

Bestimmung Hepatitis C-Virus-spezifischer CD4/CD8 T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Anke Leutz, geb. Hahn

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-
Universität Gießen

Betreuer: Professor Dr. Heinz-Jürgen Thiel

und

dem Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-
Universität, Frankfurt am Main

Betreuer: Professor Dr. med. Hans Wilhelm Doerr

Bestimmung Hepatitis C-Virus-spezifischer CD4/CD8 T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Anke Leutz, geb. Hahn
Tierärztin aus Frankfurt

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Professor Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Professor Dr. Heinz-Jürgen Thiel
Professor Dr. med. Hans Wilhelm Doerr

Tag der Disputation: 29. Mai 2009

*Meinen Eltern
und meinem Mann Steffen*

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	INFEKTIONS BIOLOGIE DER VIRUSHEPATITIS C	1
1.2	DAS VIRUS	2
1.3	HCV QUASI-SPEZIES	5
1.4	MODELLSYSTEME ZUR UNTERSUCHUNG DER VIRUS-WIRT-ZELLINTERAKTION	6
1.4.1	<i>Tierversuche</i>	6
1.4.2	<i>Weitere Tiermodelle</i>	7
1.4.3	<i>Zellkultursysteme für HCV</i>	7
1.4.4	<i>Das bovine Virusdiarrhoe-Virus als Surrogatmodell für antivirale Testungen</i>	8
1.4.5	<i>Untersuchung der zellvermittelten Immunreaktionen gegen HCV</i>	9
1.5	ZIELSETZUNG	10
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	MATERIAL	11
2.1.1	<i>Patientenproben</i>	11
2.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	11
2.1.3	<i>Chemikalien, Lösungen, Puffer</i>	12
2.1.4	<i>Antikörper</i>	14
2.1.5	<i>Antigene</i>	14
2.2	METHODEN	18
2.2.1	<i>Antigenstimulation der Vollblutproben</i>	18
2.2.2	<i>Färbung der antigenstimulierten Vollblutproben</i>	20
2.2.3	<i>Durchflusszytometrische Analyse</i>	21
2.2.4	<i>Statistische Analyse</i>	24
3	ERGEBNISSE	25
3.1	VALIDIERUNG DES LYMPHOZYTENSTIMULATIONSTESTS ZUR MESSUNG HCV-SPEZIFISCHER LYMPHOZYTEN	25
3.1.1	<i>Durchflusszytometrische Bestimmung HCV-spezifischer Lymphozyten</i>	25
3.1.2	<i>Zeitpunkt der Brefeldin-A-Zugabe</i>	28
3.1.3	<i>Vergleich der HCV-Proteine NS3 und Core</i>	30

3.1.4	<i>Bestimmung der Antigenmenge</i>	31
3.1.5	<i>Vergleich der Kontrollantigene mit den Stimulationsantigenen</i>	32
3.1.6	<i>Vergleich der Stimulation mit Protein oder Pseudotypen</i>	35
3.1.7	<i>Einfluss des Genotypen auf die Stimulation mit HCVpp</i>	37
3.1.8	<i>Ergebnisse der Stimulationen gesunder Probanden</i>	38
3.2	EINTEILUNG DER PATIENTEN IN GRUPPEN	39
3.3	MESSUNGEN VON PROBEN VON PATIENTEN, DIE SICH ZUM ZEITPUNKT DER ENTNAHME IN THERAPIE BEFANDEN	43
3.3.1	<i>Vergleich der Patientengruppen</i>	43
3.3.2	<i>Zytokinprofile innerhalb der Patientengruppen</i>	43
3.4	MESSUNGEN VON PATIENTENPROBEN, DIE VOR THERAPIEBEGINN ENTNOMMEN WURDEN	46
3.4.1	<i>Vergleich der Patientengruppen</i>	46
3.4.2	<i>Zytokinprofile innerhalb der Patientengruppen</i>	46
3.5	LYMPHOZYTENSTIMULATION VON BLUTPROBEN VON PATIENTEN OHNE ANSPRECHEN AUF DIE THERAPIE	49
3.6	KASUISTIK EINER AKUTEN HCV-INFEKTION	50
3.6.1	<i>Anamnese und Therapieverlauf</i>	50
3.6.2	<i>Lymphozytenstimulation zweier Blutproben</i>	51
4	DISKUSSION	52
4.1	DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE ZUR BESTIMMUNG HCV-SPEZIFISCHER LYMPHOZYTEN	52
4.1.1	<i>Die Immunabwehr gegen HCV</i>	54
4.1.2	<i>Optimierung der Methode für die Messung HCV-spezifischer Lymphozyten</i>	58
4.1.3	<i>Einsatzmöglichkeiten der HCVpp als Stimulationsantigen</i>	61
4.2	AUSWERTUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	64
4.2.1	<i>Kasuistik einer akuten HCV-Infektion</i>	70
4.3	DIE ZELLULÄRE IMMUNANTWORT GEGEN ANIMALE PESTIVIREN	71
4.3.1	<i>Das Klassische Schweinepest-Virus</i>	71
4.3.2	<i>Das Bovine Virus Diarrhoe-Virus</i>	72
5	ZUSAMMENFASSUNG	74

6 SUMMARY..... 76

LITERATUR..... 78

PUBLIKATIONEN

DANKSAGUNG

Abkürzungsverzeichnis

293 T-Zellen	humane embryonale Nieren-Zelllinie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Alb-uPa	„Urokinase-type plasminogen activator“ unter der Kontrolle des leberspezifischen Albumin-Promotors
APC	Allophycocyanin
Aqua bidest.	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
BFA	Brefeldin A
BVD/MD	Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease
CD	Cluster of differentiation, Zelloberflächenantigene
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid, komplementäre DNA
CFC	Cytokine flow cytometry, Zytokin-Durchflusszytometrie
C-terminal	Carboxyterminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1/E2	Envelope glycoproteins 1 and 2, Hüllproteine E1 und E2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay, enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay, enzymgekoppelter Immunospot-Test
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward-Scatter, Vorwärtsstreulicht
GB-Viren	einzelsträngige RNA-Viren, die Bezeichnung <i>GB</i> leitet sich von den Initialen des ersten Patienten ab, bei dem 1996 eine Isolierung des Virus gelang
h	Lat. hora, Stunde
HCC	Hepatocellular carcinoma, hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HCVpp	HCV pseudotyped particles, HCV-Pseudotypen
Huh7	Humane Hepatomzelllinie
HVR1	Hypervariable Region 1
IFNgamma	Interferon gamma
IFN- γ	Interferon gamma
IL-10	Interleukin 10
IL-4	Interleukin 4
IRES	Interne Ribosomeneintrittsstelle
IU	International units, internationale Einheiten
kB	Kilobasen
MHC	Major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOLT-4	Humane T-Zell-Leukämiezellen
mRNA	Messenger RNA, Boten-RNA
MT-2	Humane T-Zell-Lymphoblasten
nAK	Neutralisierende Antikörper
NS-Proteine	Nichtstruktur-Proteine
NTR	Nicht-translatierte Region
nm	Nanometer
N-terminal	Aminoterminal

P1 - P73	Patient 1 - Patient 73
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PerCP-Cy5.5	Perdinin Chlorophyll-Protein mit Cyaninfarbstoff
pH	Potentia hydrogenii
PE	Phycoerythrin
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute, Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde(n)
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
Tab.	Tabelle
Th	T-Helferzelle
TNFalpha (TNF- α)	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TU	Transducing units, transduzierende Einheiten
VCAM	Vascular cell adhesion molecule, Adhäsionsmolekül für die Adhäsion von Immunzellen am Endothel
VLA	Very late activation antigen, β_1 Integrin
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSVpp	VSV pseudotyped particles, VSV-Pseudotypen

1 Einleitung

1.1 Infektionsbiologie der Virushepatitis C

Das Hepatitis C-Virus ist eines der am weitesten verbreiteten persistierenden humanen Viren. Über 170 Millionen Menschen weltweit sind chronisch infiziert. Die auffallendste Eigenschaft des HCV ist seine Fähigkeit bei über 80 Prozent der infizierten Personen zu persistieren, wobei es bei 20 bis 30 Prozent der Patienten zu einer Leberzirrhose, bei 2,5 Prozent zu hepatozellulären Karzinomen kommt. Außerdem ist das HCV mit der Entwicklung extrahepatischer Autoimmunerkrankungen einschließlich Arthritis, Kryoglobulinämie und Glomerulonephritis assoziiert [1-3]. Bisher gibt es noch keine Impfung gegen HCV, die derzeitige antivirale Therapie ist mit starken Nebenwirkungen verbunden und nur bei 50-60% der behandelten Patienten erfolgreich [4]. Die Folgen einer Infektion mit HCV stellen heute in den USA und Europa die vorherrschende Ursache für die Notwendigkeit einer Lebertransplantation dar.

Die zelluläre Immunantwort spielt wahrscheinlich eine Schlüsselrolle im Verlauf einer akuten Infektion mit dem Hepatitis C Virus, die Dynamik solcher Antworten und ihr Zusammenhang mit einer Virusbeseitigung oder Persistenz von HCV hat man bisher aber nur unzureichend verstanden.

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass eine frühe Antwort aktivierter zytotoxischer T-Lymphozyten zu einer Beseitigung des Virus beitragen könnte. Man vermutet, dass ein Mangel an ausreichend aktivierten CD8+ T-Lymphozyten sowie eine ungenügende Breite der Epitop-Spezifität zu einer chronischen Erkrankung führen könnten [5].

Sowohl beim Menschen als auch bei Schimpansen besteht zwischen dem Auftreten von CD8+ T-Zellen im peripheren Blut und der Kontrolle einer Virämie ein zeitlicher Zusammenhang [6].

Auch die CD4+ T-Lymphozyten spielen wohl eine essentielle Rolle in der antiviralen Immunität, indem sie eine zytotoxische CD8+ T-Zellantwort induzieren und verstärken. Die Differenzierung naiver CD4+ T-Zellen zu HCV-spezifischen inflammatorischen CD4+ T-Zellen (Th1) oder CD4+ T-Helferzellen (Th2) mit ihren entsprechenden Zytokinprofilen ist ein wesentlicher Bestandteil der Immunantwort. Eine starke Th1 Antwort könnte zu einer Virusbeseitigung beitragen, während eine ausgeprägtere Th2 Antwort bei chronisch Erkrankten gemessen werden konnte [7]. Einige RNA-Viren inaktivieren die CD4+ Zellen und können so im Organismus persistieren. Auch bei der chronischen Hepatitis C nimmt man an, dass dies eine Strategie des Virus sein könnte, der Immunantwort zu entgehen [6].

Da das Hepatitis C Virus nur sehr ineffizient in Zellkultur repliziert, gibt es verschiedene Surrogatmodelle, um das Virus und seine Pathogenese genauer zu untersuchen. In dieser Arbeit werden HCV-Pseudotypen zur Stimulierung einer spezifischen T-Zell-Immunantwort eingesetzt. Die infektiösen Pseudotypen bestehen aus lentiviralen Core-Partikeln, die auf ihrer Oberfläche nicht modifizierte E1- und E2-Hüllglykoproteine tragen und so die Morphologie nativer HCV Partikel imitieren.

1.2 Das Virus

Das Hepatitis C-Virus ist einziger Vertreter des Genus *Hepacivirus* und gehört mit den Genera *Flavivirus* und *Pestivirus* zur Familie der *Flaviviridae*.

Tiermedizinisch relevante Vertreter dieser Familie sind das Louping III-Virus des Genus *Flavivirus*, als Erreger der Spring- oder Drehkrankheit der Schafe, verschiedene Pestiviren, wie das Klassische Schweinepestvirus, das Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease-Virus sowie das Border Disease-Virus der Schafe [8,9]. Diese animalen Pathogene sind von großer ökonomischer Bedeutung, vor allem in der Viehwirtschaft. Innerhalb der Familie der *Flaviviridae* zeigen die Pestiviren größere Gemeinsamkeiten zu den Hepaciviren bezüglich der Genomstruktur und der Translation, als die Flaviviren. Aus diesem Grund hat die Forschung an Pestiviren großes Interesse bei der Suche nach einem Surrogatsystem für Hepaciviren erlangt [9].

Filtrations- und Gelchromatographieanalysen weisen auf einen Durchmesser der Hepatitis C-Viruspartikel von etwa 50 nm Durchmesser hin, was dem der anderen *Flaviviridae* entspricht [10]. Dem HCV ist das GB-Virus Typ B (GBV-B) ähnlich, das

eine Hepatitis bei Tamarinäffchen hervorruft. Entfernter verwandt sind GBV-A verschiedener Neuweltaffen und GBV-C des Menschen [11,12].

Die Virushülle von HCV umschließt ein Core-Partikel, das aus dem Core-Protein und der einzelsträngigen Genom-RNA mit etwa 9.600 Basen gebildet wird. Wegen der geringen Mengen an HCV, die aus Plasma isoliert werden können, und wegen fehlender effektiver Anzuchtssysteme ist das Hepatitis C-Virus bisher nur unvollständig untersucht. Ein hypothetisches Modell des Virus ist in Abbildung 1.1 gezeigt. Das 9.6 kB grosse RNA-Genom enthält an seinem 5' und 3' Ende RNA-Strukturen, die für Translation und Replikation essentiell sind. Die Translation des offenen Leserahmens führt zu einem Polyprotein von ungefähr 3000 Aminosäuren. Dieses Polyprotein wird während und nach der Translation durch Wirts- und virale Proteasen gespalten, wobei zehn Proteine entstehen, die das Virion und die virale Replikationsmaschinerie bilden. Die Organisation des HCV-Genoms sowie dessen Translation und Replikation sind in Abbildung 1.2 und Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

Die Replikation des HCV findet vor allem in der Leber statt, während einer akuten Infektion sollen bis zu 10 Prozent der Hepatozyten die HCV-Vermehrung gewährleisten. Angesichts der sehr hohen Rate an extrahepatischen Manifestationen der Erkrankung wird angenommen, dass das Virus auch andere Zellen und Gewebe infiziert [13]. So wurde von B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten, Zellen der Lymphknoten und des Verdauungstraktes berichtet, dass sie HCV-RNA (Replikationsstufen wie minus-Strang RNA) enthielten.

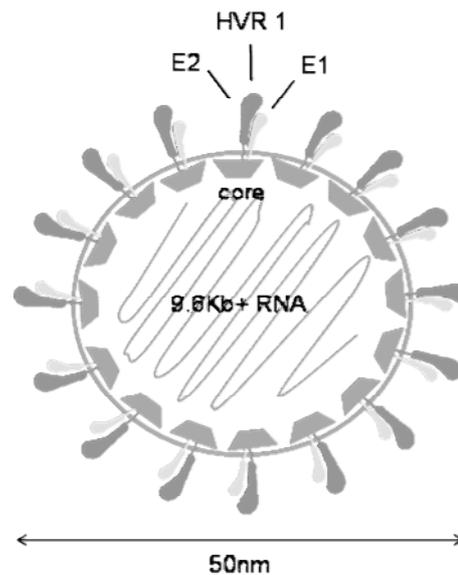


Abbildung 1.1: Hypothetisches Modell des Hepatitis C-Virus. In seiner Lipidhülle enthält das Virus die Glykoproteine E1 und E2 und im Inneren der Lipidhülle die genomische RNA, assoziiert mit dem Core-Protein. Ein im E2-Protein exponierter Proteinsequenzabschnitt wird als hypervariable Region 1 bezeichnet (HVR1) [14].

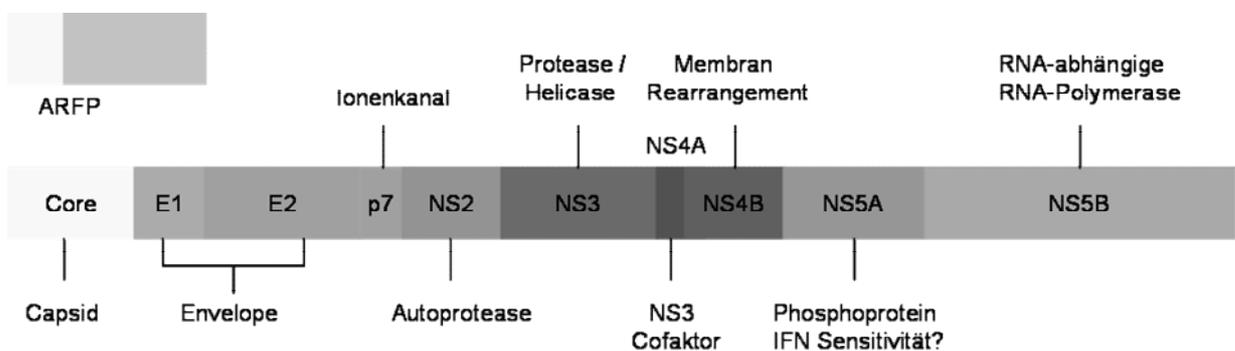


Abbildung 1.2: Die Organisation des HCV-Genoms. Die HCV-RNA kodiert ein Polyprotein von ungefähr 3000 Aminosäuren. Das Polyprotein wird, wie oben dargestellt, während und nach der Translation durch Wirts- und Virusproteasen in zehn Proteine gespalten (Core-NS5B). Die bekannten Funktionen sind neben dem jeweiligen Protein beschrieben. ARFP könnte als Ergebnis eines translationalen Frameshift produziert werden (modifiziert nach Dustin und Rice [13]).

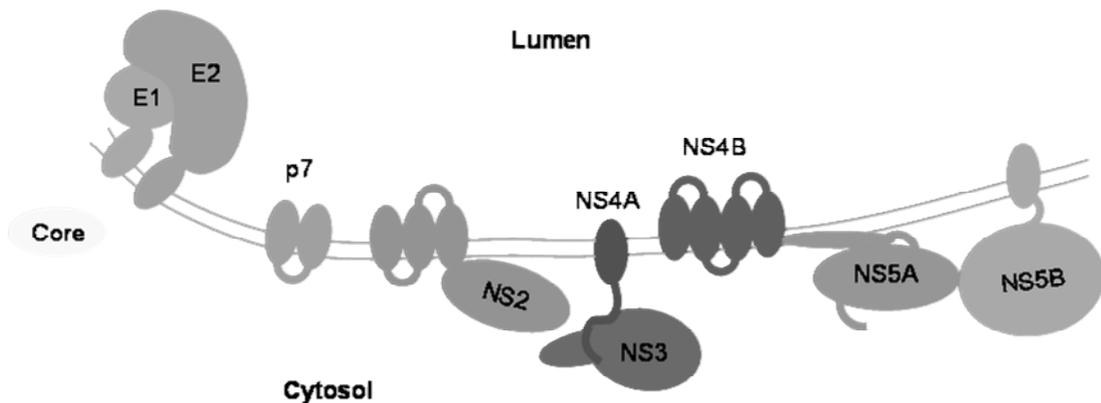


Abbildung 1.3: Translation und Replikation. Die HCV-Translation und -Replikation findet in Assoziation mit Membrankompartimenten statt, von denen man annimmt, dass sie zum Endoplasmatischen Retikulum gehören. In dieser Abbildung ist die Orientierung der verschiedenen viralen Proteine relativ zum Cytosol und dem Lumen dieses Kompartiments dargestellt (modifiziert nach Dustin und Rice [13]).

1.3 HCV Quasi-Spezies

Durch biologische Selektion und immunologischen Druck im Wirtsorganismus entwickeln sich aus einem oder mehreren Vorläuferviren nach der Infektion durch Mutationen zahlreiche HCV-Quasispezies. Diese präsentieren sich normalerweise in einer prädominanten Variante und einer Mischung von genetisch eindeutig nah verwandten Quasi-Spezies. Dies kann zu Veränderungen des Zelltropismus, der Pathogenität und der Resistenz gegen antivirale Substanzen führen. Zu sehr ausgeprägten Nukleotid-Mutationen kommt es vor allem innerhalb des Envelope-Gens 2 (E2) in der hypervariablen Region 1 (HVR1). Die hohe genetische Variation ist eine Konsequenz der relativ geringen Genauigkeit der viralen RNA-Polymerase und der hohen Replikationsrate des Virus. Daher wird die Immunantwort, die hauptsächlich auf das Envelope-Protein reagiert, als die bedeutendste Ursache angesehen, die zu einer Selektion neuer HVR1 Varianten von HCV führt und somit zu einer Persistenz des Virus beisteuert. Die Variationen der T-Zellepitope könnten einen Mechanismus der viralen Persistenz repräsentieren [15-19].

1.4 Modellsysteme zur Untersuchung der Virus-Wirt-Zellinteraktion

1.4.1 Tierversuche

Seit der Entdeckung des Hepatitis C-Virus 1989 war der Schimpanse das einzige Modell zu dessen Erforschung. Aufgrund der hohen Kosten und vor allem der ethischen Implikationen wurden Untersuchungen nur eingeschränkt durchgeführt.

Studien an Schimpansen spielten eine wichtige Rolle bei der Entdeckung von HCV und sind immer noch die einzige Methode zur Untersuchung der Pathogenese von Hepatitis C. Solche Untersuchungen ergaben einen neuen Einblick in die Natur vor allem der intrahepatischen Immunantwort des Virusträgers. Es ist das einzige Modell, um den natürlichen Verlauf von Hepatitis C, sowie virale und Wirtsfaktoren während der frühen akuten Phase einer Infektion außerhalb des Menschen nachzuvollziehen.

Über Reinfektionen von Tieren, die das Virus schon einmal eliminiert hatten, konnten Daten über eine protektive Immunität gesammelt werden. Solche Analysen haben gezeigt, dass eine zuvor erfolgreich überwundene Infektion keine schützende Immunität bietet. Bei homologer Reinfektion ist die erneute Virämie zwar deutlich verkürzt, bei heterologer Reinfektion kann sich jedoch eine persistierende Infektion entwickeln [20-23]. Auch zur Untersuchung von Escape-Mutationen wird dieses Tiermodell eingesetzt, da die Nukleotidsequenz des inokulierten Virus bekannt ist und der genetische Polymorphismus innerhalb der MHC-Komplexe kontrolliert werden kann [24].

Eine akute experimentelle HCV-Infektion in Schimpansen ist durch das frühe Auftreten einer Virämie, meist bis spätestens zum siebten Tag gekennzeichnet, mit bis zu 10^5 - 10^7 Kopien/ml. Antikörper gegen HCV-Proteine können selten vor der achten Woche gemessen werden. Die meisten akut infizierten Schimpansen haben Anzeichen einer Hepatitis mit erhöhten Leberenzymwerten im Serum und nekroinflammatorischen Veränderungen in Leberbiopsie-Proben. Typischerweise verläuft die Erkrankung etwas milder als beim Menschen. Ein Teil der experimentellen akuten Erkrankungen kann überwunden werden, wobei die meisten Tiere jedoch eine chronische Hepatitis C entwickeln, die durch eine persistierende Virämie, Seropositivität gegen zahlreiche Antigene und eine milde Hepatitis gekennzeichnet ist.

Meist erfolgt die Infektion über direkte Inokulation von genomischen RNA-Transkripten in die Leber, die *in vitro* aus komplementärer DNA synthetisiert werden. Eine so generierte Infektion unterscheidet sich nicht wesentlich von einer intravenösen mit Originalvirus. Sie vereinfacht aber die Untersuchung von HCV, weil die Interaktion mit dem Wirt nicht durch Quasi-Spezies beeinflusst wird, wie es bei natürlichen Infektionen der Fall ist [20,25].

Major et al. [26] gaben so am Beispiel von zehn Schimpansen, die mit dem wichtigsten HCV-Stamm-Prototypen, Stamm H77, infiziert wurden, eine detaillierte Beschreibung der Viruskinetik in Relation zur Erkrankung, der Immunantwort und des Ergebnisses der Infektion.

Die hohe Chronizitätsrate ist das charakteristische Merkmal der HCV-Infektion, auch bei Schimpansen. So entwickeln circa 80 Prozent infizierter Menschen und zwischen 30 und 60 Prozent der Schimpansen eine persistente Infektion.

1.4.2 Weitere Tiermodelle

Xie et al. [27] versuchten 1998, Tupaias (*T. belangeri chinensis*), eine Spezies die für das Hepatitis B-Virus empfänglich ist, mit HCV zu infizieren. Nur ein Viertel der Tiere konnte infiziert werden und entwickelten entweder eine transiente oder intermittierende Virämie mit nur niedrigem Virustiter. Andere Primaten scheinen für HCV nicht empfänglich.

Neuerdings konnte ein Kleintiermodell basierend auf transgenen Mäusen mit chimären Maus-Menschen-Lebern etabliert werden. Allerdings ist das Züchten solcher homozygoten Alb-uPa Tiere wegen der Toxizität der Transgene sehr schwierig und die Transplantation primärer humaner Hepatozyten in die Mäuse wenige Tage nach der Geburt technisch sehr aufwändig [28].

1.4.3 Zellkultursysteme für HCV

Es wurden verschiedene Zellkultursysteme basierend auf der Infektion primärer Zellkulturen oder Zelllinien oder der Kultivierung primärer Zellen von chronisch infizierten Patienten entwickelt. Diesen Systemen mangelt es jedoch an Reproduzierbarkeit, das HCV kann nur in geringem Maße repliziert werden.

Da primäre Zellkulturen nicht routinemäßig eingesetzt werden können, wurden viele Versuche mit Zelllinien humanen Ursprungs unternommen. Hohe Replikationsraten

konnten in der T-Zelllinie MT-2 und MOLT-4 sowie der B-Zelllinie Daudi erreicht werden [29].

Cai *et al.* [30] entwickelten eine stabile humane Hepatomzelllinie (Huh7), die chromosomal integrierte cDNA enthält und konstitutiv infektiöses Virus produziert.

Chong *et al.* [31] konnten sphäroide Hepatomzell-Formationen erfolgreich mit HCV-Serum infizieren, was als weiteres Untersuchungsmodell dienen könnte.

Mit der Entwicklung des Replicon-Systems 1999 durch Lohmann *et al.* [32] wurde ein gut definierbares und in hohen Quantitäten produzierendes Untersuchungssystem geschaffen. Hierbei repliziert geklontes Virusgenom sehr effizient in humanen Hepatomzelllinien. So können ganze Genome sowie verschiedene Varianten detailliert auf virale Funktionen und die Wirkung von Medikamenten untersucht werden [33-35].

Ein weiteres Modellsystem zur Untersuchung der Virushülle und ihrer Interaktion mit der Zielzelle stellen nicht infektiöse Virus-ähnliche Partikel dar. Die Expression von HCV-Strukturproteinen in Insektenzellen führt zur Bildung HCV-ähnlicher Partikel. Diese haben ähnliche morphologische, antigene und biophysikalische Eigenschaften wie HCV-Partikel aus dem menschlichen Plasma oder der Leber [36]. An ihnen konnten die verschiedenen Schritte der Infektion der Zelle untersucht werden, es war aber nicht möglich, einen Einblick in den Viruszusammenbau und die Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle zu gewinnen. Dies hat sich mit der Etablierung eines neuen Zellkulturmodells der HCV-Infektion durch Bartenschlager *et al.* [37] geändert, welches initial auf Klonen des HCV-Genoms mit ungewöhnlich robuster Replikationsfähigkeit in Zellkulturen basiert. Das produzierte Virus aus diesem System ist sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* infektiös.

1.4.4 Das bovine Virusdiarrhoe-Virus als Surrogatmodell für antivirale Testungen

Zur Untersuchung neuer Chemotherapeutika gegen HCV wird oftmals das nahe verwandte Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) als Surrogatmodell eingesetzt [38-40]. So verwendeten Durantel *et al.* und Jacob *et al.* [41,42] persistent mit BVDV infizierte Zellen, um den antiviralen Effekt von IFN- α , Ribavirin und Iminozuckerderivaten zu untersuchen. Stuyver *et al.* [40] verwendeten eine solche Zellkultur als Kontrolle zum HCV-Replicon-System.

Ferron *et al.* [43] diskutieren BVDV als Surrogatmodell, da sich die Struktur der RNA-abhängigen RNA-Polymerase zwischen BVDV und HCV in einigen Punkten zu

unterscheiden scheint. Sie postulieren das GB-Virus C als besser geeignet für antivirale Analysen, da die beiden Viren genetisch näher miteinander verwandt sind.

1.4.5 Untersuchung der zellvermittelten Immunreaktionen gegen HCV

Mit der Durchflusszytometrie ist die Messung und graphische Darstellung der Zytokinproduktion, des Differenzierungs- und des Aktivierungsstatus jeder individuellen Zelle möglich. Die Darstellung erfolgt entweder intrazellulär oder an der Zelloberfläche, nachdem die Zytokine an eine Affinitätsmatrix gebunden und gefärbt wurden.

Da Zytokine als Polypeptidhormone in die Regulation von Wachstum, Differenzierung und Funktion von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen involviert sind und sowohl normale als auch pathologische Immunantworten beeinflussen können, lassen sich aus der Messung des Antigen-spezifischen Zytokinmusters wertvolle Informationen über Zustand und Funktion des Immunsystems ableiten. Die durchflusszytometrische Analyse erlaubt die individuelle Charakterisierung großer Zellzahlen und die Darstellung der Heterogenität einer Zellpopulation.

Die Mehrfarbenfärbung kann die Expression verschiedener Zytokine in der einzelnen Zelle darstellen. Die Messung intrazellulärer Zytokine erfolgt durch Markierung mittels fluorochromkonjugierter monoklonaler Antikörper nach Stimulation der Leukozyten mit einem Antigen. Normalerweise produzieren unstimulierte Leukozyten wenig oder keine Zytokine. Nach Stimulation mit einem Antigen kann die Antigen-spezifische Expression verschiedener Zytokine als Ausdruck der Lymphozytenaktivierung und Effektorfunktion gemessen werden [44].

Außerdem kann die *de novo*-Expression von Aktivierungsmarkern wie CD69, die mit unterschiedlicher Kinetik nach spezifischer T-Zellstimulation exprimiert werden, zur Evaluierung Antigen-spezifischer T-Zellantworten genutzt werden. CD69 ist eines der frühesten Oberflächenantigene, das von T-Lymphozyten nach ihrer Aktivierung exprimiert wird. Innerhalb einer Stunde nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors kann CD69 gemessen werden, es ist funktionell mit der Proliferation von T-Zellen assoziiert [45-50].

Die Markierung von Oberflächenmarkern, wie CD3, CD4 und CD8 erlaubt die Differenzierung der Lymphozytenpopulation und ihrer Subpopulationen, die gleichzeitige Darstellung ihres Aktivierungsstatus (CD69) sowie ihrer Effektorfunktion

(Zytokine). Mittels Durchflusszytometrie können Leukozytensubpopulationen identifiziert und beurteilt werden und somit auch systemische Veränderungen des Immunsystems abgeschätzt werden. Es können ganz spezifisch diejenigen Lymphozyten analysiert werden, die direkt in die Immunreaktion gegen ein bestimmtes Antigen involviert sind, auch wenn diese nur in sehr geringen Frequenzen vorkommen [45].

Da man von Hepatitis C annimmt, dass die zelluläre Immunantwort eine zentrale Rolle bei der Elimination des Virus oder der Entwicklung einer chronischen Infektion und der Pathogenese von Hepatitis C spielt, kann die Durchflusszytometrie Aufschluss über Rolle, Funktion und Bedeutung der zellulären Immunantwort geben und so zum besseren Verständnis der Erkrankung beitragen.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Testsystems, mit dessen Hilfe HCV-spezifische T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie gemessen werden können und so ein Beitrag zum besseren Verständnis der Immunantwort gegen das Hepatitis C-Virus geleistet werden kann. Mit einem solchen Test können Studien an HCV-Patienten durchgeführt werden, um Frequenzen, Spezifität und die Effektorfunktion von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten bei akut und chronisch Erkrankten, sowie bei therapierten Patienten zu detektieren.

Wertvolle Einblicke in die virusspezifische Immunantwort könnte das System des Lymphozytenstimulationstestes auch bei weiteren verwandten humanen, aber auch animalen Viren geben, wie das Klassische Schweinepest-Virus, das Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD)-Virus oder das Border Disease-Virus des Schafes.

Das bessere Verständnis der zellulären Immunantwort kann zur Entwicklung von Impfstoffen sowie zur Prävention und Therapie einer Erkrankung entscheidend beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Die heparinisierten Vollblutproben (n = 97) von 88 Patienten mit einer Hepatitis C–Virusinfektion wurden vor, während oder nach einer Therapie in der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Frankfurt am Main zwischen 2004 und 2005 im Rahmen der Routineuntersuchungen der Gastroenterologischen Ambulanz entnommen und freundlicherweise von Frau Dr. med. G. Teuber zur Verfügung gestellt. Die Diagnose einer Hepatitis C basierte auf folgenden Kriterien:

1. Anti-HCV positiver Status;
2. Positiver Nachweis von HCV-RNA im Serum mittels HCV-spezifischer RT-PCR;
3. Anamnese.

Mögliche andere Ursachen einer akuten oder chronischen Hepatitis wie z.B. andere virale Hepatitiden, Autoimmunhepatitis, alkoholische Lebererkrankung, toxische oder metabolische Ätiologien wurden durch entsprechende Untersuchungen ausgeschlossen. Als Kontrollen wurden Blutproben von 11 gesunden Probanden (Anti-HCV negativ) verwendet.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tip One Filter Tips, 0.1-10 µl, 1-100 µl, 1-200, 101-1000 µl	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Falcon 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Costar Stripette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, New York, USA
Mikroröhre mit Verschluss, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotubes, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Combitips plus 1,0 ml, 5 ml, 10 ml 50 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
5 ml NH ₄ - Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1,8 ml Nunc Cryotube TM Vials	Nunc, Roskilde, Dänemark
2.1.3 Chemikalien, Lösungen, Puffer	
Aqua ad injectabilia	Delta Select GmbH, Dreieich
Aqua bidest.	Milli-Q biocel, Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Bovine Serum Albumin, FractionV, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Fastimmune Brefeldin A Solution (BFA)	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Lysing Solution (10x)	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Permeabilizing Solution 2 (10x)	BD Biosciences, San Jose, USA
Glycine	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Humanes Serum	Blutspendedienst der Wolfgang- Goethe-Universität
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)	Sigma, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Sterile Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tritriplex III	Merck, Darmstadt, Deutschland

Lösungen, Puffer:**PBS 10x Konzentrat:**

95,5 g Trockenmedium wurde in Aqua ad injectabilia auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Lagerung bei RT.

PBS 1x:

50 ml PBS 10x Konzentrat wurden mit 450 ml Aqua ad injectabilia verdünnt und anschließend bei RT aufbewahrt.

EDTA-Lösung:

0,077 g Tritriplex wurden mit 0,01 g Natriumacid in 10 ml PBS gelöst. Lagerung bei 4°C.

Paraformaldehyd-Fixationslösung 1%:

400 ml Aqua bidest wurden zu 600 ml 1x PBS gegeben und 10 g Paraformaldehyd darin gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert und aliquotiert. Lagerung bei -20°C, einzelner im Gebrauch befindlicher Aliquots bei 4°C.

Waschpuffer:

10 g BSA wurden in 200 ml 10x PBS gelöst und mit Aqua bidest. auf 2000 ml aufgefüllt. Der Puffer wurde steril filtriert und bei RT gelagert.

Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)-Stammlösung:

50 mg/ml Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) in werden in sterilem Aqua ad injectabilia gelöst. Lagerung bei -20°C.

“unstimulierte Kontrolle” - Proteinpuffer:

30,29 mg Tris, 142,6 mg Glycin und 50 µl 20% SDS wurden in 10 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend steril filtriert. Lagerung bei 4°C.

2.1.4 Antikörper

Zum Nachweis der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, dem Aktivierungsmarker CD69 sowie der verschiedenen Zytokine wurden fluorchromkonjugierte monoklonale Antikörper von BD Biosciences eingesetzt. Die verschiedenen verwendeten Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Bei der FACS - Färbung verwendete Antikörper.

Antikörper	Clon	Hersteller
anti-CD28 Pure	L293	BD Biosciences, San Jose, USA
anti-CD49d Pure	L25	BD Biosciences, San Jose, USA
Fastimmune IFN- γ / CD69/ CD8/ CD3	25723.11, L78, SK1, SK7	BD Biosciences, San Jose, USA
Fastimmune γ 2a/ γ 1/ CD8/ CD3	X39, X40, SK1, SK7	BD Biosciences, San Jose, USA
Fastimmune IFN γ / CD69/ CD4	25723.11, L78, SK3	BD Biosciences, San Jose, USA
Fastimmune γ 2a/ γ 1/ CD4	X39, X40, SK3	BD Biosciences, San Jose, USA
APC-rat anti-human IL-4	MP-4 25D4	BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
APC Rat IgG1, κ	R3-34	BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
APC-rat anti-human IL-10	JES3-19F1	BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
APC Rat IgG2a, κ	R35-95	BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA

2.1.5 Antigene

Als Antigene zur Stimulation der Vollblutproben wurden das NS3- und Core-Protein des Hepatitis C-Virus, sowie HCVpp eingesetzt. Die Aminosäuresequenzen der rekombinanten HCV-Proteine sind in Tabelle 2.2 erfasst.

2.1.5.1 Proteine:

- rekombinantes NS3-Protein des Hepatitis C-Virus Mikrogen GmbH, Martinsried, Deutschland
- rekombinantes Core-Protein des Hepatitis C-Virus Mikrogen GmbH, Martinsried, Deutschland
- Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) siehe auch 2.1.3 Chemikalien, Lösungen, Puffer

Die Expression der rekombinanten HCV-Proteine NS3 und Core erfolgte in einem E.coli K12 Expressionssystem. Die unlöslichen Einschlusskörper wurden mehrfach

gewaschen, die Proteine in 8-molarem Harnstoff gelöst und anschließend chromatographisch über mehrere Stufen aufgereinigt (mittels Ionenaustausch und hydrophobe Interaktion). Nach einer abschließenden Elektrophorese lagen die Proteine in einem 0,1 % SDS-Puffer vor.

Die Reinheitskontrolle erfolgte über Westernblotting und Detektion mit anti-E.coli-Hyperimmunserum (DAKO). Die Proteine waren zu >99,9 % frei von E.coli-Kontaminationen.

Tabelle 2.2: Die Aminosäuresequenzen der eingesetzten rekombinanten Proteine (Mikrogen).

Protein	Aminosäuresequenz
<p style="text-align: center;">NS3</p> <p>Aminosäuren #1007 - #1534</p>	<p>GREILLGPADGMASKGWRLAPITAYAQQTRGLLGCIITSLTGRD KNQVEGEVQIVPTAAQTFLATCINGVCWTVYHGAGTRTIASPKG PVIQMYSNVKDLVWGPAPQGSRS LAPCTCGSSDLYLVTKHAD VIPVRRRGDSRGSLLSPRPISYLGSSGGPLLCPVGHAVGIFRAA VCTRGVAKAADFIPVENLETTMRSPVFTDNSSPPVVPQSFQVAH LHPTGSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVLPNSVAATLFGAYMSKA HGIDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCAGGAYDIIICDEC HSTDATSILGIGTVLDQGETAGAKLVVFATATPPGSVTVPHPNIEE VALSTTGEIPFYGKAIPLEVIKGRHLIFCHSKRKCDELATKLVAM GINAVAYYRGLDVS VIPTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDSVIDCN TCVTQTVDFSLDPTFTIETTTLPQDAVSRTQRRGRTGRGKPGIYR FVAPGERPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAE</p>
<p style="text-align: center;">Core</p> <p>Aminosäuren #1 - #115</p>	<p>MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPR LGV RAPRKT SERSQPRGRRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPL YGNEGCGWAGWLLSPRGRPSWGPTDPRRR</p>

2.1.5.2 Pseudotypen:

Die Pseudotypen wurden von Frau Tierärztin Kerstin Pfaff aus dem Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt.

Es wurden Lentivirale Core-Partikel hergestellt, die an ihrer Oberfläche unmodifizierte HCV 1a E1- und E2-Hüllglykoproteine tragen (Abbildung 2.1). Das Plasmid, welches für die HCV-Hüllproteine codiert (strain H) wurde freundlicherweise von Herrn F. Cosset, Lyon, zur Verfügung gestellt [51]. Für die Herstellung der Pseudotypen wurden 293 T-Zellen transient mit Expressionsvektoren transfiziert, wovon einer die Komponenten für die HCV-Virushülle (E1 und E2) enthielt. Der Überstand wurde gesammelt und durch Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die so erhaltenen Pseudotypen sind zwar infektiös, aber replikationsinkompetent. Die HCVpp lagen in einer Konzentration von 10.000 TU/ml vor.

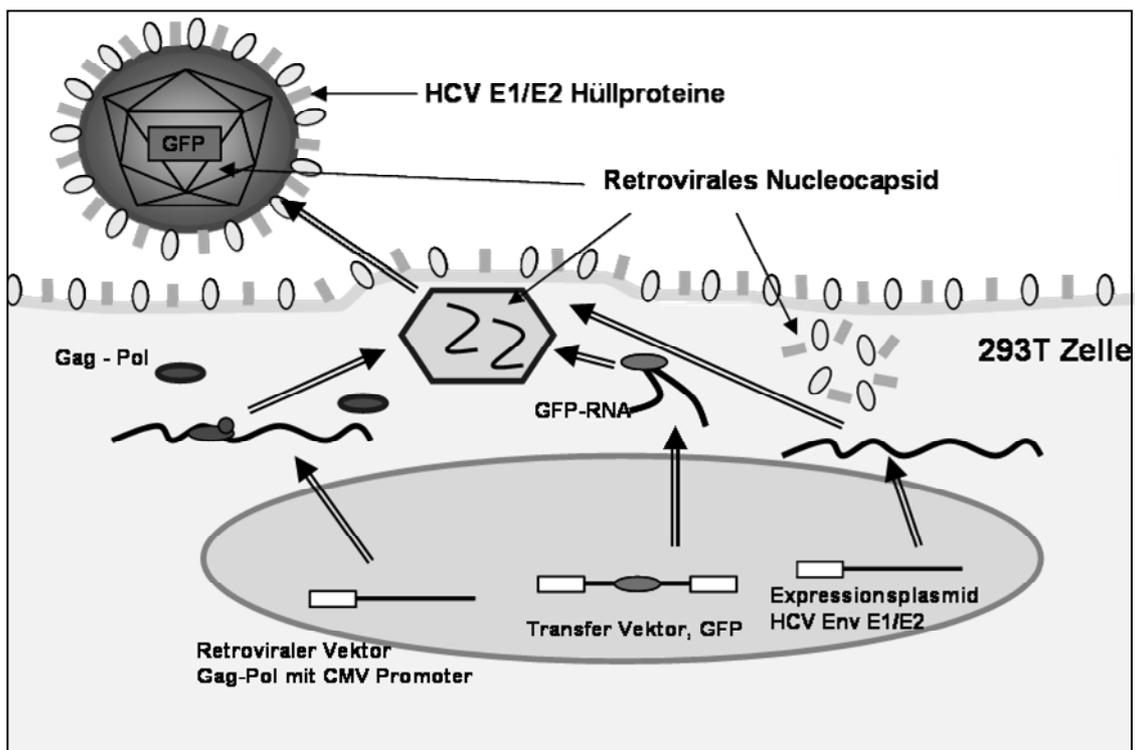


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Herstellung der HCV-Pseudotypen. 293 T-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren transfiziert, wovon einer die Komponenten für die Virushülle enthielt. GFP diente als Reporter-Gen. Der Überstand wurde gesammelt und durch Ultrazentrifugation aufgereinigt (modifiziert nach A. Berger).

2.1.5.3 Verwendete Geräte und Software

Bürker Zählkammer	Optik Labor, Deutschland
Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Multipipette® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACSCalibur-Durchflusszytometer	Becton Dickinson, San Jose, USA
Laminar-Flow-Box Hera safe	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Phaser 750 Laserdrucker	Tektronix Inc., Wilsonville, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences
Zentrifuge 48R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Cell Quest ^{Pro}	Becton Dickinson, San Jose, USA
Microsoft Office XP	Microsoft Corp., Redmont, CA, USA
SPSS für Windows	SPSS Inc., Chicago, USA
WinBIAS	Hanns Ackermann, 1998, Universität Frankfurt, Deutschland
Reference Manager® 10	Thomson Research Soft., Carlsbad, CA, USA

2.2 Methoden

Zur Bestimmung der HCV-spezifischen Immunantwort wurden Vollblutproben von HCV-Patienten mit rekombinanten HCV-Proteinen und HCV-Pseudotypen stimuliert und die aktivierten T-Lymphozyten mittels fluorchromkonjugierter monoklonaler Antikörper gegen intrazellulär akkumulierte Zytokine und Oberflächenmoleküle in der durchflusszytometrischen Messung bestimmt [49].

2.2.1 Antigenstimulation der Vollblutproben

Das Protokoll für die Lymphozyten-Stimulation basiert auf dem Fast Immune™ Assay System von Becton Dickinson und wurde zur Optimierung der Ergebnisse für die HCV-spezifische Analyse variiert [52-55].

Die Blutprobe eines Patienten wurde zunächst in mehrere Stimulationsansätze aufgeteilt und mit den verschiedenen Antigenen (HCV-Protein, HCVpp) und den entsprechenden Kontrollen (Proteinpuffer, VSVpp) für sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Das nach einer Stunde hinzugefügte Brefeldin A (BFA) bewirkt die Akkumulation der Zytokine in der Zelle. Danach wurden die Proben über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgten die Färbung mit fluorchrommarkierten Antikörpern und die Messung im Durchflusszytometer.

2.2.1.1 Durchführung

Die hier beschriebene Durchführung der Antigenstimulation und der Färbung der Proben wurde im Folgenden bei allen Patientenproben durchgeführt. Sofern es Abweichungen von diesem Protokoll gab, wird im Text explizit darauf hingewiesen.

750 µl venöses Vollblut pro Ansatz wurden in Polypropylen-Reaktionsgefäßen aliquotiert. Es erfolgte jeweils ein Ansatz für:

- § CD8 unstimulierte Kontrolle und CD8 Isotypenkontrolle
- § CD4 unstimulierte Kontrolle und CD4 Isotypenkontrolle
- § CD8 und CD4 Proteinstimulation
- § CD8 und CD4 HCVpp-Stimulation
- § CD8 und CD4 VSVpp-Stimulation

Die Proteinstimulation erfolgte mit 10 µg/ml NS3- und Core-Protein. Zu den Kontrollansätzen wurde die gleiche Menge des Proteinpuffers pipettiert, wie auch das jeweilige Protein zu den stimulierten Proben gegeben wurde, d.h. 25 µl für die Kontrolle von NS3 und 11 µl für den Kontrollansatz von Core. Zur Bestimmung der für ein optimales Stimulationsergebnis notwendigen Pseudotypenmenge wurde die Konzentration der HCVpp zu Beginn der Experimente bei drei Patientenproben titriert. Die Resultate sind detailliert im Ergebnisteil dargestellt (siehe 3.1.4 Bestimmung der Antigenmenge). Aufgrund dieser Daten wurden in allen weiteren Versuchen 400 TU/ml Stimulationsansatz HCVpp sowie als Kontrolle VSVpp eingesetzt.

Zu jedem Ansatz wurden außerdem als Co-Stimulanzen die Antikörper anti-CD28 und anti-CD49d in einer Endkonzentration von 10 µg/ml hinzupipettiert. Die effektive Stimulation von T-Zellen hängt von der Aktivierung über den T-Zellrezeptor aber auch von co-stimulatorischen Signalen ab, die über Zelloberflächenmoleküle vermittelt werden. Sie werden für die optimale Expression der T-Zellfunktion benötigt und vermitteln die Adhäsion zwischen T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen und/oder die Signaltransduktion [56].

CD28 ist ein co-stimulatorischer Rezeptor der T-Lymphozyten, der zur Immunglobulin-superfamilie gehört und dessen Bindung zur klonalen Vermehrung naiver T-Zellen und ihrer Differenzierung zu bewaffneten Effektorzellen führt [57,58].

Ruhende Lymphozyten, Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche unter anderem drei β_1 (CD29) Integrine, die als Rezeptoren für extrazelluläre Matrixkomponenten und endothelialer Zellen zur Vermittlung effizienter Zell-zu-Zell Interaktionen dienen. Zu diesen gehört neben CD49e (very late activation antigen 5 α , VLA-5 α) und CD49f (very late activation antigen 6 α , VLA-6 α) das CD49d (very late activation antigen 4 α , VLA-4 α). Diese VLA-Heterodimere werden vor allem von Memory-T-Zellen exprimiert, in geringerem Anteil auch von naiven T-Zellen. Die Interaktion von CD49d mit Fibronectin und dem endothelialen Adäsionsprotein VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) übt ebenfalls ein co-stimulatorisches Signal auf die T-Zelle aus [56].

Die Proben wurden nach Zugabe dieser Co-Stimulanzen gevortext und anschließend im Thermoblock bei 37°C inkubiert.

Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes wurden bei sieben Proben verschiedene Inkubationszeiten vor BFA-Zugabe ausgetestet. Die Resultate sind im Ergebnisteil dargestellt (siehe 3.1.2 Zeitpunkt der Brefeldin-A-Zugabe). Auf Grundlage dieser Versuche wurde bei allen weiteren Blutproben nach einer Stunde 20 µl/ml des Sekretionshemmers (1:10 Verdünnung der BFA-Stammlösung in PBS) zugegeben, um die verschiedenen Zytokine im Lymphozyten-Stimulationstest intrazellulär nachweisen zu können. Brefeldin A ist ein makrozyklisches Lacton, das von verschiedenen Pilzen synthetisiert wird. Es verhindert den Transport von Protein vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und inhibiert somit die Proteinsekretion der behandelten Zellen [59]. So können die aufgrund der Stimulation gebildeten Zytokine in der Zelle akkumulieren. Nach weiteren fünf Stunden Inkubation nach BFA-Zugabe wurden die Proben im Thermoblock automatisch auf 4°C abgekühlt und über Nacht aufbewahrt.

2.2.2 Färbung der antigenstimulierten Vollblutproben

Die über Nacht bei 4°C gelagerten Proben wurden am nächsten Tag weiterbearbeitet. Hierzu wurden zunächst die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Färbung mittels fluorochrommarkierter Antikörper (Abbildung 2.2).

2.2.2.1 Durchführung

Zu den stimulierten Proben wurden 70 µl EDTA-Lösung hinzugefügt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen von der Röhrchenwand zu lösen. Nach 10 sec Vortexen wurden die Proben in Polystyrenröhrchen zu jeweils 200 µl aliquotiert. Durch Zugabe von 1 ml pro Probe FACS Lysing Solution (10x), die zuvor 1:10 mit Aqua ad injectabilia verdünnt wurde, wurden die Erythrozyten in der Probe 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde mit je 2 ml Waschpuffer gewaschen und bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Mit 500 µl pro Röhrchen 1:10 mit Aqua ad injectabilia verdünnter FACS Permeabilizing Solution 2 (10x) wurden die Lymphozyten permeabilisiert, um die intrazellulär akkumulierten Zytokine nachweisen zu können. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Färbung mit fluorochromkonjugierten monoklonalen Antikörpern.

Zu den antigenstimulierten CD8-Proben wurden 20 µl Fastimmune IFN- γ / CD69 / CD8 / CD3, zur dazugehörigen Isotypenkontrolle 20 µl Fastimmune γ 2a / γ 1/ CD8 / CD3, zu den antigenstimulierten CD4-Proben 20 µl Fastimmune IFN γ / CD69 / CD4 und 10 µl APC-rat anti-human IL-4 oder 20 µl Fastimmune IFN γ / CD69 / CD4 und 10 µl APC-rat anti-human IL-10, zur entsprechenden Isotypenkontrolle 20 µl Fastimmune γ 2a / γ 1/ CD4 und APC Rat IgG1, κ oder APC Rat IgG2a, κ pipettiert.

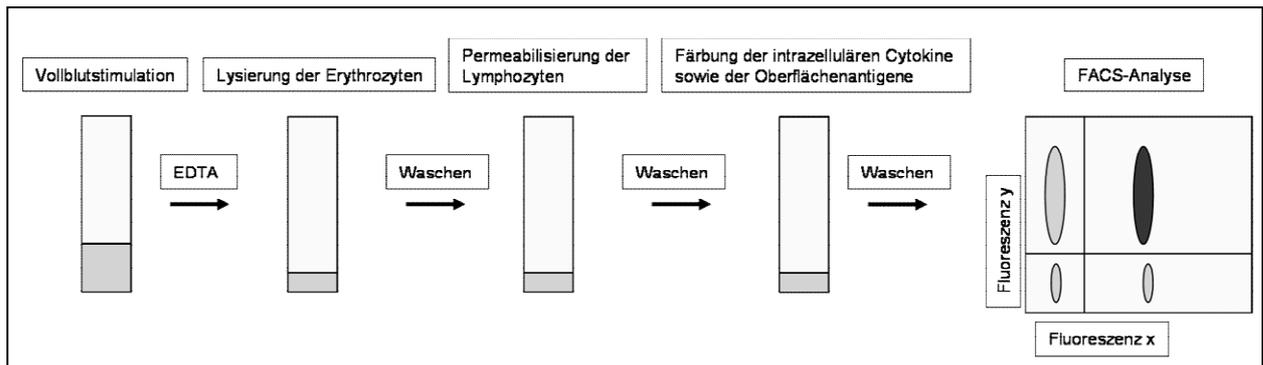


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Probenstimulation, -färbung und durchflusszytometrischen Analyse (modifiziert nach V. Maino [60]).

2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung einzelner Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle und intrazellulär akkumulierter Zytokine mit Hilfe fluorchrommarkierter monoklonaler Antikörper.

Die Zellen werden dabei in einer laminaren Strömung durch eine Messkammer geleitet. Mittels monochromatischen Laserlichts kann die Größe jeder einzelnen Zelle anhand des Vorwärtstreulichtes (Forward-Scatter, FSC) gemessen werden. Das Seitwärtstreulicht (Side Scatter, SSC) hängt zum einen von der Größe der Zelle, zum anderen von der Granularität, d.h. den inneren Strukturen der Zelle ab. Je stärker die Granularität, desto größer ist das Seitwärtstreulicht. Zusätzlich werden die Fluorochrome der gebundenen monoklonalen Antikörper angeregt. Diese emittieren daraufhin Licht eines definierten Wellenlängenspektrums, das von den Sensoren des Durchflusszytometers aufgenommen und verstärkt wird. Bei einem Vierfarben-Durchflusszytometer können so unter Verwendung vier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsmaxima sechs verschiedene

Parameter (vier Antikörper, FSC, SSC) gleichzeitig gemessen werden (Abbildung 2.3). Als Farbstoffe (siehe auch Tabelle 2.3) wurden hier Allophycocyanin (APC), Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Perdinin Chlorophyll-Protein mit Cyaninfarbstoff (PerCP-Cy5.5) und Phycoerythrin (PE) verwendet. Jede Probe wurde gemessen, bis mindestens 10.000 CD4+ oder CD8+ T-Zellen gezählt worden waren.

Tabelle 2.3: Verwendete Fluorochromkonjugate mit den entsprechenden Exzitations- und Emissionsspektren.

Fluorochrom-Konjugat	Exzitation bei Wellenlänge λ (nm)	Emission bei λ (nm)
Allophycocyanin (APC)	650	660
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	494	488
Perdinin-Chlorophyll-Protein mit Cyaninfarbstoff (PerCP-Cy5.5)	482	695
Phycoerythrin (PE)	496, 564	578

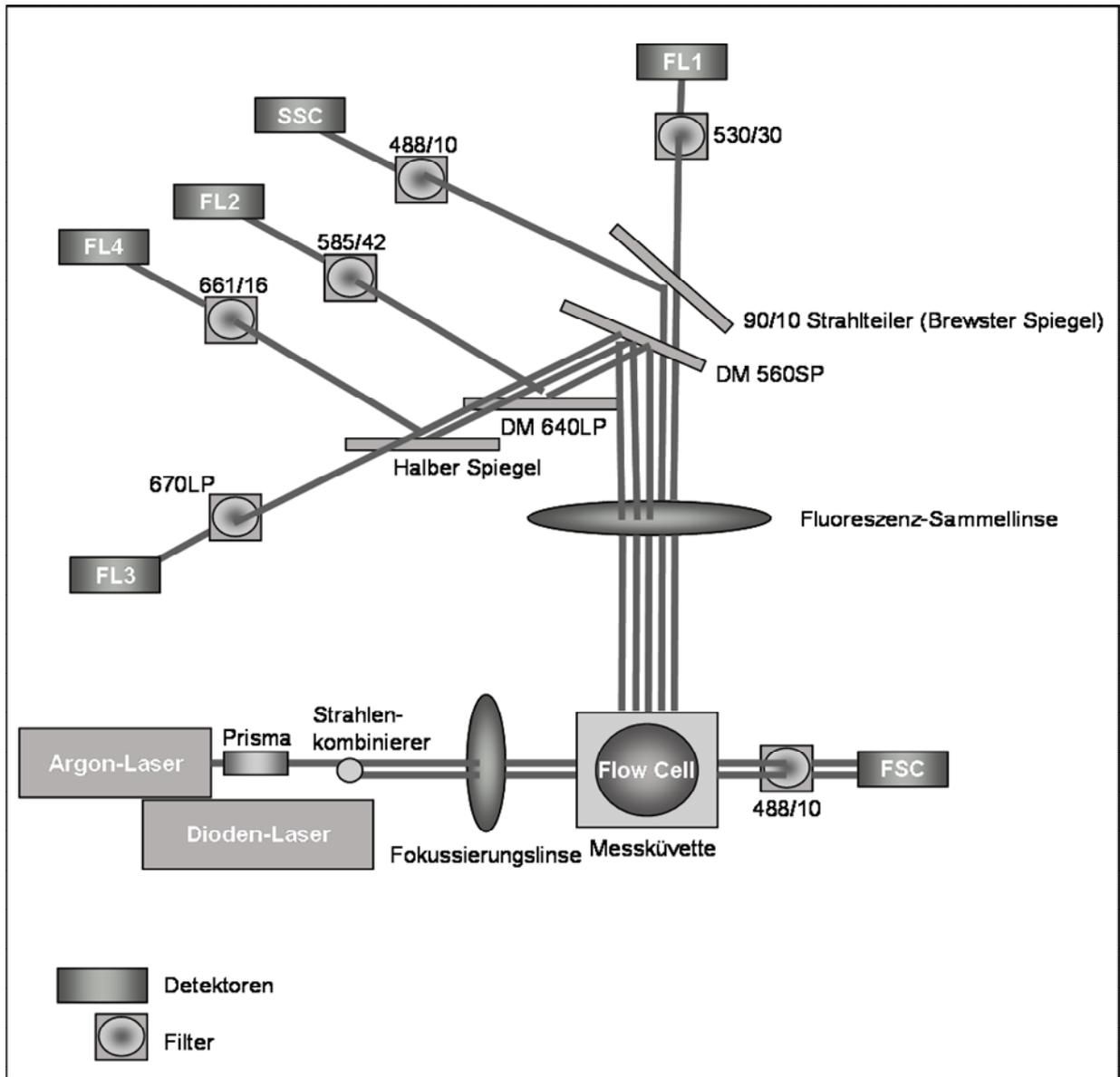


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des optischen Systems des BD

FACSCalibur™. Mit Hilfe eines Flüssigkeitssystems werden die Zellen in die Messküvette geleitet. Die Optik der Anregung besteht aus einem luftgekühlten Argonlaser (488nm) und einem Dioden-Laser (635nm). Prismen (Beam Expander) bilden und Linsen fokussieren den Laserstrahl. Die Detektionsoptik besteht aus einer Sammellinse, die das emittierte Licht im 90° Winkel sammelt. Ein System aus optischen Teiler-Spiegeln und Filtern lenkt die spezifischen Wellenlängen der emittierten Lichtsignale zu den entsprechenden optischen Detektoren. Durch diese werden die optischen Signale (Photonen) in elektronische Signale (Spannungsimpulse) umgewandelt [61].

2.2.4 Statistische Analyse

Die Messdaten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test mit Post-Hoc-Test nach Dunn und Wilcoxon-Test statistisch mit den Programmen SPSS® für Windows® und WinBiAS ausgewertet.

Die graphische Darstellung der statistischen Auswertung erfolgt mittels einfachem Boxplot-Diagramm. Dabei zeigt die untere Kante der Kästen das 1. Quartil, die waagerechte Linie innerhalb der Kästen den Median und die obere Kante das 3. Quartil. Die senkrechten Linien grenzen die größten und kleinsten Werte (ausgenommen Extremwerte und Ausreißer) ein (*Box-and-Whisker-Plot*). Des Weiteren werden zwei Arten von entlegenen Fällen dargestellt. Hierbei sind Extremwerte Fälle, die mehr als drei Kastenlängen vom oberen bzw. unteren Kastenrand entfernt liegen. Diese sind mit einem (*) gekennzeichnet. Ausreißer sind Fälle, die 1,5 bis 3 Kastenlängen vom oberen bzw. untern Kastenrand entfernt liegen. Diese sind mit einem (•) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung des Lymphozytenstimulationstests zur Messung HCV-spezifischer Lymphozyten

Eine Lymphozytenstimulation in Vollblutproben wird für unterschiedlichste Fragestellungen von zahlreichen Arbeitsgruppen eingesetzt, die in dieser Arbeit verwendeten Testparameter basieren zudem auf einem etablierten System von BD Biosciences (FastImmune Intracellular Cytokine Detection Kits) [49,50,52,53,62]. Zur optimalen Anpassung des Testsystems an die Lymphozytenstimulation von Proben HCV-positiver Spender wurden verschiedene Parameter, die in den folgenden Abschnitten erläutert werden, angepasst. Da Blutproben von HCV-Patienten nur in geringen Mengen zur Verfügung standen und von einem Patienten in der Regel nur jeweils eine Probe im Zeitraum dieser Arbeit getestet werden konnte, waren Versuche zur Validierung der Methode lediglich in begrenztem Umfang möglich. Zunächst wurden CD8⁺ IFN γ ^{+/-} (CD8 IFN- γ -) und CD4⁺ IFN γ ^{+/-} (CD4 IFN- γ -) T-Lymphozyten bestimmt und anhand dieser Ergebnisse die Testparameter für die Brefeldin-A-Zugabe, die Verwendung des Proteinantigens sowie die HCV-Pseudotypenmenge zur Stimulation spezifischer Lymphozyten festgelegt. Der Lymphozytenstimulationstest wurde später um die Messung von IL-4 und IL-10 der CD4-Lymphozyten (CD4 IL-4, CD4 IL-10) erweitert, die vorher festgelegten Parameter aber zur Erhaltung einer Konstanz und damit Vergleichbarkeit innerhalb aller Messungen beibehalten. Die gesamte Parameterwahl erfolgte vor dem Hintergrund eines möglichen standardmäßigen Einsatzes in der Routinediagnostik. Die Lymphozytenstimulation sollte somit einfach und möglichst kostengünstig durchzuführen sein.

3.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung HCV-spezifischer Lymphozyten

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte mittels Punktwolkendiagramm (Dot-Plot, siehe Abbildung 3.1 und 3.2).

Dabei entspricht jeder Punkt im Diagramm einer Zelle. Zunächst erfolgte in der Darstellung FSC gegen SSC die Diskriminierung der Lymphozytenpopulation sowie das „Live-Gating“, in dem tote Zellen und Zelltrümmer von der Analyse ausgeschlossen wurden. Die Lymphozyten wurden dann anhand ihrer Oberflächenmoleküle CD4 beziehungsweise CD3 und CD8 weiter eingegrenzt. Durch dieses Gating konnten sowohl die CD4+ T-Lymphozyten als auch die CD3+ CD8+ T-Lymphozyten dargestellt werden. Der CD3-Marker wurde benötigt, um die Lymphozyten von den ebenfalls CD8+ natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) abzugrenzen. Durch weiteres Gating wurden in der jeweiligen Population die aktivierten, CD69+, und IFN- γ -sezernierenden Lymphozyten dargestellt. Die Kombination von CD69 und einer Zytokinfärbung ermöglicht die visuelle Gruppierung und somit die prozentuale Angabe des Anteils Antigen-spezifischer T-Lymphozyten an der CD4+ oder CD8+ Lymphozytenpopulation [55,63]. Zur Analyse IL-4 oder IL-10 produzierender Zellen wurde die Zytokinproduktion der CD4-Lymphozyten im Dot-Plot anhand der Isotypenkontroll-Färbung und der Kontroll-Stimulation abgegrenzt (siehe auch Abbildung 3.1).

Die Berechnung der spezifisch aktivierten Lymphozyten erfolgte nach folgender Formel:

$$\% \text{ Aktivierte CD4+ T-Lymphozyten} = \frac{[\% \text{ Ag CD4} - \% \text{ Ag CD4 IC}] - [\% \text{ KAg CD4} - \% \text{ KAg CD4 IC}]}{[\% \text{ Ag CD4} - \% \text{ Ag CD4 IC}]}$$

Ag CD4: Antigen-stimulierte CD4+ CD69+ Interferon- γ + Lymphozyten
oder
Antigen-stimulierte CD4+ Interleukin+ Lymphozyten

Ag CD4 IC: Antigen-stimulierte CD4+ Lymphozyten Isotypenkontrolle

KAg CD4: Kontrollantigen-stimulierte CD4+ CD69+ Interferon- γ +
Lymphozyten
oder
Kontrollantigen-stimulierte CD4+ Interleukin+ Lymphozyten

KAg CD4 IC: Kontrollantigen-stimulierte CD4+ Lymphozyten Isotypenkontrolle

Diese Berechnung gilt analog für die CD3+ CD8+ T-Lymphozyten.

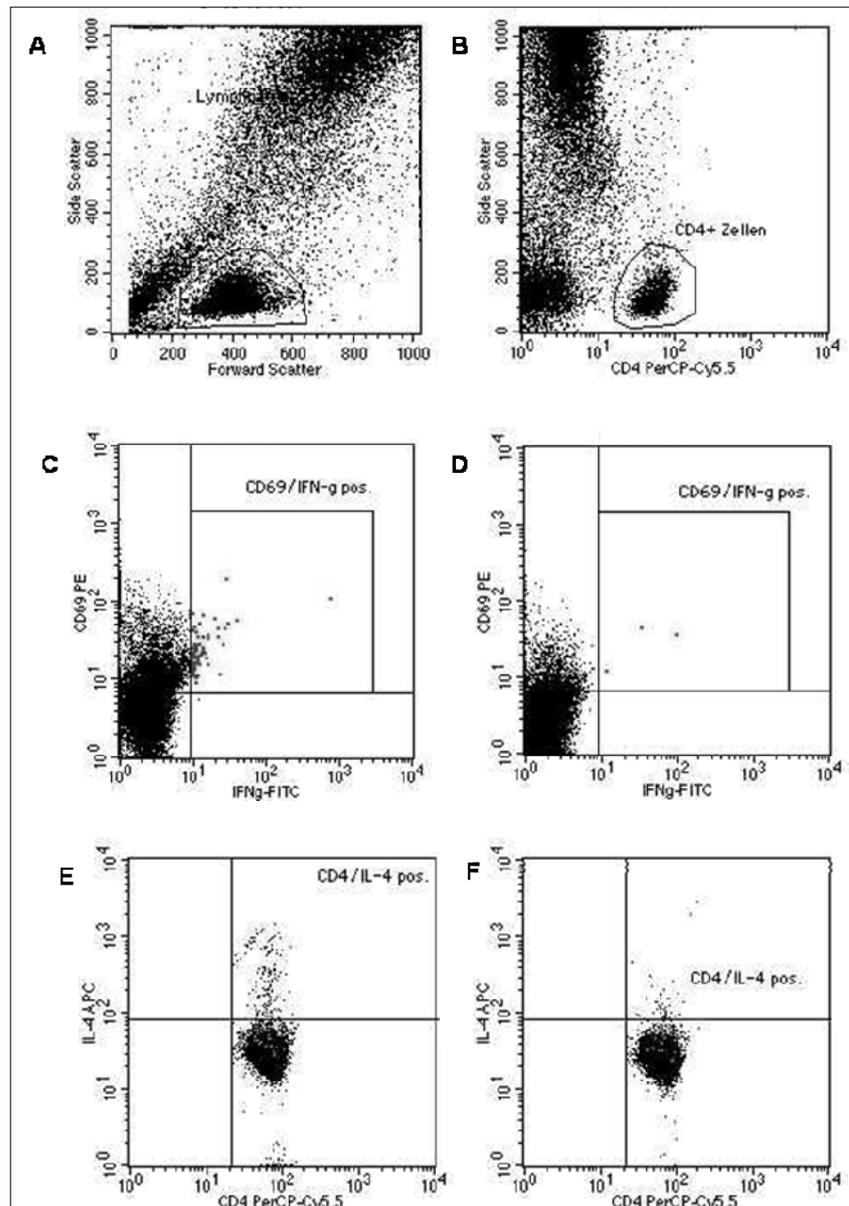


Abbildung 3.1: Dot Plots zur Analyse der CD4-Lymphozyten. Dargestellt ist die Lymphozytendiskriminierung im Forward Scatter gegen Side Scatter (A) sowie die Differenzierung der CD4-Lymphozyten (B). Die in Quadranten eingeteilten Dot-Plots (C, D) zeigen IFN- γ exprimierende, CD69+ CD4-Lymphozyten. In C ist die Stimulation einer Vollblutprobe mit HCVpp, in D die VSVpp-Stimulation eines HCV-infizierten Patienten abgebildet. In E und F sind IL-4-produzierende CD4-Lymphozyten dargestellt. E zeigt die Antigenstimulation mit NS3, F die Stimulation mit der entsprechenden Kontrolle. Die Auswertung der IL-10-Messungen erfolgte analog. Jede Probe wurde gemessen, bis mindestens 10.000 CD4+ T-Zellen gezählt worden waren.

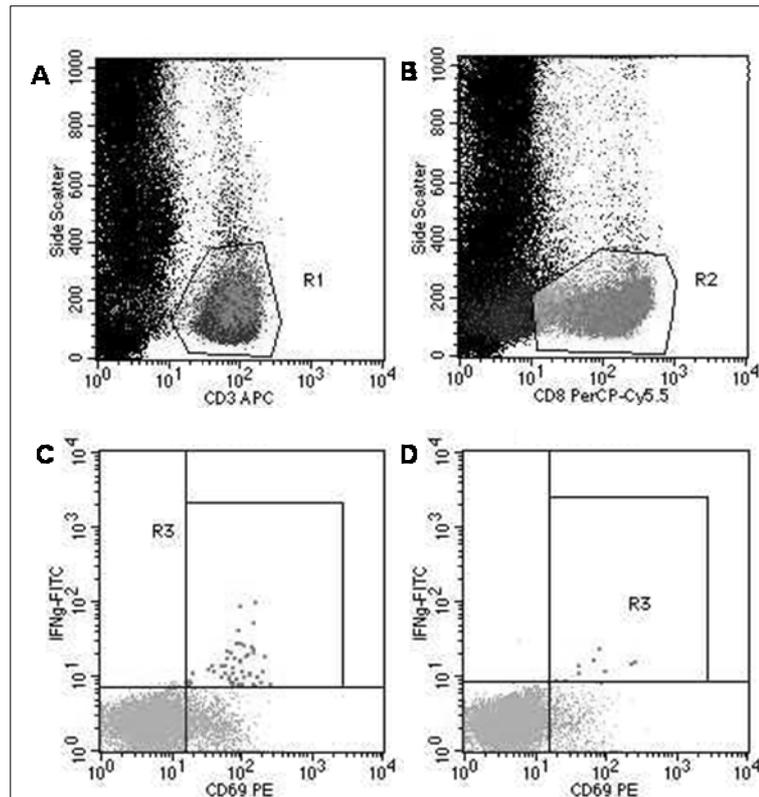


Abbildung 3.2: Dot Plots zur Analyse der CD8 IFN- γ -Lymphozyten. Dargestellt sind die CD3+ T-Lymphozyten (A) und die CD3+ CD8+ T-Lymphozyten (B). Die in Quadranten eingeteilten Dot-Plots (C, D) zeigen IFN- γ exprimierende, CD69+ CD8-Lymphozyten. C zeigt die Stimulation einer Vollblutprobe mit HCVpp, D die VSVpp-Stimulation eines HCV-infizierten Patienten. Jede Probe wurde gemessen, bis mindestens 10.000 CD8+ T-Zellen gezählt worden waren.

3.1.2 Zeitpunkt der Brefeldin-A-Zugabe

Um die verschiedenen Zytokine im Lymphozytenstimulationstest intrazellulär nachweisen zu können, wird Brefeldin-A (BFA) zu den Proben gegeben. BFA verhindert den Transport von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat und inhibiert somit die Proteinsekretion der behandelten Zellen [59]. So können die aufgrund der Stimulation gebildeten Zytokine in der Zelle akkumulieren und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der BFA-Zugabe wurden bei sieben Proben verschiedene

Inkubationszeiten vor BFA-Zugabe ausgetestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Innerhalb dieser Ansätze konnten keine eindeutigen Resultate erzielt werden. Es ließ sich lediglich vermuten, dass Vorinkubationszeiten von zwei Stunden und mehr schlechtere Ergebnisse erwarten ließen, keine oder eine Stunde Vorinkubation zeigten keine deutliche Tendenz. Für die folgenden Testungen wurde eine Stunde Inkubation vor BFA-Zugabe festgelegt [49,50,62,64,65].

Tabelle 3.1: Die Ergebnisse von CD8 IFN- γ - und CD4 IFN- γ -Lymphozyten nach unterschiedlichen Zeiten der Vorinkubation vor BFA-Zugabe. Die Proben wurden sowohl mit 400 TU/ml HCVpp als auch mit 10 μ g/ml HCV-NS3 stimuliert.

Patientenprobe	Zeit vor BFA-Zugabe	% CD8 IFN γ +		% CD4 IFN γ +	
		NS3	HCVpp	NS3	HCVpp
1	0h	0.00			
	1h	0.03			
	2h	0.05			
2	0h	0.00			
	1h	0.59			
	2h	0.00			
3	0h	0.03			
	1h	0.00			
	2h	0.00			
4	0h	0.00	0.65	0.00	0.00
	1h	0.00	0.00	0.02	0.01
	2h	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0h	0.05	0.06	0.03	0.02
	1h	0.00	0.00	0.00	0.00
	2h	0.00	0.00	0.00	0.02
6	1h	0.15			
	2h	0.21			
	2,5h	0.00			
7	1h	0.20			
	2h	0.00			
	2,5h	0.00			

3.1.3 Vergleich der HCV-Proteine NS3 und Core

Zur *in vitro*-Stimulation HCV-spezifischer Lymphozyten werden in der Literatur verschiedene Proteine eingesetzt [66-68]. Um ein Proteinantigen für die weiteren Tests auszuwählen, wurden bei sieben Patientenproben die HCV-spezifischen Proteine NS3 und Core (in der Konzentration 10 µg/ml) miteinander in der Stimulation CD8 IFN-γ-, CD4 IFN-γ-, CD4 IL-4- und CD4 IL-10-Lymphozyten verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Überblick über die Stimulationsergebnisse im Vergleich zwischen NS3- und Core-Protein. Die Konzentration jedes Proteins im Stimulationsansatz betrug 10 µg/ml.

Patientenprobe	Protein	% CD8 IFNgamma+	% CD4 IFNgamma+	% CD4 IL-4	% CD4 IL-10
1	NS3	0.00	0.00	0.56	0.29
	Core	0.00	0.03	0.00	0.00
2	NS3	0.12	0.00		
	Core	0.38	0.00		
3	NS3	0.00	0.00	0.00	0.00
	Core	0.00	0.00	0.00	0.73
4	NS3	0.00	0.00	0.00	0.00
	Core	0.00	0.00	0.00	0.00
5	NS3	0.13	0.00		
	Core	0.00	0.00		
6	NS3	0.00	0.00	13.36	
	Core	0.00	0.00	1.81	
7	NS3	0.00	0.00	0.45	
	Core	0.00	0.04	0.00	

NS3 ist, neben dem Core-Protein, das am stärksten konservierte Antigen und deshalb möglicherweise gut geeignet, um eine Immunantwort gegen verschiedene Virusvarianten zu detektieren [83]. Es wurde unter anderem nachgewiesen, dass eine starke NS3-spezifische Antwort der T-Helferzellen bei Patienten, die eine Behandlung mit IFN-α erhalten, mit der Virusbeseitigung assoziiert ist [66]. Auch Patienten, die eine HCV-Infektion in der akuten Phase spontan überwunden haben, zeigten eine signifikante Proliferationsantwort der T-Zellen gegen HCV-NS3 [84], NS3-spezifische

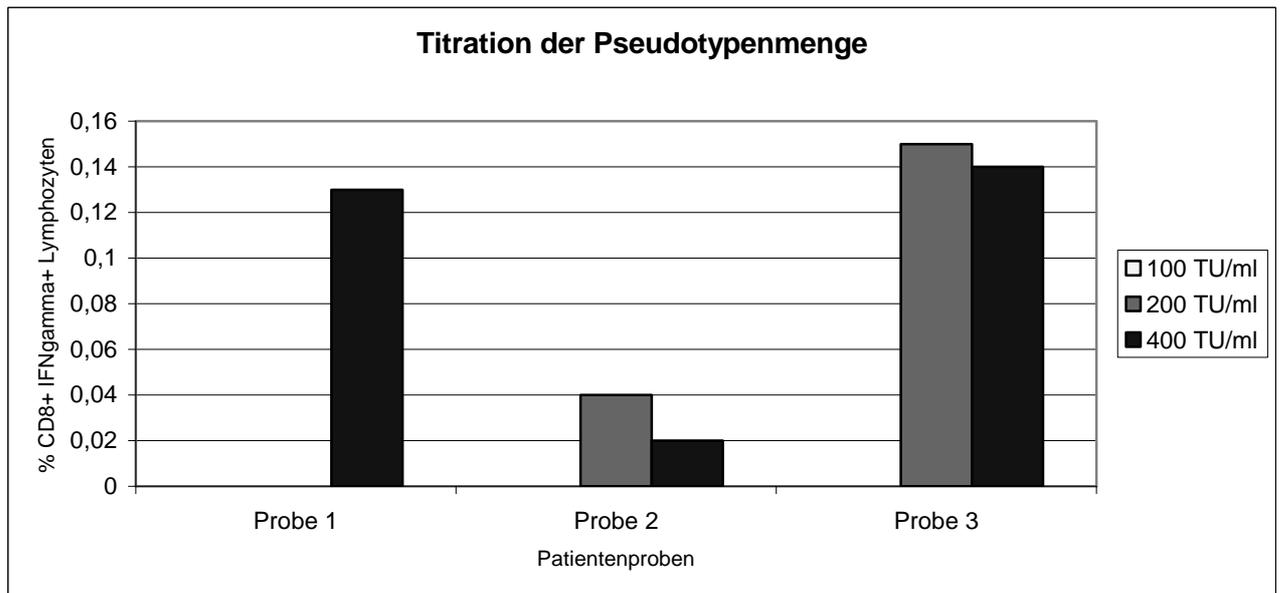
zytotoxische T-Lymphozyten wurden in Zusammenhang mit einer Ausheilung der Infektion beschrieben [67]. Da aus den vergleichenden Versuchen nicht eindeutig zu entnehmen war, welches Protein am besten für den Lymphozytenstimulationstest geeignet ist, d.h. welches die deutlicheren Antworten stimuliert, wurden 10 µg/ml NS3 für alle weiteren Versuche eingesetzt.

3.1.4 Bestimmung der Antigenmenge

Zur Bestimmung der für ein optimales Stimulationsergebnis notwendigen Pseudotypenmenge wurde die Konzentration der HCVpp bei drei Patientenproben titriert. Von diesen Stimulationsansätzen wurden die Ergebnisse CD8 IFN-γ-T-Lymphozyten ausgewertet.

Zu einer Probe (Probe 3) wurden 100 TU/ml, 200 TU/ml und 400 TU/ml der HCV-Pseudotypen (HCVpp) gegeben. Zwei weitere Proben wurden mit 200 TU/ml und 400 TU/ml der HCVpp getestet. Die Resultate sind in Grafik 3.1 dargestellt. Probe 1 zeigte nur bei 400 TU/ml HCVpp eine Stimulationsantwort. In Probe 2 und 3 unterschieden sich die Antworten auf 200 TU/ml und 400 TU/ml HCVpp nur sehr geringfügig.

Aufgrund dieser Daten wurden in allen weiteren Versuchen 400 TU/ml HCVpp eingesetzt. Größere Mengen wurden nicht getestet, da die Pseudotypen nur in begrenztem Umfang zu Verfügung standen.



Grafik 3.1: Titration der zugegebenen Menge an HCVpp zu einem Stimulationsansatz.

Es wurden drei Patienten mit 200 TU/ml und 400 TU/ml getestet, eine Patientenprobe (Probe 3) zusätzlich mit 100 TU/ml. Angegeben sind die % CD8 IFN- γ -T-Lymphozyten.

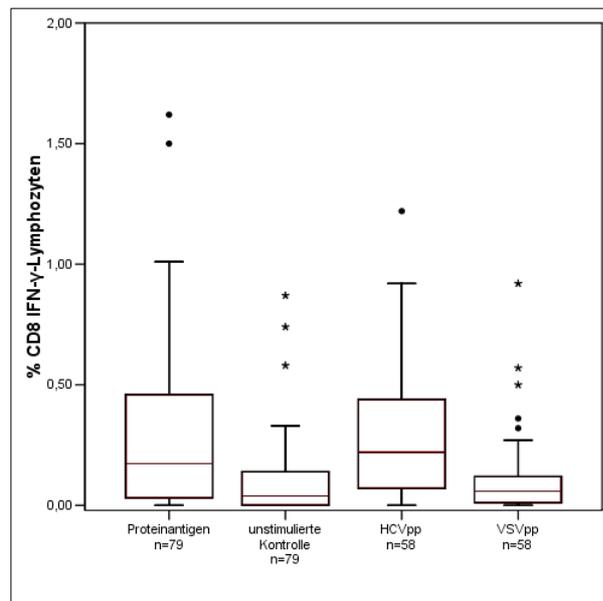
3.1.5 Vergleich der Kontrollantigene mit den Stimulationsantigenen

Um die Spezifität der Stimulation sowohl mit HCVpp als auch mit NS3 zu überprüfen, wurden die Stimulationsergebnisse des Proteinantigens mit denen der unstimulierten Probe, die Antworten auf HCVpp mit den Antworten gegen VSVpp statistisch mittels Wilcoxon Test verglichen.

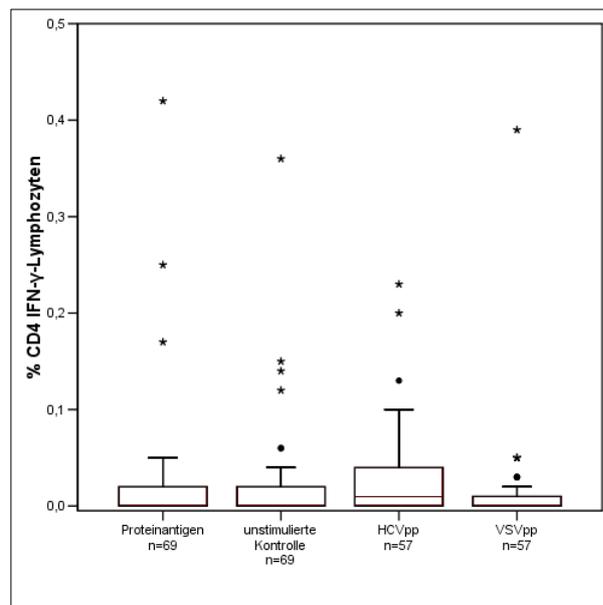
Vor allem für CD8 IFN- γ -Lymphozyten konnten HCV-spezifische Stimulationsantworten gemessen werden (Grafik 3.2). Dagegen war die Detektion einer Antigen-spezifischen Zytokinproduktion nicht für alle CD4-Messungen möglich, was sich in sehr geringen oder nicht messbaren CD4-Antworten widerspiegelt (Grafik 3.3 – Grafik 3.5). Dabei konnten die deutlichsten Stimulationsergebnisse innerhalb der CD4 IL-4-Lymphozyten detektiert werden (bis zu 84,8% CD4 IL-4-produzierende Zellen), gefolgt von den CD4 IL-10-Lymphozyten. Die Analyse CD4 IFN- γ -Lymphozyten ergab insgesamt sehr niedrige oder nicht messbare Stimulationsergebnisse. Die Antworten auf HCVpp waren dabei jedoch signifikant höher als die VSVpp-Kontrolle, während das HCV-Protein keine spezifische Zytokinproduktion stimulieren konnte.

Beim Vergleich CD8 IFN- γ -Lymphozyten der HCV-Protein-stimulierten Probe mit der unstimulierten Kontrolle oder der HCVpp-stimulierten Probe mit der VSVpp-stimulierten Probe unterschieden sich diese jeweils signifikant ($p < 0,01$, Grafik 3.2). Innerhalb der CD4 IFN- γ -T-Zellen unterschied sich die Proteinstimulation nicht von der unstimulierten Probe, die HCVpp-Stimulation jedoch signifikant von der VSV-Pseudotypen-Stimulation ($p < 0,01$, Grafik 3.3).

Die Messwerte der CD4 IL-4-Lymphozyten ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Antigenstimulation und Kontrolle (Grafik 3.4). In Grafik 3.5 ist der Vergleich der CD4 IL-10-Lymphozyten dargestellt. Auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Antigen- und Kontrollstimulationen.

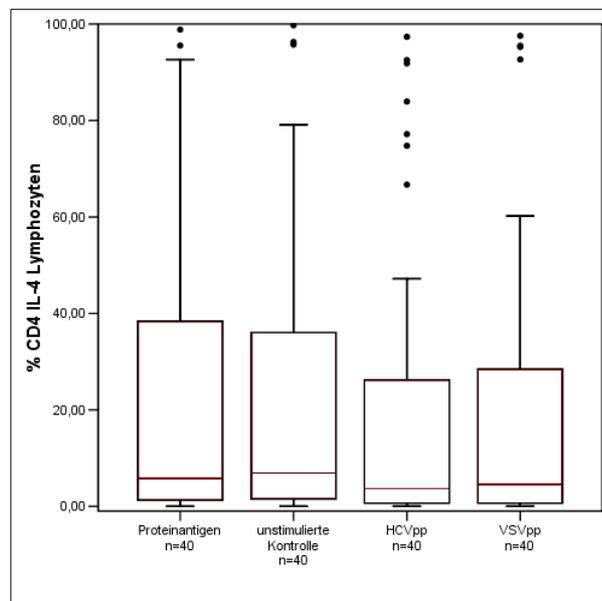


Grafik 3.2: Vergleich der antigenstimulierten Proben mit den Kontrollansätzen (unstimulierte Probe, VSVpp) der CD8 IFN- γ -Lymphozyten. Die Stimulationen der Patientenproben mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Proteinantigen und HCVpp (400 TU/ml) unterscheiden sich signifikant von der unstimulierten Kontrolle und VSVpp ($p < 0,01$).



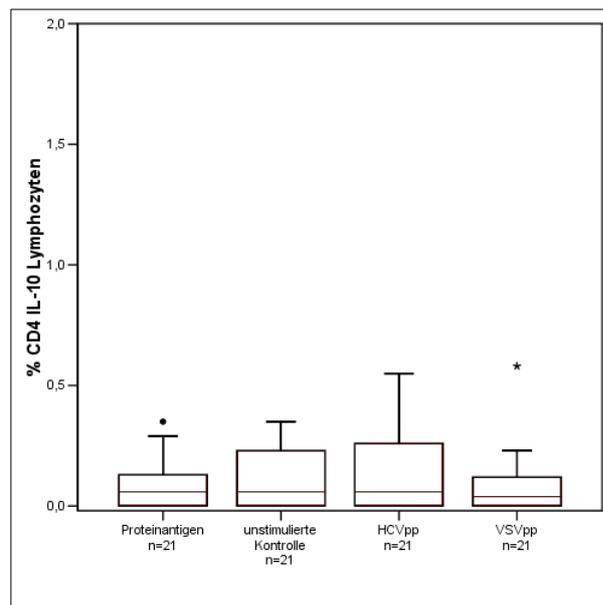
Grafik 3.3: Auswertung der antigenstimulierten Proben sowie der Kontrollen

(unstimulierte Kontrolle, VSVpp) der CD4 IFN- γ -Lymphozyten. Die unstimulierte Kontrolle und mit 10 μ g/ml NS3 stimulierte Probe unterschieden sich nicht signifikant, wohingegen sich die Stimulationen mit den HCV-Pseudotypen (400 TU/ml) signifikant von denen der VSV-Pseudotypen unterschieden ($p < 0,01$).



Grafik 3.4: Gegenüberstellung der antigenstimulierten Proben sowie der Kontrollen

(unstimulierte Kontrolle, VSVpp) der CD4 IL-4-Lymphozyten. Die Messergebnisse zeigten keine signifikanten Differenzen zwischen antigenstimulierter Probe (10 μ g/ml Proteinantigenen, 400 TU/ml HCVpp) und Kontrolle (unstimulierte Kontrolle, VSVpp).



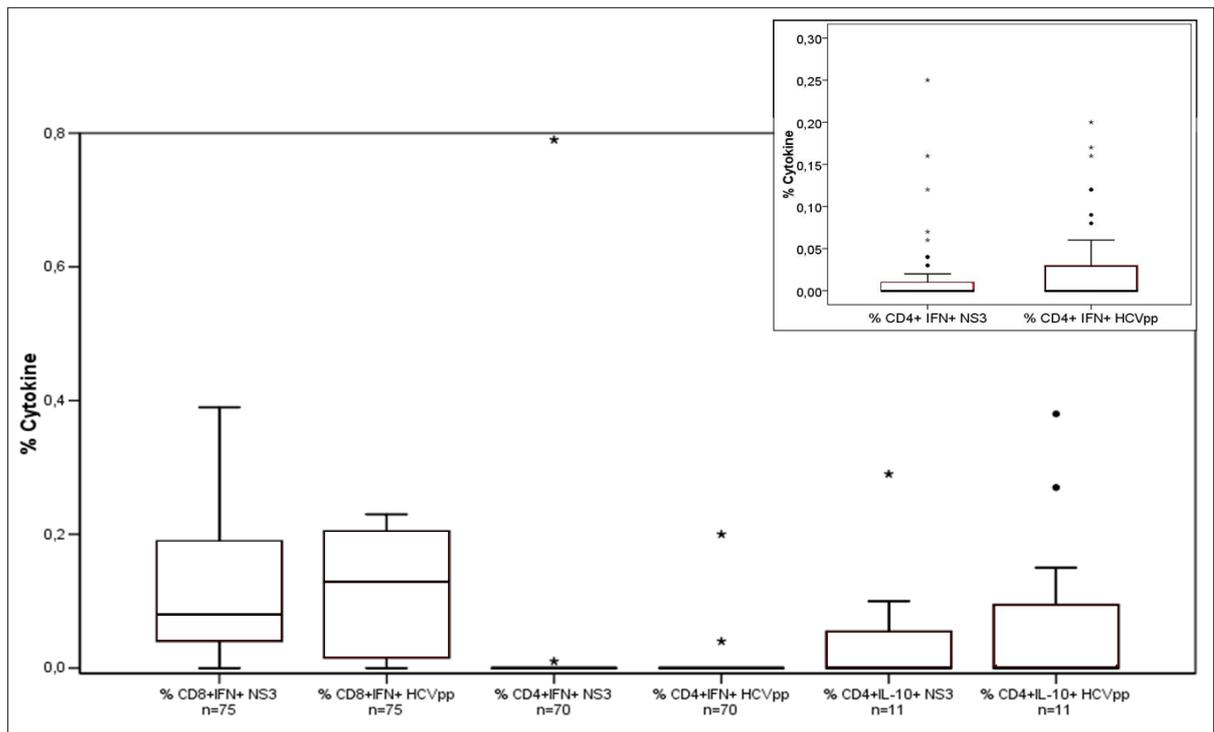
Grafik 3.5: Vergleich der antigenstimulierten Proben sowie der Kontrollen

(unstimulierte Kontrolle, VSVpp) der CD4 IL-10-Lymphozyten. Die Antigenstimulationen (10 µg/ml Proteinantigen, 400 TU/ml HCVpp) zeigten keine signifikanten Differenzen zu den Kontrollproben (unstimulierte Kontrolle, VSVpp).

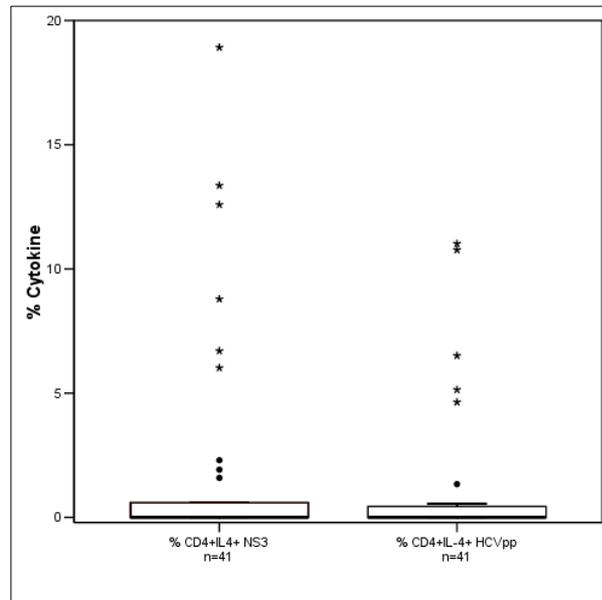
3.1.6 Vergleich der Stimulation mit Protein oder Pseudotypen

Um die Qualität und Effektivität der Stimulation mit den HCV-Pseudotypen zu überprüfen, wurden die Ergebnisse der Proteinstimulation und die der HCVpp-Stimulation statistisch miteinander verglichen.

Analysiert wurden hierbei 75 Proben bezüglich der CD8 IFN-γ-Antwort, 70 Proben auf CD4 IFN-γ, 11 Proben hinsichtlich CD4 IL-10 und 41 Proben auf CD4 IL-4-Lymphozyten. Wie in den folgenden Abbildungen (Grafik 3.6 und Grafik 3.7) detailliert dargestellt ist, ergaben sich bei allen Messungen ähnliche Ergebnisse nach Protein- oder HCVpp-Stimulation. Lediglich die HCVpp-Stimulation der CD4 IFN-γ-Lymphozyten erzielte signifikant höher Ergebnisse im Vergleich zur HCV-Protein-Stimulation ($p = 0,028$). In allen Messungen zeigten die unstimulierten Kontrollen keinen Unterschied zu den VSVpp-stimulierten Proben.



Grafik 3.6: Vergleichende Darstellung der Messergebnisse der CD8 IFN- γ -, CD4 IFN- γ - und CD4 IL-10-T-Lymphozyten nach Stimulation mit dem Proteinantigen und den HCVpp. Alle Messungen ergaben vergleichbare Ergebnisse nach HCV-Protein- oder HCVpp-Stimulation (10 μ g/ml Proteinantigen, 400 TU/ml HCVpp). Mit Ausnahme der CD4 IFN- γ -Lymphozyten, die signifikant höhere Messergebnisse nach der Stimulation mit HCVpp im Vergleich zur Protein-Stimulation zeigten ($p = 0,028$). Die Ergebnisse der CD4 IFN- γ -Lymphozyten sind rechts oben in der Abbildung vergrößert dargestellt.



Grafik 3.7: Der Vergleich der Protein- und HCVpp-Stimulation der CD4 IL-4-Zellen. Die Stimulationen mit HCV-Protein (10 µg/ml) oder HCVpp (400 TU/ml) ergaben vergleichbare Stimulationsresultate.

3.1.7 Einfluss des Genotypen auf die Stimulation mit HCVpp

Die in dieser Arbeit getesteten Blutproben stammen von Patienten, die mit unterschiedlichen HCV-Genotypen infiziert sind oder waren (Genotyp 1a/b, 2, 3, 4). Die für die Lymphozytenstimulation verwendeten Antigene jedoch stammen vom HCV-Genotypen 1. Die HCV-Proteine NS3 und Core sind rekombinante Proteine vom HCV-Genotyp 1b, die Pseudotypen tragen an ihrer Oberfläche HCV 1a E1- und E2-Hüllglykoproteine.

Um einen Einfluss des Genotypen auf die Stimulationsergebnisse zu überprüfen wurden innerhalb der Messungen von CD8 IFN- γ , CD4 IFN- γ , CD4 IL-10 und CD4 IL-4-Lymphozyten die Antworten von Genotyp 1-Infizierten statistisch mit denen von Genotyp 2-, 3- oder 4-Infizierten verglichen. Es ließen sich keine Unterschiede in den Stimulationsantworten nachweisen, die Ergebnisse korrelieren nicht mit dem Genotypen.

3.1.8 Ergebnisse der Stimulationen gesunder Probanden

In der folgenden Tabelle 3.3 sind die durchschnittlichen Antworten der gesunden Kontrollprobanden (anti-HCV negativ) und der Patienten (anti-HCV positiv) dargestellt. Danach sind die Stimulationsergebnisse der gesunden Probanden signifikant niedriger als die der HCV-Patienten. Eine Ausnahme bilden hierbei die Resultate der CD4 IFN- γ -T-Zellen, die auch bei den Patienten im Durchschnitt keine HCV-spezifische Stimulation aufwiesen. Die Ergebnisse der CD4 IL-10-Messungen nach HCVpp-Stimulation sind statistisch nicht signifikant, zeigen jedoch die Tendenz zu einer deutlicheren Antwort der Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden.

Für die Bewertung des Lymphozytenstimulationstestes bedeutet dies, dass die verwendeten Antigene zu HCV-spezifischen Zytokinexpressionen führten. Bei der Stimulation von Proben gesunder Probanden konnten keine bzw. nur sehr geringe (CD4 IL-4-Lymphozyten) unspezifische Reaktionen nachgewiesen werden. Grundsätzlich sind die Stimulationsergebnisse relativ niedrig. Mit Ausnahme der CD4 IL-4-Lymphozytenstimulationen wurde selten Werte über 1% Zytokin-sezernierende Zellen erreicht.

Tabelle 3.3: Durchschnittliche Antworten auf die Lymphozytenstimulation mit NS3 und HCVpp gesunder Kontrollprobanden. Angaben in Mittelwert, Standardabweichung. Die p-Werte geben die statistische Signifikanz des Unterschiedes der Antworten von Kontrollprobanden und Patienten an.

	% CD8+IFN+		% CD4+IFN+		% CD4+IL-4+		% CD4+IL-10+	
	NS3	HCVpp	NS3	HCVpp	NS3	HCVpp	NS3	HCVpp
gesunde Kontrollprobanden	0.02 ± 0.05	0.03 ± 0.06	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.06	0.44 ± 0.85	1.13 ± 2.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02
Patienten	0.28 ± 0.41	0.32 ± 0.42	0.04 ± 0.13	0.06 ± 0.16	15.88 ± 25.52	13.85 ± 23.90	1.02 ± 3.64	0.38 ± 1.19
p-Werte	0,000	0,000	0,212	0,976	0,001	0,006	0,029	0,087

3.2 Einteilung der Patienten in Gruppen

Zur Auswertung der Messergebnisse wurden die Patienten in Gruppen eingeteilt, die miteinander statistisch verglichen wurden. Die Charakterisierung der Patientengruppen ist in Tabelle 3.4 dargestellt. Zur Anonymisierung des Kollektivs wurden die Patienten durchgehend von P1 – P73 (Patient 1 - Patient 73) nummeriert. Die Patienten wurden in folgende Gruppen gegliedert:

- Ø Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Messung unter Therapie mit Interferon- α in Kombination mit Ribavirin in der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Frankfurt am Main befanden
- Ø Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Messung nicht in Therapie befanden, mit der Unterteilung in
 - § PCR-positiv
 - § PCR-negativ (mit positivem anti-HCV Status)
 - § PCR-positiv zum Zeitpunkt der Messung, Therapiebeginn nach der Lymphozytenstimulation
- Ø anti-HCV positive Patienten mit unbekanntem Krankheits- und Therapieverlauf
- Ø Kontrollprobanden, serologisch anti-HCV negativ

Als „Nonresponder“ wurden Patienten bezeichnet, die kein Ansprechen auf eine erfolgte Therapie zeigten und PCR-positiv blieben. Als „Relapse“ wurden HCV Infizierte benannt, die innerhalb von 24 Wochen nach Therapieende wieder HCV-PCR positiv getestet wurden.

Patienten, die innerhalb der ersten vier Wochen nach Therapiebeginn PCR-negativ wurden, werden im Folgenden als „initiale Responder“ bezeichnet. Für sie geht man von einer besseren Prognose aus als für Patienten, bei denen unter Therapie länger als vier Wochen ein Virustiter nachgewiesen werden kann („late Responder“). Je schneller die Viruslast während der Therapie abfällt, desto besser ist die Chance der Patienten ein Ansprechen auf die Therapie zu haben [69,70].

Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs (n=73) betrug 47,0 Jahre, 63% waren Männer, 37% Frauen. Von 2 Patienten war das Alter zum Zeitpunkt der Messung

unbekannt (P65 und P57). Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe (n=11) betrug 31,7 Jahre, 27% waren Männer, 73% Frauen.

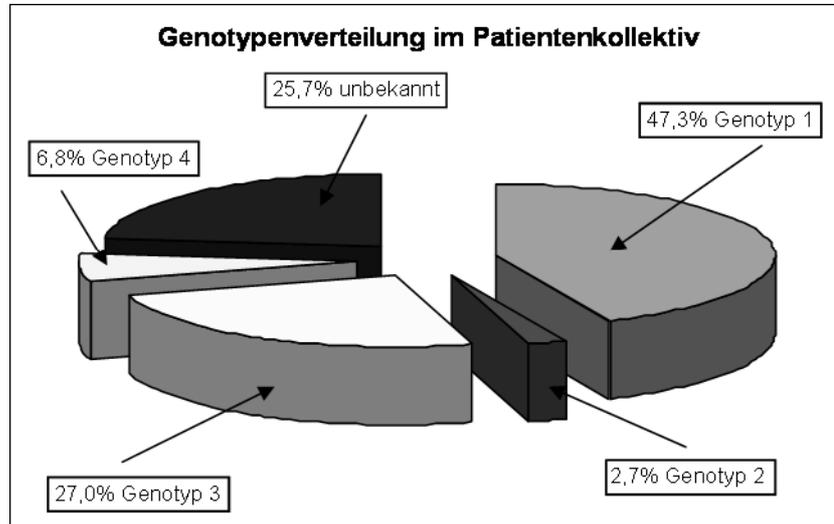


Abbildung 3.3: Prozentuale Genotypenverteilung im Patientenkollektiv.

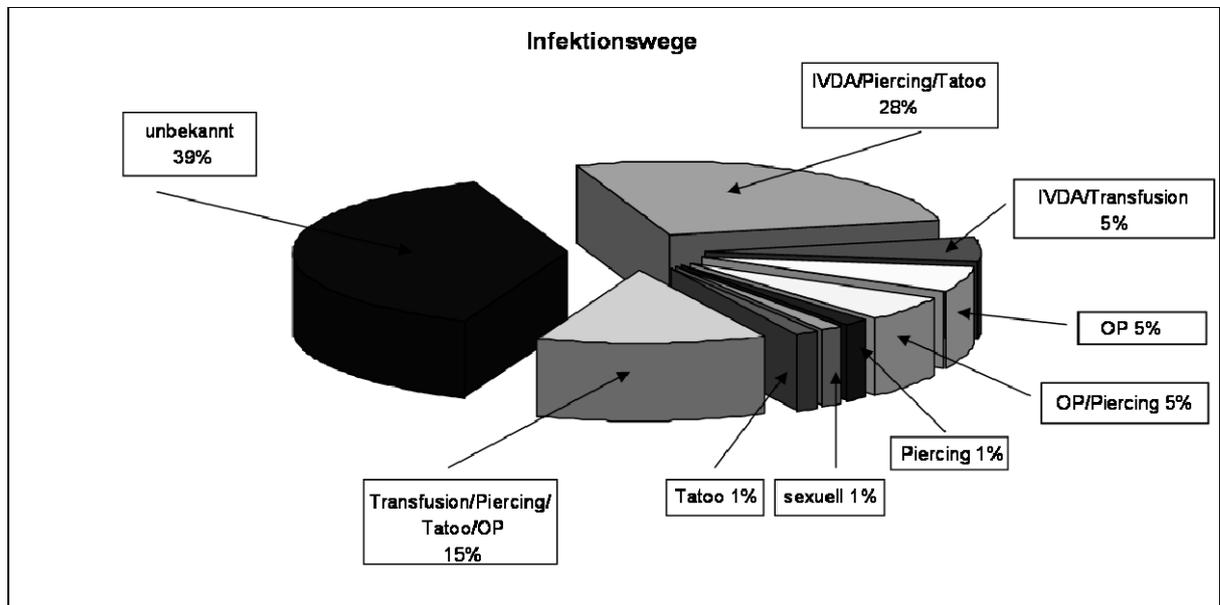


Abbildung 3.4: Prozentuale Verteilung der möglichen Infektionswege mit HCV im untersuchten Patientenkollektiv. IVDA: intravenöser Drogenabusus; OP: Operation.

Tabelle 3.4: Patientengruppierung. Charakterisierung der verschiedenen Patientengruppen, in die die Patienten zur statistischen Auswertung eingeteilt wurden.

Die Patienten durchgehend von P1 – P73 (Patient 1 - Patient 73) nummeriert. Patienten unter Therapie wurden mit Ribavirin und Interferon- α behandelt. Einige Patienten befanden sich in einer klinischen Studie, bei der Amantadin mit der Therapie aus Ribavirin und Interferon- α kombiniert wurde („w“ weiblich, „m“ männlich).

	Patient	Geschlecht	Alter	Genotyp HCV	Therapiebeginn	Ansprechen auf Therapie	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Zeitpunkt der Messung
Patienten, zum Zeitpunkt der Messung unter Therapie										
	P1	m	51	1	18.10.04 -	Nonresponder	07.02.05	-	-	4.Monat der Therapie
	P2	w	63	1a	02.12.03 - 06.04	initialer Responder	11.06.04	-	-	6. Monat der Therapie
	P3	m	50	1b	02.07.04 - 06.05	initialer Responder	20.09.04	-	-	2. Monat der Therapie
	P4	m	38	3a	08.07.04 -	initialer Responder	13.09.04	-	-	2.Monat der Therapie
	P5	m	35	1a	24.06.04 -	late Responder	29.07.04	-	-	1. Monat der Therapie
	P6	w	58	1b	06.05.04 -	late Responder	15.07.04	-	-	3. Monat der Therapie
	P7	w	24	1	05.02.04 - 01.05	initialer Responder	14.10.04	-	-	9. Monat der Therapie
	P8	w	37	3a	27.05.04 - 11.04	initialer Responder	11.11.04	-	-	6. Monat der Therapie
	P9	m	35	3a	04.04. - 09.04	late Responder	22.07.04	-	-	3. Monat der Therapie
	P10	w	66	2a/c	26.08.04 -	initialer Responder	25.10.04	-	-	2. Monat der Therapie
ohne Therapie zum Messzeitpunkt, PCR-negativ										
	P11	w	25	-	-	spontan ausgeheilt	27.09.04	-	-	-
	P12	m	27	-	-	spontan ausgeheilt	22.11.04	-	-	-
	P13	m	27	3a	15.03.02 - 27.08.02	Responder	18.09.04	-	-	-
	P14	m	56	-	08.03 - 08.04	Responder	21.10.04	-	-	-
ohne Therapie zum Messzeitpunkt, PCR-positiv										
	P15	m	60	1b	-	-	08.11.04	-	-	-
	P16	w	44	3a	11.10.04 -	Nonresponder	10.08.04	-	-	-
	P17	w	51	1b	1995, 1996, 1997, 1998, 2003-	Nonresponder	20.09.04	-	-	-
	P18	m	38	1b	-	-	19.08.04	-	-	-
	P19	w	66	3a	18.10.04 -	initialer Responder	26.08.04	25.10.04	-	-
	P20	m	49	1a	-	-	11.10.04	-	-	-
	P21	w	51	1a	-	-	04.10.04	-	-	-
	P22	w	34	2	-	-	26.07.04	-	-	-
	P23	m	48	1	11.11.04 -	late Responder	11.10.04	-	-	-
	P24	m	24	1	09.12.04 -	late Responder	25.10.04	-	-	-
	P25	m	37	4	-	-	30.03.04	-	-	-
	P26	m	41	4	1998, 2000, 1/2004 - 4/2004	Nonresponder	25.10.04	-	-	-
	P27	m	26	1b	05.01.05 -	Nonresponder	08.11.04	-	-	-
	P28	w	52	1a	-	-	07.02.05	-	-	-
	P29	m	36	1a	-	-	14.10.04	-	-	-
	P30	m	36	3a	-	-	15.07.04	10.08.04	01.03.05	-
	P31	m	48	3a	-	-	16.12.04	-	-	-
	P32	w	33	1a	17.01.05 -	late Responder	16.12.04	-	-	-
	P33	m	43	3a	-	-	20.09.04	-	-	-
	P34	w	46	3a	1196-1997	Nonresponder	30.09.04	-	-	-
	P35	m	34	4	-	-	30.09.04	-	-	-
	P36	m	51	1a	19.08.04 -	late Responder	19.08.04	-	-	-
	P37	m	28	3a	-	-	04.10.04	-	-	-
	P38	m	60	1b	-	-	08.07.04	-	-	-
	P39	m	39	3a	01.10.04 -	initialer Responder	10.08.04	-	-	-
	P40	m	45	1b	14.10.04 -	late Responder	19.08.04	-	-	-
	P41	m	51	1b	18.10.04 -	late Responder	02.08.04	-	-	-
	P42	m	47	1b	03.02.05 -	late Responder	21.10.04	-	-	-
	P43	m	33	3a	03/2003 - 09/2003	Relapse	08.11.04	-	-	-
	P44	m	61	1b	15.03.00	Nonresponder	16.12.04	-	-	-
	P45	m	29	-	-	-	13.12.04	-	-	-
	P46	w	51	-	-	-	27.09.04	-	-	-
	P47	m	28	-	-	-	02.07.05	-	-	-
	P48	w	19	1b	16.12.04 -	Nonresponder	11.08.04	-	-	-
	P49	m	31	3a	20.10.04 -	late Responder	04.10.04	-	-	-
	P50	w	45	3	03.12.04 -	initialer Responder	04.10.04	-	-	-
	P51	m	45	-	-	-	25.11.04	-	-	-
	P52	w	23	-	-	-	16.12.04	-	-	-
	P53	m	44	3a	21.10.04 -	late Responder	19.07.04	-	-	-
	P54	w	28	3a	11.10.04 -	initialer Responder	22.07.04	-	-	-
	P55	m	63	-	-	-	07.12.04	-	-	-
	P56	w	62	-	27.01.05 -	late Responder	15.11.04	-	-	-

	Patient	Geschlecht	Alter	Genotyp HCV	Therapiebeginn	Ansprechen auf Therapie	1. Messung	2. Messung	3. Messung
Therapie nach Messung	P16	w	44	3a	11.10.04 -	Nonresponder	10.08.04	-	-
	P19	w	66	3a	18.10.04 -	initialer Responder	26.08.04	25.10.04	-
	P23	m	48	1	11.11.04 -	late Responder	11.10.04	-	-
	P24	m	24	1	09.12.04 -	late Responder	25.10.04	-	-
	P27	m	26	1b	05.01.05 -	Nonresponder	08.11.04	-	-
	P32	w	33	1a	17.01.05 -	late Responder	16.12.04	-	-
	P36	m	51	1a	19.08.04 -	late Responder	19.08.04	-	-
	P39	m	39	3a	01.10.04 -	initialer Responder	10.08.04	-	-
	P40	m	45	1b	14.10.04 -	late Responder	19.08.04	-	-
	P41	m	51	1b	18.10.04 -	late Responder	02.08.04	-	-
	P42	m	47	1b	03.02.05 -	late Responder	21.10.04	-	-
	P48	w	19	1b	16.12.04 -	Nonresponder	11.08.04	-	-
	P49	m	31	3a	20.10.04 -	late Responder	04.10.04	-	-
	P50	w	45	3	03.12.04 -	initialer Responder	04.10.04	-	-
	P53	m	44	3a	21.10.04 -	late Responder	19.07.04	-	-
	P54	w	28	3a	11.10.04 -	initialer Responder	22.07.04	-	-
P56	w	62		27.01.05 -	late Responder	15.11.04	-	-	
Patienten mit unbekanntem Krankheits- und Therapieverlauf	P57	m	-	-	-	-	07.12.2004	-	-
	P58	w	45	1a	-	-	15.11.2004	-	-
	P59	w	49	1b	-	-	05.08.2004	-	-
	P60	w	53	-	-	-	02.10.2004	-	-
	P61	m	27	3	-	-	22.04.2004	-	-
	P62	w	59	-	-	-	04.10.2004	-	-
	P63	m	47	-	-	-	16.12.2004	-	-
	P64	m	73	-	-	-	08.11.2004	-	-
	P65	w	-	1b	-	-	18.10.2004	-	-
	P66	m	60	3a	-	-	18.10.2004	-	-
	P67	w	59	-	-	-	23.09.2004	-	-
	P68	w	52	-	-	-	15.11.2004	-	-
	P69	m	42	1b	-	-	19.08.2004	-	-
	P70	m	49	1	-	-	29.07.2004	-	-
	P71	m	36	-	-	-	25.10.2004	11.11.2004	-
P72	m	70	-	-	-	18.11.2004	-	-	
P73	m	53	1b	-	-	07.12.2004	-	-	
Negativkontrollen	K1	m	26	-	-	-	03.03.05	-	-
	K2	w	43	-	-	-	08.09.04	-	-
	K3	w	29	-	-	-	08.03.05	-	-
	K4	w	36	-	-	-	09.08.04	-	-
	K5	w	30	-	-	-	15.07.04	-	-
	K6	w	27	-	-	-	08.03.05	-	-
	K7	w	29	-	-	-	17.11.04	-	-
	K8	m	27	-	-	-	17.11.04	-	-
	K9	w	34	-	-	-	22.07.04	-	-
	K10	m	40	-	-	-	26.07.04	-	-
	K11	w	28	-	-	-	20.07.04	-	-

3.3 Messungen von Proben von Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Entnahme in Therapie befanden

3.3.1 Vergleich der Patientengruppen

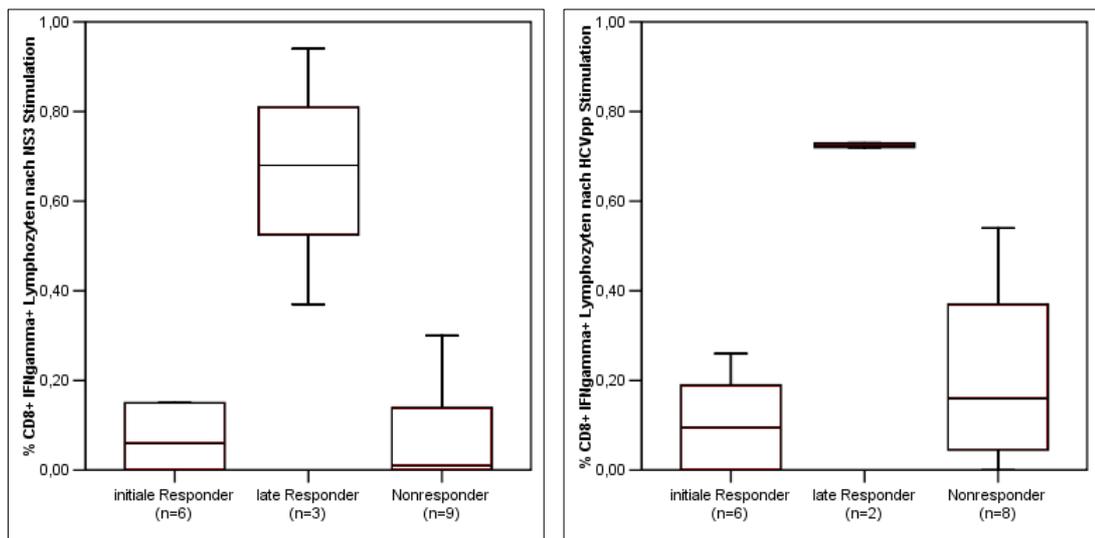
Grafik 3.8 verdeutlicht den Vergleich der IFN- γ -Produktion von CD8-Zellen nach Stimulation mit NS3 und HCVpp von Blutproben, die von Patienten stammen, die sich zu diesem Zeitpunkt in Therapie befanden. Sowohl bei initialen Respondern als auch Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen (Nonresponder) war die gemessene Zahl der CD8 IFN- γ -T-Lymphozyten signifikant geringer als die der late Responder, bei denen eine starke Aktivierung ihrer CD8 Lymphozyten nachzuweisen war.

Im Vergleich der IFN- γ Produktion der CD4-T-Lymphozyten war kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten nachzuweisen. Tendenziell zeigen aber auch hier Patienten mit einer late Response eine deutliche und höhere IFN- γ -Antwort. Diese Ergebnisse sind in Grafik 3.9 illustriert.

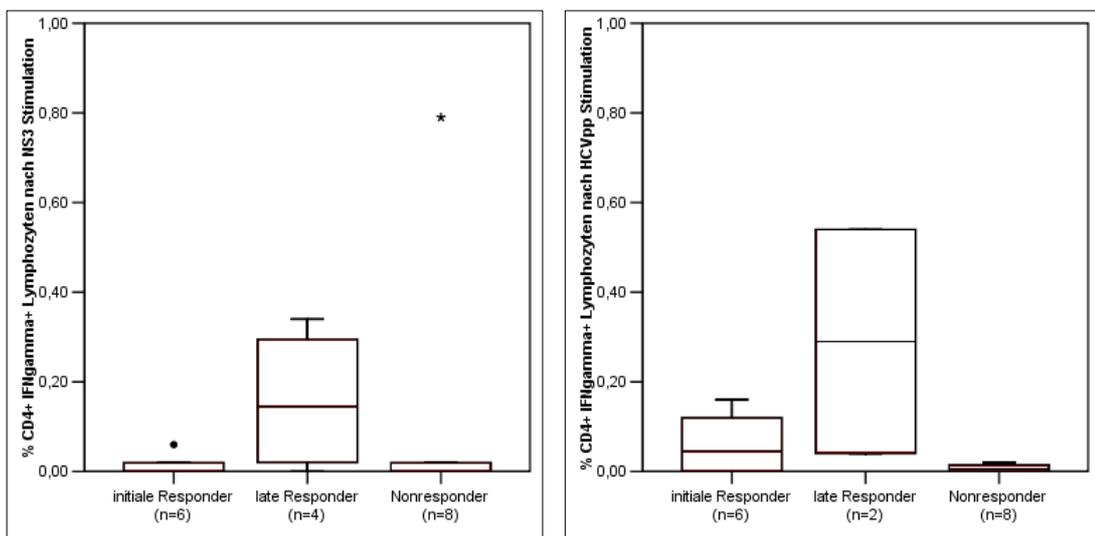
3.3.2 Zytokinprofile innerhalb der Patientengruppen

Die Analyse des Zytokinprofils der initialen Responder zeigt, dass bei diesen Patienten der Vergleich CD8 IFN- γ -, CD4 IFN- γ - und CD4 IL-4-T-Zellen eine interessante Tendenz zu einer deutlichen IFN- γ -Antwort der CD8-T-Lymphozyten zeigt. Eine IL-4-Produktion durch CD4-Zellen war hingegen nicht nachweisbar (Grafik 3.10).

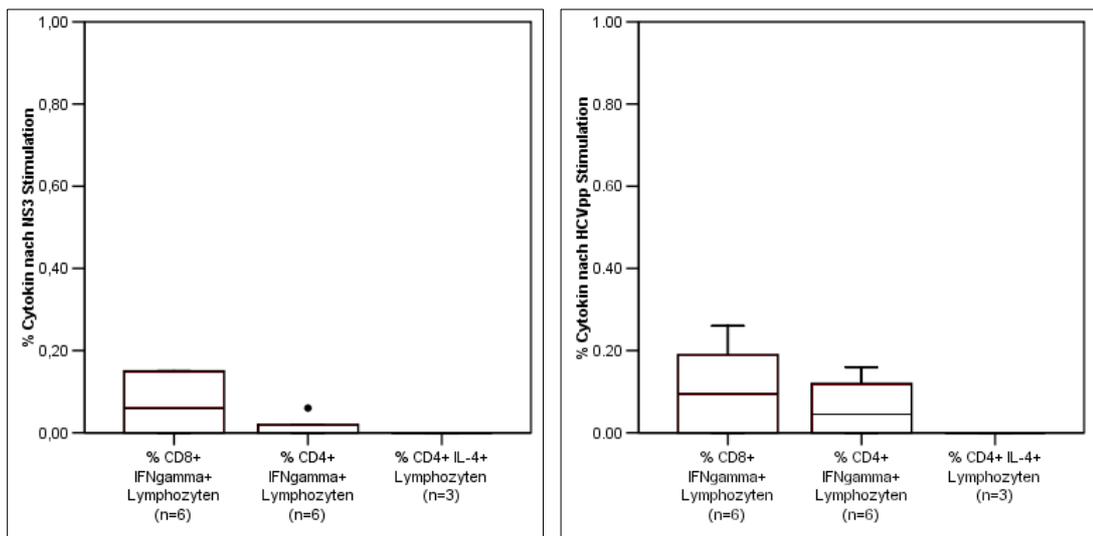
Das Zytokinmuster der late Responder zeigt eine signifikant stärkere IFN- γ -Antwort der CD8-T-Lymphozyten als der CD4-T-Lymphozyten, wobei die HCV-Pseudotypen zu einer stärkeren Aktivierung der CD4-Lymphozyten zu führen scheinen als NS3 (Grafik 3.11).



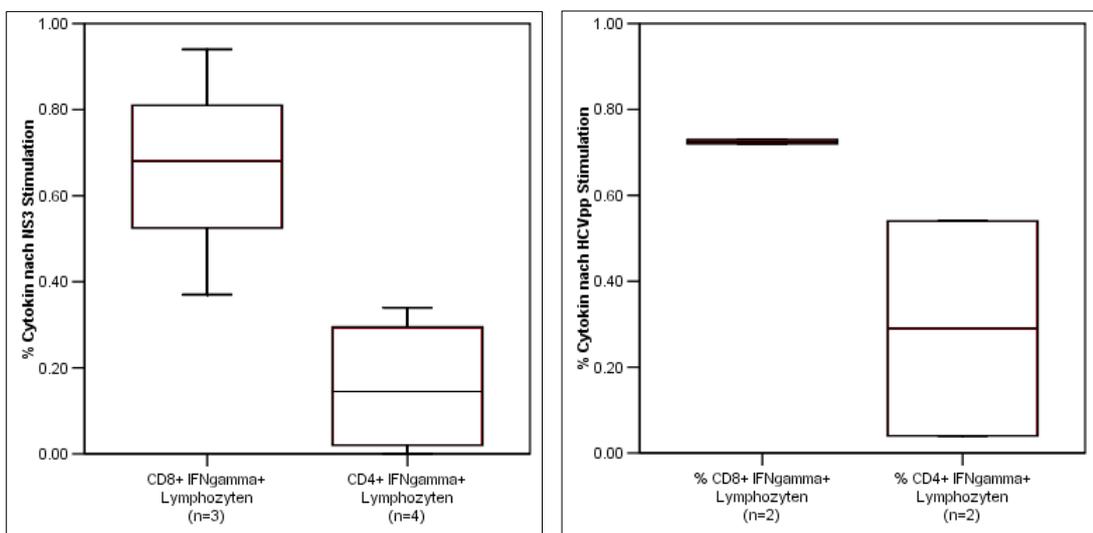
Grafik 3.8: Vergleich der CD8 IFN- γ -T-Lymphozyten nach NS3- und HCVpp-Stimulation von Blutproben, die den Patienten während der Therapie entnommen wurden. In der linken Grafik sind die Ergebnisse nach NS3-Stimulation, in der rechten Grafik nach HCVpp-Stimulation dargestellt. Initiale Responder und die Patientengruppe der Nonresponder unterscheiden sich in den Stimulationsergebnissen der CD8 IFN- γ -Lymphozyten signifikant von den late Respondern (nach NS3-Stimulation: initiale Responder versus late Responder $p = 0,02$; Nonresponder versus late Responder $p = 0,01$; nach HCVpp-Stimulation: initiale Responder versus late Responder $p = 0,02$; Nonresponder versus late Responder $p = 0,05$).



Grafik 3.9: Auswertung der CD4 IFN- γ -T-Lymphozyten nach NS3- und HCVpp-Stimulation von Patientenproben, die während der Therapie getestet wurden. Der Vergleich der CD4 IFN- γ -T-Lymphozyten nach NS3- oder HCVpp-Vollblutstimulation von initialen und late Respondern zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede. Wie bei den CD8 IFN- γ -T-Zellen zeigen aber auch hier Patienten, die erst nach über vier Wochen Therapie auf die Behandlung ansprachen, eine stärkere IFN- γ -Antwort der CD4-Lymphozyten.



Grafik 3.10: Auswertung der Zytokin-Antworten nach Stimulation von Proben initialer Responder. Der Vergleich der CD8 IFN- γ -, CD4 IFN- γ - und CD4 IL-4-T-Zellen zeigt eine interessante Tendenz zu einer deutlichen IFN- γ -Antwort der CD8-T-Lymphozyten und zu einer nicht nachweisbaren IL-4-Produktion der CD4-T-Zellen.



Grafik 3.11: Vergleich der CD8 und CD4 IFN- γ -T-Lymphozyten bei late Respondern. Die Gegenüberstellung der CD8 IFN- γ - und CD4 IFN- γ -T-Lymphozyten ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0,03$) zwischen der IFN- γ -Produktion nach NS3-Stimulation von CD8- und CD4-T-Lymphozyten sowie einen, obgleich nicht signifikanten Unterschied ($p = 0,1$) nach Stimulation mit HCVpp.

3.4 Messungen von Patientenproben, die vor Therapiebeginn entnommen wurden

3.4.1 Vergleich der Patientengruppen

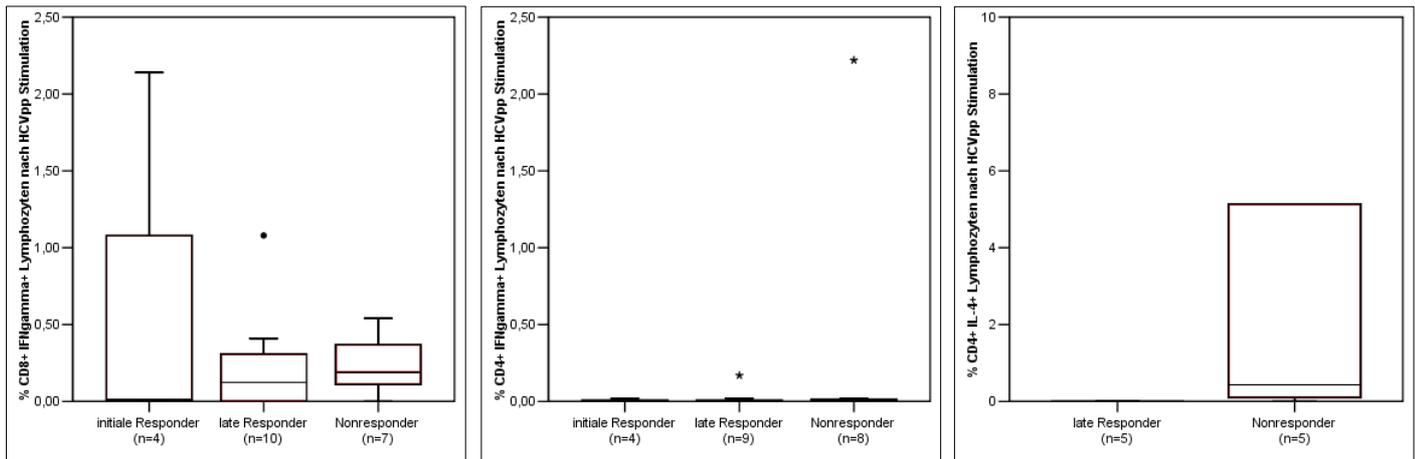
Im Gegensatz zu Messungen von Proben von Patienten, die zum Entnahmezeitpunkt therapiert wurden, konnten bei Patientenproben vor Therapiebeginn keine statistisch signifikanten Unterschiede der IFN- γ -Werte der CD8-Zellen gemessen werden. Vollblutproben von Patienten, die initial auf die spätere Therapie ansprachen, zeigten aber tendenziell höhere Werte der CD8-Lymphozyten als die zukünftigen late Responder oder Nonresponder. Generell ließen sich, wie in Grafik 3.12 dargestellt, hohe Werte an CD8 IFN- γ -T-Lymphozyten messen, während nur eine sehr geringe oder gar keine IFN- γ Produktion durch CD4-T-Zellen nach Pseudotypen-Stimulation zu detektieren war. Dies ist besonders interessant im Vergleich zu Messungen von Patienten unter Therapie, bei denen durchaus CD4 IFN- γ -Werte detektierbar waren.

Die IL-4 Antworten der CD4-T-Zellen waren bei den Nonrespondern signifikant stärker als bei late Respondern ($p = 0,02$). Die Tendenz zu einer starken IL-4-Antwort der CD4-T-Zellen bei Nonrespondern bestätigt sich auch, wenn man diese mit Ergebnissen aller nicht therapierten und ausgeheilten Patienten vergleicht (Grafik 3.13). Von initialen Respondern liegen in dieser Gruppe leider keine IL-4-Messungen vor.

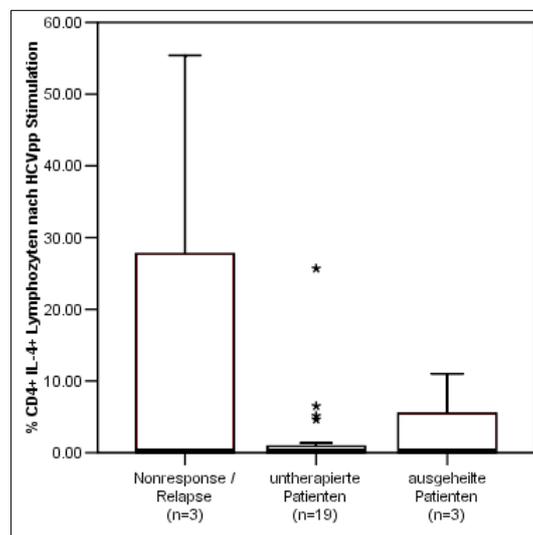
3.4.2 Zytokinprofile innerhalb der Patientengruppen

Grafik 3.14 stellt die Ergebnisse der Patienten dar, die nach der Messung eine Therapie begannen und initial auf die Therapie ansprachen. Die IFN- γ -Antwort der CD8-Zellen nach NS3-Stimulation war schwächer als nach HCVpp-Stimulation. Leider liegt innerhalb dieser Gruppe nur ein Messwert von CD4 IL-4-T-Lymphozyten nach Proteinstimulation vor (1.76% CD4 IL-4+).

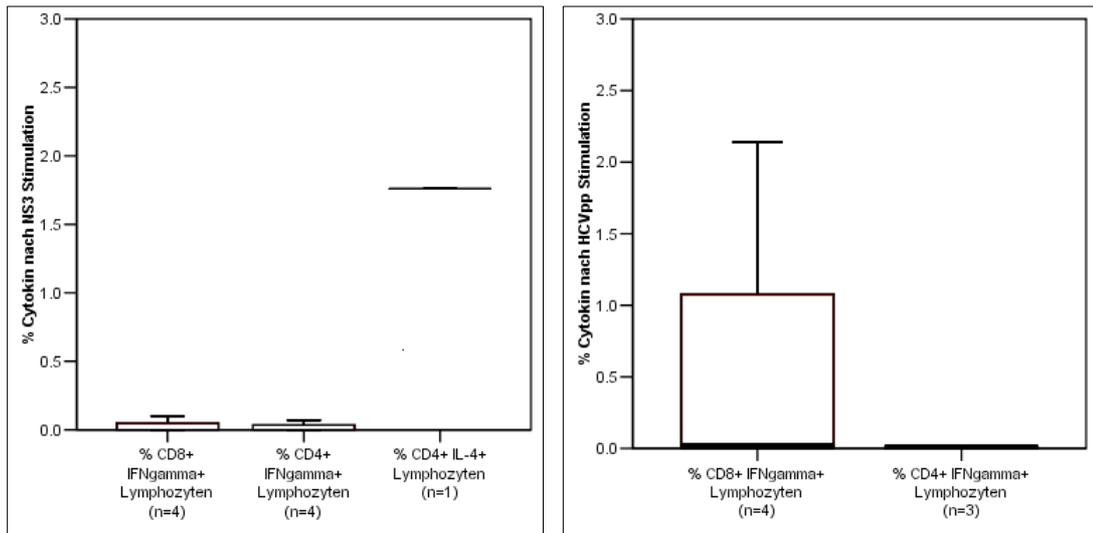
In der Gruppe der late Responder konnten signifikant mehr CD8 IFN- γ - als CD4 IFN- γ -T-Lymphozyten detektieren werden ($p = 0,04$). Die IL-4-Antwort der CD4-T-Zellen nach Proteinstimulation war signifikant höher als die IFN- γ -Antwort sowohl der CD8- als auch der CD4-T-Zellen (CD8 IFN- γ versus CD4 IL-4 $p = 0,05$, CD4 IFN- γ versus CD4 IL-4 $p < 0,01$, Grafik 3.15). Mit den HCVpp war keine IL-4 Antwort der CD4-T-Lymphozyten zu detektieren, was an den niedrigen Fallzahlen liegen könnte.



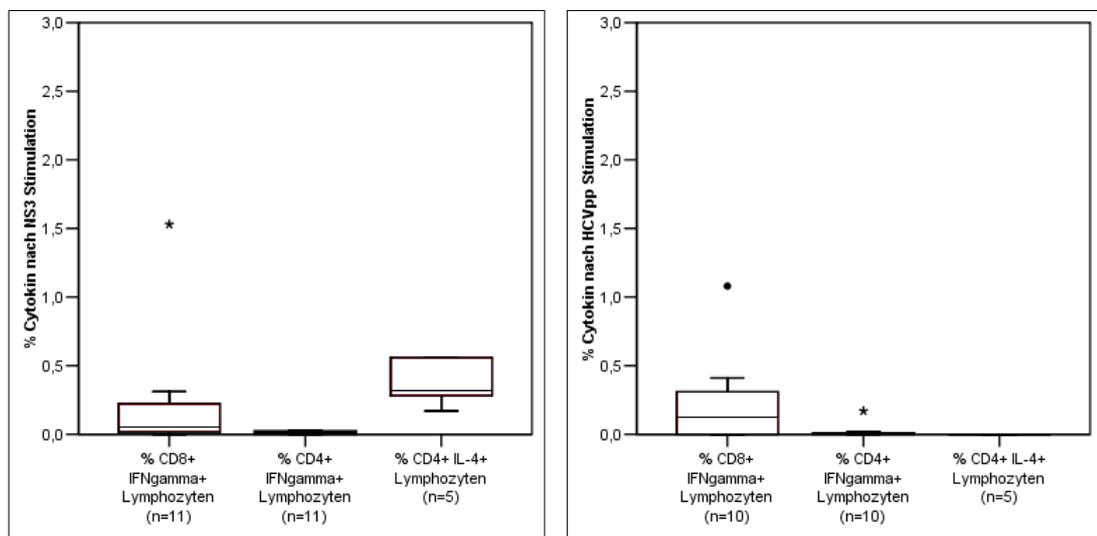
Grafik 3.12: Vergleich der Patienten, deren Lymphozytenstimulation vor Therapiebeginn gemessen wurde. Bezüglich CD8 IFN- γ -Zellen ergeben sich zwar zwischen initialen Respondern und late Responder oder Patienten, die gar nicht auf die Therapie ansprachen keine signifikanten Unterschiede. Es ließen sich aber CD8 IFN- γ -T-Lymphozyten messen (linke Grafik), während praktisch keine IFN- γ -Produktion durch CD4-T-Zellen nach Pseudotypen-Stimulation zu detektieren war (mittlere Grafik). Die IL-4-Antworten der CD4-T-Zellen war bei den Nonrespondern signifikant stärker als bei Patienten, die nach vier Wochen PCR-negativ wurden ($p = 0,02$, rechte Grafik).



Grafik 3.13: Vergleich von Nonrespondern / Relapsen, nicht therapierten und ausgeheilten Patienten bezüglich der IL-4-Produktion nach HCVpp-Stimulation. Die Gruppe der Nonresponse/Relapse zeigte eine wesentlich deutlichere Tendenz zu einer stärkeren IL-4-Antwort als die Gruppe der untherapierten und ausgeheilten Probanden.



Grafik 3.14: Ergebnisse der CD8 IFN- γ -, CD4 IFN- γ - und der CD4 IL-4-T-Lymphozyten von initialen Respondern, die vor ihrer Therapie analysiert wurden. Auf eine NS3-Stimulation war in dieser Patientengruppe nur eine geringe IFN- γ -Antwort messbar, während höhere Werte an CD8 IFN- γ -Lymphozyten nach einer Stimulation mit HCV-Pseudotypen zu detektieren waren.

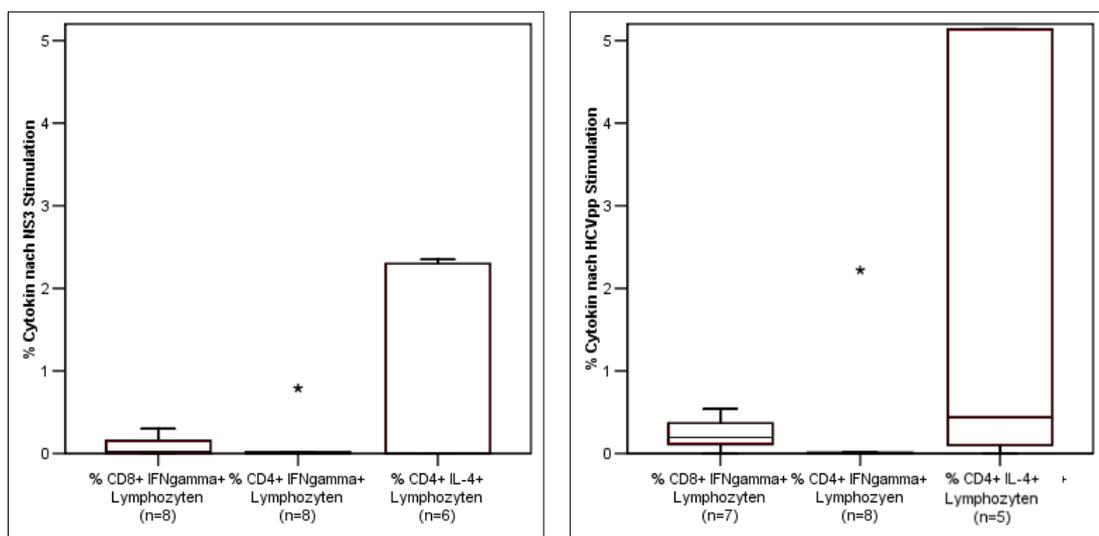


Grafik 3.15: Vergleich der Zytokin-Antworten der late Responder. Nach NS3-Stimulation waren signifikant mehr CD8 IFN- γ -T-Lymphozyten als CD4 IFN- γ zu detektieren ($p = 0,04$). Die IL-4-Antwort der CD4-T-Zellen war signifikant höher als die IFN- γ -Antwort sowohl der CD8- als auch der CD4-T-Zellen (CD8 IFN- γ versus CD4 IL-4+ $p = 0,05$, CD4 IFN- γ versus CD4 IL-4+ $p < 0,01$). Die Zahl an CD8 IFN- γ -T-Lymphozyten war auch nach Stimulation mit HCVpp signifikant höher als die der CD4 IFN- γ -T-Lymphozyten ($p = 0,04$). Eine IL-4-Antwort der CD4-T-Lymphozyten war hier jedoch nicht zu detektieren.

3.5 Lymphozytenstimulation von Blutproben von Patienten ohne Ansprechen auf die Therapie

Bei der Stimulation von Proben der Nonresponder konnten, wie aus Grafik 3.16 zu entnehmen ist, erhebliche IL-4-Werte der CD4-T-Zellen gemessen werden, im Gegensatz zu niedrigen IFN- γ -Werten der CD4- und CD8-T-Zellen. Dies bestätigen auch die Vergleiche mit untherapierten und ausgeheilten Patienten, wie unter 3.4.1 dargestellt ist, in denen Nonresponder wesentlich höhere IL-4 Werte erreichen. Diese Ergebnisse zeigen eine deutliche Tendenz zu einer Verschiebung zu einem Th2-Profil der Lymphozyten bei Patienten, die nicht auf eine Therapie ansprechen.

Die CD8-Zellen zeigten eine stärkere Aktivierung als die CD4 IFN- γ -T-Lymphozyten, wobei dieser Unterschied nicht signifikant ist.



Grafik 3.16: Zytokinvergleich der Nonresponder nach NS3- und HCVpp-Stimulation. Es konnten, im Gegensatz zu niedrigen IFN- γ Werten der CD4- und CD8-T-Zellen, erhebliche IL-4-Werte der CD4-T-Zellen gemessen werden. Die Zahl der CD4 IL-4-Zellen nach HCVpp-Stimulation war signifikant höher als die CD4 IFN- γ -T-Lymphozyten ($p = 0,045$). Der Unterschied zu CD8 IFN- γ -Lymphozyten war nicht signifikant, ist aber ebenfalls sehr deutlich. Die IFN- γ -Werte der CD4-T-Lymphozyten waren geringer als die der CD8-T-Zellen, wobei dieser Unterschied nicht signifikant ist. Auch die Differenzen nach NS3-Stimulation waren nicht signifikant.

3.6 Kasuistik einer akuten HCV-Infektion

3.6.1 Anamnese und Therapieverlauf

Im Verlauf dieser Arbeit ergab sich die interessante Möglichkeit der Untersuchung zweier Blutproben einer Patientin mit einer akuten Hepatitis C-Infektion.

Bei der ersten Untersuchung am 27.07.2004 wurde die 66 Jahre alte Patientin mit einer unklaren Hepatopathie und intermittierenden Bauchschmerzen vorgestellt. Sie gab an, Anfang des Jahres 5 Wochen in Südafrika und Namibia verbracht zu haben. Seitdem leide sie unter Fieber, Nachtschweiß und Kraftlosigkeit. Bei der Blutuntersuchung zeigten sich deutlich erhöhte Transaminasen-Werte. Eine bereits am 19.07.2004 durchgeführte PCR-Untersuchung zeigte eine Viruslast von > 700.000 IU/ml, im ELISA am 22.07.2004 war sie allerdings anti-HCV negativ. Anti-HCV Antikörper konnten erst ab dem 06.08.2004 nachgewiesen werden. Die Typisierung ergab eine Infektion mit Genotyp 3a. Durch diesen Befund kam die behandelnde Ärztin zu dem Schluss, dass es sich hierbei um einen Fall einer akuten HCV-Infektion handelte. Es wurde zunächst abgewartet, ob es zu einer Spontanremission kommt. Am 06.09.2004 ergab die Untersuchung zwar eine leichte Senkung der Viruslast auf 267.000 IU/ml, nachdem diese aber am 18.10. 2004 auf > 700.000 IU/ml angestiegen war, begann die Patientin mit einer Peginterferon-Therapie (100 µg/Woche s.c.). Im Verlauf dieser Therapie sank die Viruslast bereits am 25.10.2004 auf 21.000 IU/ml, ab dem 15.11.2004 war kein Virus mehr nachweisbar. Die Patientin blieb bis zur letzten bekannten Untersuchung am 19.03.2007 PCR-negativ. Eine Übersicht der Untersuchungsergebnisse im zeitlichen Verlauf ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Übersicht der Untersuchungsergebnisse einer Patientin mit akuter HCV-Infektion Genotyp 3a. Nachdem die Patientin keine Spontanremission zeigte, wurde sie unter Therapie mit Peginterferon innerhalb von 28 Tagen PCR-negativ („+“ kennzeichnet eine Erhöhung des Wertes über Normwert).

Messparameter (Normwerte)	19.07.04	22.07.04	05.08.04	06.08.04	26.08.04	06.09.04	18.10.04	25.10.04	15.11.04	19.03.2007
GOT (< 32 U/l)			480+	480+		67+	93+	29	22	
GPT (< 31 U/l)			426+	426+		122+	119+	46+	21	
GT (< 38 U/l)			630+	630+		269+	190+	159+	85+	
alkalische Phosphatase (35-104 U/l)			111+	111+		49	42	39		
quant. PCR IU/ml	> 700.000		> 700.000			267.000,00	> 700.000	21.000,00	negativ	negativ
ELISA		negativ!		positiv						
					Lymphozytenstimulation		Therapiebeginn	Lymphozytenstimulation		

3.6.2 Lymphozytenstimulation zweier Blutproben

Von der oben beschriebenen Patientin konnten im Verlauf ihrer Behandlung zwei Blutproben in der Lymphozytenstimulation gemessen werden. Die erste Blutprobe stammte vom 26.08.2004 und damit vor dem Beginn der Therapie, die zweite Probe wurde am 25.10.2004 gemessen, als die Patientin bereits ein Ansprechen auf die Therapie zeigte. Von beiden Proben liegen leider nur Messergebnisse der IFN- γ + CD8- und CD4-T-Lymphozyten vor. Zu beiden Zeitpunkten waren die Antworten der CD8-Lymphozyten sowohl nach NS3- als auch nach HCVpp-Stimulation äußerst gering, wie dies in Tabelle 3.6 dargestellt ist. Eine IFN- γ Antwort der CD4-Zellen war nicht zu detektieren.

Tabelle 3.6: Übersicht über die Ergebnisse der Lymphozytenstimulation der Patientin mit akuter HCV-Infektion. Messungen der IL-4- und IL-10-Antwort der CD4-Zellen liegen nicht vor, die IFN- γ Werte der CD8- Lymphozyten sind äußerst gering, eine IFN- γ Antwort der CD4-Lymphozyten war nicht zu detektieren.

	% CD8+IFN+		% CD4+IFN+		% CD4+IL-4+		% CD4+IL-10+	
	NS3	HCVpp	NS3	HCVpp	NS3	HCVpp	NS3	HCVpp
26.08.04	0.10	0.01	0.00	0.00	-	-	-	-
25.10.04	0.05	0.07	0.00	0.00	-	-	-	-

4 Diskussion

4.1 Die Durchflusszytometrie zur Bestimmung HCV-spezifischer Lymphozyten

Die Generierung und Erhaltung einer Immunität gegen die meisten viralen Infektionen bedarf einer komplexen Balance zwischen der humoralen und der zellulären Immunantwort. Eine erfolgreiche Kontrolle einer Virusinfektion benötigt die effektive Zusammenarbeit verschiedener Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Vielfach wird die Wirksamkeit der Immunantwort gegen virale Antigene anhand der Antikörperantwort mittels *Radioimmunoassay* (RIA) oder *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt. In den letzten Jahren stellte sich jedoch mehr und mehr heraus, dass sowohl die CD4- als auch die CD8-T-Lymphozytenantwort gegen eine Vakzine oder ein infektiöses Pathogen eine signifikante Rolle beim Schutz gegen virale Infektionen und Krankheiten spielen. Folglich rückte die Quantifizierung dieser T-Zellantworten in den Fokus der Untersuchungen zum Verständnis der protektiven Immunantwort bei zahlreichen infektiösen Erkrankungen.

T-Lymphozyten sind Teil des adaptiven Immunsystems und spielen eine essentielle Rolle bei der Abwehr eindringender mikrobieller Pathogene. T-Helferzellen können über die Zytokinproduktion die Funktion und Differenzierung anderer Immunzellpopulationen unterstützen, zytotoxische T-Zellen sind in der Lage infizierte Zellen zu töten, regulatorische T-Zellen kontrollieren die Funktion anderer Immunzellen.

Die Zytokin-Durchflusszytometrie kombiniert die Vorteile einer Multiparameter-Analyse der Durchflusszytometrie mit der funktionellen Überprüfung der Zytokinproduktion zur Charakterisierung einer Antigen-spezifischen T-Zellantwort.

Mit der Zytokin-Durchflusszytometrie kann man die Antwort Antigen-spezifischer Lymphozyten gegen Proteine, Viruslysate oder Peptide messen. Im Gegensatz zur Analyse von spezifischen T-Zellen mittels MHC-Peptid-Oligomeren (Tetramere oder

Pentamere), bei denen das Epitop sowie die MHC-Klasse bekannt sein muss, kann man in der Zytokin-Durchflusszytometrie die Zytokinantwort von Zellen unbekannter MHC-Klasse bestimmen. Zusätzlich zu den intrazellulären Zytokinen können verschiedene Oberflächenmarker bestimmt werden. Diese wiederum ermöglichen die Charakterisierung der einzelnen Zellpopulationen sowie die Analyse ihres Differenzierungs- und Aktivierungsstatus.

Die Methode der Zytokin-Durchflusszytometrie beinhaltet grundsätzlich eine *in vitro* Kurzzeit-Aktivierung der Lymphozyten von meist sechs Stunden mit Protein, Peptidantigenen oder Mitogenen. Die Zugabe des Sekretionshemmers Brefeldin A (BFA) führt zur Akkumulation der Zytokine in der Zelle. Bei Peptiden oder Mitogenen, die nicht von antigenpräsentierenden Zellen prozessiert werden müssen, kann BFA sofort zur Probe gegeben werden. Bei Proteinantigenen ist eine initiale Inkubationszeit von ein bis zwei Stunden vor BFA-Zugabe notwendig, damit das Antigen optimal prozessiert und präsentiert werden kann. Die gesamte Inkubationszeit ist relativ kurz, um die Viabilität der Zellen zu erhalten. So können akkurate Aussagen über den Anteil Antigen-spezifischer Zellen in peripheren mononukleären Zellen oder in Vollblutproben getroffen werden. Längere Inkubationszeiten beeinflussen möglicherweise die quantitative Aussage des Lymphozytenstimulationstests, da die Ergebnisse durch unvorhersehbare proliferative und/oder apoptotische Prozesse beeinflusst werden, die nach etwa 12 Stunden Stimulationszeit einsetzen [71].

Die Zytokin-Durchflusszytometrie ist eine sehr sensitive Methode, die eine breite Spanne an Antworten detektieren und, im Gegensatz zur Tetramertechnologie, zahlreiche Phänotypen erfassen kann. Dennoch gibt es Einschränkungen bezüglich der Komplexität und der Zahl der zu bearbeitenden Proben. Da es sich um eine Stimulation lebender Zellen handelt, die Zellen fixiert, permeabilisiert und zuletzt gefärbt werden müssen, ist die Durchführung durchaus anspruchsvoll. Die Zahl der Proben, die auf einmal bearbeitet werden können, ist abhängig von der Kapazität des Durchflusszytometers und kann eine Limitierung darstellen.

Mononukleäre Zellen, die aus dem peripheren Blut isoliert werden, liefern nützliche Informationen über individuelle Zelltypen. Funktionelle Antworten dieser präparierten Zellen reflektieren jedoch möglicherweise nicht die physiologische *in vivo*-Antwort. Die Isolation der mononukleären Zellen mittels Gradienten, wie Ficoll-Hypaque, und die Kultivierung in synthetischem Medium, welches meist fötales Kälberserum enthält,

führt mit großer Wahrscheinlichkeit zu artefiziellen Effekten auf die Leukozytenfunktion. Vollblut, das physiologische Level regulatorischer Zytokine enthält, entspricht mehr den *in vivo* Gegebenheiten und spiegelt deshalb eher krankheitsbedingte Veränderungen zellulärer und nicht-zellulärer Komponenten wider [60].

4.1.1 Die Immunabwehr gegen HCV

Die angeborene und die adaptive Immunantwort sind zu unterschiedlichen Anteilen in den Verlauf einer Hepatitis C-Infektion involviert. Starke Interaktionen mit dem angeborenen Immunsystem wurden in verschiedenen Studien demonstriert. So induziert HCV in Schimpansen signifikant Typ I-Interferon, unabhängig vom Verlauf der Erkrankung. Dies könnte eine exzessive Replikation des Virus im frühen Stadium der Infektion einschränken. Die Herabregulierung des IFN α / β -Rezeptors und die Blockade der IFN-Signalkaskade durch HCV-Proteine könnten zu einer Viruspersistenz beitragen. In transfizierten Zelllinien wurde gezeigt, dass auch natürliche Killerzellen in ihrer Funktion von HCV-Proteinen gehemmt werden. Antikörper werden von fast allen immunkompetenten Patienten gegen verschiedene Virusproteine gebildet. Die humorale Immunantwort korreliert allerdings nicht mit einem günstigen Ausgang der Infektion [6].

4.1.1.1 Die frühe Immunantwort gegen HCV

Die frühesten Funktionen der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen HCV sind im Menschen sehr schwer zu untersuchen, da Symptome in der Regel erst einige Wochen nach der Infektion auftreten. Außerdem finden initiale Abwehrmechanismen in der Leber statt und lassen sich wahrscheinlich nur eingeschränkt in leichter zugänglichen Geweben wie im Blut nachvollziehen.

RNA, die aus Leberproben von Schimpansen isoliert werden konnte, wurde mittels Microarray analysiert. Gene der angeborenen Immunität werden sehr schnell als Antwort auf virale doppelsträngige RNA induziert, die auch ein wesentliches Merkmal der HCV-Replikation darstellt. Verschiedene Typ I-Interferon-induzierbare Gene und Transkriptionsfaktoren, die mit der angeborenen Immunantwort assoziiert sind, werden heraufreguliert. Die Expression dieser Gene wird in der Leber von Schimpansen allerdings unabhängig vom Ausgang der Infektion beobachtet, weshalb man annimmt, dass das HCV gegen diese Abwehrmechanismen relativ resistent ist.

Dies könnte daran liegen, dass einige HCV-Proteine mit angeborenen Abwehrmechanismen interferieren. Hierbei spielen das NS5A-Protein, das E2-Protein sowie das NS3/4A-Holoenzym eine Rolle.

Auf der Seite der adaptiven Immunantwort werden IFN- γ -Gene vor allem in der Leber derjenigen Individuen exprimiert, die eine transiente Kontrolle der HCV-Replikation zeigen. Die Expression dieser Gene ist typischerweise auf einige Wochen nach der Infektion verschoben und trifft mit der Detektion von CD3-mRNA zusammen. Dies lässt darauf schließen, dass T-Lymphozyten die Hauptquelle dieser antiviralen Zytokine sind. DNA-Microarray-Analysen des Lebergewebes von Schimpansen bestätigen die Verbindung zwischen der Expression solcher Gene, die mit der adaptiven Immunantwort assoziiert sind, und dem günstigen Ausgang der Infektion [6].

4.1.1.2 Die zellvermittelte Immunantwort während der akuten Infektion

CD4-T-Lymphozyten spielen bei der antiviralen Immunität eine essentielle Rolle für die Entstehung und die Erhaltung einer zytotoxischen CD8-Lymphozytenantwort, werden aber durch verschiedene persistierende RNA-Viren inaktiviert. Eine solche Inaktivierung könnte auch Strategie des HCV sein. In der Leber von Schimpansen, die die Virusreplikation transient oder dauerhaft kontrollieren konnten, wurden CD4-Helferzellen gefunden, die HCV-Proteine erkannten. Dies war jedoch nicht der Fall bei solchen Tieren, die einer Infektion nicht entgegensteuern konnten [6,72]. Die CD4-Antwort in der Leber konnte beim Menschen bisher nicht charakterisiert werden.

Die Effektivität der CD4-Zellen hängt sowohl von der Zahl der erkannten Epitope ab, als auch von der Erkennung dominanter Epitope. Ein dominantes Target der T-Helferzellen ist das NS3-Protein, wobei neuere Studien belegen, dass bei selbstlimitierenden Infektionen die CD4-T-Zellen die meisten HCV-Proteine erkennen [6,72-76].

Die CD8-T-Zellen sind ein Schlüsselfaktor bei der Bestimmung des Verlaufs einer HCV-Infektion sowohl beim Menschen als auch beim Schimpansen, da zwischen dem Auftreten von CD8-T-Zellen im peripheren Blut und in der Leber und der Kontrolle einer Virämie ein zeitlicher Zusammenhang besteht.

Wie in Studien mit Schimpansen gezeigt werden konnte, migrieren HCV-spezifische CD8-T-Lymphozyten während einer akuten Infektion in die Leber und können zur

Virusbeseitigung beitragen. CD8-T-Zellen aus der Leber von Schimpansen sind zytotoxisch aktiv und produzieren nach Stimulation mit HCV-Antigenen IFN- γ [77,78]. Das Auftreten solcher Zellen in der Leber einige Wochen nach Infektion war zeitlich mit einem starken Anstieg der Transaminasen und der transienten Beseitigung von HCV-RNA aus dem Plasma assoziiert. Alle Tiere, die keine CD8-T-Zellantwort aufwiesen, entwickelten eine persistierende Infektion.

Auch im Blut expandieren HCV-spezifische CD8-Lymphozyten während einer akuten Infektion, die überwunden werden kann. Interessanterweise scheinen CD8-Zellen während der frühen Phase der Infektion in ihrer Funktion beeinträchtigt zu sein, wie mittels Analyse der IFN- γ -Produktion nach *ex vivo* Antigenstimulation nachgewiesen wurde [75,76]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Schimpansen gemacht, was darauf schließen lässt, dass eine verspätete Effektorfunktion ein beständiges Merkmal einer akuten HCV-Primärinfektion ist, auch wenn das Virus überwunden werden kann. Hierbei könnte eine temporäre virus-induzierte Anergie eine Rolle spielen. Eine solche verzögerte Effektorfunktion trat nicht bei Schimpansen auf, bei denen Memory-T-Zellen auf eine zweite Infektion antworteten [79].

Obwohl ein direkter Zusammenhang zwischen CD8-T-Lymphozyten und der Beseitigung einer HCV-Infektion besteht, weiß man wenig darüber, wie die T-Zellen das Virus aus infizierten Hepatozyten beseitigen. Es ist bemerkenswert, dass HCV sich normalerweise wochenlang in der Leber repliziert, ohne Symptome zu verursachen, bevor es gleichzeitig zu einem Anstieg der Transaminasen und dem Auftreten zytotoxischer CD8-T-Lymphozyten kommt. Hieraus interpretiert man, dass die zytotoxischen T-Lymphozyten sowohl eine Schädigung der Leber verursachen als auch die Kontrolle des Virus bedingen. Trotzdem kommt es teilweise zu Ausheilungen ohne biochemische Anzeichen einer Leberschädigung. Dies könnte auf eine nicht-zytolytische Kontrolle der infizierten Hepatozyten zurückzuführen sein. Ein Mechanismus involviert möglicherweise IFN- γ , denn dieses wird bei Spontanausheilungen in der Leber exprimiert und es hemmt die Replikation subgenomischer HCV-Replicons in Zellkultur [6].

4.1.1.3 Die zellvermittelte Immunantwort bei einer chronischen Infektion

Der Übergang einer akuten zur chronischen Hepatitis C-Infektion ist mit dem Verlust HCV-spezifischer CD4-Lymphozyten verbunden, die auch nicht mehr wiederzukehren scheinen. Auch die CD8-T-Zell-Aktivität scheint beeinträchtigt zu sein.

Eine antivirale Behandlung mit IFN- α und Ribavirin führt bei 40-70% chronisch infizierter Patienten zur Viruskontrolle, abhängig vom Genotyp des Virus. Es ist noch nicht bekannt, ob eine antivirale Therapie eine *de novo* T-Zell-Antwort unterstützt, oder ob sie die Wiederherstellung bereits geprimter, aber funktionell beeinträchtigter Zellen ermöglicht [6].

Die Untersuchung der Funktion der CD4- und CD8-Lymphozyten in der akuten Phase einer HCV-Infektion stellt sich beim Menschen als äußerst schwierig dar, da in den meisten Fällen die Erkrankung in diesem Stadium nicht erkannt wird.

In der klinischen Praxis wäre es von großer Bedeutung, wenn es nach der Diagnosestellung einer HCV-Infektion für Therapieverlauf und –erfolg prognostische Anhaltspunkte gäbe. Die antivirale Therapie mit Interferon- α und Ribavirin könnte individueller auf den Patienten abgestimmt werden. Wäre es anhand immunologischer Parameter möglich festzustellen, dass der Patient auf die Therapie nicht anspricht, könnte die mit starken Nebenwirkungen verbundene Therapie neu überdacht werden. Um ein routinemäßiges Screening von Patientenproben bezüglich einer Lymphozytenantwort gegen das Hepatitis C-Virus zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit ein Kurzzeit-Lymphozytenstimulationstest unter Verwendung von Hepatitis-C-Pseudotypen etabliert.

4.1.2 Optimierung der Methode für die Messung HCV-spezifischer Lymphozyten

Die in dieser Arbeit angewandte Methode basiert auf Protokollen, wie sie von zahlreichen Arbeitsgruppen zum Nachweis einer spezifischen Lymphozytenantwort gegen verschiedenste Antigene (CMV, VZV, HIV) verwendet werden [60,71,80-82], sowie auf dem Protokoll eines kommerziell erhältlichen Test-Kits zur intrazellulären Zytokinmessung (FastImmune Intracellular Cytokine Detection Kits, BD Biosciences) [52-54]. Der Einsatz eines Kits ermöglicht die Standardisierung des Tests und somit den Einsatz in der Routinediagnostik, die zahlreichen Qualitätskriterien unterliegt (z.B. Akkreditierung).

Zur Optimierung dieses Testprotokolls für die Messung HCV-spezifischer Lymphozyten wurden verschiedene Parameter überprüft und variiert. Für den Zeitpunkt der BFA-Zugabe ließen sich in den Versuchsansätzen sieben verschiedener Blutproben keine eindeutigen Tendenzen erkennen. Deshalb wurde für die Durchführung des Tests eine Stunde Vorinkubation vor BFA-Zugabe festgelegt. Dies basiert vor allem auf Protokollen anderer Arbeitsgruppen [49,50,62,64,65] und den Empfehlungen von BD Biosciences für das FastImmune Intracellular Cytokine Detection Kit [52,53].

Da das Hepatitis C-Virus nur sehr ineffizient in Zellkultur repliziert, gibt es verschiedene Surrogatmodelle, um das Virus und seine Pathogenese genauer zu untersuchen. Vielfach werden verschiedene rekombinante HCV-Proteine eingesetzt, um die Lymphozytenfunktion zu überprüfen. Allerdings ist unklar, inwieweit solche Antigene *in vivo* tatsächlich den T-Zellen präsentiert werden. Als neues Stimulationsmodell wurden in dieser Arbeit HCV-Pseudotypen untersucht. Die infektiösen Pseudotypen bestehen aus lentiviralen Core-Partikeln, die auf ihrer Oberfläche nicht modifizierte E1- und E2-Hüllglykoproteine des Hepatitis C-Virus tragen und so die Funktion nativer HCV-Partikel imitieren. Die Idee war, dass diese HCVpp möglicherweise mehr der *in vivo* Situation entsprechen als rekombinante virale Proteine. So könnte eine deutlichere und gut interpretierbare Stimulationsantwort der Lymphozyten erzielt werden. Um die Qualität und Effektivität der Stimulation mit den HCV-Pseudotypen zu überprüfen, sollten die Ergebnisse der HCVpp-Stimulation mit denen einer Proteinstimulation verglichen werden.

Aus Vergleichsansätzen von sieben Blutproben von HCV-infizierten Patienten mit den HCV-Proteinen NS3 und Core wurde ein Protein für die weiteren Versuche ausgewählt.

NS3 ist, neben dem Core-Protein, das am stärksten konservierte Antigen und deshalb möglicherweise gut geeignet, um eine Immunantwort gegen verschiedene Virusvarianten zu detektieren [83]. Es wurde unter anderem nachgewiesen, dass eine starke NS3-spezifische Antwort der T-Helferzellen bei Patienten, die eine Behandlung mit IFN- α erhalten, mit der Virusbeseitigung assoziiert ist [66]. Auch Patienten, die eine HCV-Infektion in der akuten Phase spontan überwunden haben, zeigten eine signifikante Proliferationsantwort der T-Zellen gegen HCV-NS3 [84], NS3-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten wurden in Zusammenhang mit einer Ausheilung der Infektion beschrieben [67]. Da aus den vergleichenden Versuchen nicht eindeutig zu entnehmen war, welches Protein am besten für den Lymphozytenstimulationstest geeignet ist, d.h. welches die deutlicheren Antworten stimuliert, wurde NS3 aus den oben genannten Gründen für alle weiteren Versuche eingesetzt.

Zum Einsatz der HCV-Pseudotypen in der Lymphozytenstimulation wurden diese zunächst titriert, um bestmögliche Antworten zu erhalten. Die HCVpp wurden nach ihrer Anzucht in Zellkultur ultrazentrifugiert, wodurch eine Konzentration von 10.000 TU/ml erreicht werden konnte. Allerdings muss man davon ausgehen, dass die „Transducing Units“ (TU) nicht mit der realen Menge der in der Suspension enthaltenen Viruspartikel übereinstimmen. Sie reflektieren die Menge an infektiösen Viruspartikeln. Es sind wahrscheinlich jedoch mehr - „defekte“ - Viruspartikel in der Suspension enthalten. Für die weiteren Stimulationsansätze wurden nach den Titrationsversuchen 400 TU/ml HCVpp eingesetzt.

Um die Spezifität der Stimulation und damit die Spezifität der Lymphozytenantworten zu überprüfen, wurden für die verwendeten Antigene (HCVpp und NS3) jeweils entsprechende Kontrollantigene zur Stimulation der Patientenproben eingesetzt. Als Kontrolle der HCVpp wurden Pseudotypen von VSV verwendet. Das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) ist der Erreger einer hochkontagiösen, fieberhaften Erkrankung bei Pferden, Maultieren und Rindern, seltener beim Schwein. Der Krankheitsverlauf ist meist gutartig, das Auftreten ist anzeigepflichtig. Die Übertragung von VSV vom Tier auf den Menschen erfolgt durch Kontakt tierischen Speichels eines infizierten Tieres mit der menschlichen Schleimhaut oder einer Wunde, der Infektionsverlauf ähnelt

einer Influenzainfektion. Solche Fälle sind aber relativ selten, da die Infektiosität von VSV für den Menschen gering ist. Deshalb eignen sich die VSVpp sehr gut als Kontrolle für die HCV-Pseudotypen, da eine spezifische Reaktivität der Patienten gegen VSV in der Regel nicht zu erwarten ist [85].

Das rekombinante NS3-Protein ist vom Hersteller in einem Puffer gelöst, der Tris, Glycin sowie SDS enthält. Dieser Puffer wurde als Kontrolle für die NS3-Stimulation eingesetzt, um unspezifische Stimulationseffekte durch eine der enthaltenen Komponenten ausschließen zu können.

Vor allem für CD8 IFN- γ -Lymphozyten konnten HCV-spezifische Stimulationsantworten gemessen werden. Beim Vergleich der CD8 IFN- γ -Lymphozyten der HCV-Protein-stimulierten Proben mit den unstimulierten Kontrollen oder der HCVpp-stimulierten Proben mit den VSVpp-stimulierten Proben unterschieden sich diese jeweils signifikant ($p < 0,01$). Dagegen war die Detektion einer Antigen-spezifischen Zytokinproduktion nicht für alle CD4-Messungen möglich, was sich in sehr geringen oder nicht messbaren CD4-Antworten widerspiegelte. Dabei konnten die deutlichsten Stimulationsergebnisse innerhalb der CD4 IL-4-Lymphozyten detektiert werden (bis zu 84,8% CD4 IL-4-produzierende Zellen), gefolgt von den CD4 IL-10-Lymphozyten. In der statistischen Analyse aller Messungen der CD4 IL-4- und der CD4 IL-10-Lymphozyten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Antigen- und der Kontrollstimulation. Die Analyse der CD4 IFN- γ -Lymphozyten ergab insgesamt sehr niedrige oder nicht messbare Stimulationsergebnisse. Die Antworten auf HCVpp waren dabei jedoch signifikant höher als die VSVpp-Kontrolle ($p < 0,01$), während das HCV-Protein keine signifikant höheren Antworten als die Kontrolle stimulieren konnte.

Diese nicht-signifikanten Unterschiede zwischen Antigenstimulation und Kontrollstimulation betreffen die statistische Signifikanz bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv. Für die einzelne Blutprobe bedeutet dies jedoch, dass bei manchen Patienten auch hier durchaus spezifische Antworten messbar waren.

In allen Messungen zeigten die unstimulierten Kontrollen keinen Unterschied zu den VSVpp-stimulierten Proben.

Die Spezifität der Stimulationsantworten wurde auch durch die Auswertung der gesunden, anti-HCV negativen Kontrollprobanden belegt. Diese zeigten nur äußerst

geringe Stimulationsantworten, durchschnittlich 0,01-0,04% für die Messungen CD8 IFN- γ -, CD4 IFN- γ - und CD4 IL-10-Lymphozyten, sowie 0,44% und 1,13% CD4 IL-4-Lymphozyten. Diese Antworten sind signifikant niedriger als die Stimulationsresultate HCV-infizierter Patienten und belegen somit die Spezifität der Lymphozytenantworten bezüglich der verwendeten Antigene. Nicht signifikant unterschieden sich hierbei die Ergebnisse der CD4 IFN- γ -T-Zellen, die auch bei den Patienten im Durchschnitt eine kaum nachweisbare HCV-spezifische Stimulation aufwiesen. Auch die Auswertung der CD4 IL-10 Messungen nach HCVpp-Stimulation ergaben keine statistische Signifikanz, zeigten jedoch die Tendenz zu einer deutlicheren Antwort der Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden.

Grundsätzlich sind die Stimulationsergebnisse der HCV-positiven Proben jedoch sehr niedrig. Mit Ausnahme der CD4 IL-4-Lymphozytenstimulationen wurde selten Werte über 1% Zytokin-sezernierende Zellen erreicht. Dies verdeutlicht die Schwierigkeit des Nachweises HCV-spezifischer Lymphozyten. Bei anderen viralen Antigenen, wie z.B. HCMV (humanes Cytomegalievirus), können deutlich höhere Resultate erzielt werden.

4.1.3 Einsatzmöglichkeiten der HCVpp als Stimulationsantigen

Normalerweise werden Peptide, Peptidmischungen oder komplexere Moleküle (z.B. Proteine oder Proteinmischungen) verwendet, um die T-Zellfunktion *in vitro* zu analysieren. Alternativ werden MHC-Molekül-Multimere verwendet, an die ein entsprechendes Peptid gekoppelt ist [44].

Da eine effektive Anzucht von HCV in Zellkultur bis heute nicht möglich ist, werden gentechnologische Verfahren angewendet, um HCV-Antigene herzustellen. Diese Methoden sind jedoch sehr arbeits-, zeit- und kostenintensiv und können demnach kaum in einer klinischen Routinediagnostik eingesetzt werden. Das Hepatitis C-Virus ist zwar nicht in der Lage Zellkulturen produktiv zu infizieren, aber die Hülle vermittelt die Virusadsorption und -penetration in die Zelle. Die Vermehrung scheint in einem späteren Stadium der Replikation abgebrochen zu werden. Ein Surrogatsystem zur Untersuchung von HCV sind deshalb in Zellkultur vermehrungsfähige Retroviren, die an ihrer Oberfläche Hüllantigene von HCV tragen, die Glycoproteine E1 und E2.

Die HCV-Glycoproteine E1 und E2 werden während der Virusreplikation durch eine Peptidase aus dem HCV-Polyprotein abgespalten. Sie sind Typ-I-

Transmembranproteine mit einer großen N-terminalen Ectodomäne und einer C-terminalen Transmembrandomäne. Diese lagern sich zu nicht-kovalenten Heterodimeren zusammen. Die Ectodomänen der HCV-Hüllproteine E1 und E2 sind durch N-gekoppelte Glykane modifiziert. Tatsächlich besitzen E1 und E2 sechs bis elf potentielle Glycolisierungsstellen, die meisten von ihnen sind hoch konserviert. Einige dieser Glykane spielen eine Rolle bei der HCV-Glycoprotein-Faltung und dem Viruseintritt. Da sie für die Infektion von essentieller Bedeutung sind, stellen die Hüllglycoproteine ein geeignetes Target für die Entwicklung antiviral wirksamer Moleküle dar, die den Viruseintritt verhindern können.

Im E2-Hüllglycoprotein wurden hypervariable Regionen (HVR) identifiziert. Die ersten 27 Aminosäuren der E2-Ectodomäne bilden die HVR1. Die deutliche Variabilität dieser Region wird wohl durch Antikörperselektion von neuen Virusvarianten verursacht. Funktionell scheint diese Region am Viruseintritt beteiligt zu sein. Aber abgesehen von der hohen Sequenzvariabilität scheinen die physiko-chemischen Eigenschaften sowie die Konformation der HVR1 zwischen den verschiedenen Genotypen konserviert zu sein. Eine weitere hypervariable Region wurde für E2 beschrieben, HVR2. Von dieser nimmt man an, dass sie die Rezeptorbindung von E2 moduliert.

Die beiden Hüllglycoproteine, E1 und E2, sind entscheidend für den HCV-Lebenszyklus. Sie sind essentiell für den Viruseintritt und sie sind am Zusammenbau der infektiösen Partikel beteiligt. Das E1-E2-Heterodimer spielt offensichtlich als Ligand für zelluläre Rezeptoren eine Rolle. Eine lösliche Form des Hüllglycoproteins E2 kann beispielsweise an CD81 auf der Oberfläche von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) binden. Diese Interaktion inhibiert die Zytotoxizität und die Zytokinproduktion dieser Zellen. Die Bindung von löslichem E2 an CD81 kann außerdem ein co-stimulatorisches Signal für T-Lymphozyten sein und es aktiviert B-Lymphozyten. Es muss jedoch noch untersucht werden, ob das E2-Glycoprotein auch im Kontext nativer Viruspartikel die gleichen Effekte und Funktionen erfüllt [86].

Zudem sind E1 und E2, durch ihre exponierte Lage an der Oberfläche des Virions, Targets für neutralisierende Antikörper. Die Entwicklung von retroviralen Pseudotypen mit unmodifizierten HCV E1- und E2-Hüllproteinen hat Analysen HCV-neutralisierender Antikörper ermöglicht [51,87]. Die Mehrzahl der chronisch infizierten Patienten scheint kreuzreaktive neutralisierende Antikörper (nAK) zu besitzen. Dagegen wurden in einigen Fällen einer akuten überwundenen Infektion keine nAK

gefunden und in akut infizierten Patienten scheinen sie nicht mit der Virusbeseitigung assoziiert zu sein [86].

In dieser Arbeit wurden nun HCVpp eingesetzt, um die spezifische T-Zellantwort in chronisch infizierten Patienten zu untersuchen. Um die Qualität und Effektivität der Stimulation mit den HCV-Pseudotypen zu überprüfen, wurden die Ergebnisse der HCVpp-Stimulation und die der HCV-Proteinstimulation miteinander verglichen.

Bei allen Messungen ergaben sich ähnliche Ergebnisse nach Protein- oder HCVpp-Stimulation. Die Ergebnisse der CD4 IFN- γ –Lymphozyten aber waren nach HCVpp-Stimulation im Vergleich zur HCV-Protein-Stimulation signifikant höher ($p = 0,028$). Dies ist sehr interessant für weitere Studien, da gerade die CD4-Antwort in HCV-infizierten Patienten sehr schwierig zu messen ist.

Da die HCVpp an ihrer Oberfläche die Hüllantigene E1 und E2 vom Genotyp 1 tragen, stellt sich die Frage, ob dies einen Einfluss auf die T-Zellstimulation bei solchen Patienten hat, die mit einem anderen HCV-Genotypen infiziert sind. Die in dieser Arbeit getesteten Blutproben stammen von Patienten, die mit unterschiedlichen HCV-Subtypen infiziert sind oder waren, sowohl Genotyp-1a/b als auch Genotyp-2, -3 und -4. Aber auch die verwendeten HCV-spezifischen Proteine NS3 und Core sind rekombinante Proteine vom HCV-Genotyp 1b.

Bei der Überprüfung der Messungen von CD8 IFN- γ -, CD4 IFN- γ -, CD4 IL-10- und CD4 IL-4-Lymphozyten von Patienten, die mit Genotyp-1 infiziert sind oder solchen, die eine Infektion mit Genotyp-2, -3 oder -4 haben, ließen sich keine Unterschiede in den Stimulationsantworten nachweisen. Dies bedeutet, dass der Genotyp des Stimulationsantigens zu keiner Beeinflussung der Antwort von Patientenproben zu führen scheint, die eine Infektion mit einem anderen HCV-Genotyp aufweisen.

Auch bei gesunden Kontrollprobanden führten die HCV-Pseudotypen zu keinen unspezifischen Stimulationsergebnissen. Ob die leicht erhöhten Durchschnittswerte innerhalb der CD4 IL-4-Messungen (durchschnittlich 0,01-0,04% für die Messungen CD8 IFN- γ -, CD4 IFN- γ - und CD4 IL-10-Lymphozyten, 1,13% CD4 IL-4-Lymphozyten) auf der Verwendung von Pseudotypen beruhen oder lediglich auf die generelle Grundproduktion von IL-4 unter diesen Kulturbedingungen zurückzuführen sind, bleibt in weiteren Studien zu evaluieren. Allerdings unterschieden sich auch hier die Ergebnisse der gesunden Kontrollprobanden signifikant von denen der getesteten Patientenproben, was die Spezifität der Ergebnisse unterstreicht.

4.2 Auswertung des Patientenkollektivs

Die CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten sind für die Beseitigung Virus-infizierter Zellen oder anderer intrazellulärer Pathogene sowie maligner Zellen zuständig. CD4-Zellen haben vor allem eine regulative Aufgabe und werden demnach auch als T-Helferzellen (Th) bezeichnet. Mosmann und Coffman fanden heraus, dass die Th-Zellen aus zwei funktionellen Untergruppen bestehen, den Th1- und Th2-Zellen, die die Immunantwort regulieren [88,89]. Heute besteht der Konsensus, dass naive Th-Zellen nach der Aktivierung zu Th1 oder Th2 ausdifferenzieren. Th1-Zellen produzieren pro-inflammatorische Zytokine, wie beispielsweise IFN- γ , und vermitteln die zelluläre Immunität. Im Gegensatz hierzu produzieren die Effektor-Th2-Zellen Zytokine wie Interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-9, IL-10. Diese beeinflussen die humorale Immunantwort. Obwohl es vermutlich weitere Th-Untergruppen gibt, die das Immunsystem beeinflussen, scheint die primäre Funktion der Th-Zellen die negative Regulation der Immunantwort zu sein [90].

Verschiedene infektiöse Antigene führen zu einer Th1- oder Th2-Aktivierung. Viren induzieren meist eine Th1-Antwort, Th1-Zytokine spielen bei der antiviralen Verteidigung über die Aktivierung von T-Zellen und Phagozyten eine entscheidende Rolle [91]. Über den Einfluss der Zytokine auf den Verlauf einer HCV-Infektion ist noch nicht sehr viel bekannt. Zurzeit wird in Bezug auf Hepatitis C kontrovers diskutiert, ob eine Verschiebung von Th1 zu Th2 eine kritische Determinante für die Entwicklung einer chronischen Infektion darstellt [64,66,68,91-94].

Die Zytokin-Durchflusszytometrie ist vor allem besonders gut geeignet, um eine Th1- oder Th2-gerichtete Lymphozytenantwort bei einer Infektion oder Erkrankung zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurden 73 HCV-infizierte Patienten bezüglich ihrer CD8-, CD4-Th1- und CD4-Th2-Antwort analysiert. Von den meisten Patienten konnte nur eine Blutprobe während oder vor der Therapie, oder vor bzw. nach ihrer (spontanen) Ausheilung gemessen werden. Generell war die Beurteilung der Messergebnisse schwierig, da kein definiertes Patientenkollektiv zur Verfügung stand und die Antworten in hohem Maße variierten. Um eine Auswertung der Stimulationsergebnisse zu ermöglichen, wurden deshalb die Patienten in Gruppen mit gemeinsamen Merkmalen zusammengefasst. Zum einen wurden Patienten

untersucht, die zum Zeitpunkt der Messung eine antivirale Therapie erhielten. Zum anderen wurden Patienten, die zum Zeitpunkt der Messung der Probe nicht therapiert wurden, in PCR-positive und PCR-negative unterteilt. Gesondert wurden hier außerdem solche betrachtet, die eine Therapie nach dem Messzeitpunkt begannen, um prospektive Daten zu erhalten. Außerdem wurden zur Test-Validierung Daten von Patienten ausgewertet, deren Krankheits- und Therapieverlauf im Laufe dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnte.

Bei der Analyse der Stimulationsergebnisse von Patienten, die eine Kombinationstherapie aus INF- α und Ribavirin erhielten, zeigte sich eine deutliche Tendenz einer signifikant höheren IFN- γ -Antwort der CD8-Lymphozyten der late Responder im Vergleich zu den initialen Respondern oder Patienten, die das Virus nicht beseitigen konnten. Die IFN- γ -Antwort der CD4-T-Zellen zeigte das gleiche Muster.

Initiale Responder zeigten in ihren Stimulationsantworten die Tendenz zu einer nachweisbaren IFN- γ Produktion, sowohl der CD4- als auch der CD8-Lymphozyten, aber keine Antigen-spezifische Produktion von IL-4. Late Responder hatten eine signifikant höhere IFN- γ Produktion der CD8- gegenüber den CD4-Zellen, wobei die HCV-Pseudotypen zu einer stärkeren Aktivierung der CD4-Lymphozyten zu führen scheinen als NS3. Eine etwas stärkere Aktivierung der CD4 IFN- γ -Lymphozyten durch die HCVpp ließ sich auch bei den initialen Respondern erkennen.

Die Auswertung der Stimulationsergebnisse von Patienten vor dem Beginn einer anti-HCV-spezifischen Therapie ergab zwar keine signifikanten Unterschiede der CD8 IFN- γ -Zellen zwischen Patienten mit einem initialen Ansprechen auf die spätere Therapie, late Respondern oder Nonrespondern. Allerdings konnte generell eine IFN- γ -Produktion der CD8-Lymphozyten gemessen werden, kaum aber der CD4-T-Zellen. Dies ist besonders interessant im Vergleich zu Messungen von Patienten unter Therapie, bei denen CD4 IFN- γ -Werte detektierbar waren.

Patienten, die initial auf die spätere Therapie ansprachen, zeigten tendenziell höhere Werte der CD8-Zellen als die zukünftigen late Responder oder Nonresponder. Bei late Respondern war die IL-4-Antwort der CD4-Zellen nach NS3-Stimulation signifikant höher als die IFN- γ -Ergebnisse der CD8- und der CD4-Lymphozyten. Dies konnte durch die Stimulation mit den HCVpp nicht bestätigt werden, hier war keine IL-4-

Produktion messbar. Aber sowohl nach Protein- als auch nach HCVpp-Stimulation war die IFN- γ -Ausschüttung der CD8-Lymphozyten höher als die der CD4-Zellen.

Die Gruppe der Nonresponder/Relapse zeigte eine deutliche Tendenz zu einer starken IL-4-Antwort im Gegensatz zur Gruppe der untherapierten oder ausgeheilten Probanden. Die IL-4-Werte waren auch im Vergleich mit late Respondern, die vor einer Therapie gemessen wurden, signifikant erhöht. Die Nonresponder/Relapser hatten hohe IL-4-Werte im Gegensatz zu niedrigen IFN- γ -Werten, sowohl der CD8- als auch der CD4-Zellen.

Die CD8-T-Zellen sind wichtig für die Virusbeseitigung. Sie töten entweder direkt infizierte Zellen oder wirken über nicht-zytotoxische Mechanismen, wie die Sekretion antiviraler Zytokine (IFN- γ). Die CD4-Lymphozyten verstärken über Th1-Zytokine die Immunantwort, indem sie die Expression von HLA-Molekülen auf infizierten Zellen erhöhen und damit die Präsentation von Antigenen für Immunzellen. Außerdem werden hierdurch CD8-Zellen aktiviert.

Sowohl bei den initialen als auch vor allem bei den late Respondern konnte während der Therapie eine Th1-Antwort der CD4-Zellen sowie eine IFN- γ -Produktion der CD8-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten bei späteren initialen und late Respondern vor ihrer Therapie kaum CD4 IFN- γ -Lymphozyten detektiert werden. Auch die Nonresponder hatten eine kaum nachweisbare IFN- γ -Produktion der CD4-Zellen. Dies unterstreicht die Bedeutung der CD4-Zellen innerhalb der antiviralen Immunantwort gegen HCV. CD4 T-Lymphozyten spielen bei der antiviralen Immunantwort eine essentielle Rolle für die Entstehung und die Erhaltung einer zytotoxischen CD8-Lymphozytenantwort, werden aber durch verschiedene persistierende RNA-Viren inaktiviert. Eine solche Inaktivierung könnte auch Strategie des HCV sein. Verschiedene Studien haben bereits die enge Korrelation zwischen einer polyklonalen, multispezifischen proliferativen CD4-T-Zellantwort und der Beseitigung des Hepatitis C-Virus während der akuten Infektion nachgewiesen [95-97]. Tsai *et al.* [68] zeigten, dass es häufiger zu einer Virusbeseitigung kommt, wenn periphere mononukleäre Blutzellen ein Th1-Profil aufweisen als bei einem Th2-Phänotypen. Der Übergang einer akuten zur chronischen Hepatitis C-Infektion ist mit dem Verlust HCV-spezifischer CD4- Lymphozyten verbunden, die nicht mehr wiederzukehren scheinen. Auch während einer chronischen Infektion könnte eine

starke Th1-Antwort mit einem besseren Krankheitsausgang und geringeren entzündlichen Prozessen verbunden sein [97]. Möglicherweise führt die Therapie zu einer Reaktivierung oder Neuentstehung einer Th1-Antwort und somit zur erfolgreichen Bekämpfung der Infektion. Dies würde die Detektion einer IFN- γ -Produktion durch CD4-Lymphozyten während der Therapie und das Fehlen einer solchen vor einer Therapie erklären. Diese Unterschiede zeigen sich allerdings in dieser Arbeit nur bei den late Respondern deutlich. Die initialen Responder lassen sowohl vor der Therapie als auch während einer solchen keine deutliche Th1-Antwort erkennen.

Während der Therapie zeigten in dieser Arbeit die late Responder eine signifikant höhere IFN- γ -Produktion der CD8-Zellen als der CD4-Zellen. Messungen vor der Therapie ergaben dieses Bild bei den späteren initialen Respondern. Gegebenenfalls ist die erhöhte Menge IFN- γ + CD8-Zellen ein Zeichen für die erfolgreiche Bekämpfung der Infektion. Patienten, die bereits vor der Therapie IFN- γ -produzierende CD8-Zellen haben, könnten das Virus sehr schnell unter der Therapie beseitigen, late Responder müssen eine solche Antwort möglicherweise erst während der Therapie entwickeln. Thimme *et al.* zeigten die Bedeutung IFN- γ -produzierender CD8-Zellen bei Untersuchungen von fünf Personen, die sich durch Nadelstichverletzungen mit HCV infizierten. Ein Proband, dessen CD8-Zellen kein IFN- γ produzierten, hatte nur eine geringe Abnahme der Virämie und zeigte Anzeichen einer Leberzellschädigung. Dagegen korrelierte bei den anderen Patienten das Auftreten von IFN- γ + CD8-Zellen mit einem deutlichen Abfall des Virustiters. Die Bedeutung der CD8-Zellen während der chronischen Infektion hingegen ist noch nicht vollständig geklärt. Trotz vorhandener HCV-spezifischer CD8 zytotoxischer T-Zellen im peripheren Blut und in der Leber kann das Virus persistieren. Dies zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit an der hohen Zahl IFN- γ -produzierender CD8-Zellen bei den Patienten, die erst in der folgenden Therapie ein initiales Ansprechen zeigen. Diese Persistenz, trotz der Anwesenheit zytotoxischer Zellen, weist darauf hin, dass eine Zelllyse durch Lymphozyten allein nicht ausreicht, um das Virus zu beseitigen. Die Immunreaktion dieser Zellen führt zudem zu einer lang andauernden Entzündungsreaktion, die nach einigen Jahren für die Entwicklung einer Zirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms verantwortlich ist. Durch die zytotoxischen T-Zellen werden nicht nur infizierte sondern auch nicht-infizierte Zellen getötet, sogenannte Umgebungszellen

(engl.: *bystander cells*, Zellen, die sich in der Nachbarschaft zu infizierten Zellen befinden). Untersuchungen von Gremion *et al.* belegten, dass 0,8%-1,5% HCV-antigenpräsentierende Zellen genügen, um die Lyse von 10%-29% Umgebungszellen zu verursachen [97]. Diese Zerstörung von nicht infizierten Zellen während der chronischen Infektion erklärt möglicherweise das Ausmaß der Leberzerstörung, trotz der niedrigen Zahl HCV-infizierter Zellen und wenigen HCV-spezifischen CD8-Zellen in der Leber. Willberg *et al.* vertreten die Theorie, dass die Präsentation von HCV-Antigenen in der Leber die T-Zelldysfunktion und die virale Persistenz fördert, während die Präsentation in lymphatischen Organen eine effektive T-Zellantwort und die Kontrolle der Virämie unterstützt [98,99]. Bei der chronischen Infektion überwiegt die Attenuierung der T-Zellantwort, während bei einer überwundenen Infektion die Aktivierung in den lymphatischen Organen dominiert. Dieses Muster ist sowohl bei Hepatitis B als auch bei Hepatitis C zu beobachten, was sie deutlich von anderen Viren wie EBV, CMV und HIV unterscheidet, wo sehr starke zelluläre Immunantworten induziert werden. Diese Theorie würde erklären, warum trotz einer schwachen T-Zellantwort die intrahepatische Inflammation persistiert. T-Zellen, die über das Blut in die Leber gelangen, erhalten dort Signale, die zu deren Tod oder Funktionsverlust führen [100]. Dies könnte auch, trotz intakter Zellbildung, der Grund für die geringe Zahl an HCV-spezifischen T-Zellen sein. Wird dieses Gleichgewicht beispielsweise durch eine Therapie verändert, könnte das zur Reduktion des intrahepatischen Zelltodes und somit zu einer Wiederherstellung der Immunantwort führen.

Vor der Therapie konnte in dieser Arbeit bei den späteren late Respondern eine große Zahl IL-4-produzierender CD4-Zellen gemessen werden. Warum dies nur nach HCV-Proteinstimulation und nicht nach HCVpp-Stimulation zu messen war, bleibt zu evaluieren. Es könnte aber an den geringen Fallzahlen liegen. Auch bei Patienten mit einem Nonresponse oder Relapse war eine deutliche IL-4-Antwort zu messen. Diese Verschiebung hin zu einer Th2-Immunantwort könnte ein Indikator für eine nicht ausreichende bzw. nicht erfolgreiche Immunantwort gegen HCV sein. Offensichtlich gelingt aber dennoch unter Therapie einigen Patienten die Überwindung der Infektion. Vor dem Therapiebeginn zeigten spätere late Responder eine Th2-Verschiebung. Patienten, die unter Therapie gemessen wurden, zeigten bei einem frühen Ansprechen auf die Therapie keine Produktion von IL-4 durch CD4-Lymphozyten. Von late Respondern liegen hierzu leider keine IL-4-Messungen vor.

Die Aussagen in der Literatur zu einer solchen Imbalance der Th1- und Th2-Zytokine sind nicht übereinstimmend. Zum einen wird eine Verschiebung zu einer Th2-Antwort für die Entwicklung einer chronischen Erkrankung verantwortlich gemacht [68,92], zum anderen kann eine solche Verschiebung von Th1 nach Th2 nicht bestätigt werden [64,66]. Auch Amati *et al.* konnten in HCV-infizierten Patienten nachweisen, dass systemisch mehr Th2- als Th1- Zytokine zu messen waren [101]. Erhöhte IL-10-Serumlevel (Th2) würden auch erklären, warum die IFN- γ -Produktion trotz der HCV-Infektion nicht erhöht ist. Außerdem ist zu bemerken, dass zahlreiche Studien an Patienten durchgeführt wurden, die keine antivirale Therapie erhielten. Das antivirale Ansprechen auf eine INF- α -Monotherapie ist sehr schwach. Erst durch die Kombination von INF- α und Ribavirin konnte die Therapie einer Hepatitis-C-Infektion deutlich verbessert werden. INF- α scheint eher die *de novo* Infektion von empfänglichen Zellen, als die Replikation des Virus zu verhindern [101].

Ribavirin ist ein synthetisches Nukleosidanalogen, das Guanosin gleicht. Es besitzt ein breites Spektrum an Aktivität sowohl gegen DNA- als auch gegen RNA-Viren, auch gegen Flaviviridae. Ribavirin wirkt möglicherweise über die Depletion von Phosphatvorräten, die Inhibierung der viralen Polymerase oder über die Modulation der Zytokine [101,102]. Studien in Tieren haben gezeigt, dass Ribavirin eine Th1-Antwort unterstützt, indem es das Th2-Profil supprimiert und/oder die Th1-Zytokinproduktion verstärkt [101,103-107]. Diese Verstärkung einer Th1-Antwort könnte der Grund für die Beobachtung in dieser Arbeit sein, dass vor Therapiebeginn spätere late Responder eine Th2-Verschiebung zeigten und auch bei späteren initialen Respondern zunächst nur sehr wenige CD4 IFN- γ -Lymphozyten zu detektieren waren. Patienten unter Therapie aber hatten eine deutlichere Th1-Antwort. Unter Therapie zeigten late Responder eine starke Aktivierung der CD8-Lymphozyten. Auch dies könnte darauf beruhen, dass eine Kombinationstherapie von INF- α und Ribavirin möglicherweise die virusspezifische Aktivität der zytotoxischen T-Zellen verstärkt. Warum allerdings die initialen Responder im Vergleich zu den late Respondern eine niedrigere Zahl IFN- γ + CD8-Zellen zeigten, bleibt zu klären. Ein Grund könnte sein, dass die initialen Responder sich zum Zeitpunkt der Messung seit mindestens zwei Monaten unter Therapie befanden und das Virus bereits beseitigen konnten.

4.2.1 Kasuistik einer akuten HCV-Infektion

Im Verlauf dieser Arbeit ergab sich die interessante Möglichkeit der Untersuchung zweier Blutproben einer Patientin mit einer akuten Hepatitis C-Infektion. Die 66 Jahre alte Patientin wurde mit einer unklaren Hepatopathie und intermittierenden Bauchschmerzen vorstellig. Nach einem Aufenthalt in Südafrika und Namibia litt die Patientin unter Fieber, Nachtschweiß und Kraftlosigkeit. Die Diagnose war eine akute HCV-Infektion mit Genotyp 3a. Nachdem es nicht zu einer Spontanremission kam, begann die Patientin eine Therapie mit Peginterferon. Sie wurde innerhalb von vier Wochen PCR-negativ, zeigte einen initialen Response auf die Therapie. Bis zur letzten Untersuchung nach 26 Monaten blieb die Patientin PCR-negativ. Im Verlauf der Behandlung konnten zwei Blutproben in der Lymphozytenstimulation gemessen werden. Die erste Blutprobe wurde vor dem Beginn der Therapie entnommen. Die zweite Probe wurde nach sieben Tagen unter Therapie gemessen, als die Patientin bereits ein Ansprechen auf die Therapie zeigte (von >700.000 IU/ml vor Therapiebeginn auf 21.000 IU/ml nach sieben Tagen Therapie in der quantitativen HCV-PCR).

Zu beiden Zeitpunkten waren die Antworten CD8-Lymphozyten äußerst gering, eine IFN- γ Antwort CD4-Zellen war nicht zu detektieren.

Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Dustin und Rice sowie Lechner *et al.* [13,76], die eine starke IFN- γ -Antwort der T-Zellen für eine spontane Heilung verantwortlich machen. In vorliegenden Fall hatte die Patientin eine kaum nachweisbare IFN- γ -Antwort, weder der CD4- noch der CD8-Zellen. Sie war erst unter Therapie in der Lage, das Virus zu eliminieren. Lechner *et al.* fanden zudem zu einem frühen Zeitpunkt der akuten Infektion stark aktivierte CD8-Lymphozyten, die zeitweise kein IFN- γ sezernierten. Da in dieser Arbeit die CD8-Zellen auf ihre IFN- γ -Produktion untersucht wurden, kann es durchaus sein, dass die CD8-Lymphozyten bei der untersuchten Patientin zwar aktiviert waren, aber aufgrund fehlender IFN- γ -Sekretion nicht in die Analyse miteinbezogen wurden.

4.3 Die zelluläre Immunantwort gegen animale Pestiviren

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines durchflusszytometrischen Testsystems, mit dessen Hilfe HCV-spezifische T-Lymphozyten bestimmt werden können und so ein Beitrag zum besseren Verständnis der Immunantwort gegen das Virus geleistet werden kann. Wertvolle Einblicke in die virusspezifische Immunantwort könnte dieses System des Lymphozytenstimulationstestes auch bei weiteren verwandten humanen, aber auch animalen Viren geben, wie das Klassische Schweinepest-Virus und das Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD)-Virus.

Das Wissen über die Antigen-spezifische zelluläre Immunantwort kann zur Entwicklung von Impfstoffen sowie zur Prävention und Therapie einer Erkrankung entscheidend beitragen.

4.3.1 Das Klassische Schweinepest-Virus

Das Klassische Schweinepestvirus (KSPV) gehört innerhalb der Familie der Flaviviridae zu den Pestiviren. Es verursacht eine hoch kontagiöse und oft fatal verlaufende perakute, akute, subakute oder chronische Erkrankung bei Schweinen, die durch Fieber, schwere Leukopenie und Hämorrhagien charakterisiert ist. KSPV kann bei Ferkeln nach *in utero*-Infektion zur Persistenz führen, die auf einer immunologischen Toleranz beruht. Derart infizierte Tiere bleiben lebenslang Virusträger und scheiden Viren aus, ohne klinisch erkrankt zu sein [85]. Ein Ausbruch der klassischen Schweinepest verursacht schwere ökonomische Verluste in der Schweinehaltung.

KSPV kann verschiedene immunologische Anomalien wie Leukopenie, reduzierte Ansprechbarkeit der Lymphozyten auf antigene Stimuli sowie die Depletion von B-Lymphozyten verursachen [108]. Der Einsatz von Vakzinen wurde aber 1990 durch die Europäische Union untersagt. Um alternative Impfstoffe zu entwickeln wurde begonnen, die porcine Immunantwort gegen KSPV detailliert zu untersuchen [109-112]. Ziel verschiedener Studien ist die Entwicklung Protein-basierender Subunit-Vakzinen.

Subunit-Vakzinen, die auf dem immundominanten viralen Glycoprotein E2 basieren, induzieren erst drei Wochen nach der Vakzination einen effektiven Schutz. Bei

Infektion zu einem früheren Zeitpunkt kommt es zu chronischen oder persistierenden Infektionen [113].

Die zelluläre Immunantwort, vor allem die der zytotoxischen T-Lymphozyten, ist ein weiterer wichtiger Bestandteil einer antiviralen Immunantwort [114]. Die virale Infektion induziert eine starke T-Zellantwort mit einer hohen Aktivität zytotoxischer T-Zellen einschließlich starker IFN- γ -Produktion, während nach Vakzination mit einer Lebendvakzine eine Th2-Antwort induziert wird [116]. KSPV-spezifische T-Lymphozyten produzieren neben IFN- γ auch IL-2, IL-4 und IL-10, was Einfluss auf die Induktion einer humoralen Immunantwort gegen KSPV haben könnte [120,120,120-122]. Sánchez-Cordon *et al.* [121] fanden in der frühen und mittleren Phase einer Infektion eine Th1-T-Zellantwort, während sich diese später zu einer Th2-Antwort veränderte. Die Autoren vermuten, dass hierin die Ursache der verspäteten humoralen Immunantwort gegen KSPV liegt.

Mittels eines rekombinanten Vacciniavirus, das strukturelle Proteine von KSPV exprimiert, konnte eine protektive Immunantwort gegen KSPV induziert werden. Diese wurde allerdings nicht durch neutralisierende Antikörper vermittelt, was auf eine schützende Rolle der T-Zellantwort oder nicht-neutralisierender Antikörper schließen lässt. In den nicht-strukturellen Proteinen des KSPV befinden sich T-Zellepitope [117,118], Rau *et al.* [113] entdeckten für NS3 das Potential, eine Antwort der CD4 und CD8 T-Zellen gegen KSPV zu induzieren. Aber auch Epitope von E2 induzieren eine frühe zytotoxische T-Zellantwort (1-3 Wochen nach KSPV-Infektion), wie von Ceppi *et al.* gezeigt wurde [119].

Da eine zellvermittelte Immunantwort eine entscheidende Rolle beim Schutz vor einer KSPV-Infektion spielt, könnte die Induktion einer potenten T-Zellantwort die Wirksamkeit von KSPV-Vakzinen verbessern [113].

4.3.2 Das Bovine Virus Diarrhoe-Virus

Das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) ist ein Pestivirus, das für massive ökonomische Verluste in der Rinderhaltung sorgt. Das Virus führt zu respiratorischen, enteralen und reproduktiven Erkrankungen. Die Manifestation variiert mit dem Biotypen, dem Genotypen und dem Stamm des BVD-Virus. Die Isolate werden aufgrund ihrer Fähigkeit, in Zellkulturen eine Lyse auszulösen, in zytopathogen oder nicht-zytopathogen eingeteilt. Beide Biotypen können die Plazentaschranke

überwinden und zu Aborten, Mumifikationen und kongenitalen Defekten führen. Eine Infektion des Fötus mit nicht-zytopathogenen Stämmen kann zu immuntoleranten, persistent infizierten Tieren führen. Dies stellt einen der häufigsten Übertragungsmechanismen in einer Herde dar. Die Superinfektion eines persistent infizierten Tieres mit einem homologen zytopathogenen Stamm kann eine fatale Mucosal Disease auslösen [123-125].

Nicht-zytopathogene Biotypen führen *in vitro* zu keiner IFN-Produktion, aber *in vivo* lösen sie eine starke IFN-Antwort bei Kälbern aus. Im Fötus allerdings wird kein IFN durch nicht-zytopathogenes BVDV induziert und das Virus ist in der Lage zu persistieren [126-129,129].

Grundsätzlich geht man davon aus, dass die humorale Immunantwort eine Hauptrolle beim Schutz gegen BVDV spielt. Maternale Antikörper schützen Kälber vor einer Infektion, hohe Titer können eine aktive Antikörperantwort auf eine Vakzination verhindern. Allerdings kann trotzdem eine protektive Antwort durch T-Gedächtniszellen gegen das Virus induziert werden. Die CD4 und CD8 T-Lymphozyten produzieren IFN- γ und schützen gegen eine Infektion mit BVDV, auch nachdem die maternalen Antikörper verschwunden sind [130].

Lambot *et al.* [131] zeigten, dass es vom Biotypen des BVDV abhängt, ob eine humorale oder zelluläre Immunantwort induziert wird. Nach einer akuten Infektion werden sowohl CD4- als auch CD8-Lymphozyten induziert [132]. Die T-Zellantwort scheint invers mit den Antikörpertitern zu korrelieren. Die Autoren vermuten, dass dies von der Th1/Th2-Regulation der Immunantwort gegen das Virus abhängt. Während NS3 ein immundominantes Antigen der Antikörperantwort ist, scheinen die Hüllproteine E^{ms} und E2 sowie das nicht-strukturelle Protein NS2-3 T-Zell-determinanten zu sein [133].

In seropositiven Rindern detektierten Rhodes *et al.* [134] eine Th2 CD4 T-Zellantwort mit hohen Leveln an IL-4, sowie eine CD8-Antwort mit einer deutlichen IFN- γ -Produktion.

5 Zusammenfassung

Das Hepatitis C-Virus ist eines der am weitesten verbreiteten persistierenden humanen Viren, mit dem weltweit über 170 Millionen Menschen chronisch infiziert sind. Bei über 80 Prozent der infizierten Personen kommt es zu einer chronischen Infektion, 20 bis 30 Prozent der Patienten erkranken an Leberzirrhose und bei 2,5 Prozent treten hepatozelluläre Karzinome auf. Gegenwärtig existiert keine Impfung gegen HCV, die derzeitige antivirale Therapie ist mit starken Nebenwirkungen verbunden, und überhaupt nur bei 50-60 Prozent der behandelten Patienten erfolgreich. Zudem stellen die Folgen einer Infektion mit HCV heute in den USA und Europa die vorherrschende Ursache für die Notwendigkeit einer Lebertransplantation dar.

Es ist anzunehmen, dass im Verlauf einer Infektion mit dem Hepatitis C-Virus der zellulären Immunantwort eine Schlüsselrolle zukommt. Ziel dieser Arbeit war es, ein Testsystem zu etablieren, mit dessen Hilfe HCV-spezifische T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie gemessen werden können, um so einen Beitrag zum besseren Verständnis für die Immunantwort gegen das Hepatitis C-Virus zu leisten. Das System des Lymphozytenstimulationstestes soll außerdem als Modell für die Messung der Immunantwort gegen weitere Viren dienen, wie das verwandte Klassische Schweinepest-Virus oder das Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD)-Virus. Das bessere Verständnis der zellulären Immunantwort kann zur Entwicklung von Impfstoffen sowie zur Prävention und Therapie einer Erkrankung entscheidend beitragen.

Die vorliegende Arbeit etabliert ein Testsystem zur Messung HCV-spezifischer T-Lymphozyten. Da das Hepatitis C-Virus nur sehr ineffizient in Zellkultur repliziert, gibt es verschiedene Surrogatmodelle, um das Virus und seine Pathogenese genauer zu untersuchen. Vielfach werden verschiedene rekombinante HCV-Proteine eingesetzt, um die Lymphozytenfunktion zu überprüfen. Es bleibt allerdings unklar, inwieweit

solche Antigene *in vivo* tatsächlich den T-Zellen präsentiert werden. Als neues Stimulationsmodell setzt diese Arbeit HCV-Pseudotypen ein. Dabei bestehen die HCVpp aus lentiviralen Core-Partiken, die an ihrer Oberfläche unmodifizierte HCV E1- und E2-Hüllglykoproteine tragen, um so als Pseudotypen das native Hepatitis C-Virus zu imitieren.

Die Verwendung von HCVpp im Lymphozytenstimulationstest führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Protein-Stimulation, wobei die HCVpp zu einer stärkeren Stimulation der CD4-Lymphozyten führten. Falls sich diese Überlegenheit der HCVpp in weiteren Studien bestätigen würde, wäre dies ein großer Vorteil gegenüber der herkömmlichen Stimulation mit HCV-Proteinen, da die CD4-Lymphozyten eine entscheidende Rolle im Verlauf der HCV-Infektion spielen.

Die Auswertung der Patientendaten ergab eine Th2-Verschiebung der Lymphozytenantwort bei denjenigen Patienten, die das Virus nicht beseitigen konnten. Zudem lassen die Ergebnisse vermuten, dass eine antivirale Therapie zu einer Rekonstitution oder Entwicklung einer Th1-Antwort und damit zur erfolgreichen Überwindung der HCV-Infektion führen könnte. Warum bei einigen Patienten die Therapie jedoch versagt, bleibt in weiteren Studien zu klären.

6 Summary

The hepatitis C virus is one of the most prevalent persistent human viruses, more than 170 million humans worldwide are chronically infected. In more than 80 percent of infected persons the infection causes chronicity, which leads in 20 to 30 percent of patients to cirrhosis of the liver and in 2.5 percent to hepatocellular carcinoma. There is still no vaccine against HCV, the current antiviral therapy has strong side effects, and the treatment is successful in only 50 to 60 percent of patients. An infection with HCV is the leading cause for liver transplantation in the United States and Europe.

The cellular immune response is supposed to play an important role in the course of infection with the HCV. The objective of this work was to establish a test system for the analysis of HCV-specific T lymphocytes by flow cytometry to achieve a better understanding of the immune response against the hepatitis C virus. In addition, the system could serve as a model for analysing the immune response against other viruses such as the related Classical Swine Fever Virus or Bovine Virus Diarrhea/Mucosal Disease (BVD/MD) Virus. The enhanced understanding of the cellular immune response can support the development of vaccines as well as be helpful for the prevention and treatment of illness.

In this study, a test system for the analysis of HCV-specific T lymphocytes could be established. Given that the hepatitis C virus replicates very insufficiently in a cell culture, there are several surrogate markers for the virus and its pathogenesis. Different recombinant HCV proteins are used for the investigation of lymphocyte function. But it still remains unclear, how such antigens are presented to the T cells *in vivo*. In this study, HCV pseudoparticles (HCVpp) are used as a new model for the specific stimulation of T cells. The HCVpp consist of lentiviral core particles which are carrying unmodified HCV E1 and E2 glycoproteins on their surface. This pseudoparticles mimic the native hepatitis C virus.

The use of HCVpp for the stimulation of antigen specific T lymphocytes led to similar results in comparison to the stimulation with HCV proteins. Notably, in CD4+ lymphocytes the stimulation with HCVpp resulted in stronger cytokine responses. As CD4+ lymphocytes play a crucial role in the course of HCV infections, this superiority of the HCVpp is a big advantage over conventional stimulation approaches with HCV proteins. However, these enhanced stimulation properties remain to be confirmed in further studies.

The analysis of patient data showed a shift to Th2 response for those patients who could not eliminate the virus. Moreover, the results suggest that the antiviral therapy leads to a reconstitution or development of a Th1 response, and thus a successful resolution of HCV infection could result. The reason for therapy failure in some patients remains to be scrutinized in further studies.

Literatur

1. Eisen-Vandervelde AL, Yao ZQ, and Hahn YS. The molecular basis of HCV-mediated immune dysregulation. *Clin Immunol* 2004; 111:16-21.
2. Kessel A and Toubi E. Chronic HCV-related autoimmunity: A consequence of viral persistence and lymphotropism. *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14:547-54.
3. Sene D, Limal N, and Cacoub P. Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: A review. *Metabolic Brain Disease* 2004; 19:357-81.
4. Bowen DG and Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005; 436:946-52.
5. Urbani S, Amadei B, Fisicaro P et al. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 2006; 44:126-39.
6. Shoukry NH, Cawthon AG, and Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58:391-424.
7. Cabrera R, Tu Z, Xu Y et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40:1062-71.
8. Miller RH and Purcell RH. Hepatitis-C Virus Shares Amino-Acid-Sequence Similarity with Pestiviruses and Flaviviruses As Well As Members of 2 Plant-Virus Supergroups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87:2057-61.
9. Fields, Bernard, Knipe, and David. *Virology*. 2007.
10. Purcell R. The hepatitis C virus: Overview. *Hepatology* 1997; 26:11-14.
11. Karayiannis P and McGarvey MJ. The GB hepatitis viruses. *Journal of Viral Hepatitis* 1995; 2:221-6.
12. Berzsenyi MD, Bowden DS, and Roberts SK. GB virus C: Insights into co-infection. *Journal of Clinical Virology* 2005; 33:257-66.
13. Dustin LB and Rice CM. Flying Under the Radar: The Immunobiology of Hepatitis C. *Annual Review of Immunology* 2007; 25:71-99.

14. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch -Gesundheitsschutz 2003. Bekanntmachung des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit und soziale Sicherung Hepatitis-C-Virus (HCV) Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit.
15. Tagariello G, Gerotto M, Pontisso P et al. Hepatitis C virus quasispecies in the natural course of HCV-related disease in patients with haemophilia. *Haemophilia* 2004; 10:81-6.
16. Sallie R. Replicative homeostasis: a mechanism of viral persistence. *Medical Hypotheses* 2004; 63:515-23.
17. Lyra AC, Fan X, and Di Bisceglie AM. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004; 37:691-5.
18. Rosen HR. Hepatitis C pathogenesis: Mechanisms of viral clearance and liver injury. *Liver Transplantation* 2003; 9:35-43.
19. Moorman JP, Joo M, and Hahn YS. Evasion of host immune surveillance by hepatitis C virus: Potential roles in viral persistence. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2001; 49:189-94.
20. Bukh J. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39:1469-75.
21. Prince AM, Pawlotsky JM, Soulier A et al. Hepatitis C virus replication kinetics in chimpanzees with self-limited and chronic infections. *J Viral Hepat* 2004; 11:236-42.
22. Mizukoshi E, Nascimbeni M, Blaustein JB et al. Molecular and immunological significance of chimpanzee major histocompatibility complex haplotypes for hepatitis C virus immune response and vaccination studies. *Journal of Virology* 2002; 76:6093-103.
23. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99:15669-74.
24. Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S et al. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001; 15:883-95.
25. Shimizu YK, Weiner AJ, Rosenblatt J et al. Early Events in Hepatitis-C Virus-Infection of Chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87:6441-4.
26. Major ME, Dahari H, Mihalik K et al. Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology* 2004; 39:1709-20.

27. Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ et al. Transmission of Hepatitis C Virus Infection to Tree Shrews. *Virology* 1998; 244:513-20.
28. Pietschmann T and Bartenschlager R. Tissue culture and animal models for hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 2003; 7:23-43.
29. Bartenschlager R and Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81:1631-48.
30. Cai Z, Zhang C, Chang KS et al. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J Virol* 2005; 79:13963-73.
31. Chong TW, Smith RL, Hughes MG et al. Primary human hepatocytes in spheroid formation to study hepatitis C infection. *J Surg Res* 2006; 130:52-7.
32. Lohmann V, Rner F, Koch JO, Herian U, Theilmann L, and Bartenschlager R. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* 1999; 285:110-3.
33. Bartenschlager R, Kaul A, and Sparacio S. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Res* 2003; 60:91-102.
34. Horscroft N, Lai VC, Cheney W et al. Replicon cell culture system as a valuable tool in antiviral drug discovery against hepatitis C virus. *Antivir Chem Chemother* 2005; 16:1-12.
35. Poduri CD. Hepatitis C virus (HCV)--a review molecular biology of the virus, immunodiagnosics, genomic heterogeneity and the role of virus in hepatocellular carcinoma. *Indian J Exp Biol* 2003; 41:549-62.
36. Baumert TF, Ito S, Wong DT, Greenberg HB, and Liang TJ. Synthesis of hepatitis C virus like particles in insect cells. *Hepatology* 1996; 24:500.
37. Bartenschlager R. Hepatitis C virus molecular clones: from cDNA to infectious virus particles in cell culture. *Current Opinion in Microbiology* 2006; 9:416-22.
38. Tabarrini O, Manfroni G, Fravolini A et al. Synthesis and Anti-BVDV Activity of Acridones As New Potential Antiviral Agents. *J Med Chem* 2006; 49:2621-7.
39. Whitby K, Taylor D, Patel D, Ahmed P, and Tjoms AS. Action of celgosivir (6 O-butanoyl castanospermine) against the pestivirus BVDV: implications for the treatment of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother* 2004; 15:141-51.
40. Stuyver LJ, McBrayer TR, Tharnish PM et al. Inhibition of hepatitis C replicon RNA synthesis by beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine: a specific inhibitor of hepatitis C virus replication. *Antivir Chem Chemother* 2006; 17:79-87.
41. Durantel D, Carrouee-Durantel S, Branza-Nichita N, Dwek RA, and Zitzmann N. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells

- persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:497-504.
42. Jacob JR, Mansfield K, You JE, Tennant BC, and Kim YH. Natural iminosugar derivatives of 1-deoxynojirimycin inhibit glycosylation of hepatitis viral envelope proteins. *J Microbiol* 2007; 45:431-40.
 43. Ferron F, Bussetta C, Dutartre H, and Canard B. The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases. *BMC Bioinformatics* 2005; 6:255.
 44. Gratama JW and Kern F. Flow cytometric enumeration of antigen-specific T lymphocytes. *Cytometry A* 2004; 58:79-86.
 45. Thiel A, Scheffold A, and Radbruch A. Antigen-specific cytometry--new tools arrived! *Clin Immunol* 2004; 111:155-61.
 46. Borges O, Borchard G, de Sousa A, Junginger HE, and Cordeiro-da-Silva A. Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. *International Journal of Pharmaceutics* In Press, Corrected Proof.
 47. Sancho D, Gomez M, and Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in Immunology* 2005; 26:136-40.
 48. Ziegler SF, Ramsdell F, and Alderson MR. The Activation Antigen Cd69. *Stem Cells* 1994; 12:456-65.
 49. He XS, Reherrmann B, Boisvert J et al. Direct functional analysis of epitope-specific CD8+ T cells in peripheral blood. *Viral Immunology* 2001; 14:59-69.
 50. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, and Picker LJ. Determination of antigen-specific: Memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry - Evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99:1739-50.
 51. Bartosch B, Dubuisson J, and Cosset FL. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med* 2003; 197:633-42.
 52. BD Biosciences. Application Note - Detecting Intracellular Cytokines in Activated Lymphocytes. 2007.
 53. BD Biosciences. Application Note - Cytokine Detection in Antigen-Activated CD8+ and CD4+ T Cells. 2007.
 54. Maino, V. C. Fast Immune Assay System; A Rapid and Comprehensive System for Assessing Lymphocyte Function by Flow Cytometry. 2007.

55. Nomura LE, Walker JM, and Maecker HT. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) cells. *Cytometry* 2000; 40:60-8.
56. Damle NK and Aruffo A. Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:6403-7.
57. Carreno BM and Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual Review of Immunology* 2002; 20:29-53.
58. Marelli-Berg FM, Okkenhaug K, and Mirenda V. A two-signal model for T cell trafficking. *Trends in Immunology* 2007; 28:267-73.
59. Davey J. Sorting Out the Secretory Pathway. *Bioessays* 1989; 11:185-7.
60. Maino VC. Rapid assessment of antigen induced cytokine expression in memory T cells by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1998; 63:199-207.
61. BD Biosciences. Trainingshandbuch Durchflußzytometrie.
62. Kern F, Sural IP, Brock C et al. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nature Medicine* 1998; 4:975-8.
63. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z et al. Direct Demonstration of Cytokine Synthesis Heterogeneity Among Human Memory/Effector T-Cells by Flow-Cytometry. *Blood* 1995; 86:1408-19.
64. Bergamini A, Bolacchi F, Cerasari G et al. Lack of evidence for the Th2 predominance in patients with chronic hepatitis C. *Clinical & Experimental Immunology* 2001; 123:451-8.
65. Suni MA, Picker LJ, and Maino VC. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 1998; 212:89-98.
66. Hempel G, Galle PR, and Lohr HF. Quantitative analysis of specific Th1/Th2 helper cell responses and IgG subtype antibodies in interferon-alpha-treated patients with chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology* 2001; 64:340-9.
67. Thimme R, Oldach D, Steiger C, Ray S, and Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; 34:434A.
68. Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, and Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: Implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25:449-58.

69. Berg T, Sarrazin C, Herrmann E et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: Significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 2003; 37:600-9.
70. Mihm U, Herrmann E, Sarrazin C, and Zeuzem S. Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2006; 23:1043-54.
71. Maino VC and Maecker HT. Cytokine flow cytometry: a multiparametric approach for assessing cellular immune responses to viral antigens. *Clinical Immunology* 2004; 110:222-31.
72. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ et al. HCV Persistence and Immune Evasion in the Absence of Memory T Cell Help. *Science* 2003; 302:659-62.
73. Kalams SA and Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 188:2199-204.
74. Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH et al. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4(+) T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37:1189-98.
75. Gale MJ, Korth MJ, Tang NM et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997; 230:217-27.
76. Lechner F, Wong DKH, Dunbar PR et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 191:1499-512.
77. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10:439-49.
78. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99:15661-8.
79. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M et al. Memory CD8+ T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J Exp Med* 2003; 197:1645-55.
80. Buxbaum S, Kraus FB, Hahn A et al. Flow cytometric analysis of virus-specific T lymphocytes: Practicability of detection of HCMV-specific T lymphocytes in whole blood in patients after stem cell transplantation. *Journal of Immunological Methods* 2006; 311:164-73.
81. Ludwig B, Kraus FB, Kipp M et al. Cytomegalovirus-specific CD4 T-cell and glycoprotein B specific antibody response in recipients of allogenic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Virology* 2006; 35:160-6.

82. Maino VC and Picker LJ. Identification of functional subsets by flow cytometry: Intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry* 1998; 34:207-15.
83. Rollier C, Depla E, Drexhage JAR et al. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. *Journal of Virology* 2004; 78:187-96.
84. Brian Boyle, MD. HCV NS3 and NS4 Proteins Contain Epitopes Associated with Spontaneous Viral Clearance. 24-10-2003. 54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases.
85. Rolle, Mayr. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 6., neu bearbeitete Auflage.
86. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World Journal of Gastroenterology* 2007; 13:2406-15.
87. Bartosch B, Bukh J, Meunier JC et al. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: Evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100:14199-204.
88. Mosmann TR and Coffman RL. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology* 1989; 7:145-73.
89. Mosmann TR and Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 1996; 17:138-46.
90. Dong C and Flavell RA. Th1 and Th2 cells. *Current Opinion in Hematology* 2001; 8:47-51.
91. Cribier B, Schmitt C, Rey D, Lang JM, Kirn A, and Stoll-Keller F. Production of cytokines in patients infected by hepatitis C virus. *Journal of Medical Virology* 1998; 55:89-91.
92. Eckels DD, Tabatabail N, Bian TH et al. In vitro human Th-cell responses to a recombinant Hepatitis C Virus antigen: failure in IL-2 production despite proliferation. *Human Immunology* 1999; 60:187-99.
93. Sarih M, Bouchrit N, and Benslimane A. Different cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from patients with persistent and self-limited hepatitis C virus infection. *Immunology Letters* 2000; 74:117-20.
94. Tsai SL, Sheen IS, Chien RN et al. Activation of Th1 immunity is a common immune mechanism for the successful treatment of hepatitis B and C: Tetramer assay and therapeutic implications. *Journal of Biomedical Science* 2003; 10:120-35.

95. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Gerlach T, and Pape GR. The role of hepatitis C virus specific CD4+ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis C. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 1996; 74:583-8.
96. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117:933-41.
97. Gremion C and Cerny A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Rev Med Virol* 2005; 15:235-68.
98. Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, and Klenerman P. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clinical and Experimental Immunology* 2002; 128:195-203.
99. Willberg C, Barnes E, and Klenerman P. HCV immunology - Death and the maiden T cell. *Cell Death and Differentiation* 2003; 10:39-47.
100. Mehal WZ, Azzaroli F, and Crispe IN. Antigen Presentation by Liver Cells Controls Intrahepatic T Cell Trapping, Whereas Bone Marrow-Derived Cells Preferentially Promote Intrahepatic T Cell Apoptosis. *J Immunol* 2001; 167:667-73.
101. Amati L, Caradonna L, Magrone T et al. Modifications of the Immune Responsiveness in Patients with Hepatitis C Virus Infection following Treatment with IFN-alpha / Ribavirin. *Current Pharmaceutical Design* 2002; 8:981-93.
102. Rigopoulou EI, Abbott WG, Williams R, and Naoumov NV. Direct evidence for immunomodulatory properties of ribavirin on T-cell reactivity to hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2006.
103. Fang SH, Hwang LH, Chen DS, and Chiang BL. Ribavirin enhancement of hepatitis C virus core antigen-specific type 1 T helper cell response correlates with the increased IL-12 level. *Journal of Hepatology* 2000; 33:791-8.
104. Fang SH, Lai MY, Hwang LH et al. Ribavirin enhances interferon-gamma levels in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha. *Journal of Biomedical Science* 2001; 8:484-91.
105. Hultgren C, Milich DR, Weiland O, and Sallberg M. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th)1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 1998; 79:2381-91.
106. Ning Q, Brown D, Parodo J et al. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *Journal of Immunology* 1998; 160:3487-93.
107. Tam RC, Pai B, Bard J et al. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *Journal of Hepatology* 1999; 30:376-82.

108. Kimman TG, Bianchi AT, Wensvoort G, de Bruin TG, and Meliefste C. Cellular immune response to hog cholera virus (HCV): T cells of immune pigs proliferate in vitro upon stimulation with live HCV, but the E1 envelope glycoprotein is not a major T-cell antigen. *J Virol* 1993; 67:2922-7.
109. Konig M, Lengsfeld T, Pauly T, Stark R, and Thiel HJ. Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol* 1995; 69:6479-86.
110. Stark R, Rumenapf T, Meyers G, and Thiel HJ. Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins. *Virology* 1990; 174:286-9.
111. Susa M, Konig M, Saalmuller A, Reddehase MJ, and Thiel HJ. Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J Virol* 1992; 66:1171-5.
112. Weiland E, Ahl R, Stark R, Weiland F, and Thiel HJ. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol* 1992; 66:3677-82.
113. Rau H, Revets H, Balmelli C, McCullough KC, and Summerfield A. Immunological properties of recombinant classical swine fever virus NS3 protein in vitro and in vivo. *Vet Res* 2006; 37:155-68.
114. Suradhat S, Intrakamhaeng M, and Damrongwatanapokin S. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 83:177-89.
115. Summerfield A, Alves M, Ruggli N, de Bruin MG, and McCullough KC. High IFN-alpha responses associated with depletion of lymphocytes and natural IFN-producing cells during classical swine fever. *J Interferon Cytokine Res* 2006; 26:248-55.
116. Piriou L, Chevallier S, Hutet E, Charley B, Le Potier MF, and Albina E. Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. *Vet Res* 2003; 34:389-404.
117. Pauly T, Elbers K, Konig M, Lengsfeld T, Saalmuller A, and Thiel HJ. Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J Gen Virol* 1995; 76:3039-49.
118. Armengol E, Wiesmuller KH, Wienhold D et al. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J Gen Virol* 2002; 83:551-60.
119. Ceppi M, de Bruin MGM, Seuberlich T et al. Identification of classical swine fever virus protein E2 as a target for cytotoxic T cells by using mRNA-transfected antigen-presenting cells. *J Gen Virol* 2005; 86:2525-34.

120. Suradhat S, Sada W, Buranapraditkun S, and Damrongwatanapokin S. The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV). *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 106:197-208.
121. Sanchez-Cordon PJ, Nunez A, Salguero FJ, Carrasco L, and Gomez-Villamandos JC. Evolution of T lymphocytes and cytokine expression in classical swine fever (CSF) virus infection. *J Comp Pathol* 2005; 132:249-60.
122. Sanchez-Cordon PJ, Romero-Trevejo JL, Pedrera M, Raya AI, and Gomez-Villamandos JC. The role of B cells in the immune response to pestivirus (classical Swine Fever virus). *J Comp Pathol* 2006; 135:32-41.
123. Tautz N, Thiel HJ, Dubovi EJ, and Meyers G. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol* 1994; 68:3289-97.
124. Becher P, Meyers G, Shannon AD, and Thiel HJ. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J Virol* 1996; 70:2992-8.
125. Lackner T, Muller A, Konig M, Thiel HJ, and Tautz N. Persistence of Bovine Viral Diarrhea Virus Is Determined by a Cellular Cofactor of a Viral Autoprotease. *J Virol* 2005; 79:9746-55.
126. Schweizer M and Peterhans E. Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis. *J Virol* 2001; 75:4692-8.
127. Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr BV, and Morrison WI. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol* 2001; 82:1893-7.
128. Charleston B, Brackenbury LS, Carr BV et al. Alpha/Beta and Gamma Interferons Are Induced by Infection with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus In Vivo. *J Virol* 2002; 76:923-7.
129. Bensaude E, Turner JL, Wakeley PR et al. Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. *J Gen Virol* 2004; 85:1029-37.
130. Endsley JJ, Ridpath JF, Neill JD, Sandbulte MR, and Roth JA. Induction of T lymphocytes specific for bovine viral diarrhoea virus in calves with maternal antibody. *Viral Immunol* 2004; 17:13-23.
131. Lambot M, Douart A, Joris E, Letesson JJ, and Pastoret PP. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* 1997; 78:1041-7.

132. Glew EJ and Howard CJ. Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, a member of the Flaviviridae, are not compromised in their ability to present viral antigen. *J Gen Virol* 2001; 82:1677-85.
133. Collen T and Morrison WI. CD4(+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res* 2000; 67:67-80.
134. Rhodes SG, Cocksedge JM, Collins RA, and Morrison WI. Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *J Gen Virol* 1999; 80:1673-9.

Publikationen

Teile der Dissertation wurden vorab publiziert.

Originalarbeiten

Schmidt-Chanasit J, Stürmer M, Hahn A, Schäd SG, Gross G, Ulrich RG, Heckel G, Doerr HW.: Novel approach for genotyping varicella-zoster virus strains from Germany.
J Clin Microbiol. 2007; 45(11):3540-5. Epub 2007 Sep 12.

Ogbomo H, Hahn A, Geiler J, Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J.: NK sensitivity of neuroblastoma cells determined by a highly sensitive coupled luminescent method.
Biochem Biophys Res Commun. 2006; 339(1):375-9.

Buxbaum S, Kraus FB, Hahn A, Beck O, Kabartas B, Doerr HW, Ludwig B.: Flow cytometric analysis of virus-specific T lymphocytes: practicability of detection of HCMV-specific T lymphocytes in whole blood in patients after stem cell transplantation.
J Immunol Methods. 2006; 311(1-2):164-73.

Kongressbeiträge und Abstracts

Geiler J. and Hahn A., Lukas A., Mayer B., Muster T., Seipelt J., Michaelis M., Doerr H.W., Cinatl J.: Identification of New B-cell Epitopes of H1N1, H3N2, H5N1 and Influenza B for Vaccine Development.
Gesellschaft für Virologie - Annual Meeting 2006, München, Deutschland

Hahn A., Pfaff K., Giroglou T., Sadeghi-Naini S., Teuber G., von Laer D., Doerr H.W., Cinatl J., Berger A.: Humoral and Cellular Immune Response: Utilisation of HCV Pseudoparticles (HCVpp) as a Diagnostic Tool.
Gesellschaft für Virologie - Annual Meeting 2006, München, Deutschland

Publikationen

Hahn A. and Geiler J., Lukas A., Mayer B., Muster T., Seipelt J., Michaelis M., Doerr H.W., Cinatl J.: Identification of New B-cell Epitopes of SARS-CoV for Vaccine Development.
Gesellschaft für Virologie - Annual Meeting 2006, München, Deutschland

Hahn A., Ludwig B., Buxbaum S., Pfaff K., Giroglou T., von Laer D., Doerr H.W., Teuber G., Berger A.: A new Possibility for Antigen-Specific T-Cell Stimulation: Pseudotyped HCV particles?
IUMS 2005, San Francisco, Californien, USA

Hahn A., Ludwig B., Buxbaum S., Pfaff K., Giroglou T., von Laer D., Doerr H.W., Teuber G., Berger A.: A new Possibility for Antigen-Specific T-Cell Stimulation: Pseudotyped HCV particles?
Gesellschaft für Virologie - Annual Meeting 2005, Hannover, Deutschland

Danksagung

Herrn Professor Dr. H.-J. Thiel danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Professor Dr. med. H. W. Doerr, unter dessen Leitung diese Arbeit durchgeführt wurde, danke ich für die Überlassung dieses Themas, die fachliche Betreuung und die Unterstützung meiner Arbeit.

Priv. Doz. Dr. med. vet. Dr. med. habil. A. Berger danke ich für die fachliche und persönliche Betreuung, das Vertrauen und die stete Unterstützung.

Frau Dr. med. G. Teuber danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit.

Prof. Dr. rer. nat. J. Cinatl danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis.

Dr. S. Buxbaum und Dr. B. Ludwig danke ich für die Betreuung.

Den ehemaligen Kollegen meines Arbeitskreises danke ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung. Vor allem Janette Spitznagel, Corinna Fleckenstein und Janina Geiler danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mich bei all meinen Entscheidungen stets mit viel Motivation und Elan unterstützt und mir auch in schwierigen Situationen den Rücken gestärkt haben. Ihnen verdanke ich meine akademische Ausbildung.

Meinem Bruder Christian und seiner Frau Luzie danke ich für ihre immer aufheiternden und unterstützenden Kommentare sowie für ihre Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.

Auch meinem Mann Steffen gilt besonderer Dank, der mich bei jeder Gelegenheit mit viel Geduld unterstützt und mir immer den nötigen Ansporn gegeben hat. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus - Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Frankfurt, den 04. Dezember 2008

Anke Leutz