γ Produktion getestet. Die Analyse der HCV spezifischen Antikörper ergab gravierende Unterschiede zu den initialen Befunden. Während ursprünglich alle im Suchtest als reaktiv getestet wurden und im Immunoblot eine schwache Reaktion zu detektieren war, waren die Ergebnisse bei den Nachtestungen entweder eindeutig negativ, fraglich oder eindeutig positiv, wobei generell eine Abnahme der Antikörperkonzentration zu beobachten war. Die Analyse der zellulären Immunantwort zeigte jedoch, dass bei fast 50% der Spender HCV spezifische CD4 $^{+}$ T Zellen nachzuweisen sind. Somit kann man bei diesen Spendern davon ausgehen, dass sie eine selbstlimitierende HCV Infektion durchgemacht haben und spontan ausgeheilt sind. Im Umkehrschluss kann auch festgehalten werden, dass bei den anderen Spendern die serologischen Ergebnisse aufgrund einer Kreuzreaktion von Antikörpern mit HCV Proteinen zu Stande gekommen sind und somit eine abgelaufene HCV Infektion eher unwahrscheinlich ist. Da keine Korrelation zwischen den Ergebnissen der zellulären und humoralen Analysen vorliegt, zeigt diese Studie, dass durch serologische Tests eine lang zurückliegende ausgeheilte Infektion nicht nachgewiesen werden kann. Die Analyse der T Zellantwort dagegen ist eine geeignete Alternative, um eventuell früher abgelaufene Infektionen zu bestätigen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit bei chronischen HCV Infektion der Rezeptor PD-1 und der Liganden PD-L1 exprimiert werden und wie die

Interaktion die Funktion der T Zellen beeinflussen. In früheren Studien war gezeigt worden, dass die Expression des Rezeptors auf Virus spezifischen T Zellen und des Liganden auf infizierten Wirtszellen bei chronischen viralen Infektionen erhöht ist. Die Bindung des Liganden an PD-1 ist mit einem Funktionsverlust der Effektorzellen assoziiert. Dadurch kann das Virus der zellulären Immunantwort entgehen und möglicherweise den chronischen Verlauf begünstigen. Weitere Studien belegten, dass durch antivirale Therapie die PD-1 Expression auf T Zellen reduziert wird.

In dieser Studie wurde die Expression von PD-1 auf T Zellen im Verlauf der antiviralen Therapie mit IFN bei chronischen Hepatitis C Patienten analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von PD-1 sowohl auf den gesamten CD4+ als auch auf den gesamten CD8+ T Zellen bei chronisch infizierten Patienten im Vergleich zu nicht infizierten Personen erhöht ist. Jedoch nimmt eine antivirale Therapie in dem hier beobachteten Zeitraum keinen Einfluss auf die PD-1 Expression. In einem weiteren Ansatz wurde die Expression von PD-1 auf HCV spezifischen T Zellen untersucht. Bei sieben von 22 Patienten konnten spezifische Zellen nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Expression von PD-1 war signifikant höher als in den anderen Populationen. Dennoch wurde auch der Anteil an PD-1 positiven HCV spezifischen T Zellen durch die Therapie nicht beeinflusst.

Bei in vitro Versuchen zur PD-L1 Expression auf Huh7 Zellen zeigten naive und HCV replizierende Zellen keinen großen Unterschied. Von daher scheinen zumindest die nichtstrukturellen Proteine des HCV keinen Einfluss auf die Expression von PD-L1 zu nehmen. Die erhöhte Bildung des Liganden nach der Behandlung mit IFN γ spricht für das Konzept, dass die Bildung von PD-L1 einem übermäßigen Gewebeschaden durch Herunterregulierung der T Zellfunktion vorbeugt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die ersten zwölf Wochen einer IFN Therapie keinen Einfluss auf die Expression von PD-1 auf spezifischen T Zellen haben. Daher scheint eine unterstützende Wirkung des IFN α auf die zelluläre Immunantwort über die Modulation von PD-L1 fraglich zu sein. Vor allem auch aufgrund der Tatsache, dass das IFN die Expression des entsprechenden Liganden auf Hepatozyten noch erhöht.

Daher ist die PD-1 Expression auf T Zellen in den ersten zwölf Wochen der Therapie kein prädiktiver Faktor für eine erfolgreiche Therapie. Inwieweit möglicherweise eine Reduktion des Rezeptors im späteren Verlauf der Behandlung eintritt, muss durch weitere Studien geklärt werden.

6. Literatur

Abe, K., Inchauspe, G., Shikata, T., Prince, A. M. 1992. Three different patterns of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 15:690-695.

Accapezzato, D., Francavilla, V., Paroli, M., Casciaro, M., Chircu, L. V., Cividini, A., Abrignani, S., Mondelli, M. U., Barnaba, V. 2004. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 113:963-972.

Alter, M. J. 2002. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 36:S93-98.

Appel, N., Schaller, T., Penin, F., Bartenschlager, R. 2006. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem* 281:9833-9836.

Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., Jacobsen, H. 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 68:5045-5055.

Bartenschlager, R., Frese, M., Pietschmann, T. 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63:71-180.

Bartenschlager, R., Lohmann, V. 2000. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81:1631-1648.

Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J. C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., Cosset, F. L., Purcell, R. H. 2003. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14199-14204.

Bartosch, B., Dubuisson, J., Cosset, F. L. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197:633-642.

Beach, M. J., Meeks, E. L., Mimms, L. T., Vallari, D., DuCharme, L., Spelbring, J., Taskar, S., Schleicher, J. B., Krawczynski, K., Bradley, D. W. 1992. Temporal relationships of hepatitis C virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzees. *J Med Virol* 36:226-237.

Bigger, C. B., Brasky, K. M., Lanford, R. E. 2001. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 75:7059-7066.

Billerbeck, E., Bottler, T., Thimme, R. 2007. Regulatory T cells in viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 13:4858-4864.

Blight, K. J., Kolykhalov, A. A., Rice, C. M. 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290:1972-1974.

Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J., Rice, C. M. 2003. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 77:3181-3190.

Blight, K. J., McKeating, J. A., Rice, C. M. 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76:13001-13014.

Bode, J. G., Brenndorfer, E. D., Haussinger, D. 2007. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. *Arch Biochem Biophys* 462:254-265.

- Bode, J. G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P. C., Haussinger, D. 2003. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *Faseb J* 17:488-490.
- Boettler, T., Panther, E., Bengsch, B., Nazarova, N., Spangenberg, H. C., Blum, H. E., Thimme, R. 2006. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 80:3532-3540.
- Boettler, T., Spangenberg, H. C., Neumann-Haefelin, C., Panther, E., Urbani, S., Ferrari, C., Blum, H. E., von Weizsacker, F., Thimme, R. 2005. 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.
- Boni, C., Fiscaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Di Vincenzo, P., Giuberti, T., Laccabue, D., Zerbini, A., Cavalli, A., Missale, G., Bertoletti, A., Ferrari, C. 2007. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 81:4215-4225.
- Bowen, D. G., Shoukry, N. H., Grakoui, A., Fuller, M. J., Cawthon, A. G., Dong, C., Hasselschwert, D. L., Brasky, K. M., Freeman, G. J., Seth, N. P., Wucherpennig, K. W., Houghton, M., Walker, C. M. 2008. Variable patterns of programmed death-1 expression on fully functional memory T cells after spontaneous resolution of hepatitis C virus infection. *J Virol* 82:5109-5114.
- Branch, A. D., Stump, D. D., Gutierrez, J. A., Eng, F., Walewski, J. L. 2005. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 25:105-117.
- Burton, D. R. 2002. Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* 2:706-713.
- Carreno, V. 2006. Occult hepatitis C virus infection: a new form of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 12:6922-6925.
- Castillo, I., Pardo, M., Bartolome, J., Ortiz-Movilla, N., Rodriguez-Inigo, E., de Lucas, S., Salas, C., Jimenez-Heffernan, J. A., Perez-Mota, A., Graus, J., Lopez-Alcorocho, J. M., Carreno, V. 2004. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis* 189:7-14.
- Chang, K. M., Rehemann, B., McHutchison, J. G., Pasquinelli, C., Southwood, S., Sette, A., Chisari, F. V. 1997. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J Clin Invest* 100:2376-2385.
- Chaudhary, R. K., MacLean, C. 1991. Evaluation of first- and second-generation RIBA kits for detection of antibody to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 29:2329-2330.
- Cheng, J. C., Chang, M. F., Chang, S. C. 1999. Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J Virol* 73:7044-7049.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K., Kuo, C., et al. 1994. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1294-1298.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., Houghton, M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.

- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., Houghton, M., Parham, P., Walker, C. M. 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10:439-449.
- Cox, A. L., Mosbruger, T., Lauer, G. M., Pardoll, D., Thomas, D. L., Ray, S. C. 2005. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* 42:104-112.
- Cox, A. L., Mosbruger, T., Mao, Q., Liu, Z., Wang, X. H., Yang, H. C., Sidney, J., Sette, A., Pardoll, D., Thomas, D. L., Ray, S. C. 2005. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 201:1741-1752.
- Crispe, I. N. 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3:51-62.
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E. J., Coovadia, H. M., Goulder, P. J., Klenerman, P., Ahmed, R., Freeman, G. J., Walker, B. D. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354.
- Day, C. L., Lauer, G. M., Robbins, G. K., McGovern, B., Wurcel, A. G., Gandhi, R. T., Chung, R. T., Walker, B. D. 2002. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 76:12584-12595.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., Dubuisson, J. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 71:697-704.
- Di Bisceglie, A. M., Hoofnagle, J. H. 2002. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* 36:S121-127.
- Diepolder, H. M., Zachoval, R., Hoffmann, R. M., Wierenga, E. A., Santantonio, T., Jung, M. C., Eichenlaub, D., Pape, G. R. 1995. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 346:1006-1007.
- Dittmann, S., Roggendorf, M., Durkop, J., Wiese, M., Lorbeer, B., Deinhardt, F. 1991. Long-term persistence of hepatitis C virus antibodies in a single source outbreak. *J Hepatol* 13:323-327.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Chen, L. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5:1365-1369.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Flies, D. B., van Deursen, J. M., Chen, L. 2004. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* 20:327-336.
- Eckart, M. R., Selby, M., Masiarz, F., Lee, C., Berger, K., Crawford, K., Kuo, C., Kuo, G., Houghton, M., Choo, Q. L. 1993. The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 192:399-406.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., Bienz, K. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76:5974-5984.

- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T., Glenn, J. S. 2004. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* 78:11288-11295.
- Erickson, A. L., Kimura, Y., Igarashi, S., Eichelberger, J., Houghton, M., Sidney, J., McKinney, D., Sette, A., Hughes, A. L., Walker, C. M. 2001. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 15:883-895.
- Eppihimer, M. J., Gunn, J., Freeman, G. J., Greenfield, E. A., Chernova, T., Erickson, J., Leonard, J. P. 2002. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation* 9:133-145.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., Rice, C. M. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-805.
- Failla, C., Tomei, L., De Francesco, R. 1994. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 68:3753-3760.
- Farci, P., Alter, H. J., Wong, D., Miller, R. H., Shih, J. W., Jett, B., Purcell, R. H. 1991. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 325:98-104.
- Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H. J., Purcell, R. H. 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15394-15399.
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncalves, F. L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347:975-982.
- Fytili, P., Dalekos, G. N., Schlaphoff, V., Suneetha, P. V., Sarrazin, C., Zauner, W., Zachou, K., Berg, T., Manns, M. P., Klade, C. S., Cornberg, M., Wedemeyer, H. 2008. Cross-genotype-reactivity of the immunodominant HCV CD8 T-cell epitope NS3-1073. *Vaccine* 26:3818-3826.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C. A., Santantonio, T., Pape, G. R. 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117:933-941.
- Gerlach, J. T., Ulsenheimer, A., Gruner, N. H., Jung, M. C., Schraut, W., Schirren, C. A., Heeg, M., Scholz, S., Witter, K., Zahn, R., Vogler, A., Zachoval, R., Pape, G. R., Diepolder, H. M. 2005. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J Virol* 79:12425-12433.
- Golden-Mason, L., Klarquist, J., Wahed, A. S., Rosen, H. R. 2008. Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. *J Immunol* 180:3637-3641.

- Golden-Mason, L., Palmer, B., Klarquist, J., Mengshol, J. A., Castelblanco, N., Rosen, H. R. 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 81:9249-9258.
- Goodell, V., dela Rosa, C., Slota, M., MacLeod, B., Disis, M. L. 2007. Sensitivity and specificity of tritiated thymidine incorporation and ELISPOT assays in identifying antigen specific T cell immune responses. *BMC Immunol* 8:21.
- Grakoui, A., Shoukry, N. H., Woollard, D. J., Han, J. H., Hanson, H. L., Ghayeb, J., Murthy, K. K., Rice, C. M., Walker, C. M. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302:659-662.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., Rice, C. M. 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67:1385-1395.
- Gretch, D. R. 1997. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 26:43S-47S.
- Groschel, S., Piggott, K. D., Vaglio, A., Ma-Krupa, W., Singh, K., Goronzy, J. J., Weyand, C. M. 2008. TLR-mediated induction of negative regulatory ligands on dendritic cells. *J Mol Med* 86:443-455.
- Gruner, N. H., Gerlach, T. J., Jung, M. C., Diepolder, H. M., Schirren, C. A., Schraut, W. W., Hoffmann, R., Zachoval, R., Santantonio, T., Cucchiaroni, M., Cerny, A., Pape, G. R. 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 181:1528-1536.
- Hadziyannis, S. J., Sette, H., Jr., Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H., Jr., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P. J., Lin, A., Ackrill, A. M. 2004. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140:346-355.
- Harcourt, G. C., Lucas, M., Godkin, A. J., Kantzanou, M., Phillips, R. E., Klenerman, P. 2003. Evidence for lack of cross-genotype protection of CD4⁺ T cell responses during chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 131:122-129.
- Hoofnagle, J. H. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36:S21-29.
- Ikeda, M., Abe, K., Dansako, H., Nakamura, T., Naka, K., Kato, N. 2005. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem Biophys Res Commun* 329:1350-1359.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* 11:3887-3895.
- Isogawa, M., Furuichi, Y., Chisari, F. V. 2005. Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* 23:53-63.
- Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., Honjo, T. 2003. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 198:39-50.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. 2005. Immunobiology. 6th Edition. Garland Science

- Jeong, H. Y., Lee, Y. J., Seo, S. K., Lee, S. W., Park, S. J., Lee, J. N., Sohn, H. S., Yao, S., Chen, L., Choi, I. 2008. Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection. *J Leukoc Biol* 83:755-764.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S., Kohara, M. 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75 (Pt 7):1755-1760.
- Kamal, S. M., Fehr, J., Roesler, B., Peters, T., Rasenack, J. W. 2002. Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 123:1070-1083.
- Kasprovicz, V., Schulze Zur Wiesch, J., Kuntzen, T., Nolan, B. E., Longworth, S., Beral, A., Blum, J., McMahon, C., Reyor, L. L., Elias, N., Kwok, W. W., McGovern, B. G., Freeman, G., Chung, R. T., Klenerman, P., Lewis-Ximenez, L., Walker, B. D., Allen, T. M., Kim, A. Y., Lauer, G. M. 2008. High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *J Virol* 82:3154-3160.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Mizokami, M., Wakita, T. 2005. Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J Virol* 79:592-596.
- Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., Koulmanda, M., Freeman, G. J., Sayegh, M. H., Sharpe, A. H. 2006. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 203:883-895.
- Kimura, Y., Gushima, T., Rawale, S., Kaumaya, P., Walker, C. M. 2005. Escape mutations alter proteasome processing of major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 79:4870-4876.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., Rice, C. M. 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70:3363-3371.
- Koziel, M. J., Wong, D. K., Dudley, D., Houghton, M., Walker, B. D. 1997. Hepatitis C virus-specific cytolytic T lymphocyte and T helper cell responses in seronegative persons. *J Infect Dis* 176:859-866.
- Lauer, G. M., Barnes, E., Lucas, M., Timm, J., Ouchi, K., Kim, A. Y., Day, C. L., Robbins, G. K., Casson, D. R., Reiser, M., Dusheiko, G., Allen, T. M., Chung, R. T., Walker, B. D., Klenerman, P. 2004. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 127:924-936.
- Lauer, G. M., Ouchi, K., Chung, R. T., Nguyen, T. N., Day, C. L., Purkis, D. R., Reiser, M., Kim, A. Y., Lucas, M., Klenerman, P., Walker, B. D. 2002. Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol* 76:6104-6113.
- Lauwerys, B. R., Garot, N., Renaud, J. C., Houssiau, F. A. 2000. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. *J Immunol* 165:1847-1853.
- Lemaire, J. M., Courouce, A. M., Defler, C., Bouchardeau, F., Coste, J., Agulles, O., Cantaloube, J. F., Barlet, V., Barin, F. 2000. HCV RNA in blood donors with isolated reactivities by third-generation RIBA. *Transfusion* 40:867-870.

- Li, X., Jeffers, L. J., Shao, L., Reddy, K. R., de Medina, M., Scheffel, J., Moore, B., Schiff, E. R. 1995. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *J Viral Hepat* 2:227-234.
- Liang, C., Rieder, E., Hahn, B., Jang, S. K., Paul, A., Wimmer, E. 2005. Replication of a novel subgenomic HCV genotype 1a replicon expressing a puromycin resistance gene in Huh-7 cells. *Virology* 333:41-53.
- Lin, W., Kim, S. S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Kim, K. A., Holtzman, M. J., Chung, R. T. 2006. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol* 80:9226-9235.
- Lindenbach, B. D., Rice, C. M. 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436:933-938.
- Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A., Quesnel, B. 2007. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 110:296-304.
- Logvinoff, C., Major, M. E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S. M., Alter, H., Rice, C. M., McKeating, J. A. 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10149-10154.
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., Bartenschlager, R. 2003. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* 77:3007-3019.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.
- Lukens, J. R., Cruise, M. W., Lassen, M. G., Hahn, Y. S. 2008. Blockade of PD-1/B7-H1 interaction restores effector CD8⁺ T cell responses in a hepatitis C virus core murine model. *J Immunol* 180:4875-4884.
- Macdonald, A., Crowder, K., Street, A., McCormick, C., Harris, M. 2004. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J Gen Virol* 85:721-729.
- Major, M. E., Dahari, H., Mihalik, K., Puig, M., Rice, C. M., Neumann, A. U., Feinstone, S. M. 2004. Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology* 39:1709-1720.
- Mehta, S. H., Cox, A., Hoover, D. R., Wang, X. H., Mao, Q., Ray, S., Strathdee, S. A., Vlahov, D., Thomas, D. L. 2002. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 359:1478-1483.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R., Tyrrell, D. L., Kneteman, N. M. 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7:927-933.
- Missale, G., Bertoni, R., Lamonaca, V., Valli, A., Massari, M., Mori, C., Rumi, M. G., Houghton, M., Fiaccadori, F., Ferrari, C. 1996. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 98:706-714.

- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P., Ghersa, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J. M., Sa-Cunha, A., Maurel, P. 2007. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46:411-419.
- Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., Thomssen, R. 1999. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 57:223-229.
- Muhlbauer, M., Fleck, M., Schutz, C., Weiss, T., Froh, M., Blank, C., Scholmerich, J., Hellerbrand, C. 2006. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 45:520-528.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J. 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42:3858-3863.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., Perelson, A. S. 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282:103-107.
- NIH 2002. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. *NIH Consensus State Sci Statements* 19:1-46.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151.
- Oikawa, T., Takahashi, H., Ishikawa, T., Hokari, A., Otsuki, N., Azuma, M., Zeniya, M., Tajiri, H. 2007. Intrahepatic expression of the co-stimulatory molecules programmed death-1, and its ligands in autoimmune liver disease. *Pathol Int* 57:485-492.
- Pawlotsky, J. M. 1999. Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol* 31 Suppl 1:71-79.
- Pawlotsky, J. M. 2003. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis* 7:127-137.
- Peng, G., Li, S., Wu, W., Tan, X., Chen, Y., Chen, Z. 2008. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol* 45:963-970.
- Penin, F. 2003. Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 7:1-21, vii.
- Penna, A., Pilli, M., Zerbini, A., Orlandini, A., Mezzadri, S., Sacchelli, L., Missale, G., Ferrari, C. 2007. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 45:588-601.
- Petrovas, C., Price, D. A., Mattapallil, J., Ambrozak, D. R., Geldmacher, C., Cecchinato, V., Vaccari, M., Trynieszewska, E., Gostick, E., Roederer, M., Douek, D. C., Morgan, S. H., Davis, S. J., Franchini, G., Koup, R. A. 2007. SIV-specific CD8+ T cells express high levels of PD1 and cytokines but have impaired proliferative capacity in acute and chronic SIVmac251 infection. *Blood* 110:928-936.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., Bartenschlager, R. 2002. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 76:4008-4021.

- Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., Bartenschlager, R. 2001. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 75:1252-1264.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.
- Quiroga, J. A., Llorente, S., Castillo, I., Rodriguez-Inigo, E., Pardo, M., Carreno, V. 2006. Cellular immune responses associated with occult hepatitis C virus infection of the liver. *J Virol* 80:10972-10979.
- Racanelli, V., Rehermann, B. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43:S54-62.
- Radziewicz, H., Ibegbu, C. C., Fernandez, M. L., Workowski, K. A., Obideen, K., Wehbi, M., Hanson, H. L., Steinberg, J. P., Masopust, D., Wherry, E. J., Altman, J. D., Rouse, B. T., Freeman, G. J., Ahmed, R., Grakoui, A. 2007. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol* 81:2545-2553.
- Rahman, F., Heller, T., Sobao, Y., Mizukoshi, E., Nascimbeni, M., Alter, H., Herrine, S., Hoofnagle, J., Liang, T. J., Rehermann, B. 2004. Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C. *Hepatology* 40:87-97.
- Ray, S. C., Fanning, L., Wang, X. H., Netski, D. M., Kenny-Walsh, E., Thomas, D. L. 2005. Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J Exp Med* 201:1753-1759.
- Rehermann, B., Nascimbeni, M. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5:215-229.
- Rehr, M., Cahenzli, J., Haas, A., Price, D. A., Gostick, E., Huber, M., Karrer, U., Oxenius, A. 2008. Emergence of polyfunctional CD8+ T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy. *J Virol* 82:3391-3404.
- Rollier, C. S., Paranhos-Baccala, G., Verschoor, E. J., Verstrepen, B. E., Drexhage, J. A., Fagrouch, Z., Berland, J. L., Komurian-Pradel, F., Duverger, B., Himoudi, N., Staib, C., Meyr, M., Whelan, M., Whelan, J. A., Adams, V. C., Larrea, E., Riezu, J. I., Lasarte, J. J., Bartosch, B., Cosset, F. L., Spaan, W. J., Diepolder, H. M., Pape, G. R., Sutter, G., Inchauspe, G., Heeney, J. L. 2007. Vaccine-induced early control of hepatitis C virus infection in chimpanzees fails to impact on hepatic PD-1 and chronicity. *Hepatology* 45:602-613.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., Vitelli, A. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21:5017-5025.
- Schneider, U., Schwenk, H. U., Bornkamm, G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19:621-626.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., Hume, D. A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189.

Schulze zur Wiesch, J., Lauer, G. M., Day, C. L., Kim, A. Y., Ouchi, K., Duncan, J. E., Wurcel, A. G., Timm, J., Jones, A. M., Mothe, B., Allen, T. M., McGovern, B., Lewis-Ximenez, L., Sidney, J., Sette, A., Chung, R. T., Walker, B. D. 2005. Broad repertoire of the CD4+ T cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 175:3603-3613.

Schulze Zur Wiesch, J., Lauer, G. M., Timm, J., Kuntzen, T., Neukamm, M., Bercial, A., Jones, A. M., Nolan, B. E., Longworth, S. A., Kasprovicz, V., McMahon, C., Wurcel, A., Lohse, A. W., Lewis-Ximenez, L. L., Chung, R. T., Kim, A. Y., Allen, T. M., Walker, B. D. 2007. Immunologic evidence for lack of heterologous protection following resolution of HCV in patients with non-genotype 1 infection. *Blood* 110:1559-1569.

Scognamiglio, P., Accapezzato, D., Casciaro, M. A., Cacciani, A., Artini, M., Bruno, G., Chircu, M. L., Sidney, J., Southwood, S., Abrignani, S., Sette, A., Barnaba, V. 1999. Presence of effector CD8+ T cells in hepatitis C virus-exposed healthy seronegative donors. *J Immunol* 162:6681-6689.

Seeger, C. 2005. Salient molecular features of hepatitis C virus revealed. *Trends Microbiol* 13:528-534.

Seifert, U., Liermann, H., Racanelli, V., Halenius, A., Wiese, M., Wedemeyer, H., Ruppert, T., Rispeter, K., Henklein, P., Sijts, A., Hengel, H., Kloetzel, P. M., Rehmann, B. 2004. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* 114:250-259.

Semmo, N., Barnes, E., Taylor, C., Kurtz, J., Harcourt, G., Smith, N., Klenerman, P. 2005. T-cell responses and previous exposure to hepatitis C virus in indeterminate blood donors. *Lancet* 365:327-329.

Semmo, N., Day, C. L., Ward, S. M., Lucas, M., Harcourt, G., Loughry, A., Klenerman, P. 2005. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 41:1019-1028.

Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y. Y., Kaneko, S., Shimotohno, K., Murakami, S. 2004. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 78:2738-2748.

Shimizu, Y. K., Feinstone, S. M., Kohara, M., Purcell, R. H., Yoshikura, H. 1996. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 23:205-209.

Shindo, M., Di Bisceglie, A. M., Biswas, R., Mihalik, K., Feinstone, S. M. 1992. Hepatitis C virus replication during acute infection in the chimpanzee. *J Infect Dis* 166:424-427.

Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., Murakami, S. 2002. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 277:11149-11155.

Shoukry, N. H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D. Y., Ghayeb, J., Reimann, K. A., Walker, C. M. 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 197:1645-1655.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S.,

- Weiner, A. J., Widell, A. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962-973.
- Soderholm, J., Ahlen, G., Kaul, A., Frelin, L., Alheim, M., Barnfield, C., Liljestrom, P., Weiland, O., Milich, D. R., Bartenschlager, R., Sallberg, M. 2006. Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. *Gut* 55:266-274.
- Subudhi, S. K., Zhou, P., Yerian, L. M., Chin, R. K., Lo, J. C., Anders, R. A., Sun, Y., Chen, L., Wang, Y., Alegre, M. L., Fu, Y. X. 2004. Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection. *J Clin Invest* 113:694-700.
- Sugimoto, K., Ikeda, F., Stadanlick, J., Nunes, F. A., Alter, H. J., Chang, K. M. 2003. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 38:1437-1448.
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J. L., Manns, M. P., Rehermann, B. 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6:578-582.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Shimotohno, K. 1995. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* 215:744-749.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K., Shimotohno, K. 1996. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 70:3307-3312.
- Tester, I., Smyk-Pearson, S., Wang, P., Wertheimer, A., Yao, E., Lewinsohn, D. M., Tavis, J. E., Rosen, H. R. 2005. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med* 201:1725-1731.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H., Chisari, F. V. 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15661-15668.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C., Chisari, F. V. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194:1395-1406.
- Tilg, H. 1997. New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology* 112:1017-1021.
- Timm, J., Lauer, G. M., Kavanagh, D. G., Sheridan, I., Kim, A. Y., Lucas, M., Pillay, T., Ouchi, K., Reyor, L. L., Schulze zur Wiesch, J., Gandhi, R. T., Chung, R. T., Bhardwaj, N., Klenerman, P., Walker, B. D., Allen, T. M. 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 200:1593-1604.
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M. R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R. S., Routy, J. P., Haddad, E. K., Sekaly, R. P. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12:1198-1202.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66:1476-1483.

- Ulsenheimer, A., Gerlach, J. T., Gruener, N. H., Jung, M. C., Schirren, C. A., Schraut, W., Zachoval, R., Pape, G. R., Diepolder, H. M. 2003. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 37:1189-1198.
- Urbani, S., Amadei, B., Fiscaro, P., Tola, D., Orlandini, A., Sacchelli, L., Mori, C., Missale, G., Ferrari, C. 2006. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 44:126-139.
- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G., Ferrari, C. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 80:11398-11403.
- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Pedrazzi, G., Sacchelli, L., Cavallo, M. C., Orlandini, A., Missale, G., Ferrari, C. 2008. Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: effect of viremia levels and antiviral treatment. *J Hepatol* 48:548-558.
- Velu, V., Kannanganat, S., Ibegbu, C., Chennareddi, L., Villinger, F., Freeman, G. J., Ahmed, R., Amara, R. R. 2007. Elevated expression levels of inhibitory receptor programmed death 1 on simian immunodeficiency virus-specific CD8 T cells during chronic infection but not after vaccination. *J Virol* 81:5819-5828.
- Waeckerle-Men, Y., Starke, A., Wahl, P. R., Wuthrich, R. P. 2007. Limited costimulatory molecule expression on renal tubular epithelial cells impairs T cell activation. *Kidney Blood Press Res* 30:421-429.
- Wahl, C., Bochtler, P., Chen, L., Schirmbeck, R., Reimann, J. 2008. B7-H1 on hepatocytes facilitates priming of specific CD8 T cells but limits the specific recall of primed responses. *Gastroenterology* 135:980-988.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T. J. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-796.
- Walter, E., Keist, R., Niederost, B., Pult, I., Blum, H. E. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* 24:1-5.
- Wang, C., Sarnow, P., Siddiqui, A. 1993. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67:3338-3344.
- Wang, S., Bajorath, J., Flies, D. B., Dong, H., Honjo, T., Chen, L. 2003. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med* 197:1083-1091.
- Woollard, D. J., Grakoui, A., Shoukry, N. H., Murthy, K. K., Campbell, K. J., Walker, C. M. 2003. Characterization of HCV-specific Patr class II restricted CD4+ T cell responses in an acutely infected chimpanzee. *Hepatology* 38:1297-1306.
- Xie, Z. C., Riezu-Boj, J. I., Lasarte, J. J., Guillen, J., Su, J. H., Civeira, M. P., Prieto, J. 1998. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244:513-520.
- Yamada, N., Tanihara, K., Takada, A., Yorihuri, T., Tsutsumi, M., Shimomura, H., Tsuji, T., Date, T. 1996. Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 223:255-261.

- Yan, R. Q., Su, J. J., Huang, D. R., Gan, Y. C., Yang, C., Huang, G. H. 1996. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:283-288.
- Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Bukh, J. 1999. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2291-2295.
- Yao, Z. Q., King, E., Prayther, D., Yin, D., Moorman, J. 2007. T cell dysfunction by hepatitis C virus core protein involves PD-1/PDL-1 signaling. *Viral Immunol* 20:276-287.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J., Lemon, S. M. 2007. Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J Virol* 81:629-638.
- Youn, J. W., Park, S. H., Lavillette, D., Cosset, F. L., Yang, S. H., Lee, C. G., Jin, H. T., Kim, C. M., Shata, M. T., Lee, D. H., Pfahler, W., Prince, A. M., Sung, Y. C. 2005. Sustained E2 antibody response correlates with reduced peak viremia after hepatitis C virus infection in the chimpanzee. *Hepatology* 42:1429-1436.
- Zibert, A., Meisel, H., Kraas, W., Schulz, A., Jung, G., Roggendorf, M. 1997. Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. *Hepatology* 25:1245-1249.

7. Abkürzungen

aa	Aminosäure
Abb.....	Abbildung
ABC.....	Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex
AEC.....	3-Amino-9-ethylcarbazol
ALT.....	Alanin-Aminotransferase
APC.....	Allophycocyanin
AST.....	Aspartat-Aminotransferase
ATP.....	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA.....	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CARDIF.....	CARD Adaptor Inducing IFN β
CD.....	Cluster of Differentiation
cHCV.....	chronische HCV Infektion
Ci.....	Curie
CMIA.....	Chemilumineszenztest
Con1.....	Replikonstrukt
CPM.....	Counts pro Minute
CTL.....	Zytotoxische T Lymphozyten
DC.....	Dendritische Zellen
DEPC.....	Diethylpyrocarbonat
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dNTP.....	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRK.....	Deutsches Rotes Kreuz
dsRNA.....	Doppelsträngige RNA
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA.....	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)- tetraessigsäure
EIA.....	Enzym Immuno Assay
ELISA.....	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
ELISpot.....	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
FACS.....	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS.....	Fötales Kälberserum
FITC.....	Fluorescein Isothiocyanat
g.....	Gramm
GT.....	Genotyp
h.....	Stunde
HBV.....	Hepatitis B Virus
HCC.....	Hepatozelluläres Karzinom
HCV.....	Hepatitis C Virus
HEPES.....	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure
HLA.....	Humanes Leukozyten Antigen
IB.....	Immunoblot

ICS	Intrazelluläre Zytokinfäbung
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP10	IFN γ -induzierbares Protein 10
ISG	Interferon stimuliertes Gen
IU	Internationale Einheit
Jak	Janus Kinase
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
LSEC	Leber Sinosidal Endothelienzellen
M	Mol
Min	Minute
mRNA	messenger RNA
MxA	Myxovirus Resistenzprotein A
nAK	neutralisierender Antikörper
NS	Nicht-Strukturprotein
nt	Nukleotid
OAS	Oligoadenylat Synthetase
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	Periphere Blut Mononukleare Zellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed Death 1
PD-L	Programmed Death Ligand
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PHA	Phytohämoagglutinin
PHH	Primäre Humane Hepatozyten
PKR	Protein Kinase R
Pt	Patient
RIG-I	Retinoic Acid Inducible Gene I
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Reverse Transkriptase
S/CO	Sample Over Cut-Off
SDS	Natriumdodecylsulfanat
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
sec	Sekunde
SI	Stimulationsindex
SSC	Standard Sodium Citrate
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

Tab	Tabelle
TCR	T Zell Rezeptor
TLR	Toll-like Receptor
TMA	Transcription Mediated Amplification
TRIF	TIR Domain Containing Adaptor Inducing IFN β
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TT	Tetanus Toxoid
ÜN	Über Nacht
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
Vol.	Volumen

8. Anhang

8.1. Sequenzen

HCV Core:

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRAPRKTSEERSQPR
GRRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSPRGRPSWGPTDPRRR

HCV NS3:

GREILLGPADGMASKGWRLAPITAYAQQTRGLLGCITSLTGRDKNQVEGEVQIVPTAAQTF
LATCINGVCWTVYHGAGTRTIASPKGPVIQMYSNVDKDLVWGPAPQGSRLAPCTCGSSDL
YLVTKHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRPISYLGSSGGPLLCPVGHAVGIFRAAVCTRGVAKA
ADFIPIVENLETTMRSPVFTDNSSPPVVPQSFQVAHLHAPTGSKGSTKVPAAAYAAQGYKVLV
LNPSVAATLGFAYMSKAHGIDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCAGGAYDIICDE
CHSTDATSILGIGTVLDQGETAGAKLVFATATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAIP
LEVIKGRHLIFCHSKRKCDELATKLVAMGINAVAYYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDALMTGY
TGDFDSVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETTTLPQDAVSRTQRRGRTGRGKPGIYRFVAPGE
RPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAE

HCV NS4:

TLHGPTPLLYRLGAVQNEVTLTHPITKYIMTCMSADLEVVTSTWVLVGGVLAALAAYCLSTG
CVVIVGRIVLSGKPAVIPDREVLYREFDEMEECSQLPHYIEQGMALAEQFKQKALGLLQTAS
RQAEVIAPAVQTNWQKLEAFWAKHMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTAAVTSPLT
TSQTLNFNILGGWVAAQLAAPGAATAFVGAGLAGAAIGSVGLGKVLVDILAGYGAGVAGALV

PD-L1 Chimäre:

MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKN
IIQFVHGEEDLKVQHSSYRQARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKR
ITVKVNAPYNKINGRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREE
KLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERT

HCV Peptide:

HCV-1a (H77) Core

C1	(aa 1-20)	MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQ
C2	(aa 11-30)	TKRNTNRRPQDVKFPGGGQI
C3	(aa 21-40)	DVKFPGGGQIVGGVYLLPRR
C4	(aa 31-50)	VGGVYLLPRRGPRLGVRATR
C5	(aa 41-60)	GPRLGVRATRKTSEERSQPRG
C6	(aa 51-70)	KTSEERSQPRGRRQPIPKARR
C7	(aa 61-80)	RRQPIPKARRPEGRTWAQPG
C8	(aa 71-90)	PEGRTWAQPGYPWPLYGNEG
C9	(aa 81-100)	YPWPLYGNEGCGWAGWLLSP
C10	(aa 91-110)	CGWAGWLLSPRGRPSWGPT
C11	(aa 101-120)	RGRPSWGPTDPRRRSRNLG
C12	(aa 111-130)	DPRRRSRNLGKVIDTLTCGF
C13	(aa 121-140)	KVIDTLTCGFADLMGYIPLV
C14	(aa 131-150)	ADLMGYIPLVGAPLGAARA

C15 (aa 141-160)	GAPLGGAARALAHGVRVLED
C16 (aa 151-170)	LAHGVRVLEDGVNYATGNLP
C17 (aa 161-180)	GVNYATGNLPGCSFSIFLLA
C18 (aa 171-190)	GCSFSIFLLALLSCLTVPAS

HCV-1 (GenBank accession number: M62321)

P124 (aa 1241-1260)	PAAYAAQGYKVLVLNPSVAA	NS3
P153 (aa 1531-1550)	TPAETTVRLRAYMNTPLPV	NS3
P158 (aa 1581-1600)	ENLPYLVAYQATVCARAQAP	NS3
P177 (aa 1771-1790)	GIQYLAGLSTLPGNPAIASL	NS4b
P257 (aa 2571-2590)	KGGRKPARLIVFPDLGVRVC	NS5b
P294 (aa 2941-2960)	CGKYLFNWAVRKLKLTPIA	NS5b

8.2. Alignments

Die folgenden Alignments dienen dazu, die entsprechenden Epitope für 1073, 1406 und 2594 bei Genotypen zu ermitteln, die nicht mittels Sequenzierung bestimmt werden konnten.

GT1a							GT1b												
2594																			
consensus	A	L	Y	D	V	V	S	K	L	consensus	A	L	Y	D	V	V	S	T	L
'AF011753	'AB016785
'AF271632	T	.	.	'AB049087
'AF511948	.	.	D	.	.	.	P	.	.	'AB049088
'AF511949	L	'AB049089	.	.	.	N
'AF511950	R	.	.	'AB049090
'AJ278830	'AB049091
'D10749'	'AB049092
'EF032886	'AB049093
'EF407411	L	'AB049094
'EF407412	'AB049095
'EF407413	'AB049096	N	.
'EF407414	'AB049097
'EF407415	'AB049098
'EF407417	'AB049099
'EF407418	'AB049100
'EF407419	'AB049101
'EF407421	'AB080299
'EF407422	'AB191333
'EF407423	'AB426117
'EF407425	'AF054250
'EF407426	'AF139594
'EF407427	'AF145454
'EF407428	T	.	.	'AF165046
'EF407431	'AF165048
'EF407432	R	.	.	'AF165050
'EF407433	'AF165052
'EF407434	L	'AF165054
'EF407435	'AF165056
'EF407436	'AF165058
'EF407437	'AF165060

'EU482835	'EU155255
'EU482838	'EU155256
'EU482842	'EU155257
'EU482846	'EU155258
'EU482848	.	.	.	L	'EU155259
'EU482850	'EU155260
'EU482853	'EU155261
'EU482855	K	.	.	.	'EU155262
'EU482856	R	.	.	.	'EU155263
'EU482857	'EU155264
'EU482858	'EU155279
'EU482867	K	.	.	.	'EU155280
'EU482870	.	.	.	L	.	G	.	.	.	'EU155281
'EU482871	'EU155300
'EU482872	'EU155301
'EU482876	'EU155302
'EU482882	K	.	.	.	'EU155303
'EU482887	'EU155304
'EU482889	'EU155305
'EU529676	'EU155306
'EU529679	'EU155307
'EU529681	'EU155308
										'EU155315
										'EU155316
										'EU155317
										'EU155318
										'EU155324
										'EU155325
										'EU155326
										'EU155327
										'EU155328
										'EU155329
										'EU155330
										'EU155331
										'EU155332
										'EU155333
										'EU155334
										'EU155335
										'EU155336
										'EU155337
										'EU155356
										'EU155357
										'EU155358
										'EU155359
										'EU155360
										'EU155361
										'EU155362
										'EU155363
										'EU155364
										'EU155365	N	.
										'EU155366
										'EU155367
										'EU155368
										'EU155369
										'EU155370
										'EU155371

'EU155372
 'EU155373
 'EU155374 N .
 'EU155375
 'EU155376
 'EU155377
 'EU155381
 'EU155382
 'EU234061
 'EU234062
 'EU482833
 'EU482839
 'EU482849
 'EU482859
 'EU482860
 'EU482874
 'EU482875
 'EU482877
 'EU482879
 'EU482880
 'EU482881
 'EU482883
 'EU482885
 'EU482886
 'EU482888
 'EU529682
 'L02836 '
 'M58335 '
 'M84754 '
 'M96362 '
 'U01214 '
 'U45476 '
 'U89019 '
 'X61596 '

GT2a

1073

consensus	S	I	S	G	V	L	W	T	V
'AB047645	.	.	A
'AF169002
'AF169003	T	.	.	.	I
'AF169004	.	.	?
'AF169005
'AF238481	.	.	A
'AF238482	T
'AF238483
'AF238484	T	.	.	.	I
'AF238485
'AY746460
'NC_00982

1406

consensus	A	L	R	G	M	G	L	N	A	V
'AB047645	.	.	.	A
'AF169002
'AF169003
'AF169004
'AF169005	.	.	.	S
'AF238481
'AF238482
'AF238483
'AF238484	G	.	P
'AF238485
'AY746460
'NC_00982	S	.

2594

consensus	A	L	Y	D	V	T	Q	K	L
'AB047645
'AF169002
'AF169003	P
'AF169004
'AF169005
'AF238481
'AF238482
'AF238483	I
'AF238484
'AF238485
'AY746460
'NC_00982	I

GT3a

2594

consensus	A	L	Y	D	V	I	Q	K	L
'AF046866
'D28917 '	R	.
'NC_009824
'X76918 '	V

GT4:

1073

consensus	Q	L	T	S	L	G	L	N	A	V
'DQ418782
'DQ418783
'DQ418784	.	.	K
'DQ418785	.	.	S
'DQ418786	.	.	S
'DQ418787	.	.	.	A
'DQ418788
'DQ418789
'DQ516083	.	.	S
'DQ516084
'DQ988073	.	.	S
'DQ988074
'DQ988075
'DQ988076
'DQ988077
'DQ988078
'DQ988079
'EF589160	N	.	S	A
'EF589161	N	.	S	A
'Y11604 '

1406

consensus	A	V	N	G	V	M	W	T	V
'DQ418782
'DQ418783
'DQ418784	.	I
'DQ418785
'DQ418786	.	I
'DQ418787	S	.
'DQ418788	S	.
'DQ418789	.	I
'DQ516083	.	I
'DQ516084
'DQ988073
'DQ988074	.	I
'DQ988075	.	I
'DQ988076
'DQ988077
'DQ988078	L	.	.
'DQ988079	.	I
'EF589160
'EF589161
'Y11604 '

2594

consensus	A	L	H	D	V	I	N	Q	L
'DQ418782	D	.	.
'DQ418783	V	.	.	.
'DQ418784	Q	.	.
'DQ418786	.	.	Y	.	A	V	K	.	.
'DQ418787
'DQ418788
'DQ418789
'Y11604 '	K	K	T

8.3. Publikationsverzeichnis

Publikation

Ein Teil der Arbeit befindet sich zur *minor revision* bei der Fachzeitschrift ‚Transfusion‘:

Indeterminate anti-HCV reactivity in HCV RNA negative blood donors is frequently caused by previously resolved infection. Tobias Hitziger, Michael Schmidt, Volkmar Schottstedt, Holger Hennig, Alexandra Schumann, Stefan Ross, Mengji Lu, Erhard Seifried and Michael Roggendorf

Poster

Analysis of Cellular Immune Response in Non Viremic Blood Donors with Isolated anti-HCV Reactivity. T. Hitziger, M. Schmidt, A. Schumann, V. Schottstedt, H. Hennig, E. Seifried & M. Roggendorf. International Society of Blood Transfusion, 23.-27.06.2007 in Madrid

Detection of the Nuclear Protein Ki-67: A New Tool to Investigate Antigen Specific Proliferation of PBMC in the Woodchuck Model. Tobias Hitziger, Alexandra Schumann, Claudia Budde, Michael Roggendorf. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Virus, 16.-20.09.2007)

8.4. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Michael Roggendorf für die interessante Themenstellung sowie die dazu notwendige wissenschaftliche Betreuung und die hilfreichen Ideen und Ratschläge.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Dr. Jörg Timm bedanken, für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen. Außerdem danke ich Dr. Mengji Lu und Dr. Stefan Ross, die sich immer Zeit genommen haben und hilfsbereite Ansprechpartner waren. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Sabine Bein, Frau Monika Nyga und allen Mitarbeitern der gastroenterologischen Ambulanz bedanken, die diese Arbeit tatkräftig durch die Akquirierung von Blutproben unterstützt haben.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich in den Laboralltag der Virologie eingeführt haben und mit denen es eine große Freude war zu arbeiten: Alexandra Schumann, die mich bei den ersten Experimenten begleitet hat und ohne die natürlich die ELISpot-Platten immer noch auf ihre Auswertung warten würden; Cesar Oniangue-Ndza, der mir auf den bildlichsten Arten und Weisen die Grundlagen der Molekularbiologie und der Zellkultur erklärt hat und der bei Problemen immer gleich zu Stelle war; Nina Pawlowski, mit der ich mir immer gerne die Laborbank geteilt habe, weil es immer in einem großer Spaß endete, und die eigentlich nur viel zu kurz hier war; dann natürlich Anja Mayer, Thekla Kemper und Barbara Bleekmann, für all die geduldigen Antworten zu Fragen des Laboralltags, für Ratschläge und Unterstützungen ... und natürlich die Abkühlungen im Sommer; Shadi Salloum, Marina Klein, Silvia Giugliano und Sina Luppus, der ‚neuen‘ HCV Gruppe für eine schöne Zusammenarbeit im Labor; Julia Kort, für den Ausflug in ein abenteuerlichen Nebenprojekt, bei dem trotzdem viel gelacht wurde und natürlich allen weiteren wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter, mit denen ich zusammenarbeiten durfte.

Äußerst dankbar bin ich natürlich auch meinem Vater und Vera, die alle Höhen und Tiefen mitdurchlebt haben und auf deren Unterstützung ich immer bauen konnte. Genauso möchte ich mich bei meinem Bruder Niclas bedanken, der immer bemüht war, Fragen und Probleme des (Labor-)Alltags zu lösen und dafür immer kurzerhand parat stand.

Und zu guter Letzt möchte ich Yvonne Pietsch danken, für all die Unterstützung, den schonungslosen Optimismus, den Du mir in den letzten Jahren entgegengebracht hast und die Toleranz, die alles andere als selbstverständlich war.

8.5. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias Christopher Hitziger
Geburtsdatum: 08.09.1978
Geburtsort: Essen-Werden

Schulbildung:

08/1989 - 06/1998 Otto-Pankok-Gymnasium, Mülheim an der Ruhr
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Bundeswehr:

07/1998 - 04/1999 Luftwaffensicherungsstaffel KR/S
Jagdbombergeschwader 31 „Boelcke“, Kerpen

Studium:

04/1999 - 04/2003 Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
Abschluss: 2. Staatsexamen
05/2003 - 10/2003 Mitarbeiter des Cancer Care Nova Scotia, Halifax, Kanada
(Erste Hälfte des Praktischen Jahres)
11/2003 - 04/2004 Mitarbeiter der Millrather Apotheke, Erkrath
(Zweite Hälfte des Praktischen Jahres)
Abschluss: 3. Staatsexamen
06/2004 Approbation zum Apotheker

Promotion:

seit 01/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie,
Universitätsklinikum Essen

Essen den 04.12.2008

Tobias Hitziger

8.6. Erklärungen

Erklärung gemäß § 6, Abs. 2, Nr. 6-8, Promotionsordnung der Fachbereiche 6-9 der Universität Duisburg-Essen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die zelluläre Immunantwort bei ausgeheilten und chronischen Hepatitis C Virus Infektionen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Tobias Hitziger befürworte.

Essen, den 04.12.2008

Prof. Dr. med. Michael Roggendorf

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 04.12.2008

Tobias Hitziger

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 04.12.2008

Tobias Hitziger