

Charakterisierung koregulatorischer Moleküle auf HCV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen in verschiedenen Stadien der Hepatitis C Infektion

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christin Ackermann

Hamburg, 2019

1. Gutachter: PD Dr. Julian C. Schulze zur Wiesch

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner

Tag der Disputation: 24.05.2019

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich, selbstständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe. Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Hamburg, 06.06.2019

Christin Ackermann

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Zusammenfassung.....	III
Abstract	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das menschliche Immunsystem	2
1.1.1 Die angeborene Immunantwort	2
1.1.2 Die adaptive Immunantwort.....	3
1.1.2.1 B-Lymphozyten	3
1.1.2.2 T-Lymphozyten	4
1.1.2.3 T-Zelldifferenzierung	5
1.1.2.4 CD8+ T-Lymphozyten	6
1.1.2.5 CD4+ T-Lymphozyten	6
1.2 Das Hepatitis C Virus	9
1.2.1 Taxonomie	10
1.2.2 Aufbau und Genomorganisation des Virus	10
1.2.3 Replikationszyklus.....	12
1.2.4 Epidemiologie	13
1.2.5 Übertragung	13
1.2.6 Krankheitsverlauf	14
1.2.7 Therapie.....	15
1.2.8 Die T-Zellimmunantwort in der HCV Infektion.....	16
1.2.8.1 Die CD8+ T-Zellantwort in der HCV Infektion	16
1.2.8.2 Die CD4+ T-Zellantwort in der HCV Infektion	17
1.3 Immunerschöpfung bei chronisch viralen Infektionen	19
1.3.1 Koinhibitorische Rezeptoren.....	21

1.3.2	Der TIGIT/CD226 Signalweg.....	24
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Geräte.....	28
2.1.2	Reagenzien und Lösungen	28
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	29
2.1.4	Puffer und Medien.....	29
2.1.5	Antikörper.....	30
2.1.6	HCV-spezifische Tetramere	30
2.2	Probanden	31
2.2.1	HLA-Typisierungen	32
2.3	MHC-Klasse II Tetramer-Komplexe.....	32
2.4	Methoden	33
2.4.1	Kryokonservierung von Zellen	33
2.4.1.1	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	34
2.4.2	<i>Ex vivo</i> Analyse von HCV-spezifischen T-Zellen mittels MHC-Klasse I und Klasse II Tetrameren.....	35
2.4.2.1	Zellaufbereitung	35
2.4.2.2	Detektion und Anreicherung MHC-Klasse I und Klasse II Tetramer positiver T-Zellen.....	35
2.4.3	Oberflächen-Antikörperfärbung	36
2.4.4	Durchflusszytometrie.....	36
2.4.5	Statistische Methoden	37
2.4.5.1	GraphPad 7.0 Prism.....	37
2.4.5.2	SPICE Analyse	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Phänotypische Charakterisierung von CD4+ T-Zellen	39

3.1.1	TIGIT Expression auf CD4+ T- Zellen	39
3.1.2	Expression koinhibitorischer Rezeptoren auf CD4+ T-Zellen.....	41
3.1.3	Expression kostimulierender Rezeptoren auf CD4+ T-Zellen	43
3.2	<i>Ex vivo</i> Analyse HCV-spezifischer CD4+ T-Zellen.....	44
3.2.1	<i>Ex vivo</i> Frequenz und Differenzierungsstatus	44
3.2.2	Expression verschiedener koinhibitorischer Rezeptoren auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen.....	47
3.2.2.1	SPICE Analyse	50
3.2.3	Differenzierungsstatus von HCV-spezifischen TIGIT+ CD4+ T-Zellen.....	51
3.2.4	TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen	52
3.2.5	CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen	55
3.2.6	Longitudinale Analysen der Korezeptor Expression	56
3.3	<i>Ex vivo</i> Analyse von HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen	59
3.3.1	TIGIT/CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen	59
4	Diskussion	61
4.1	TIGIT Expression auf CD4+ T-Zellen	62
4.2	TIGIT/PD-1/CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen	64
4.2.1	TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen	65
4.2.2	CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen	68
4.3	TIGIT/CD226 Verhältnis auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen	70
5	Schlussfolgerung und Ausblick	72
6	Anhang	73
7	Abkürzungsverzeichnis	76
8	Referenzen	79
9	Danksagung	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T-Zellen in der chronischen HCV Infektion.....	1
Abbildung 2: Genomorganisation des Hepatitis C Virus.....	11
Abbildung 3: Natürlicher Verlauf einer Hepatitis C Virus Infektion.....	14
Abbildung 4: Korezeptor Expression auf humanen T-Zellen	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung der TIGIT/CD226/PVR/PVRL2 Interaktion.	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines MHC-Klasse II Tetramers	33
Abbildung 7: Expression von TIGIT auf CD4+ T-Zellen.	40
Abbildung 8: Koinhibitorische Rezeptor Expression auf CD4+ T-Zellen.....	42
Abbildung 9: Kostimulatorische Rezeptor Expression auf CD4+ T-Zellen.....	43
Abbildung 10: Frequenzen der HCV-spezifischen MHC-Klasse II Tetramer positiven CD4+ T-Zellen	45
Abbildung 11: Differenzierungsstatus von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen	46
Abbildung 12: Inhibitorische Rezeptor Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen.....	47
Abbildung 13: Expression inhibitorischer Rezeptoren auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen.	49
Abbildung 14: SPICE Analyse der inhibitorischen Rezeptoren	50
Abbildung 15: TIGIT Expression auf HCV-spezifischen naïven und CD4+ Gedächtnis-T-Zellsubpopulationen	51
Abbildung 16: TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen	53
Abbildung 17: CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen	55
Abbildung 18: MFI der Korezeptoren TIGIT, PD-1 und CD226 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen im Verlauf einer DAA-Therapie.	57
Abbildung 19: Longitudinale Analyse der Korezeptor MFI in der frühen Phase der Infektion.	58
Abbildung 20: TIGIT und CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen.	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	28
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Lösungen.	28
Tabelle 3: Verwendetes Verbrauchsmaterial.	29
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien.	29
Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper.....	30
Tabelle 6: Liste der verwendeten HCV-spezifischen MHC-Klasse II und MHC-Klasse I Tetramer-Komplexe.	30
Tabelle 7: Demographische und klinische Daten der HCV Patientengruppen welche mit HCV-spezifischen MHC-Klasse II Tetrameren untersucht wurden.....	31
Tabelle 8: Demographische und klinische Daten der HCV Patientengruppen welche mit HCV-spezifischen MHC-Klasse I Tetrameren untersucht wurden.....	32
Tabelle 9: Detaillierte demographische und klinische Daten der für die HCV MHC-Klasse II Tetramer Analyse benutzen HCV Patienten.	73
Tabelle 10: Detaillierte demographische und klinische Daten der für die HCV MHC-Klasse I Tetramer Analyse benutzen HCV Patienten.	74
Tabelle 11: Detaillierte demographische und klinische Daten der gesunden Probanden.	75

Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus (HCV) persistiert unbehandelt in der Mehrheit der mit akuter Hepatitis C infizierten Patienten. Der Minderheit der HCV Patienten ist es möglich, die Infektion spontan auszuheilen. Immunologische Studien haben gezeigt, dass eine breite und langanhaltende HCV-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort essenziell für die Kontrolle einer HCV Infektion ist. Dagegen verlieren T-Zellen in der chronisch verlaufenden HCV Infektion zunehmend ihre Funktionalität. Die Hochregulation verschiedener koinhibitorischer Rezeptoren ist dabei ein kritischer Schritt bei der Entwicklung der T-Zell dysfunktion. Eine besondere Rolle bei der T-Zellregulation konnte in der Vergangenheit für die koinhibitorischen Rezeptoren TIGIT (*engl.* T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) und PD-1 (*engl.* Programmed cell death-1) bei chronischen Virusinfektionen und Krebserkrankungen gezeigt werden. Beide Moleküle werden in hohem Maße auf anti-viralen und anti-Tumor-spezifischen T-Zellen exprimiert und erste klinische Studien in der Krebstherapie konnten durch eine gezielte Blockade wieder eine Erholung der T-Zellantwort erreichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden HCV-spezifische CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilte HCV Infektion mit Hilfe einer *ex vivo* MHC-Klasse II Tetrameranalyse hinsichtlich ihrer TIGIT, PD-1, BTLA (*engl.* B- and T-lymphocyte attenuator), Tim-3 (*engl.* T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3) Oberflächenexpression, als auch ihrer OX40 (TNFRSF4; *engl.* Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4) und CD226 (DNAM-1; *engl.* DNAX accessory molecule-1) Expression untersucht. Als wichtiges Ergebnis dieser Arbeit konnte eine deutliche parallel erhöhte Expression von TIGIT⁺ und PD-1⁺ auf HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen während der akuten und chronischen HCV Infektion verglichen zu Patienten mit spontan ausgeheilte HCV Infektion nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde auf HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit chronischer HCV Infektion auch eine verminderte Expression von TIGIT's komplementären Rezeptor CD226 detektiert. Diese Reduktion der CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen entwickelte sich bei Patienten mit einem chronifizierenden Verlauf bereits früh während der akuten HCV Infektion. HCV-spezifische CD4⁺ T-Zellen von akut und chronisch infizierten Patienten zeichneten sich insbesondere durch eine hohe Expression von TIGIT⁺, PD-1⁺, BTLA⁺, Tim-3⁻ aus. Im Gegensatz dazu konnte auf HCV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen die Hochregulation von TIGIT nur in Patienten mit chronischer HCV Infektion detektiert werden. Diese Ergebnisse einer umfassenden phänotypischen durchflusszytometrischen Oberflächenanalyse identifizieren TIGIT zusammen mit PD-1 als potenziellen neuen Marker für dysfunktionale HCV-spezifische CD4⁺ T-Zellen.

Abstract

In the majority of hepatitis C virus (HCV) infected patients, the virus persists and the patients progress to chronic infection, although a minority of individuals is able to spontaneously control viral replication. During chronic HCV infection virus-specific T cells lose effector function, fail to expand and become functionally impaired. Recent studies have shown that a vigorous virus-specific CD4⁺ T cell response is crucial for successful control of HCV and other human viral infections. Upregulation of a combination of different coinhibitory receptors may be the critical step in the development of T cell dysfunction during acute HCV infection. More recently, the role of the coinhibitory receptors TIGIT (T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) and PD-1 (Programmed cell death-1) has come to the forefront in cancer and chronic viral infection where these receptors are highly expressed and are being targeted to improve anti-tumor and anti-viral T cell responses. Here, *ex vivo* HCV MHC class II tetramer staining and tetramer-associated magnetic bead enrichment technique was performed with baseline and longitudinal PBMC samples in a large cohort of patients with acute, chronic and spontaneously resolved HCV infection in order to assess the expression of the coinhibitory molecule TIGIT together with PD-1, BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator), Tim-3 (immunoglobulin domain and mucin domain-3 as well as OX40 (TNFRSF4: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4) and CD226 (DNAM-1: DNAX accessory molecule-1). As main result, a significantly higher expression level of TIGIT+PD-1⁺ on MHC class II tetramer positive HCV-specific CD4⁺ T cells during acute and chronic HCV infection compared to patients with spontaneous resolved HCV infection could be detected. Conversely, expression of the TIGIT complementary costimulatory receptor CD226 (DNAM-1) was significantly decreased on HCV-specific CD4⁺ T cells during chronic infection. In addition, this downregulation could already be detected during acute state of patients with persistent outcome. The predominant phenotype of the HCV-specific CD4⁺ T cells during acute and chronic infection was TIGIT⁺, PD-1⁺, BTLA⁺, Tim-3⁻. In contrast, on MHC class I tetramer positive CD8⁺ T cells, TIGIT was only found to be higher expressed in patients with chronic infection, but not in patients during acute HCV infection. Here, we present for the first time the expression of TIGIT on HCV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells as part of a network of coinhibitory and costimulatory receptors that induce T cell dysfunction associated with loss of viral control in chronic HCV infected patients. These findings of a comprehensive phenotypic analysis identify TIGIT together with PD-1 as a potential novel discriminatory marker of dysfunctional HCV-specific CD4⁺ T cells and suggest TIGIT along with other checkpoint receptors to be a novel curative target to reverse T cell exhaustion in chronic viral infections.

1 Einleitung

Chronisch virale Infektionen stellen weiterhin ein großes gesundheitliches Problem weltweit dar. Ungeachtet der medizinischen Entwicklung prophylaktischer Vakzine gegen verschiedene virale Erreger, wie z.B. gegen das Influenza und das Hepatitis B Virus (HBV), sowie wirksamer antiviraler Medikamente wie z.B. gegen das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) oder das Hepatitis C Virus (HCV), gehen chronisch virale Infektionen immer noch mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (Hallager et al., 2016) (Poorolajal, Hooshmand, Mahjub, Esmailnasab, & Jenabi, 2016). Bei zahlreichen chronischen Virusinfektionen scheint die CD4+ T-Zellantwort dysfunktional zu sein oder ganz zu fehlen. Jedoch ist der exakte Mechanismus, der zu einem Wirkungsverlust führt, nur unzureichend verstanden (Virgin, Wherry, & Ahmed, 2009) (Schulze zur Wiesch et al., 2012) (Walton, Mandaric, & Oxenius, 2013) (Morou, Palmer, & Kaufmann, 2014) (Crawford et al., 2014). Die Rolle von HCV-spezifischen T-Zellen in der chronischen HCV Infektion wird in **Abbildung 1** schematisch dargestellt.

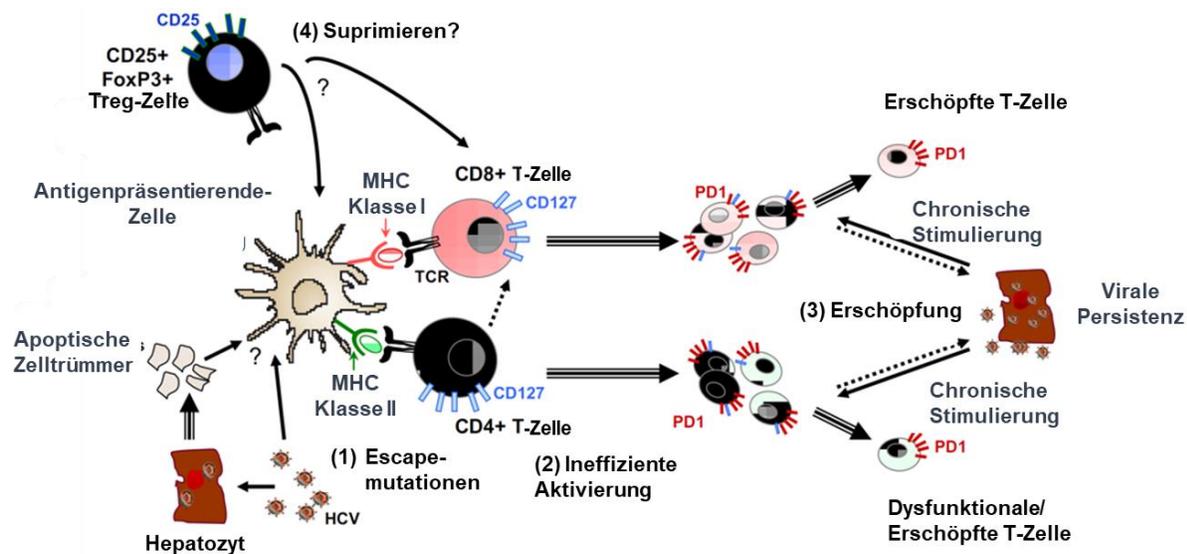


Abbildung 1: T-Zellen in der chronischen HCV Infektion. Eine chronische HCV Infektion ist mit einer verminderten T-Zellantwort verbunden, die durch verminderte Zytokinproduktion, reduzierte proliferative Kapazität der T-Zellen und eine Hochregulation von koinhibitorischen Molekülen gekennzeichnet ist. Mögliche Mechanismen des Versagens der T-Zellantwort sind hier dargestellt: (1) Escapemutationen in HLA-beschränkten Epitopen, die die Antigenerkennung beeinträchtigen, (2) Funktionsverlust der CD4+ T-Zellantworten, (3) Überexpression von PD-1 auf CD8+ T-Zellen; wenn PD-1 an seinen Liganden PD-Ligand 1 (PD-L1) bindet, wird ein inhibitorisches Signal an CD8+ T-Zellen übertragen, wodurch eine verminderte Effektorfunktion eintritt (4) Erhöhte Frequenz regulatorischer T-Zellen. Pfeile mit einzelner Linie zeigen die Wechselbeziehungen an, während Pfeile mit Doppellinien Zelldifferenzierungen angeben. Modifiziert nach Zeisel et al. (Zeisel et al., 2009).

1.1 Das menschliche Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl von Molekülen, Organen und Zellen, die koordiniert wirken, um den Organismus vor zahlreichen unterschiedlichen Erregern zu schützen (Chaplin, 2010). Die Mechanismen, die wir gegen Krankheitserreger, sowie gegen andere schädliche Substanzen, wie etwa Toxine von Insekten entwickeln, bezeichnet man als Immunantwort oder Immunreaktion. Dabei unterscheidet man zwischen angeborener Immunantwort und erworbener bzw. adaptiver Immunantwort (Brodin & Davis, 2017). Alle Zellen der angeborenen als auch adaptiven Immunantwort stammen von gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen, den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab. Von dort migrieren sie entweder zur weiteren Reifung in sekundäre lymphoide Organe, wandern in die Lymphe oder ins periphere Blutsystem (Eaves, 2015). Aus diesen pluripotenten Stammzellen entwickeln sich die direkten Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen, der Blutplättchen und der beiden Hauptgruppen der weißen Blutzellen (Leukozyten), die lymphatische und die myeloide Zellreihe. Sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort basieren hauptsächlich auf der Abwehr der Leukozyten (Yatim & Lakkis, 2015) (Sattler, 2017).

1.1.1 Die angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort bildet die erste Abwehrstufe gegen invasive Pathogene, die innerhalb kürzester Zeit ausgelöst wird (Zimmerman, Vogel, & Bowden, 2010) (Alberts et al., 2002). Es handelt sich dabei um eine unspezifische Immunreaktion, die jedoch ein breites Spektrum von Krankheitserregern bekämpfen kann, aber keine dauerhafte Immunität hervorbringt. Das angeborene Immunsystem erkennt mikrobielle Moleküle durch ein sogenanntes Muster-Erkennungs-System (*engl.* Pattern recognition system) (Riera Romo, Pérez-Martínez, & Castillo Ferrer, 2016) (Netea et al., 2016). Bei einer Infektion mit Pilzen, Bakterien oder Viren kann das angeborene Immunsystem hochkonservierte Moleküle wie Bestandteile der Zellwand, Nukleinsäuren oder Lipopolysaccharide (LPS) der Pathogene erkennen (Iwasaki & Medzhitov, 2015) (Takeuchi & Akira, 2010). Diese sogenannten PAMPs (*engl.* Pathogen-associated molecular pattern) werden über zugehörige Mustererkennungs-Rezeptoren auf Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. Zu den Aufgaben des angeborenen Immunsystems gehört, neben der ersten und möglichst schnellen Abwehr von Pathogenen, die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Hierfür sind vor allem dendritische Zellen und Makrophagen, die sogenannten Antigenpräsentierenden-Zellen (APCs; *engl.* Antigen presenting cells) wichtig (Diefenbach, Colonna, & Koyasu, 2014).

1.1.2 Die adaptive Immunantwort

Das adaptive Immunsystem erkennt im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem neben den konservierten Strukturen vor allem variable Strukturen der Pathogene (Charles A Janeway, Travers, Walport, & Shlomchik, 2001). Die Zellen des adaptiven Immunsystems zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass sie nach dem ersten Kontakt mit einem Pathogen ein Immungedächtnis ausbilden. Dadurch können sie ein Pathogen bei erneutem Kontakt schneller eliminieren, wodurch die Infektion nicht nochmals ausbricht oder milder verläuft (Bonilla & Oettgen, 2010) (Kugelberg, 2016) (Leavy, 2016). Das adaptive Immunsystem setzt sich aus einer zellulären und einer humoralen Immunantwort zusammen. Die zelluläre Immunantwort wird durch Leukozyten (weiße Blutkörperchen), vor allem den T-Lymphozyten ausgelöst. Antikörper (Immunglobuline, Ig) bilden die humorale Komponente. Die Antikörper produzierenden B-Lymphozyten reifen im Knochenmark, während die T-Lymphozyten im Thymus reifen (Simon, Hollander, & McMichael, 2015). Nachdem sie sich in den primären lymphoiden Organen (Thymus und Knochenmark) entwickelt haben, gelangen sie zu sekundären lymphoiden Organen, einschließlich Lymphknoten und Milz, die dazu dienen, zirkulierende Antigene aus Lymphe bzw. Blut einzufangen. Dort findet die weitere Differenzierung statt (M. D. Cooper & Alder, 2006) (Fu, Ward, & Marelli-Berg, 2016).

1.1.2.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten (B-Zellen) spielen eine zentrale Rolle im adaptiven Immunsystem. Sie exprimieren Immunglobulin Rezeptoren (allg. als Antikörper bekannt) auf ihrer Oberfläche, die Epitop-spezifisch Antigene erkennen (Raff, 1973) (Cella et al., 1999). Nach ihrer Ausreifung im Knochenmark zirkulieren B-Zellen im Blut und in den peripheren lymphatischen Organen (Lala, Johnson, Batty, & Nossal, 1979). Nach Antigenkontakt und Aktivierung des B-Zellrezeptors kommt es zur massiven Proliferation und Ausdifferenzierung zu Plasmazellen (LeBien & Tedder, 2008). Ein Teil der Ausdifferenzierung ist der sogenannte Immunglobulin-Klassenwechsel. Der Klassenwechsel ermöglicht die Kombination mehrerer alternativer konstanter Regionen von schweren Ketten mit der gleichen variablen Region. Somit entstehen Antikörper mit derselben Spezifität aber unterschiedlichen Effektorfunktionen. Auf diese Weise können die Klone einer einzelnen B-Zelle viele verschiedene Antikörperklassen exprimieren und die Effektorfunktionen eines bestimmten Antikörpers maximieren (Stavnezer, Guikema, & Schrader, 2008).

1.1.2.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten (T-Zellen) spielen eine wichtige Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung von Immunantworten sowie deren Homöostase und Gedächtnisfunktion (Butcher & Picker, 1996) (Masopust & Schenkel, 2013) (Kumar, Connors, & Farber, 2018) (Jameson & Masopust, 2018). Durch die Aktivierung von B-Zellen helfen sie bei der Antikörper Produktion und regulieren die Antigen-spezifische, zellvermittelte Immunität. Diese ist wichtig für die Beseitigung von Zellen, die mit Pathogenen infiziert sind, die sich intrazellulär replizieren (z.B. Viren, Mykobakterien und einigen anderen Bakterien) oder Zellen, die eine abweichende Differenzierung zeigen (z. B. Neoplasmen) (Kersey & Gajl-Peczalska, 1975) (Bowen & Walker, 2005) (A. M. Cooper, 2009). Die zellvermittelte Immunität zerstört auch allogene Zellen (Transplantatabstoßung) (Ogonek et al., 2016). Darüber hinaus ist sie an zellulären Autoimmunreaktionen sowie an allergischen Reaktionen beteiligt. T-Zellen aktivieren zusätzlich Zellen des angeborenen Immunsystems wie etwa Makrophagen, die dann beim Abtöten anderer Arten von Pathogenen wie etwa Pilzen wirksamer werden.

Nach der Reifung im Thymus entwickeln sich zwei unterschiedliche T-Zellarten, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen T-Zellrezeptoren (TCR; *engl.* T cell receptor) differenzieren lassen, die $\gamma\delta$ - und $\alpha\beta$ -T-Zellen (Born, Kemal Aydintug, & O'Brien, 2013) (Petri, Scollay, & Shortman, 1992). Aus der größeren $\alpha\beta$ -T-Zellreihe gehen dann zwei funktionell getrennte Untergruppen hervor, die CD4+ und CD8+ T-Zellen (Taghon & Rothenberg, 2008) (Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2010). Im Gegensatz zu Antikörpern kann der TCR das Antigen nicht direkt binden. Stattdessen muss das Antigen in Peptide fragmentiert und mit Hilfe von APCs über einen Proteinkomplex präsentiert werden (Braciale et al., 1987) (Vyas, Van der Veen, & Ploegh, 2008). Die Moleküle auf den APCs, die das Antigen präsentieren, werden als Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC; *engl.* Major histocompatibility complex) bezeichnet. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. Zytotoxische CD8+ T-Zellen erkennen Antigene, die über den MHC-Klasse I-Komplex präsentiert werden; CD4+ Helfer T-Zellen erkennen MHC-Klasse II-Komplexe (Neefjes, Jongma, Paul, & Bakke, 2011). Für eine vollständige Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen wird noch ein weiteres Signal über einen Korezeptor benötigt. Korezeptoren werden ebenfalls auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert und können die durch den TCR induzierte Signalübertragung entweder verstärken oder inhibieren (Janeway, 1991) (Smith-Garvin, Koretzky, & Jordan, 2009) (Chen & Flies, 2013).

1.1.2.3 T-Zelldifferenzierung

Nach der Entwicklung im Thymus werden T-Zellen als reife, naive T-Zellen in die Peripherie freigesetzt und sind bereits mit einer Antigenspezifität ausgestattet (Boehm & Bleul, 2006) (N. Zhang & Bevan, 2011). Nach Kontakt mit dem entsprechenden Antigen expandieren naive T-Zellen massiv und differenzieren sich zu Effektor-T-Zellen, von denen die überwiegende Mehrheit ins periphere Gewebe und die entzündeten Regionen wandert (MacLeod, Kappler, & Marrack, 2010). Nach der Eliminierung der Infektion sterben bis zu 95 % der Effektor-T-Zellen, während sich ein kleiner Pool an T-Zellen letztendlich zu langlebigen Gedächtnis-T-Zellen entwickelt (Mahnke, Brodie, Sallusto, Roederer, & Lugli, 2013). Bei der Differenzierung zu Effektor-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen verändern diese ihre Oberflächenmoleküle und lassen sich entsprechend der Molekülexpression in unterschiedliche Subpopulationen unterteilen (Taniuchi, 2018). Basierend auf den Differenzierungsmarkern CD45 und CCR7 lassen sich T-Zellen in naive und Gedächtniszellen klassifizieren (Federica Sallusto, Lenig, Förster, Lipp, & Lanzavecchia, 1999) (Mahnke et al., 2013).

Das Molekül CD45 ist eine Protein-Tyrosinphosphatase, die Kinasen der Src-Familie reguliert und die auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Fujii, Okumura, Inada, Nakahara, & Matsuda, 1992). CD45RA wird auf naiven, sowie CD4+ Effektor-T-Zellen als auch von CD8+ T-Zellen exprimiert (Okada, Kondo, Matsuki, Takata, & Takiguchi, 2008) (Carrasco, Godelaine, Van Pel, Boon, & van der Bruggen, 2006). Nach Antigenkontakt entwickelt sich ein Teil der T-Zellen zu Zentralen- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (Chang, Wherry, & Goldrath, 2014). Diese Differenzierung bewirkt eine Reduktion der CD45RA und eine Hochregulation der CD45RO Expression (Akbar, Terry, Timms, Beverley, & Janossy, 1988).

Der Chemokinrezeptor CCR7 wird von naiven und Gedächtnis-T-Zellen exprimiert, die zu sekundären lymphoiden Organen wandern (F Sallusto, Langenkamp, Geginat, & Lanzavecchia, 2000) (Campbell et al., 2001). Eine fehlende Expression von CCR7 hingegen, erlaubt Effektor- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen in peripheren Gewebe zu akkumulieren (Worbs & Förster, 2007). Mit Hilfe der Differenzierungsmarker CD45RO und CCR7 können T-Zellen in naive und Gedächtnis-T-Zellsubpopulationen unterteilt werden: CCR7-CD45RO- – Terminale-Effektor-T-Zellen: T_{EMRA} ; CCR7+CD45RO- – naive T-Zellen: T_{naive} ; CCR7-CD45RO+ – Effektor-Gedächtnis-T-Zellen – T_{EM} ; CCR7+CD45RO+ – Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen – T_{CM} (Federica Sallusto, Geginat, & Lanzavecchia, 2004) (Sathaliyawala et al., 2013).

1.1.2.4 CD8+ T-Lymphozyten

CD8+ T-Lymphozyten (CD8+ T-Zellen), oder auch zytotoxische CD8+ T-Zellen genannt, sind eine Subpopulation adaptiver Lymphozyten und spielen eine wichtige Rolle bei der Immunität gegen intrazelluläre Pathogene und Tumore (Gattinoni, Klebanoff, & Restifo, 2012) (Klenerman & Hill, 2005) (Kuang et al., 2010) (Loser et al., 2010).

Sie tragen zusätzlich zur Regulation pathologischer Prozesse wie Autoimmunerkrankungen und allergischen Erkrankungen bei (Huber et al., 2009) (Loser et al., 2010) (Y. Tang et al., 2012) (Visekruna et al., 2013). Naïve CD8+ T-Zellen werden durch den Kontakt mit spezifischen Peptiden/Antigenen aktiviert, die ihnen über MHC-Klasse I Komplexe auf APCs in peripheren lymphatischen Organen präsentiert werden (Hewitt, 2003). Zusätzlich beeinflussen kostimulatorische Signale und Zytokine, die von APCs und / oder CD4+ T-Zellen bereitgestellt werden, die Differenzierung von CD8+ T-Zellen. Daraufhin differenzieren naïve CD8+ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen und expandieren massiv, um eine große Anzahl von Effektor-T-Zellen zu erzeugen, die in die Peripherie wandern können (N. Zhang & Bevan, 2011). Da MHC-Klasse I Moleküle auf den meisten kernhaltigen Zellen exprimiert werden, können CD8+ Effektor-T-Zellen ihr Zielantigen auf fast allen Zellen unseres Körpers außer Erythrozyten erkennen (Mittrücker, Visekruna, & Huber, 2014). Am Ende der primären Antwort stirbt die Mehrheit der CD8+ Effektor-T-Zellen durch Apoptose ab. Ein kleiner Teil bleibt jedoch als langlebige CD8+ Gedächtnis-T-Zellen erhalten. Bei erneutem Kontakt mit bereits bekannten Antigenen können diese CD8+ Gedächtnis-T-Zellen mit erhöhter Proliferation und schneller Umwandlung in Effektor-T-Zellen reagieren (Kaech & Cui, 2012) (Shrikant et al., 2010).

1.1.2.5 CD4+ T-Lymphozyten

CD4+ T-Lymphozyten (CD4+ T-Zellen) nehmen nach ihrer Aktivierung und Differenzierung in verschiedene Effektor-Zellsubtypen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Immunantwort durch Sekretion spezifischer Zytokine ein (Abbas, Murphy, & Sher, 1996) (J. Zhu & Paul, 2008) (Leung et al., 2010). Durch ihre unterstützende Rolle in der Immunantwort werden sie auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet. Abgesehen von der Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems, der B-Zellen, der zytotoxischen CD8+ T-Zellen sowie auch Nicht-Immunzellen, spielen sie auch eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung von Immunreaktionen (J. Zhu & Paul, 2008).

Bei einer Infektion differenzieren sich naive CD4+ T-Zellen, unter dem Einfluss von Zytokinen, deren Freisetzung durch den Erreger ausgelöst wird, zu verschiedenen Typen von Effektor-T-Zellen (Jinfang Zhu, Yamane, & Paul, 2010). Neben den klassischen T-Helfer-1 (Th1)- und T-Helfer-2-Zellen (Th2) (Mosmann & Rebhahn, 2016) lassen sich CD4+ T-Zellen in weitere Subpopulationen unterteilen. Dazu gehören T-Helfer 17-Zellen (Th17), T-regulatorische Zellen (Treg), folliculäre T-Helfer-Zellen (Tfh), und die regulatorischen Typ-1-Zellen (Tr1) sowie die T-Helfer 9 (Th9)- und T-Helfer-22-Zellen (Th22) (Schmitt et al., 1994) (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012) (Caza & Landas, 2015) (Goswami, 2017). Die Unterscheidung der verschiedenen Linien erfolgt durch das komplexe Netzwerk spezifischer Zytokinsignale und Transkriptionsfaktoren, gefolgt von epigenetischen Modifikationen (J. Zhu & Paul, 2008). Auf die einzelnen Zellgruppen wird im Folgenden näher eingegangen.

Die **Th1**-Zellen sind für die Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen wie Viren und einigen Bakterien verantwortlich. Interleukin- (IL-) 12 und IFN- γ sind wichtige Zytokine, die an Th1-Immunantworten beteiligt sind. Die intrazellulären Transkriptionsfaktoren T-bet (*engl.* T-box gene expressed in T cells) und STAT-4 (*engl.* Signal transducer and activator of transcription 4) sind für die Differenzierung und Funktion von Th1-Zellen verantwortlich (Thieu et al., 2008).

Th2-Zellen sind wichtig für die Abwehr großer extrazellulärer Organismen wie Helminthen, wobei Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 (Ansel, Djuretic, Tanasa, & Rao, 2006) (Djuretic et al., 2007) eine entscheidende Rolle einnehmen. Gata-3 (*engl.* GATA binding protein 3) und STAT-6 (*engl.* Signal transducer and activator of transcription 6) sind wesentlich für die Differenzierung und Funktion von Th2-Zellen (Usui et al., 2006).

Th17-Zellen sind bei der Immunabwehr von extrazellulären Pathogenen, so wie Pilzen beteiligt und sind von zentraler Bedeutung bei Autoimmunerkrankungen (Khader, Gaffen, & Kolls, 2009) (Aujla, Dubin, & Kolls, 2007) (Bedoui, Gebhardt, Gasteiger, & Kastenmüller, 2016). Zahlreiche Studien haben auch gezeigt, dass Th17-Zellen entscheidend bei der Abwehr von Pathogenen wie dem HIV (Bixler & Mattapallil, 2013) (Douek, Picker, & Koup, 2003) und der Bekämpfung von Krebszellen wie z.B. bei einem hepatozellulären Karzinom oder Magenkarzinom sind (F. Zhao et al., 2012) (Bailey et al., 2014). Hauptsächlich werden Th17-Zellen über die Produktion der Zytokine IL-17A und IL-17F definiert (Dong, 2008) (Cai, Blase, Zhang, Eickhoff, & Hoft, 2016). Zusätzlich produzieren sie noch weitere Zytokine wie IL-21 und IL-22 (Hoe et al., 2017) (Sonnenberg, Fouser, & Artis, 2010). Der Haupttranskriptionsfaktor für die Differenzierung der Th17-Zellen ist ROR γ t (*engl.* Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma).

Die Expression von ROR γ t wird mittels TGF- β und IL-6 induziert und steuert unter anderem die Transkription der Gene, die für die Zytokine IL-17A und IL-17F kodieren (Ivanov et al., 2006) (Diller, Kudchadkar, Delman, Lawson, & Ford, 2016).

Humane **Th22**-Zellen werden als eine CD4⁺ T-Zellsubpopulation charakterisiert, die IL-22 in Abwesenheit von IL-17 und IFN- γ produzieren und die Chemokinrezeptoren CCR10, CCR6 und CCR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Duhon, Geiger, Jarrossay, Lanzavecchia, & Sallusto, 2009) (Trifari, Kaplan, Tran, Crellin, & Spits, 2009) (Basu et al., 2012). Die Entwicklung von Th22-Zellen hängt vom Transkriptionsfaktor AHR (*engl.* Aryl hydrocarbon receptor) ab, dessen Aktivierung zu einer erhöhten IL-22 Produktion, so wie einer Abnahme der IL-17 Expression (Ramirez et al., 2010) führt. Humane Th22-Zellen sind vor allem in der Haut lokalisiert, wo sie zu der Abwehr von mikrobiellen Pathogenen beitragen und zusätzlich die Gewebereparatur oder -umbildung fördern können (H. Fujita, 2012) (Jia & Wu, 2014). Demzufolge sind Th22-Zellen stark mit unterschiedlichen Hauterkrankungen, wie Psoriasis und psoriatische Arthritis (Benham et al., 2013) sowie anderen Autoimmunerkrankungen der Haut assoziiert (Azizi, Yazdani, & Mirshafiey, 2015).

Regulatorische T-Zellen (**Treg**) sind essenziell für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz, schützen den Wirt vor Autoimmunität, regulieren die Entzündungsreaktion bei chronischen Erkrankungen mit Pathogenen und schützen somit vor Gewebeschäden. (Shevach et al., 2006) (Belkaid, 2007). Sie begrenzen jedoch auch die vorteilhaften Reaktionen, indem sie die sterilisierende Immunität unterdrücken und die anti-Tumor-Immunität begrenzen (Sakaguchi et al., 2001) (Kretschmer, Apostolou, Jaeckel, Khazaie, & von Boehmer, 2006). Treg-Zellen wurden zunächst basierend auf der konstitutiven Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors, CD25 definiert (Jordan et al., 2001). Die Entdeckung des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 (*engl.* Forkhead box protein 3), der für die Entwicklung und den Erhalt der Zellen essenziell ist, erlaubte eine umfassendere phänotypische und funktionelle Charakterisierung (Hori, Shohei Nomura, Taskashi Sakaguchi, 2003) (Ali & Rosenblum, 2017). Über die Zytokine IL-10, IL-35 und den Wachstumsfaktor TGF- β , können Treg-Zellen sowohl die Immunantworten des angeborenen als auch adaptiven Immunsystems regulieren und inhibieren (Q. Tang & Bluestone, 2008) (Chaudhry et al., 2011) (Schmidt, Oberle, & Krammer, 2012).

Tr1-Zellen wurden erstmals von Roncarolo et al. im Jahr 1997 identifiziert, als eine Untergruppe von CD4⁺ T-Zellen, die Antigen-spezifische T-Zellreaktionen unterdrückt und Colitis-Erkrankungen verhindert (Groux et al., 1997). Tr1-Zellen zeichnen sich vor allem durch ein IL-10⁺ TGF- β ⁺ IFN- γ ⁺ IL-5⁺ Zytokinprofil aus.

Ein entscheidender Unterschied zu Treg-Zellen ist das Fehlen des Transkriptionsfaktors Foxp3 (Gagliani et al., 2013). Tr1-Zellen werden mit Krebserkrankungen wie z.B. dem Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses, sowie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht (Bergmann et al., 2008) (Geem, Harusato, Flannigan, & Denning, 2015).

Tfh-Zellen sind spezialisierte T-Helfer-Zellen, die überwiegend in den Keimzentren lokalisiert sind. Eine wichtige Funktion der Tfh-Zellen besteht darin, B-Zellen Hilfe zu leisten für die Reifung, Differenzierung zu Plasma bzw. Gedächtnis-B-Zellen über die Sezernierung von ICOS, CD40L, IL-4 und IL-21 (Crotty, 2011). Die Entwicklung und Differenzierung von Tfh-Zellen wird durch die Transkriptionsfaktoren Bcl-6 (*engl.* B-cell lymphoma 6 protein), STAT3 (*engl.* signal transducer and activator of transcription 3) und durch Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) reguliert und gesteuert (Nurieva et al., 2009) (R. J. Johnston et al., 2009). Darüber hinaus werden Tfh-Zellen über eine hohe Expression des Chemokinrezeptors CXCR5, welcher auch von B-Zellen exprimiert wird und das Chemokin CXCL13 detektiert, charakterisiert (D. A. Rao, 2018).

Die **Th9-Zellen** sind eine jüngst identifizierte Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen, die über die Produktion von IL-9 charakterisiert werden (Dardalhon et al., 2008) (Veldhoen et al., 2008). Neben der IL-9 Produktion, wird ebenfalls das Zytokin IL-21 von Th9-Zellen sekretiert, als auch IL-4 und TGF- β , die entscheidend für die Differenzierung sind (Schmitt, Klein, & Bopp, 2014). Th9-Zellen sind wichtig bei der Immunabwehr von Parasiten wie Darmwürmern und in der anti-Tumor Immunität (Licona-Limón et al., 2013) (Lu et al., 2012). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Th9-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung von Entzündungen bei Krankheiten wie Asthma, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), Colitis oder bei Hautentzündung spielen (Jager, Dardalhon, Sobel, Bettelli, & Kuchroo, 2009) (Kaplan, Hufford, & Olson, 2015).

1.2 Das Hepatitis C Virus

Die Hepatitis C Infektion ist eine Entzündung der Leber, die aufgrund einer Infektion mit dem Hepatitis C Virus entsteht. Das Hepatitis C Virus wurde erstmals im Jahr 1989 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*; *engl.* Polymerase chain reaction) im Blut nachgewiesen und als Hauptursache der chronischen Non-A-Non-B-Hepatitis identifiziert, die bis dahin überwiegend bei Patienten nach Bluttransfusionen nachgewiesen werden konnte (Feinstone, Kapikian, Purcell, Alter, & Holland, 1975) (Choo et al., 1989).

Mit Hilfe von Antikörpersuchtests und PCR Untersuchungen ist das Risiko einer Ansteckung durch Bluttransfusionen in der westlichen Welt seit 1992 auf 1: > 4.000.000 gesunken (Kuo et al., 1989) (Offergeld, Faensen, Ritter, & Hamouda, 2005).

1.2.1 Taxonomie

Das Hepatitis C Virus gehört zu der Gattung Hepacivirus innerhalb der Familie der *Flaviviridae* (Bukh, Miller, & Purcell, 1995) (Irvine et al., 1993) (Peter Simmonds et al., 2005). Durch seine molekularbiologischen Besonderheiten wird das Hepatitis C Virus neben dem GBV-B Virus in die eigenständige Gattung Hepacivirus eingeordnet, welche neben den beiden Genera Flavivirus und Pestivirus die Familie der *Flaviviridae* bilden (Simons et al., 1995) (Muerhoff et al., 1995). Infolge der genetischen Variabilität des Hepatitis C Virus werden bislang sieben HCV Genotypen mit mindestens 67 weiteren Subtypen unterschieden (P Simmonds et al., 1994) (Smith et al., 2014). Diese Variabilität kann durch die sehr hohe Mutationsrate und einer Produktion von ca. 10^{12} Viruspartikeln pro Individuum pro Tag erklärt werden (Neumann et al., 1998). Die beträchtliche genetische Heterogenität aufgrund der Mutationsrate fördert den Anteil an chronischen Infektionen und ist ein entscheidender Grund für die Schwierigkeiten in der Impfstoffentwicklung und das häufige Versagen einer Therapie (Stoll-Keller, Barth, Fafi-Kremer, Zeisel, & Baumert, 2009) (Abdelwahab & Ahmed Said, 2016).

1.2.2 Aufbau und Genomorganisation des Virus

Das HCV Genom umfasst eine Größe von ca. 9,6 Kilobasen (kb) und beinhaltet einen offenen Leserahmen (ORF: *engl.* Open reading frame,), der für ein 3011 Aminosäuren langes Polyprotein kodiert (**Abbildung 2**). Sowohl das 5´ als auch 3´ Ende am ORF werden von nicht-kodierenden-Regionen (NCR; *engl.* Non-coding-region) flankiert.

Beide NCRs enthalten hoch konservierte Abschnitte, die essenziell für die Regulation der Virusreplikation sind (Moradpour & Penin, 2013). Die NCR am 5´ Ende beinhaltet eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES: *engl.* Internal ribosome entry site), welche die Translation der viralen RNA ermöglicht. Mit Hilfe der IRES-vermittelten Translation wird die virale RNA in ein Vorläuferpolyprotein umgeschrieben. Durch zelluläre und virale Proteasen wird das Vorläuferprotein in zehn funktionsfähige Proteine gespalten.

Diese umfassen die drei Strukturproteine Core, E1 und E2 sowie die folgenden sechs Nichtstrukturproteine, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B, als auch P7 als Verbindung zwischen strukturellen und nichtstrukturellen Proteinen (Pietschmann, Lohmann, Rutter, Kurpanek, & Bartenschlager, 2001). In **Abbildung 2** ist der Aufbau des HCV-Genoms, dessen Struktur und Organisation schematisch dargestellt. Zusätzlich sind die einzelnen Funktionen der HCV Proteine vermerkt.

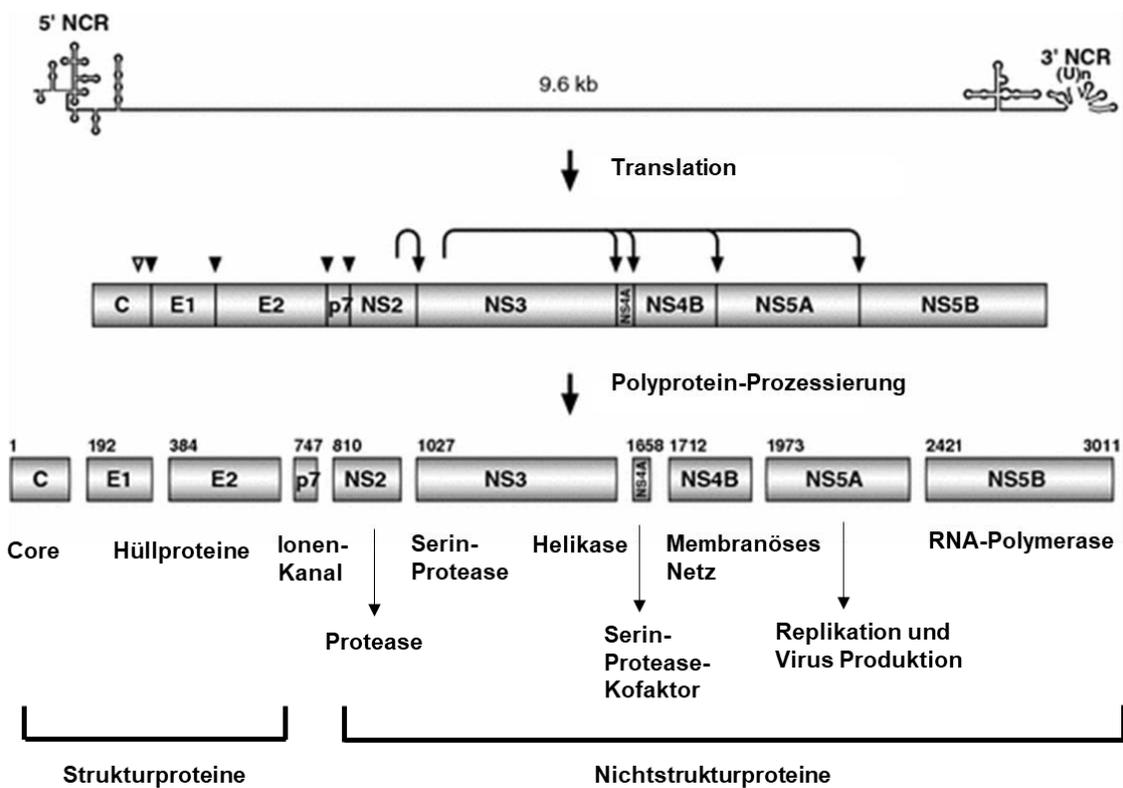


Abbildung 2: Genomorganisation des Hepatitis C Virus. Das Hepatitis C Virus enthält ein einzelsträngiges 9,6 kb positiv polarisiertes RNA Genom. Durch IRES-vermittelte Translation entsteht ein Vorläuferpolyprotein, welches mit Hilfe zellulärer und viraler Proteasen prozessiert wird. Dabei entstehen drei strukturelle (Core, E1, E2,) und sechs nichtstrukturelle (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) Proteine, sowie P7 als Verbindung zwischen strukturellen und nichtstrukturellen Proteinen. IRES: internal ribosome entry site; NCR: noncoding region; E1/2: envelope; NS: nonstructural. Modifiziert nach Moradpour et al. (Moradpour & Penin, 2013).

Die Strukturproteine werden durch die Signalpeptidase des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gespalten, während die Nichtstrukturproteine durch viruscodierte Proteasen prozessiert werden.

Das Kernprotein bildet das Kapsid um das virale RNA Genom und ist am Aufbauprozess des Viruspartikels, sowie auch an der Regulation der Translation beteiligt (Ait-Goughoulte et al., 2006). Die beiden Glykoproteine E1 und E2 sind wesentliche Bestandteile der HCV Virionhülle und für den Eintritt und die Fusion des Virions verantwortlich (Bartosch et al., 2003) (Nielsen, Bassendine, Burt, Bevitt, & Toms, 2004).

P7 ist ein 63 Aminosäuren langes Polypeptid, welches für die Bildung und Freisetzung neuer infektiöser Viruspartikel wesentlich ist (Steinmann & Pietschmann, 2010). Die NS2-3-Protease ist eine für die Replikation essentielle Autoprotease (Kolykhalov, Mihalik, Feinstone, & Rice, 2000) (Pietschmann et al., 2006). Das NS3 Protein besitzt eine N-terminale Serinprotease-Aktivität, sowie eine C-terminale RNA-Helikase/NTPase-Aktivität. Die Protease-Aktivität von NS3 wird durch den Kofaktor NS4A verstärkt (R Bartenschlager, Lohmann, Wilkinson, & Koch, 1995) (Wölk et al., 2000).

Das Nichtstrukturprotein NS4B spielt eine wichtige Rolle bei der Formation eines membranösen Netzwerkes, das die Funktion der Replikation unterstützt (Herod, Jones, McLauchlan, & McCormick, 2012). NS5A ist ein Phosphoprotein, das eine Schlüsselrolle bei der HCV-RNA-Replikation und bei viralen Assemblierungsprozessen spielt. NS5B präsentiert die RNA-abhängige RNA Polymerase und stellt somit die enzymatische Komponente des Replikationskomplexes dar (Weber et al., 1999). Das NS5B Protein besitzt keine Korrekturfunktion und baut durchschnittlich einen Fehler pro 10^3 Nukleotide ein und ist somit für die hohe Mutationsrate des Virus verantwortlich (Bressanelli, Tomei, Rey, & De Francesco, 2002).

1.2.3 Replikationszyklus

Das HCV ist ein positiv Einzelstrang RNA Virus, dessen Reproduktion hauptsächlich in humanen Hepatozyten stattfindet (Suzuki, 2017). Nach der Infektion mit HCV zirkuliert das Virion als freies Partikel oder umgeben von Lipoproteinen des Wirtes mit geringer Dichte im Blutstrom des Menschen (André et al., 2002). Durch sequenzielle Bindung verschiedener Rezeptormoleküle bindet das Viruspartikel an die Zellmembran der Hepatozyten und dringt über einen Clathrin-vermittelten-Endozytoseprozess in die Zelle ein. Durch das Aufbrechen des viralen Kapsids im endozytischen Kompartiment wird das Virus-Genom freigesetzt (Lindenbach, 2013). Das RNA-Genom wird dann direkt am rauen ER in ein einziges Vorläufer-Polypeptid von 3011 Aminosäureresten translatiert, das schließlich durch zelluläre und virale Proteasen in zehn reife Virusproteine (s. Kapitel 1.2.5) gespalten wird (Lohmann, 2013) (Niepmann, 2013).

Die Entwicklung neuer Virusgenome wird durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase katalysiert. Nach der Synthese aller viralen Proteine und der Replikation des Genoms erfolgt die Zusammensetzung des Virus im ER (McLauchlan, Lemberg, Hope, & Martoglio, 2002). Daraufhin kommt es zur Abknospung der einzelnen Viruspartikel in das Lumen des ER. Im Zuge des vesikulären Transports zur Plasmamembran kommt es zur Glykosylierung der Membranproteine im Golgi-Apparat. Durch die Fusion der Golgi-Vesikel mit der Plasmamembran werden daraufhin die infektiösen Viruspartikel freigesetzt (Ralf Bartenschlager, Penin, Lohmann, & André, 2011).

1.2.4 Epidemiologie

Weltweit sind neuesten Schätzungen der WHO zufolge etwa 71 Millionen Menschen chronisch mit HCV infiziert, das entspricht etwa 1 % der Weltbevölkerung (Puchades Renau & Berenguer, 2018) ("WHO | Global hepatitis report, 2017," 2017) (Polaris Observatory HCV Collaborators et al., 2017). Dem *global hepatitis report* der WHO 2017 zufolge waren die am meisten von der Infektion betroffenen Regionen die östliche Mittelmeerregion mit der höchsten Prävalenz chronischer Hepatitis C (2,3 %), gefolgt von Europa (1,5 %) und dem westlichen Pazifikraum (0,7 %) im Jahre 2015 ("WHO | Global hepatitis report, 2017," 2017). In den anderen Regionen variiert die Prävalenz chronischer Infektionen zwischen 0,5 % und 1,0 %. Schätzungen zufolge lag weltweit die Zahl der Neuinfektionen mit 1,75 Millionen höher als die Zahl der Personen, die durch HCV-bedingte Spätfolgen verstorben waren (399.000) oder erfolgreich behandelt wurden (843.000) ("WHO | Global hepatitis report, 2017," 2017).

1.2.5 Übertragung

Die Übertragung des HCV erfolgt überwiegend parental; Infektionen nach heterosexuellen Kontakten sind sehr selten (Tibbs, 1995) (Morozov & Lagaye, 2018). Vor Einführung des anti-HCV Screenings Anfang der neunziger Jahre zählten vor allem Infektionen durch Bluttransfusionen mit kontaminierten Blutkonserven zu den häufigsten Infektionsgründen. (Alter et al., 1989) (Heintges & Wands, 1997). Eine Übertragung von der Mutter an das neugeborene Kind ist möglich, jedoch eher selten (Roberts & Yeung, 2002) (Syriopoulou et al., 2005). Ebenso besteht ein sehr geringes Risiko bei der Übertragung des Hepatitis C Virus durch Muttermilch (Polywka, Schroter, Feucht, Zollner, & Laufs, 1999). Heutzutage erfolgt die Übertragung vor allem durch die gemeinsame Nutzung von kontaminiertem Spritzbesteck bei Drogenabhängigen Personen (Kogure et al., 2006) (Mitrovic et al., 2018).

1.2.6 Krankheitsverlauf

Eine akute HCV Infektion ist definiert als die ersten 6 Monate der Infektion und kann mit unterschiedlichen Krankheitssymptomen in Erscheinung treten wie z.B. grippale Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Unwohlsein, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Bauchschmerzen oder aber auch Sklerenikterus (Gelbsucht) (Villano, Vlahov, Nelson, Cohn, & Thomas, 1999) (Cox, Netski, et al., 2005) (Araujo, Astrakhantseva, Fields, & Kamili, 2011) (Hajarizadeh, Grebely, & Dore, 2012). Laborchemisch fallen 5- bis 10-fach erhöhte Alanin-Aminotransferase-Werte (ALT) und erhöhte Aspartat-Aminotransferase (AST) (Leberwerte) auf, auch kommt es zu einer Erhöhung des Bilirubin Wertes und in wenigen Fällen sogar zu einem Ausfall der Leberfunktion (Martinello, Hajarizadeh, Grebely, Dore, & Matthews, 2018). In den meisten Fällen verläuft eine akute HCV Infektion jedoch asymptomatisch, wodurch eine Diagnose erschwert wird und das Virus unbemerkt weiter übertragen werden kann. Der natürliche Infektionsverlauf bei einer Hepatitis C Infektion ist in **Abbildung 3** schematisch dargestellt.

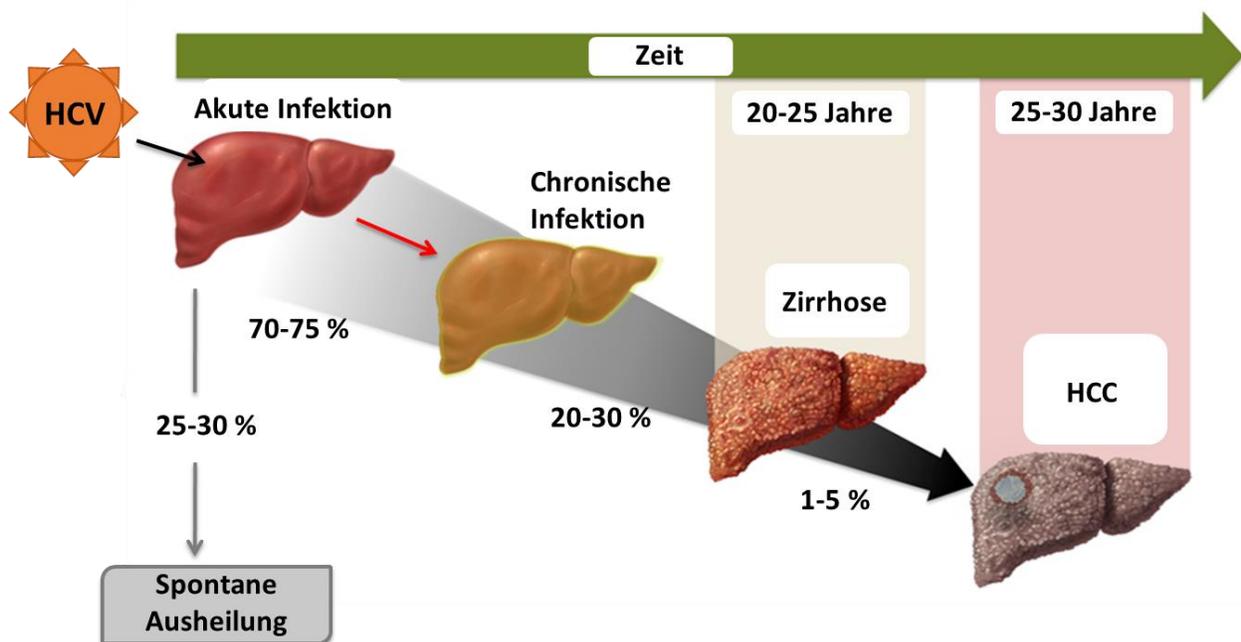


Abbildung 3: Natürlicher Verlauf einer Hepatitis C Virus Infektion. Zeitliche Entwicklung einer Hepatitis C Infektion von der akuten Phase (erste 6 Monate) gefolgt von spontaner Ausheilung in 25-30 % oder (unbehandelt) einem chronischen Verlauf in 70-75 % der Fälle. Als Folge einer chronischen Hepatitis C Infektion entwickeln 20-30 % der Patienten innerhalb von 20-25 Jahren eine Leberzirrhose, die Komplikationen wie hepatische Dekompensation beinhaltet und davon entwickeln 1-5 % der Patienten ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC; *engl.* Hepatocellular carcinoma) Modifiziert nach David H. Spach ("Core Concepts - Natural History of Hepatitis C Infection - Evaluation, Staging, and Monitoring of Chronic Hepatitis C - Hepatitis C Online," n.d.).

In etwa 70-75 % der Fälle entwickeln die Patienten eine chronische HCV Infektion, während 25-30 % der Patienten das Virus spontan eliminieren können (Micallef, Kaldor, & Dore, 2006) (Thomson, Smith, & Klenerman, 2011) (Bowen & Walker, 2005). Eine chronische, unbehandelte HCV Infektion ist oftmals mit einer fortschreitenden Fibrose der Leber assoziiert und führt in 20-30 % der Patienten zur einer Leberzirrhose und in etwa 1-5 % zu einem hepatozellulären Karzinom (HCC; *engl.* Hepatocellular carcinoma) über einen Zeitraum von etwa 20-30 Jahren (Armstrong et al., 2006). Zudem gibt es eine Vielzahl an extrahepatischen Manifestationen der HCV Infektion (Cacoub et al., 1999). In etwa 80 % der Fälle ist eine HCV Infektion die Ursache einer Kryoglobulinämie (Zignego et al., 2002). Zusätzlich können Symptome und Erkrankungen wie das Non-Hodgkin-Lymphom, die membranoproliferative Glomerulonephritis und die *Porphyria cutanea tarda* auftreten (Quinn et al., 2001) (Cacoub et al., 2016). Zudem besteht bei Patienten mit HCV Infektion ein erhöhtes Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen und dem Auftreten von Diabetes mellitus Typ II (Zein, Levy, Basu, & Zein, 2005) (Puchner & Berg, 2009).

1.2.7 Therapie

Die Entwicklung und der Einsatz von direkt wirkenden antiviralen Medikamenten (DAA; *engl.* Direct acting antiviral agents) hat die Therapie von chronischen HCV Patienten revolutioniert (Falade-Nwulia et al., 2017) (Forns et al., 2017). Bis 2011 bestand die Behandlung der chronischen HCV Infektion aus einer Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon- α (peg-IFN) und Ribavirin (Kwo et al., 2014). Eine Therapie mit peg-IFN und Ribavirin war häufig mit Nebenwirkungen wie Fieber, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Arthralgien und Myalgien verbunden und in einigen Fällen mit neuropsychiatrischen Nebenwirkungen wie Depression und Reizbarkeit (Dusheiko, 1997). Die Behandlung erfolgte in den meisten Fällen über einen Zeitraum von 24-48 Wochen, abhängig von dem HCV Genotyp, der Krankheitsprogression (Zirrhose) und dem Therapieansprechen der Patienten. Anhand Virus-RNA-Kinetik konnte die Behandlung teilweise entweder verkürzt oder verlängert werden (Farnik et al., 2010) (Di Martino et al., 2011). Allgemein spricht man von einem dauerhaft virologischem Therapieansprechen (SVR; *engl.* Sustained virological response), wenn 12 Wochen (SVR12) bzw. 24 Wochen (SVR24) nach Beendigung der Therapie keine HCV-RNA mehr detektiert werden kann. Der Therapieerfolg war unter anderem davon abhängig, mit welchem HCV Genotyp der Patient infiziert war.

Bei Patienten, die mit dem HCV Genotyp 2 oder 3 infiziert waren, konnte in 78-80 % bei SVR24 und in 80-88 % bei SVR48 der Fälle ein dauerhaftes Ansprechen der Therapie beobachtet werden. (Manns et al., 2001) (Hadziyannis et al., 2004) (von Wagner et al., 2005). Bei Patienten, die mit dem HCV Genotyp 1 infiziert waren konnten nur 41 % bei SVR24 und 51 % bei SVR48 erfolgreich therapiert werden (Hadziyannis et al., 2004) (Wyles, 2013). Mit der Zulassung der Protease Inhibitoren Boceprevir und Telaprevir wurde im Jahr 2011 der erste Meilenstein im Bereich der DAA Therapie gelegt (Tungol, Rademacher, & Schafer, 2011). Die beiden Medikamente inhibieren direkt die HCV NS3/4A-Protease und konnten in Kombinationsregimen mit peg-IFN und Ribavirin, die Heilungsraten bei Therapie-naiven Patienten im Vergleich zur Standardtherapie von 38-44 % auf 63-75 % steigern (Poordad et al., 2011) (Jacobson et al., 2011). Die Zulassung und Entwicklung, sowie auch der große Heilungserfolg von DAA-Substanzen, die in Kombination eingesetzt werden (2 oder mehr) hat die Interferon- und Ribavirin-freie Behandlung der HCV Infektion zum derzeitigen Standard gemacht (Casey & Lee, 2013) (De Luca, Bianco, & Rossetti, 2014). Aufgrund der effektiven Therapiemöglichkeiten hat sich die WHO zum Ziel gesetzt, HCV bis 2030 weltweit einzudämmen bzw. zu eliminieren (Lazarus, Wiktor, Colombo, & Thursz, 2017).

1.2.8 Die T-Zellimmunantwort in der HCV Infektion

An der Immunantwort gegen HCV sind sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem beteiligt. Der vorliegende Abschnitt und diese Arbeit beschäftigen sich überwiegend mit der adaptiven T-Zellimmunantwort in der HCV Infektion.

1.2.8.1 Die CD8+ T-Zellantwort in der HCV Infektion

Bei etwa 25-30 % der Infektionen mit HCV erfolgt eine spontane Ausheilung der Krankheit. Bei den restlichen 70-75 % der Patienten mit HCV Infektionen verläuft die Infektion chronisch (Grebely et al., 2012) (Hajarizadeh, Grebely, & Dore, 2013) (Luxenburger, Neumann-Haefelin, Thimme, & Boettler, 2018). Die CD8+ T-Zellen stellen die Haupteffektorzellen in der HCV Infektion dar. Etwa vier bis sechs Wochen nach der Infektion können HCV-spezifische CD8+ T-Zellen im Blut von Patienten mit akuter HCV nachgewiesen werden (Lauer et al., 2002).

Ein zentraler Effektormechanismus ist die Sekretion von IFN- γ , wobei die zytotoxische Aktivität der CD8+ T-Zellen für die Eliminierung der HCV Infektion eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Jo et al., 2009). Studien mit Schimpansen zeigten die zentrale Bedeutung der CD8+ T-Zellantwort für das spontane Ausheilen der HCV Infektion. Nach Depletion der CD8+ T-Zellen persistierte die HCV Viruslast auf einem hohen Level und sank erst nach Regeneration der CD8+ T-Zellen wieder und war anschließend im weiteren Verlauf dauerhaft nicht mehr nachweisbar (Shoukry et al., 2003). Patienten, die chronisch mit HCV infiziert sind, weisen deutlich niedrigere Frequenzen als auch funktionell beeinträchtigte CD8+ T-Zellen auf, im Vergleich zu Patienten mit spontan ausgeheilte Infektion (Lechner et al., 2000) (Grüner et al., 2000) (Cox, Mosbrugger, et al., 2005).

Eine mögliche Ursache für das Versagen der T-Zellantwort ist das Auftreten von viralen Escapemutationen, welche die Antigenpräsentation durch das MHC-Klasse I Molekül oder die Aktivierung des T-Zellrezeptors einschränkt oder verhindert (Shoukry et al., 2003) (Timm et al., 2004) (Keck, Wrensch, Pierce, Baumert, & Foug, 2018). Eine weitere Ursache für das Versagen der CD8+ T-Zellimmunantwort ist die sogenannte T-Zellerschöpfung, die durch verminderte Effektivität, geringere Zytokinausschüttung und Hochregulation von inhibitorischen Oberflächenmolekülen gekennzeichnet ist (Neumann-Haefelin & Thimme, 2013) (Sumida et al., 2013) (Wieland, Hofmann, & Thimme, 2017). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass für eine funktionierende zytotoxische CD8+ T-Zellimmunantwort eine begleitende CD4+ T-Helfer-Zellantwort (Kalams & Walker, 1998) essenziell ist, diese jedoch bei chronischen HCV Patienten fehlt.

1.2.8.2 Die CD4+ T-Zellantwort in der HCV Infektion

Eine starke und multispezifische CD4+ T-Helferantwort ist für die spontane Ausheilung der HCV unerlässlich (Diepolder et al., 1995) (Eckels, Wang, Bian, Tabatabai, & Gill, 2000) (Day et al., 2002) (Semmo & Klenerman, 2007) (Schulze zur Wiesch et al., 2012) (J. Zhao et al., 2018). HCV-spezifische CD4+ T-Zellen sind bei Patienten mit spontan ausgeheilte HCV Infektion in höherer Zahl nachweisbar im Vergleich zu Patienten mit chronischer HCV Infektion und können auch nach bis zu 20 Jahren im Blut detektiert werden (Diepolder et al., 1995) (Takaki et al., 2000) (Schulze zur Wiesch et al., 2005). Bei einer erfolgreichen Immunantwort bestehen neben einer höheren Anzahl detektierter CD4+ T-Zellepitope (Day et al., 2002) (Schulze zur Wiesch et al., 2005) auch erhebliche Unterschiede in der Funktionalität der CD4+ T-Zellen.

Ein Ausheilen der HCV Infektion ist mit einem Th1-Profil, also mit der Sekretion von IFN- γ und IL-2 assoziiert, während das Zytokinprofil chronisch infizierter Patienten eine verminderte Sekretion von IL-2, beziehungsweise ein Th2-Profil aufweist (Tsai, Liaw, Chen, Huang, & Kuo, 1997) (Gerlach et al., 1999) (Semmo et al., 2005) (Semmo & Klenerman, 2007). Die essentielle Rolle von CD4+ T-Zellen wurde in Experimenten in Schimpansen verdeutlicht, die die HCV Infektion zunächst spontan ausheilen konnten.

Bei einer anschließenden Depletion der CD4+ T-Zellen waren die Schimpansen, bei darauffolgender Reinfektion und trotz detektierbarer HCV-spezifischer CD8+ T-Zellantworten, nicht mehr in der Lage, das Virus zu eliminieren. Escapemutationen der MHC-Klasse II korrespondierenden Abschnitte konnten als Ursachen identifiziert werden, deren Auftreten durch die fehlende T-Helferzellantwort begünstigt wurden (Grakoui et al., 2003). Ein detailliertes Verständnis der genauen Mechanismen, die zum Versagen der T-Zellimmunantwort führt, ist jedoch nicht vorhanden (Luxenburger et al., 2018).

Ex vivo Analysen von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen stellen zusätzlich in der chronischen HCV Infektion aufgrund ihrer niedrigen Frequenz eine besondere Herausforderung dar (Gruener et al., 2001). In der akuten Phase der HCV Infektion wird unabhängig vom weiteren Krankheitsverlauf eine starke HCV-spezifische CD4+ T-Zellantwort generiert. Bei Patienten, die eine chronische HCV Infektion entwickeln, sind diese jedoch innerhalb weniger Monate verschwindend gering und kaum mehr detektierbar (Schulze zur Wiesch et al., 2012). Unterschiedliche Mechanismen werden diskutiert, die als mögliche Ursachen für das Versagen der CD4+ T-Zellantwort und der damit assoziierten Chronifizierung einer HCV Infektion in Frage kommen. Virale Escapemutationen bei MHC-II Epitopen scheinen für den Verlust der CD4+ T-Zellantwort eine unwesentlichere Rolle zu spielen (Fuller et al., 2010) (Fleming, Harcourt, Barnes, & Klenerman, 2010). Einzelne Studien haben Hinweise darauf gegeben, dass erhöhte Treg-Frequenzen mit einem chronischen HCV Verlauf korreliert werden können (Cabrera et al., 2004) (Langhans et al., 2017). Andererseits wird den Treg-Zellen auch eine protektive Funktion in der chronischen HCV Infektion zugeschrieben. Durch Suppression der Immunantwort werden die inflammatorischen Komponenten der Infektion und damit auch die Progression der Leberschädigung vermindert. Studien haben gezeigt, dass chronisch infizierte Patienten mit normalen Leberenzymwerten höhere Treg-Frequenzen und -Aktivitäten aufwiesen, als Patienten mit erhöhten Leberenzymen (Bolacchi et al., 2006) (Itose et al., 2009). Eine Balance im Treg/Th17-Zell Verhältnis wurde auch in zahlreichen Studien als Marker für eine intakte Immunantwort in der HCV Infektion und ein spontanes Ausheilen beschrieben (Hao et al., 2014) (Kared, Fabre, Bédard, Bruneau, & Shoukry, 2013).

Es konnten ebenfalls genetische Prädiktoren für das Ansprechen auf eine peg-IFN basierte Therapie und die spontanen Ausheilung einer HCV Infektion ermittelt werden. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS, *engl.* Genome wide association study) konnten unter anderem ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, *engl.* Single nucleotide polymorphism) rs12979860 im Bereich des Interleukin-28B Gens identifizieren, der mit einer erhöhten Ausheilungsrate von GT1 Infektionen assoziiert werden konnte (Ge et al., 2009). Der SNP liegt in den Allelvarianten C oder T vor, wobei eine homozygote Allelvariante CC die begünstigende Komponente darstellt, die eine spontane Ausheilung und das Ansprechen auf eine peg-IFN Therapie bei einer GT1 Infektion um den Faktor 2 erhöht (Thomas et al., 2009) (Thompson, 2012). Im Gegensatz dazu zeigten weitere Studien, dass der beschriebene IL28B Polymorphismus und eine multispezifische CD4+ T-Zellantwort zwei voneinander unabhängige Variablen der spontanen Viruselimination darstellen (Duggal et al., 2013) (Scheurich et al., 2016).

Zudem konnte eine Hochregulation von Erschöpfungsmarkern auf HCV-spezifischen T-Zellen in der chronischen HCV Infektion beobachtet werden (Golden-Mason et al. 2009). Zahlreiche Studien konnten die erhöhte Expression von PD-1 und weiteren Erschöpfungsmarkern auf HCV-spezifischen CD4+ als auch CD8+ T-Zellen nachweisen (Golden-Mason et al., 2009) (Raziorrouh et al., 2011). In welchem Umfang diese Erschöpfungsmarker am Versagen der T-Zellantwort beteiligt sind muss noch genauer untersucht werden.

1.3 Immunerschöpfung bei chronisch viralen Infektionen

Bei einer akuten Infektion mit einem viralen Pathogen werden naive T-Zellen aktiviert, vermehren sich und differenzieren zu Effektor-T-Zellen. Die meisten Effektor-T-Zellen sterben nach der Eliminierung des Pathogens durch Apoptose ab, jedoch überleben 5-10 % der Zellen und differenzieren sich zu Gedächtnis-T-Zellen (Rosendahl Huber, van Beek, de Jonge, Luytjes, & van Baarle, 2014). Bei erneuter Exposition mit demselben Antigen können diese Gedächtnis-T-Zellen innerhalb kürzester Zeit massiv expandieren und eine Immunreaktion auslösen (Ahmed & Gray, 1996) (Federica Sallusto et al., 1999) (Vasconcelos et al., 2012). Im Gegensatz dazu entwickeln sich bei vielen chronischen Infektionen schwere Defekte und Dysfunktionen in der T-Zellantwort und die T-Zellen differenzieren nicht zu Gedächtnis-Zellen. Dieser Zustand wird als „T-Zellerschöpfung“ bezeichnet (Moskophidis, Lechner, Pircher, & Zinkernagel, 1993) (Wherry, 2011) (Alfei & Zehn, 2017).

Dieser Erschöpfungszustand wurde erstmals für CD8+ T-Zellen in Mausmodellen mit chronisch Lymphozytärer Choriomeningitis-Virus (LCMV) Infektion beschrieben (Gallimore et al., 1998) (Zajac et al., 1998) (Urata et al., 2018) und konnte anschließend auch bei Primaten, die mit dem Simiane Immundefizienz-Virus (SIV) und bei Menschen, die mit HIV, HBV, HCV oder anderen Erregern infiziert sind, sowie bei Krebserkrankungen beobachtet werden (Day et al., 2006) (Petrovas et al., 2007) (Wherry, 2011) (Kahan, Wherry, & Zajac, 2015).

Eine T-Zellerschöpfung ist assoziiert mit verminderter Proliferationsrate, geringer Zytokinproduktion und einer Hochregulation von inhibitorischen Rezeptoren (Wherry, Blattman, Murali-Krishna, van der Most, & Ahmed, 2003) (Fuller, Khanolkar, Tebo, & Zajac, 2004) (Klenerman & Hill, 2005) (Yi, Cox, & Zajac, 2010). Dieser Erschöpfungszustand ist überwiegend für CD8+ T-Zellen beschrieben, während über die Rolle und Funktion von CD4+ T-Zellen weniger bekannt ist (Han, Asoyan, Rabenstein, Nakano, & Obst, 2010) (Morou et al., 2014) (Saeidi et al., 2018).

Ähnlich wie bei erschöpften CD8+ T-Zellen scheinen Antigen-spezifische CD4+ T-Zellen in chronisch viralen Infektionen und bei Krebserkrankungen häufig auch dysfunktional zu sein oder fast vollständig zu fehlen (Schulze zur Wiesch et al., 2005) (Yi et al., 2010) (Wherry, 2011) (Crawford et al., 2014). Über die detaillierten Mechanismen, die zu dieser Dysfunktion von CD4+ T-Zellen führen, ist immer noch wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CD4+ T-Zellen eine verminderte Zytokinproduktion von IFN- γ , TNF- α und IL-2 in chronisch viralen Infektionen aufweisen, welches auf einen vergleichbaren Erschöpfungszustand wie bei CD8+ T-Zellen hinweist. Hingegen konnte eine erhöhte Produktion von IL-21 und IL-10 detektiert werden. IL-21 ist vor allem wichtig für die Entwicklung von CD8+ T-Zellen sowie B-Zellen, während IL-10 immunsupprimierend auf T-Zellantworten wirkt (Brooks et al., 2006) (Elsaesser, Sauer, & Brooks, 2009) (Frohlich et al., 2009). Eine wichtige Rolle bei der T-Zellerschöpfung spielt die Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen. Umfangreiche Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte Expression des inhibitorischen Rezeptors PD-1 auf erschöpften T-Zellen detektiert werden kann und dieser somit in starkem Zusammenhang mit der Dysfunktion der T-Zellen steht (Day et al., 2006) (Butler et al., 2012) (Sen et al., 2016). Neben PD-1 wurden zahlreiche weitere, inhibitorische Rezeptoren beschrieben, die wahrscheinlich gemeinsam an der T-Zellerschöpfung beteiligt sind (Golden-Mason et al., 2009) (Blackburn et al., 2009).

1.3.1 Koinhibitorische Rezeptoren

Die Funktion und Feinregulation von verschiedenen Immunzellen wird durch kostimulatorische und koinhibierende Moleküle, auch als Immun-Checkpoints bekannt, streng kontrolliert und abgestimmt. Während kostimulatorische Rezeptoren nach der Bindung mit dem entsprechenden Liganden ein aktivierendes Signal an die Immunzelle weiterleiten, vermitteln inhibitorische Rezeptoren nach der Aktivierung ein inhibierendes Signal (Fuertes Marraco, Neubert, Verdeil, & Speiser, 2015).

Die Hochregulation von inhibitorischen Rezeptoren, wie z.B. PD-1, CTLA-4 (*engl.* Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4), TIGIT, Tim-3, Lag-3 (*engl.* Lymphocyte-activation protein 3), 2B4 (CD224; *engl.* Cluster of differentiation 244), BTLA ist stark assoziiert mit der Erschöpfung von T-Zellen in chronisch viralen Infektionen und bei Krebserkrankungen (Pauken & Wherry, 2015). Der Rezeptor, der im Zusammenhang mit Erschöpfung von Immunzellen am besten beschrieben wurde, ist PD-1 (Latchman et al., 2001) (Okazaki & Honjo, 2006) (Sharpe, Wherry, Ahmed, & Freeman, 2007). PD-1 wird auf T-Zellen, B-Zellen und einigen myeloischen Zellen exprimiert. Dabei ist seine Funktion für T-Zellen am besten charakterisiert (Jin, Ahmed, & Okazaki, 2010) (Asano et al., 2015). PD-1 interagiert mit zwei Liganden, PD-L1 und PD-L2 (Keir, Butte, Freeman, & Sharpe, 2008). PD-L1 wird im Vergleich zu PD-L2 stärker von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert. Sowohl PD-L1 als auch PD-L2 interagieren jedoch mit zusätzlichen Rezeptoren. PD-L1 interagiert mit dem Liganden CD80 und PD-L2 mit dem repulsiven Führungsmolekül-Familienmitglied b (RGMb: *engl.* Repulsive guidance molecule BMP coreceptor b), wodurch ein bidirektionales Hemmsignal abgegeben wird. (Y. Xiao et al., 2014).

Die physiologischen Konsequenzen der Diversität dieser Rezeptor-Ligandenkombinationen sind nicht vollständig verstanden, unterstreichen jedoch die Komplexität dieses Signalwegs *in vivo* (Sharpe & Pauken, 2017). Die physiologische Funktion des PD-1-Signalwegs besteht in der Regulation der Immunopathologie und der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Eigenantigenen (Francisco et al., 2009) (Sun, Mezzadra, & Schumacher, 2018). In chronisch viralen Infektionen und Krebserkrankungen wird dieser Mechanismus jedoch genutzt, um die Wirtsimmunität zu umgehen. Anti-PD-1 Antikörper zielen daher darauf ab, diese Immunsuppression aufzuheben (Wherry, 2011) (Curiel et al., 2003) (Iwai, Terawaki, & Honjo, 2004) (Barber et al., 2006). Zahlreiche Studien konnten eine erhöhte Expression von PD-1 auf erschöpften HIV-spezifischen T-Zellen detektieren (Day et al., 2006) (Chew et al., 2016).

Zudem wurde gezeigt, dass durch Blockade des PD-1/PD-1L Signalwegs die Effektor-T-Zellfunktion wiederhergestellt werden kann (Freeman, Wherry, Ahmed, & Sharpe, 2006) (Porichis et al., 2011) (Porichis & Kaufmann, 2012). Ebenfalls konnte eine massive PD-1 Expression auf T-Zellen bei weiteren chronisch viralen Infektionen wie der HCV (Radziewicz et al., 2008) (Kasprowicz et al., 2008) und der HBV Infektion (Bensch, Martin, & Thimme, 2014) (Ye et al., 2015) (Salimzadeh et al., 2018) gezeigt werden. Neben PD-1 wurden andere inhibitorische Rezeptoren wie z.B. CTLA-4, TIGIT, BTLA oder auch Tim-3 mit einer T-Zellerschöpfung in chronisch viralen Infektionen sowie bei Krebserkrankungen assoziiert (Fuertes Marraco et al., 2015) (Nakamoto et al., 2009) (Teigler et al., 2017) (Grabmeier-Pfistershammer et al., 2017).

Neben der Blockade von PD-1 zeigt eine Vielzahl an Studien, dass eine Blockade anderer Inhibitoren die Effektor-T-Zellfunktion wiederherstellen kann. Insbesondere im Bereich der Immuntherapie in der Krebsforschung gewinnt der Einsatz von Immun-Checkpoint blockierenden Antikörpern, von sogenannten Immun-Checkpoint Inhibitoren an Bedeutung (Buchbinder & Desai, 2016) (Lingel et al., 2017) (M. Rao, Valentini, Dodoo, Zumla, & Maeurer, 2017). Die Blockade der Immun-Checkpoint Moleküle CTLA-4 oder PD-1 durch monoklonale Antikörper konnte in vielen Krebsformen bereits klinische Erfolge erzielen, unter anderem sind zwei Medikamente zur Melanom Therapie klinisch zugelassen worden (Seidel, Otsuka, & Kabashima, 2018). Neben ihrem Einsatz in der Krebstherapie werden Immun-Checkpoint Inhibitoren auch in ersten Studien bei der Behandlung von chronisch viralen Infektionen geprüft (M. Rao et al., 2017) (Y. Zhu, 2014) (Okoye, Houghton, Tyrrell, Barakat, & Elahi, 2017). Anders als in der Krebstherapie konnten unterschiedliche Erfolge bei der Immun-Checkpoint Blockade erzielt werden, wie z.B. bei CTLA-4 im chronischen LCMV-Mausmodell. Hier konnte die Effektor-T-Zellfunktion durch die Blockade von PD-1, jedoch nicht CTLA-4 auf CD8+ T-Zellen wieder hergestellt werden (Barber et al., 2006).

Die Wirkung der PD-1-Blockade wurde ebenfalls für HBV Infektionen in Maus- und Murmeltiermodellen, die mit dem Murmeltier-Hepatitis-Virus infiziert waren (WHV), *in vivo* untersucht (E. Zhang et al., 2011). Die Blockade der PD-1/PD-L1 oder PD-1/PD-L2-Signalwege mit Anti-PD-L1- und Anti-PD-L2-Antikörpern in WHV infizierten Tieren stellte die T-Zellfunktion teilweise ohne Hepatotoxizität wieder her (J. Liu et al., 2014). Die Verabreichung von Anti-PD1-Antikörpern gegen SIV-infizierte Rhesus-Makaken führte zu einer schnellen Expansion von SIV-spezifischen CD8+ T-Zellen mit verbesserter funktioneller Qualität, zu niedrigeren SIV-RNA Level im Plasma sowie zu einem längeren Überleben der Makaken (Velu et al., 2009).

Jedoch musste eine Phase-II-Dosis-Eskalationsstudie zur Anti-PD-L1-Antikörpertherapie (von Bristol-Myers Squibb) kürzlich nach Verabreichung der niedrigsten Dosis an sechs Personen mit HIV Infektion unter antiretroviraler Therapie (ART) eingestellt werden (Gay et al., 2017). Die Studie wurde aufgrund von retinaler Toxizität gestoppt, die in einer gleichzeitigen Makakenstudie beobachtet wurde. Ob diese Toxizität Antikörper-spezifisch ist oder ein Klasseneffekt bleibt, ist unklar zum jetzigen Zeitpunkt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Immun-Checkpoint Inhibitoren in chronisch viralen Infektionen zukünftig eine Rolle in der Immuntherapie einnehmen könnten. Dafür müssen jedoch noch weitere Untersuchungen hinsichtlich des inhibitorischen Expressionsmusters und der Funktion der T-Zellen durchgeführt werden (Wykes & Lewin, 2017) (M. Rao et al., 2017). In **Abbildung 4** ist schematisch die Expression verschiedener koregulatorischer Rezeptoren auf T-Zellen und die Expression ihrer entsprechenden Liganden auf APCs dargestellt.

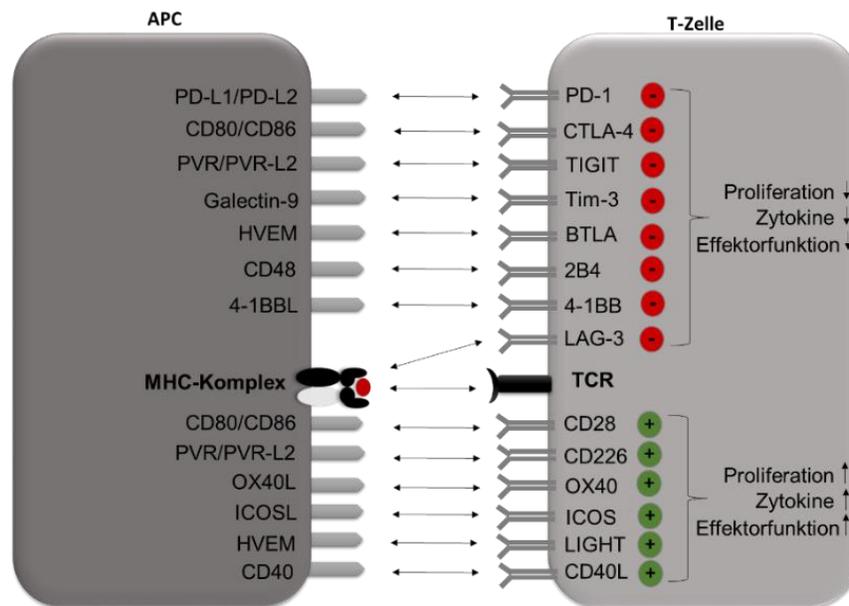


Abbildung 4: Korezeptor Expression auf humanen T-Zellen. Schematische Übersicht über die Expression verschiedener koregulatorischer Rezeptoren auf T-Zellen und die Expression ihrer entsprechenden Liganden auf APCs. Die inhibitorischen Rezeptoren vermitteln ein negatives Signal (-) an die Zelle und sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Die stimulierenden Rezeptoren vermitteln ein positives (+) Signal an die Zelle und sind mit einem grünen Kreis gekennzeichnet. Zusätzlich ist die Interaktion vom MHC-Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex; engl. Major histocompatibility complex; MHC) und TCR (T-Zell Rezeptor; engl. T cell receptor; TCR) dargestellt.

Ein weiterer wichtiger inhibitorischer Rezeptor, welcher ein Ansatzpunkt solcher immunmodulatorischer Strategien sein könnte, und der bereits in zahlreichen Studien als Marker für erschöpfte T-Zellen in chronisch viralen Infektionen und auch Krebserkrankungen beschrieben wurde, ist das TIGIT Molekül (Chew et al., 2016) (Manieri, Chiang, & Grogan, 2017). Gemeinsam mit seinem komplementären Rezeptor CD226 ist TIGIT ein wichtiger Regulator der T-Zellfunktion und nimmt dadurch bereits eine Schlüsselrolle als Immun-Checkpoint in der Krebsforschung ein (Hung et al., 2018).

1.3.2 Der TIGIT/CD226 Signalweg

TIGIT (auch bekannt als WUCAM, Vstm3, VSIG9) ist ein koinhibitorischer Rezeptor, der von großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort und ein Mitglied der Poliovirus-Rezeptor (PVR) / Nectin-Familie, einer Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie, ist (X. Yu et al., 2009) (Manieri et al., 2017).

Exprimiert wird TIGIT auf regulatorischen- und CD4+ Gedächtnis-T-Zellen, CD8+ T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). TIGIT reguliert die Zytotoxizität von NK-Zellen, sowie die Aktivierung von CD4+ T-Zellen und fördert die immunologische Toleranz durch Erhöhung der IL-10 Produktion, während die IL-12-Produktion von dendritischen Zellen gehemmt wird (Stanietsky et al., 2013). TIGIT bindet an die Liganden PVR oder PVRL2 (*engl.* Polivirus receptor-related 2) gemeinsam mit seinem stimulierenden Komplementärrezeptor CD226/DNAM-1.

CD226 wird auf der Oberfläche von unterschiedlichen Immunzellen wie T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten exprimiert und ist an einer Reihe immunologischer Funktionen beteiligt. Es wurde gezeigt, dass CD226 eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von Tumorzellen einnimmt (Pende et al., 2005). Die Interaktion von CD226 auf NK-Zellen oder CD8+ T-Zellen mit PVR/PVR-L2 auf Tumorzellen führt zu einer Aktivierung der zytotoxischen Antwort seitens der Effektorzelle und letztlich zur Eliminierung der PVR/PVR-L2 exprimierenden Tumorzellen (El-Sherbiny et al., 2007) (Carlsten et al., 2007). Neben seiner Funktion bei der Abwehr von Tumorzellen ist CD226 ebenfalls an Mechanismen beteiligt, die zur Differenzierung und Proliferation von CD4+ und CD8+ T-Zellen beitragen. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von CD8+ T-Zellen durch nicht-professionelle APCs, wie z.B. B-Zellen, abhängig von der Interaktion von CD226 mit PVR ist. Hingegen ist eine Aktivierung durch professionelle APCs, wie dendritische Zellen, CD226-unabhängig. Eine erfolgreiche Immunantwort gegen persistierende virale Infektionen scheint ebenfalls von einer funktionalen CD226 Signaltransduktion abhängig zu sein (Cella et al., 2010).

Eine reduzierte CD226 Expression auf Virus-spezifischen T-Zellen scheint mit einem immunologischen Erschöpfungszustand der Zellen in Verbindung zu stehen. Ferner reduziert eine niedrigere CD226 Expression die Menge an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-2, die von CD8+ T-Zellen ausgeschüttet werden, was ebenfalls zu einer schlechteren Virusabwehr führt (Welch, Teijaro, Lewicki, Colonna, & Oldstone, 2012). Eine Fehlregulation von CD226 kann allerdings auch zu diversen Autoimmunerkrankungen beitragen, wie z.B. der Multiplen Sklerose (MS) (Hafler et al., 2009) (Piédavent-Salomon et al., 2015).

Durch das Konkurrieren um die gleichen Liganden stellt der TIGIT/CD226 Signalweg einen interessanten Mechanismus für die Regulation von T-Zellen dar. Es konnte gezeigt werden, dass zum einem TIGIT mit einer höheren Affinität an seine Liganden bindet als CD226 und zudem, dass TIGIT zusätzlich direkt die Interaktion von CD226 und PVR/PVR-L2 beeinflussen kann (Pauken & Wherry, 2014). TIGIT kann sowohl in einer *cis* als auch *trans*-Verbindung die Homodimerisierung von CD226 zu den gemeinsamen Liganden unterbinden (Stengel et al., 2012). Eine schematische Darstellung der TIGIT/CD226 Interaktion ist in **Abbildung 5** gezeigt.

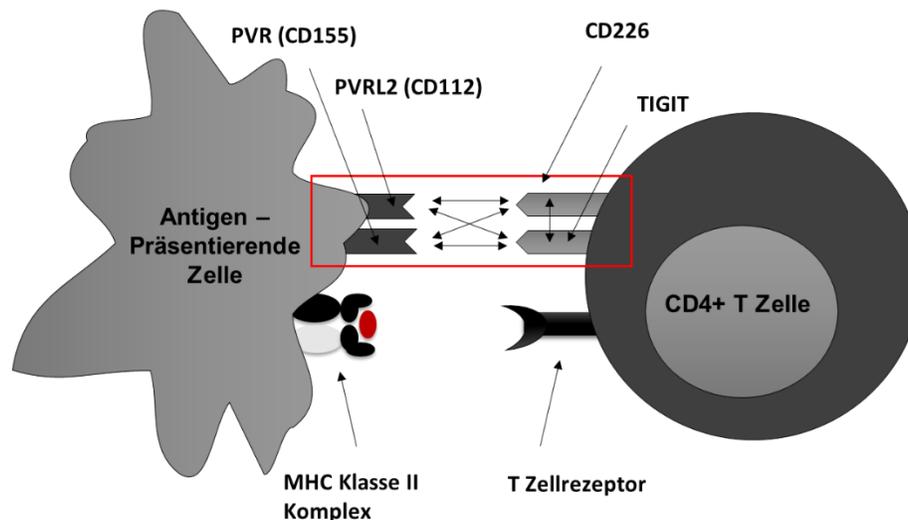


Abbildung 5: Schematische Darstellung der TIGIT/CD226/PVR/PVRL2 Interaktion. Die Rezeptoren TIGIT und CD226 konkurrieren um die gleichen Liganden (PVR/PVRL2) auf Antigenpräsentierenden-Zellen. Die Affinität zwischen TIGIT und Liganden ist stärker als zwischen CD226 und den Liganden. Zusätzlich kann TIGIT in einer *cis* oder *trans* Form mit CD226 interagieren und somit die Homodimerisierung und Bindung zwischen CD226 und den Liganden negativ beeinflussen.

Die Expression von TIGIT ist stark assoziiert mit der Expression von weiteren inhibitorischen Rezeptoren wie z.B. PD-1. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade von TIGIT allein oder gemeinsam mit PD-1 eine Reaktivierung der erschöpften anti-Tumor oder anti-viralen T-Zellantwort induziert (Robert J. Johnston et al., 2014). *In vivo* Studien in Mausmodellen für multiple Melanome zeigen vielversprechende Erfolge bei der Blockade von TIGIT (Guillerey et al., 2018). In Folge dessen haben die ersten humanen Studien in der Krebstherapie begonnen, die anti-TIGIT Antikörper therapeutisch einzusetzen (Park, Kuen, & Chung, 2018). Das Expressionsmuster von TIGIT und CD226 auf T-Zellen in der HCV Infektion ist nahezu unbekannt. Einige wenige Studien zeigen die TIGIT Expression auf HCV spezifischen CD8+ T-Zellen (Wieland, Kemming, et al., 2017) und auf HCV-unspezifischen T-Zellen bei Kindern, die mit HCV infiziert sind (Sheiko et al., 2016). Ob und welchem Maße die beiden Moleküle auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen in der HCV Infektion exprimiert werden, ist bisher noch nicht näher untersucht.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Eine starke und multispezifische CD4+ T-Zellantwort spielt eine zentrale Rolle für eine spontane Ausheilung einer Hepatitis C Virus Infektion. Allerdings stellt die immunologische phänotypische Charakterisierung der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen aufgrund der niedrigen *ex vivo* Frequenzen dieser Zellen besondere Herausforderungen dar (Gruener et al., 2001) (Day et al., 2002). Deswegen beziehen sich die immunologischen, phänotypischen und funktionellen Analysen zur T-Zellerschöpfung in viralen murinen und humanen Infektionen oftmals auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellantworten (Wherry, 2011). Es bleibt völlig unklar, ob CD4+ T-Zellen bei Erschöpfung eine ähnliche Oberflächensignatur bestimmter inhibitorischer Moleküle aufzeigen. Die Kenntnis dieser Signaturen wird in Zukunft wichtig sein für weitere therapeutische immunmodulatorische Interventionen, um die T-Zell-Dysfunktion in chronisch viralen Infektionen aufzuheben (Holz & Rehermann, 2015) (Luxenburger et al., 2018).

Aufgabe und Ziel dieser Arbeit war:

- Die *ex vivo* Analyse der Frequenz von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von HCV-Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilte Infektion mit Hilfe von HCV-spezifischen MHC-Klasse II Tetrameren und magnetischer Säulenanreicherung.
- Charakterisierung von unspezifischen und HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen hinsichtlich Oberflächenexpression von verschiedenen Immun-Checkpoint Molekülen. Gibt es Signaturen, die den in der Literatur beschriebenen CD8+ T-Zell Defekten entsprechen?
- Longitudinale Analyse der Immun-Checkpoint Moleküle von Patienten mit akuter HCV Infektion bis hin zur Chronifizierung bzw. spontanen Ausheilung der Infektion oder Patienten während der DAA Therapie.
- Die vergleichende Untersuchungen der Expression von TIGIT, PD-1 und CD226 auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen mittels HCV-spezifischen MHC-Klasse I Tetrameren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Nachfolgend sind in alle bei der Durchführung der Experimente verwendeten Geräte und Materialien sowie deren Hersteller aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
CO ₂ - Brutschrank (Heracell)	Heraeus, Hannover, Deutschland
Durchflusszytometer LSR Fortessa	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
MACS MultiStand	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop Olympus CK2	Olympus Europa SE, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterilwerkbank HeraSafe KS15	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Stratacooler	Stratagene Corp., La Jolla, CA, USA
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Vortexer Lab Dancer, S40	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad, Model WNE-7	Memmert GmbH, Büchenbach, Deutschland
Zentrifuge Sigma 4K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland

2.1.2 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Lösungen.

Produkt	Hersteller
Anti-PE MicroBeads UltraPure	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Benzonase® Nuclease	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
HEPES-Puffer, 1M	GIBCO, Invitrogen Corp, New York, USA
Human BD Fc Block™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
L-Glutamin RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Natriumazit	Merck, Darmstadt, Deutschland

Nunc Cryotubes (1,8ml)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	GIBCO, Invitrogen Corp, New York, USA
Trypanblau, (0,4 %)	GIBCO, Invitrogen Corp, New York, USA
Zombie NIR™ Fixable Viability Kit	BioLegend, San Diego, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendetes Verbrauchsmaterial.

Produkt	Hersteller
96 Well Platte, U bottom	TPP, Trasadingen, Schweiz
Mononuclear Cell Preparation Tube (CPT™)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen (15 ml, 50ml)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nunc Cryotubes 1,8ml	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
MACS Säulen (LS Columns)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Parafilm	Bemis, Solgnies, Belgium
Plastic Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polystyrene Röhrchen (5 ml)	BD FALCONTM, Heidelberg, Deutschland
Serological Pipette Tips	BD FALCONTM, Heidelberg, Deutschland

2.1.4 Puffer und Medien

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien.

Name	Zusammensetzung
Einfriermedium	25ml FCS (inaktiviert), 15ml RPMI, 10ml DMSO
FACS Puffer	497,2 ml PBS, 1,2 ml EDTA, 10 ml FCS, 9 ml NaN ₃
MACS Puffer	PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA
PFA-Gebrauchslösung	0,5 % PFA in PBS
R10 Medium	440ml RPMI, 5ml PenStrep, 50ml FCS, 5ml HEPES-Puffer

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Klon	Konjugat	Hersteller
CD3	OKT3	AF700	BioLegend, London, UK
CD4	RPA-T8	BV786	BioLegend, London, UK
CD8	RPA-T4	BV786	BioLegend, London, UK
CCR7	G043H7	BV650	BioLegend, London, UK
CD45RO	UCHL1	BV510	BioLegend, London, UK
TIGIT	A15153G	BV605	BioLegend, London, UK
DNAM-1 (CD226)	J168-540	BUV395	BD, Heidelberg, Deutschland
PD-1	EH12.2H7	BV421	BioLegend, London, UK
BTLA	BTLA	PerCP-Cy5.5	BioLegend, London, UK
Tim-3	F38-2E2	PE-Dazzle	BioLegend, London, UK
Ceacam-1	ASL-32	AF488	BioLegend, London, UK
LIGHT (CD258)	115520	AF647	BD, Heidelberg, Deutschland
CD14	63D3	APC-Cy7	BioLegend, London, UK
CD19	HIB19	APC-Cy7	BioLegend, London, UK
OX40 (CD134)	ACT-35	PE-Cy7	BioLegend, London, UK

2.1.6 HCV-spezifische Tetramere

Tabelle 6: Liste der verwendeten HCV-spezifischen MHC-Klasse II und MHC-Klasse I Tetramer-Komplexe.

ID	Allele	Spezifität	Peptid- position	Sequenz	Hersteller
Klasse II					
1	DRB1*01:01	NS4B	aa1806–1818	TLLFNILGGWVAA	MBL, Woburn, USA
2	DRB1*04:01	NS3	aa1248–1262	GYKVLVLNPSVAATL	MBL, Woburn, USA
3	DRB1*04:01	NS4	aa1770–1790	SGIQYLAGLSTLPGNPAIASL	MBL, Woburn, USA
4	DRB1*15:01	NS3	aa1411–1425	GINAVAYYRGLDVSV	MBL, Woburn, USA
5	DRB1*15:01	NS3	aa1582–1597	NFPYLVAYQATVCARA	MBL, Woburn, USA
6	DRB1*11:01	NS4	aa1773-1790	QYLAGLSTLPGNPAIASL	BRI, Seattle, USA

Klasse I					
7	A*01:01	Polyprotein	aa1435- 1443	ATDALMTGY	MBL, Woburn, USA
8	A*02:01	NS3	aa1073-1081	CINGVCWTV	MBL, Woburn, USA
9	A*02:01	NS3	aa1406-1415	KLVALGINAV	MBL, Woburn, USA
10	A*24:02	E2	aa717-725	EYVLLLFL	MBL, Woburn, USA

2.2 Probanden

Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Studie wurden insgesamt 39 HCV Patienten und 10 gesunde Probanden rekrutiert. Die Studienteilnehmer stammten aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik und dem Ambulanzzentrum für Virushepatologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf. Alle Patienten und gesunden Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis und sind von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg (Antrag WF-014/09) (PV4780) (PV4081) entsprechend der Richtlinien genehmigt worden. Bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten handelt es sich um 39 HCV-monoinfizierte Patienten (Tabelle 7, 8 und 9). Davon waren 11 Patienten akut infiziert, 15 chronisch infiziert, 5 unter HCV Therapie und 8 Patienten konnten die HCV Infektion spontan ausheilen. Von den 11 akut infizierten Patienten konnten 10 Proben mit Hilfe von MHC-Klasse II Tetrameren, davon 3 longitudinal und 5 mit Hilfe von MHC-Klasse I näher untersucht werden. Von den 15 chronisch infizierten HCV Patienten wurden 11 Patientenproben mittels MHC-Klasse II Tetrameren, davon 4 longitudinal und 5 mit MHC-Klasse I Tetrameren analysiert. Von den HCV Patienten, die das Virus spontan ausheilen konnten, wurden 8 Patientenproben mit Hilfe von MHC-Klasse II und 3 Patientenproben mit Hilfe von MHC-Klasse I untersucht.

Tabelle 7: Demographische und klinische Daten der HCV Patientengruppen welche mit HCV-spezifischen MHC-Klasse II Tetrameren untersucht wurden.

Patienten	n	Alter	Geschlecht w/m	VL (IU/ml)	ALT (U/l)
aHCV	10	43 (22-68)	6/4	70000	103
rHCV	8	41 (26-68)	2/6	Llod	26,5
cHCV	11	46 (28-65)	6/5	2884373	54
tHCV	5	39 (37-62)	0/5	26	34

Werte sind als Median (ranges) dargestellt; **aHCV**: akute HCV; **cHCV**: chronische HCV; **rHCV**: spontan ausgeheilte HCV; **tHCV**: therapierte HCV; **ALT**: Alanin-Aminotransferase; **n**= Anzahl; **w/m**: weiblich/männlich; **VL**: Viruslast; **Llod**: unter der Nachweisgrenze (*engl.* Lower level of detection).

Tabelle 8: Demographische und klinische Daten der HCV Patientengruppen welche mit HCV-spezifischen MHC-Klasse I Tetrameren untersucht wurden.

Patienten	n	Alter	Geschlecht w/m	VL (IU/ml)	ALT (U/l)
aHCV	5	44 (32-54)	2/3	15035000	91
rHCV	3	43 (32-44)	0/3	Llod	43
cHCV	5	43 (38-77)	3/2	5230000	72

Werte sind als Median (ranges) dargestellt; **aHCV**: akute HCV; **cHCV**: chronische HCV; **rHCV**: spontan ausgeheilte HCV; **ALT**= Alanin-Aminotransferase; **n**= Anzahl; **w/m**: weiblich/männlich; **VL**: Viruslast; **Llod**: unter der Nachweisgrenze (*engl.* Lower level of detection).

Tabelle 9: Demographische und klinische Daten der gesunden Probanden.

Patienten	n	Alter	Geschlecht w/m	VL (IU/ml)	ALT (U/l)
HC	10	26 (22-70)	6/4	n.a.	n.a.

Werte sind als Median (ranges) dargestellt; HC: gesunde Probanden (*engl.* Healthy controls. **ALT**= Alanin-Aminotransferase; **n**= Anzahl; **w/m**: weiblich/männlich; **VL**: Viruslast.

2.2.1 HLA-Typisierungen

Die MHC-Klasse I und Klasse II Typisierungen wurden freundlicherweise vom Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf wie vormals beschrieben durchgeführt (da Costa Lima Caniatti, Borelli, Guilherme, & Tsuneto, 2017).

2.3 MHC-Klasse II Tetramer-Komplexe

Aufgrund der geringen Avidität der multivalenten Bindung zwischen TCR und MHC-Komplex werden MHC-Multimer-Komplexe bei der Analyse und Detektion von virus-spezifischen T-Zellen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Tetramer-Komplexe verwendet. Bei Tetrameren handelt es sich um vier (griechisch: τετρα = tetra) Monomere aus MHC-I oder MHC-II-Epitop-Komplexen. Jeder MHC-I oder MHC-II-Epitop-Komplex bindet an je einen T-Zellrezeptor auf der Oberfläche der T-Zelle. Durch die Multivalenz erhöht sich die Avidität für das entsprechende Antigen. Der gesamte Komplex wird durch Streptavidin zusammen gehalten und ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der im Durchflusszytometer detektiert werden kann. Die Tetramer Frequenzen wurden wie zuvor beschrieben berechnet (Day et al., 2002) (Lucas et al., 2007).

Im Rahmen dieser Studie wurden ausschließlich Tetramere mit PE-Konjugat verwendet. Bei Patienten mit dem HLA-Typ DRB1*04:01 oder DRB1*15:01 wurden die zwei entsprechend vorhandenen Tetramere jeweils gemeinsam verwendet. Die verwendeten Tetramere, deren Spezifität, enthaltene Peptidsequenz so wie auch deren Position sind in **Tabelle 6** zusammengefasst. In **Abbildung 6** ist eine schematische Darstellung eines MHC-Klasse II Tetramer-Komplexes gezeigt.

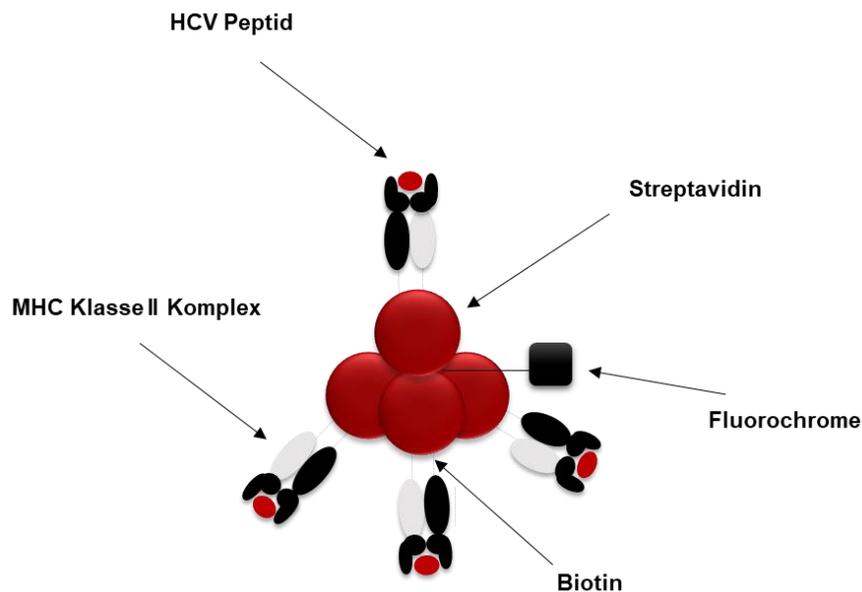


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines MHC-Klasse II Tetramers. Tetramere für die Analyse von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen sind Protein Komplexe, zusammengesetzt aus vier MHC-Klasse II Molekülen beladen mit HCV Peptiden. Die MHC-Klasse II-Komplexe sind über ein Streptavidin-Fluorochrom-Konjugat miteinander verbunden.

2.4 Methoden

2.4.1 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellaufbereitung umfasste die Schritte der PBMC Isolation, des Einfrierens und Auftauens, sowie der Zählung der PBMC. Die Isolierung von PBMC erfolgte über Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von BD Vacutainer CPT Zell-Präparationsröhrchen. Diese fassen 8 ml Vollblut und enthalten Natriumcitrat als Antikoagulans, sowie eine Gelmatrix zur Zellseparation.

Durch Zentrifugation der befüllten Röhrchen bei 1999xg bei 20 °C für 20 Minuten (min) gelangen Erythrozyten und Granulozyten durch die Gelmatrix hindurch, während sich oberhalb die Plasma- und Interphase mit Lymphozyten und Monozyten absetzen. Von der Plasmaphase wurden 2 ml abgenommen und in einem Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Das verbliebene Plasma und die Interphase mit den PBMC wurden in ein Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 450xg und bei 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands und Lösen des Zellpellets konnten die frisch isolierten PBMC in Kryoröhrchen überführt und für die Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Hierzu wurden die aufgereinigten Zellen in RPMI und Einfriermedium im Verhältnis 1:1 aufgenommen und in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in vorgekühlten Stratacoolern bei -80°C eingefroren und nach 24 Stunden in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten PBMC wurde das Kryoröhrchen zunächst in 37 °C warmem Wasser geschwenkt. Anschließend wurden die PBMC durch mehrmaliges Pipettieren mit warmem RPMI/R10 Medium aufgetaut und in ein Falcon-Röhrchen mit 40 ml RPMI überführt. Nach Zentrifugation (450xg bei 4 °C für 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet im Rücklauf resuspendiert, um die PBMC in weiteren Arbeitsschritten zu verwenden.

2.4.1.1 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der entsprechenden Zelllösung mit 90 µl Trypanblau verdünnt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht. Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen ins Zellinnere und bindet an Proteine, sodass tote Zellen blau angefärbt werden. Vitale Zellen leuchten dagegen unter dem Mikroskop hell auf. Insgesamt wurden die vier Eckfelder der Zählkammer ausgezählt und daraus der Mittelwert berechnet. Die Zellkonzentration errechnet sich aus Mittelwert, Volumen eines Eckfeldes (0,1 µl) und Verdünnung (1:10). Dementsprechend ergibt sich die Zellkonzentration pro Milliliter aus dem Mittelwert multipliziert mit 1×10^5 .

2.4.2 Ex vivo Analyse von HCV-spezifischen T-Zellen mittels MHC-Klasse I und Klasse II Tetrameren

2.4.2.1 Zellaufbereitung

Für die *ex vivo* Analyse von HCV-spezifischen T-Zellen aus peripherem Blut wurde die MHC-Klasse I+II Tetramer-Technologie genutzt und die Zellen entsprechend aufbereitet. Hierfür wurde R10 Medium im Wasserbad erwärmt und anschließend jeweils 10 ml pro Patientenprobe in ein 15 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert. Das R10 Medium wurde mit Benzonase versetzt, um ein späteres Zusammenkleben von Zellen durch DNA-Reste zu vermeiden. PBMC wurden aufgetaut, in die 15 ml Falcon-Röhrchen mit Benzonase versetzten R10 Medium überführt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 450xg runterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden daraufhin mit der Humanen BD Fc Blockade Lösung behandelt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Dafür wurden 10 µl der Blockade-Lösung der Suspension (200-300 µl) hinzugefügt und die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte dann die Detektion und Anreicherung von spezifischen T-Zellen mit Hilfe von Tetrameren.

2.4.2.2 Detektion und Anreicherung MHC-Klasse I und Klasse II Tetramer positiver T-Zellen

Die Detektion von HCV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen erfolgte mit Hilfe von MHC-Klasse II und Klasse I Tetrameren. Hierfür wurden die PBMC mit 4 µl Tetramer-Lösung für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die PBMC mit PBS versetzt und für 10 min bei 450xg runterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig im Rücklauf resuspendiert. Aufgrund der geringen Frequenz von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen in der Hepatitis C Infektion, insbesondere in der chronischen Phase, wurden die Tetramer positiven Zellen mit Hilfe von Anti-PE magnetischen Microbeads wie von Ulsenheimer et al. beschrieben (Ulsenheimer et al., 2006) angereichert. Dafür wurden die PBMC mit 10 µl Anti-PE Microbeads für 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die PBMC wurden anschließend mit PBS gewaschen und auf 1 ml aufgefüllt. Es wurden jeweils 5 µl für Zellzahlbestimmung und eine Kontroll-Färbung vor der Tetramer-Anreicherung (Pre-Fraktion) entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die verbleibenden Zellen wurden auf eine Magnet aktivierte Zellseparations- (MACS-) Säule gegeben, die MACS-Säule wurden mit 3 ml PBS gespült und der Durchlauf als Tetramer-Depletion Fraktion (Dep-Fraktion) aufgefangen.

Die PE-Konjugierten Tetramer-positiven Zellen blieben an den Anti-PE Microbeads haften und konnten anschließend durch entfernen der MACS-Säulen mit PBS eluiert und als Tetramer-angereicherte Fraktion (Enr-Fraktion) aufgefangen werden. Im nächsten Schritt erfolgte die Analyse der Oberflächenexpression von Gesamt- und HCV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen.

2.4.3 Oberflächen-Antikörperfärbung

Die *ex vivo* Oberflächenexpression von koinhibitorischen und kostimulierenden Rezeptoren auf den gesamten und HCV-spezifischen T-Zellen wurde mit Hilfe von Oberflächen-Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie (FACS: *engl.* Fluorescence-activated cell sorting) untersucht. Für die Färbung von Oberflächenantigenen wurden die Zellen in PBS Puffer aufgenommen (ca. 100 µl) und in 5 ml FACS Röhrchen überführt. Um tote Zellen später im Durchflusszytometer identifizieren zu können, wurden die Zellen zunächst mit dem Zombie NIR™ Fixable Farbstoff markiert. Dafür wurden die Zellen mit 1 µl (Stock-Lösung 1:10 vorverdünnt) Zombie NIR™ Fixable Farbstoff für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Das Prinzip dieser Färbungen beruht darauf, dass der Farbstoff in tote Zellen, nicht jedoch in vitale Zellen mit intakter Zellmembran eindringen kann. Dort reagiert er mit freien Aminen im Inneren der Zelle. Somit konnten tote Zellen anhand ihrer höheren Fluoreszenzintensität von lebenden Zellen abgegrenzt werden. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Oberflächenantikörpern (siehe Tabelle 5) für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS Puffer, um die ungebunden Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen mit 0,5 % PFA-Lösung für 15-60 min fixiert. Die PFA-Lösung wurde daraufhin mit einen Waschschrift mit FACS Puffer entfernt, der Überstand dekantiert und die Zellen im Rücklauf resuspendiert. Für die anschließende Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde zusätzlich 80-100 µl FACS Puffer hinzugefügt.

2.4.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften sowie ihrer intrazellulären Komplexität. Des Weiteren ermöglicht sie den Nachweis von Antigenen auf der Zelloberfläche und nach Permeabilisierung der Zellmembran ebenfalls intrazellulär.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Identifizierung von Gesamt- und HCV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie zur Bestimmung der Oberflächenexpression der in Tabelle 5 aufgeführten Moleküle auf CD4+ und CD8+ T-Zellen angewendet. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Analyse der optischen Eigenschaften von Zellen, die einzeln mit hoher Geschwindigkeit in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Die Passage jeder Zelle führt zur Streuung des vom Laserstrahl ausgesandten Lichts, welches auf zwei räumlich unterschiedlich angeordnete optische Detektoren trifft, die entweder das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) oder das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) erfassen.

Die photometrische Messung beider Parameter wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und erlaubt anhand der Höhe, Fläche und Weite des Spannungspulses Rückschlüsse auf verschiedene zelluläre Parameter wie Zellgröße, Zellkern und Granularität der untersuchten Zelle. Das Vorwärtsstreulicht ist dabei proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße), das Seitwärtsstreulicht dagegen proportional zur relativen Granularität. Der Nachweis extra- und intrazellulärer Antigene erfolgt mit Hilfe Fluorochrom-konjugierter Antikörper. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrom-Moleküle auf der Zelle (Adan, Alizada, Kiraz, Baran, & Nalbant, 2017). In dieser Arbeit wurde für alle durchflusszytometrischen Messungen ein LSR Fortessa (BD, Heidelberg) verwendet. Dieses Durchflusszytometer ist mit 5 unterschiedlichen Lasern ausgestattet und kann mit diesen bis zu 18 Parameter zur gleichen Zeit detektieren. Die anschließende Analyse der Messdaten erfolgte mit Hilfe der FlowJo Software (Tristar, Ashland, Oregon, US).

2.4.5 Statistische Methoden

2.4.5.1 GraphPad 7.0 Prism

Für alle klinischen Parameter der einzelnen Patientengruppen und aus FlowJo ermittelten Werte wurden zur graphischen und statistischen Auswertung, sowie der Berechnung der Signifikanz die Software GraphPad Prism® verwendet. Die Daten wurden hinsichtlich einer Normalverteilung mit dem Kolmogorov–Smirnov Test hin überprüft. Für die weiteren Analysen wurde bei zwei normal verteilten unabhängigen Stichproben ein t-Test verwendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle ANOVA (*engl.* Analysis of variance) mit anschließender Bonferroni-Korrektur angewandt.

Die Daten wurden in diesem Fall als Mittelwert mit Standardabweichung (SD: *engl.* Standard deviation) dargestellt. Die Analyse von zwei nicht-normal verteilten unabhängigen Stichproben erfolgte unter der Verwendung des Mann-Whitney-Tests. Zur Korrektur für multiple Tests bei mehr als zwei Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test oder Tukey's multiple comparisons test verwendet. In beiden Fällen wurden die Daten als Scatter oder Box Plots dargestellt. Im Fall von gepaarten Stichproben wurde entweder eine gepaarte ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur (parametrisch) angewandt bzw. ein Friedman-Test mit anschließendem Dunn-Test bei nicht-parametrischen Stichproben. Korrelationen zwischen Ergebnissen und klinischen Daten wurden mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (parametrisch) bzw. der Rangkorrelation nach Spearman (nicht-parametrisch) analysiert. Die statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung der Programme GraphPad Prism 7.0 (GraphPad, La Jolla, USA) durchgeführt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

2.4.5.2 SPICE Analyse

Durchflusszytometrie-Experimente mit vielen Parametern erzeugen große Mengen komplexer Daten und erfordern ausgefeilte Softwares zur Auswertung. SPICE ist eine Data-Mining- (Systematische Anwendung statistischer Methoden auf große Datenbestände mit dem Ziel, neue Querverbindungen und Trends zu erkennen) Softwareanwendung, die große FlowJo-Datensätze aus der polychromatischen Durchflusszytometrie analysiert und die normalisierten Daten grafisch organisiert. Mit SPICE können potenzielle Korrelationen in ihren experimentellen Daten in komplexen Datensätzen detektiert werden. Es gibt viele mögliche Anwendungen für SPICE: Mit der Software können alle multivariaten Datensätze analysiert werden, für die eine Serie von Nennmessungen und eine einzige kontinuierliche Messung verfügbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SPICE Software zur Analyse der Oberflächenexpression von inhibitorischen Rezeptoren auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen verwendet. Die Anwendung der SPICE Software erfolgte wie von Roederer et al. beschrieben (Roederer, Nozzi, & Nason, 2011).

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypische Charakterisierung von CD4+ T-Zellen

3.1.1 TIGIT Expression auf CD4+ T- Zellen

In der akuten unbehandelten HCV Infektion verlieren T-Zellen unter dem Einfluss koinhibitorischer Moleküle ihre Funktionalität und die HCV Infektion verläuft in der Mehrzahl der Fälle unbehandelt chronisch (Urbani et al., 2006) (Golden-Mason et al., 2007) (Radziewicz et al., 2008) (Kroy et al., 2014). Die detaillierte Aufklärung der Oberflächenexpression verschiedener koinhibitorischer und kostimulierender Moleküle auf HCV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen kann helfen, diesen Funktionsverlust besser zu verstehen.

Für den inhibitorischen Rezeptor TIGIT konnte kürzlich eine entscheidende Rolle in der Regulation von erschöpften T-Zellen identifiziert werden (Lozano, Dominguez-Villar, Kuchroo, & Hafler, 2012) (Pauken & Wherry, 2014). Ähnlich wie beim CTLA-4 und CD28 Signalweg konkurriert TIGIT mit dem kostimulierenden komplementär-Rezeptor CD226 um die gleichen Liganden, PVR und PVRL2, auf APCs (Fuhrman et al., 2015). In LCMV-Mausmodellen für chronische Infektionen und Krebserkrankungen konnte durch den Einsatz von Anti-TIGIT Antikörpern mit einem parallelen Einsatz von Anti-PD-1 Antikörpern bei erschöpften T-Zellen eine nahezu vollständige Effektorfunktion wieder hergestellt werden (Robert J. Johnston et al., 2014). Diese entscheidende Rolle in der T-Zellregulation konnte ebenfalls in humanen Studien bestätigt werden wie z.B. bei Patienten mit multiplem Myelom (Guillerey et al., 2018) oder chronischen Virus Infektionen wie der HIV Infektion (Tauriainen et al., 2017) (Chew et al., 2016).

In der HCV Infektion ist über die Expression von TIGIT auf CD4+ T-Zellen, insbesondere HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen wenig bekannt. In dem folgenden Abschnitt wird zunächst die TIGIT Expression auf der Gesamt-CD4+ T-Zellpopulationen bei HCV Patienten in unterschiedlichen Stadien der Infektion untersucht. In den folgenden Abschnitten wird die Gesamt-CD4+ T-Zellpopulation einfachheitshalber als CD4+ T-Zellen bezeichnet. Die TIGIT Expression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (**Abbildung 7**).

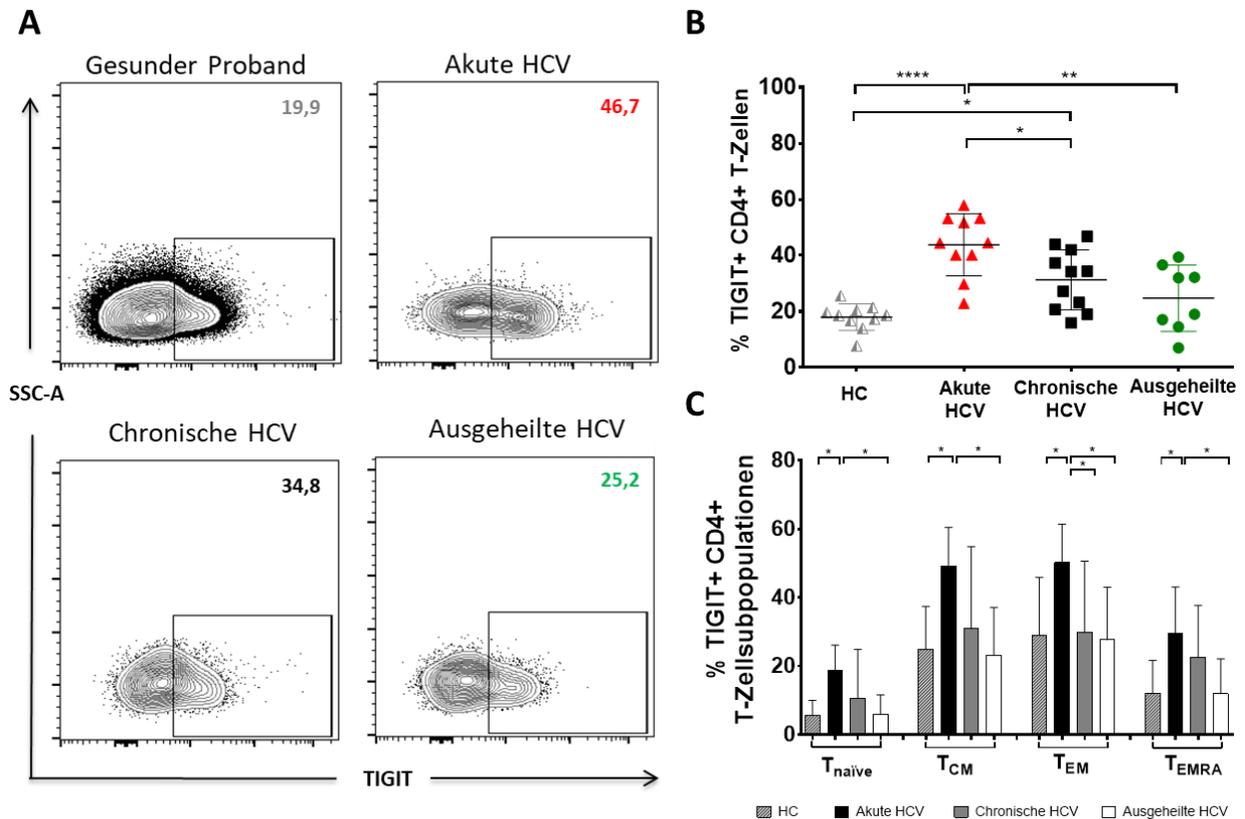


Abbildung 7: Expression von TIGIT auf CD4+ T-Zellen. (A) Repräsentative Dotplots zeigen die TIGIT Expression auf CD4+ T-Zellen und (B) die TIGIT Frequenzen auf CD4+ T-Zellen von gesunden Probanden (HC; *engl.* Healthy controls) (n=10) und Patienten mit akuter (n=10), chronischer (n=11) und spontan ausgeheilter (n=8) HCV Infektion. (C) Die Differenzierungsmarker CD45RO und CCR7 wurden verwendet, um die TIGIT Expression auf naiven und CD4+ Gedächtnis-T-Zellen von gesunden Probanden und Patienten mit HCV Infektion zu untersuchen (CCR7-/CD45RO- – Terminale Effektor-T-Zellen: T_{EMRA}; CCR7+/CD45RO- – naive T-Zellen: T_{naive}; CCR7-/CD45RO+ – Effektor-Gedächtnis-T-Zellen – T_{EM}; CCR7+/CD45RO+ – Zentrale Gedächtnis-T-Zellen – T_{CM}). P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$. Dargestellt sind Mittelwerte und \pm Standardabweichungen (SD).

Die **Abbildung 7A** zeigt repräsentative Dotplots der TIGIT Expression auf CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilter HCV Infektion, sowie gesunden Probanden. In **Abbildung 7B** sind die TIGIT Frequenzen der CD4+ T-Zellen von gesunden Probanden und der einzelnen HCV Patientengruppen dargestellt. Im Vergleich zu gesunden Probanden (HC; *engl.*: Healthy controls), zeigten HCV Patienten mit akuter (HC vs. akut: $p < 0,0001$) und mit chronischer (HC vs. chronisch: $p = 0,0199$) HCV Infektion eine signifikant höhere TIGIT Expression. Interessanterweise konnte aber kein Unterschied in der TIGIT Expression zwischen gesunden Probanden und HCV Patienten mit spontan ausgeheilter Infektion detektiert werden.

Zusätzlich konnte eine statistisch signifikant höhere TIGIT Expression auf CD4+ T-Zellen bei Patienten mit akuter HCV Infektion im Vergleich zu Patienten mit spontan ausgeheilte HCV Infektion (akut vs. ausgeheilt: $p=0,0014$) und bei Patienten mit chronischer Infektion beobachtet werden. Mit Hilfe der Differenzierungsmarker CD45RO und CCR7 wurden die CD4+ T-Zellen in Subpopulationen (CCR7-/CD45RO – Terminale-Effektor-T-Zellen – T_{EMRA} ; CCR7+/CD45RO – naive T-Zellen – T_{naive} ; CCR7-/CD45RO+ – Effektor-Gedächtnis-T-Zellen – T_{EM} ; CCR7+/CD45RO+ – Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen – T_{CM}) eingeteilt und hinsichtlich der TIGIT Expression näher untersucht (**Abbildung 7C**). Dabei wurde deutlich, dass TIGIT überwiegend auf Gedächtnis- und nur gering auf naiven CD4+ T-Zellen exprimiert wurde. Des Weiteren war TIGIT signifikant höher exprimiert auf allen CD4+ T-Zellsubpopulationen von Patienten mit akuter HCV Infektion im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit ausgeheilte HCV Infektion. Bei den CD4+ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen konnte eine signifikant höhere TIGIT Expression bei Patienten mit akuter HCV Infektion im Vergleich zu Patienten mit chronischer Infektion detektiert werden (akut vs. chronisch: $p= 0,0383$).

3.1.2 Expression koinhibitorischer Rezeptoren auf CD4+ T-Zellen

In chronischen Virusinfektionen werden T-Zellen kontinuierlich durch virales Antigen aktiviert, was zu einem fortschreitenden Funktionsverlust führt, welcher als „T-Zellerschöpfung“ bezeichnet wird (Wherry, 2011). Während dieser Phase erhöhen T-Zellen die Expression mehrerer inhibitorischer Immunrezeptoren, welche die Schwelle für die Aktivierung anheben, was zu einer unterdrückten Immunreaktion führt (Fuertes Marraco et al., 2015).

Der inhibitorische Rezeptor TIGIT wurde bereits in zahlreichen Studien als Marker für erschöpfte T-Zellen in chronisch viralen Infektionen und Krebserkrankungen beschrieben (Kong et al., 2016) (Chew et al., 2016) (Manieri et al., 2017). Neben TIGIT wurden zahlreiche weitere inhibitorische Rezeptoren beschrieben, die erschöpfte oder dysfunktionale T-Zellen kennzeichnen. PD-1 ist einer der früh identifizierten Oberflächenmoleküle, der erschöpfte T-Zellen charakterisiert (Day et al., 2006) (Dyavar Shetty et al., 2012) (Porichis et al., 2011). Im folgenden Abschnitt wurden CD4+ T-Zellen auf die Expression von weiteren inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1, BTLA und Tim-3 bei Patienten mit akuter ($n=10$), chronischer ($n=11$) und spontan ausgeheilte HCV Infektion ($n=8$), sowie gesunden Probanden ($n=10$) untersucht (**Abbildung 8**).

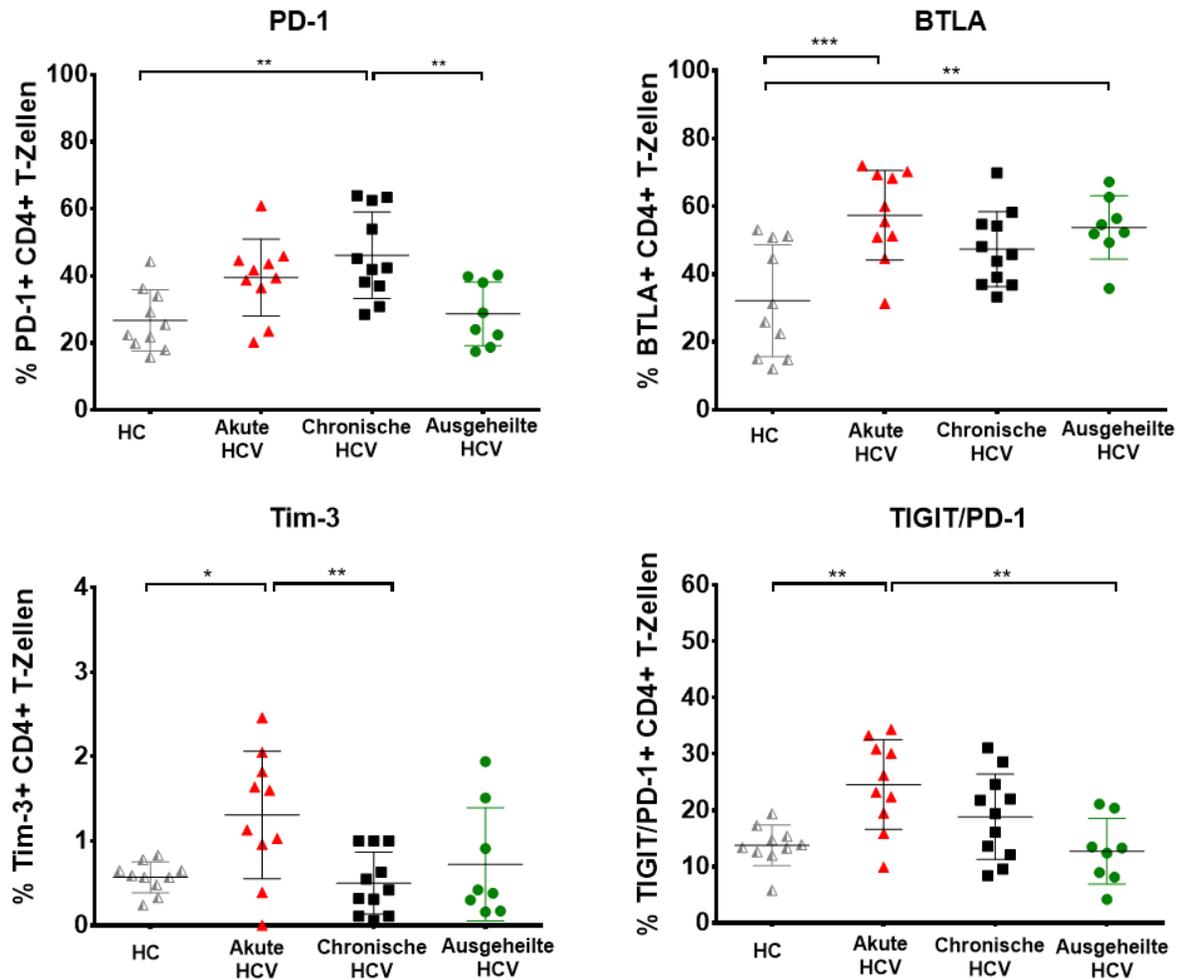


Abbildung 8: Koinhibitorische Rezeptor Expression auf CD4+ T-Zellen. Dargestellt sind die Frequenzen der inhibitorischen Rezeptoren PD-1, BTLA, Tim-3 und TIGIT/PD-1 Koexpression auf CD4+ T-Zellen von gesunden Probanden (HC) (n=10) und HCV Patienten mit akuter (n=10), chronischer (n=11) und spontan ausgeheilte (n=8) Infektion. P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$. Dargestellt sind Mittelwerte und \pm Standardabweichungen (SD).

Patienten mit chronischer HCV Infektion wiesen signifikant höhere PD-1 Frequenzen auf im Vergleich zu gesunden Probanden (chronisch vs. HC: $p= 0,0015$) und Patienten mit spontan ausgeheilte HCV Infektion (chronisch vs. ausgeheilt: $p= 0,0084$). Bei der Analyse der BTLA Expression auf CD4+ T-Zellen konnten signifikant höhere Frequenzen bei Patienten mit akuter und spontan ausgeheilte HCV Infektion verglichen mit gesunden Probanden aufgezeigt werden (akut vs. HC: $p= 0,0006$) (ausgeheilt vs. HC: $p= 0,0063$).

Eine leichte, jedoch signifikant höhere Tim-3 Expression wurde auf CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit akuter HCV Infektion verglichen mit gesunden Probanden (akut vs. HC: $p=0,0188$) und Patienten mit chronischer HCV Infektion (akut vs. chronisch: $p=0,0073$) detektiert. Es wurde ebenfalls die TIGIT/PD-1 Koexpression auf CD4⁺ T-Zellen vergleichend untersucht. Hierbei konnte eine signifikant höhere TIGIT/PD-1 Frequenz auf CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit akuter HCV Infektion im Vergleich zu gesunden Probanden (akut vs. HC: $p=0,0040$) und Patienten mit spontan ausgeheilter HCV Infektion (akut vs. ausgeheilt: $p=0,0028$) aufgezeigt werden.

3.1.3 Expression kostimulierender Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen

Neben der Expression von inhibitorischen Rezeptoren wurde zusätzlich die Expression der kostimulierenden Rezeptoren OX40 und CD226 auf CD4⁺ T-Zellen von gesunden Probanden und HCV Patienten in unterschiedlichen Infektionsstadien analysiert (**Abbildung 9**).

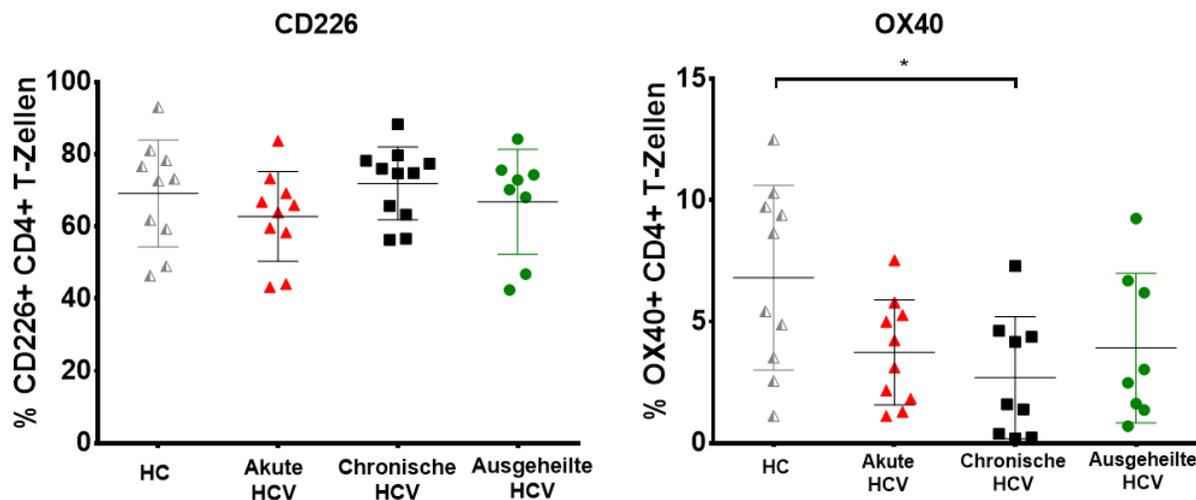


Abbildung 9: Kostimulatorische Rezeptor Expression auf CD4⁺ T-Zellen. Dargestellt sind die Frequenzen der kostimulierenden Rezeptoren CD226 und OX40 auf CD4⁺ T-Zellen von gesunden Probanden (HC) ($n=10$) und HCV Patienten mit akuter ($n=10$), chronischer ($n=11$) und spontan ausgeheilter ($n=8$) Infektion. P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$. Dargestellt sind Mittelwerte und \pm Standardabweichungen (SD).

Abbildung 9 zeigt, dass eine erhöhte CD226 Frequenz insgesamt auf CD4+ T-Zellen, unabhängig von Gesundheitszustand und Infektionsstatus detektiert werden konnte. Es wurden jedoch keine Unterschiede in den Frequenzen der CD226 Expression auf CD4+ T-Zellen zwischen gesunden Probanden und Patienten mit HCV Infektion aufgezeigt. Ebenfalls konnten keine Differenzen in der CD226 Expression auf CD4+ T-Zellen von HCV den Patienten in den verschiedenen Infektionsstadien gefunden werden.

Bei der Analyse von OX40 hingegen konnte ein Unterschied in der Expression auf CD4+ T-Zellen zwischen gesunden Probanden und Patienten mit chronischer HCV Infektion aufgezeigt werden. Patienten, bei denen eine chronische HCV Infektion diagnostiziert wurde, zeigten eine signifikant niedrigere OX40 Frequenz auf CD4+ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Proben (HC vs. chronisch: $p=0,0234$). Es konnten keine Unterschiede in der OX40 Expression auf CD4+ T-Zellen von HCV Patienten in unterschiedlichen Infektionsstadien festgestellt werden.

3.2 Ex vivo Analyse HCV-spezifischer CD4+ T-Zellen

Für die *ex-vivo* Analyse von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen wurden PBMC von HCV Patienten mit akuter ($n=10$), chronischer ($n=11$), spontan ausgeheilte Infektion und von HCV Patienten unter peg-IFN oder antiviraler HCV-Therapie ($n=8$) mit Hilfe von MHC-Klasse II Tetrameren markiert und mit Oberflächen-Antikörperfärbung hinsichtlich der Expression von koregulatorischen Molekülen analysiert. Aufgrund der niedrigen *ex-vivo* Frequenzen von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen, vor allem in der chronischen Phase der Infektion, wurden die Tetramer-positiven Zellen mittels magnetischen Säulen angereichert und sowohl die Pre-, En- und Dep-Fraktion wurden nach Oberflächen-Antikörperfärbung mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

3.2.1 Ex vivo Frequenz und Differenzierungsstatus

Im ersten Schritt wurden die Frequenzen der HCV-spezifischen Tetramer positiven CD4+ T-Zellen wie vormals beschriebene bestimmt (Day et al., 2002) (Lucas et al., 2007) (**Abbildung 10**). Repräsentative FACS Dotplots zeigen, die mittels MHC-Klasse II Tetramer detektierten, HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilte Infektion (**Abbildung 10A**).

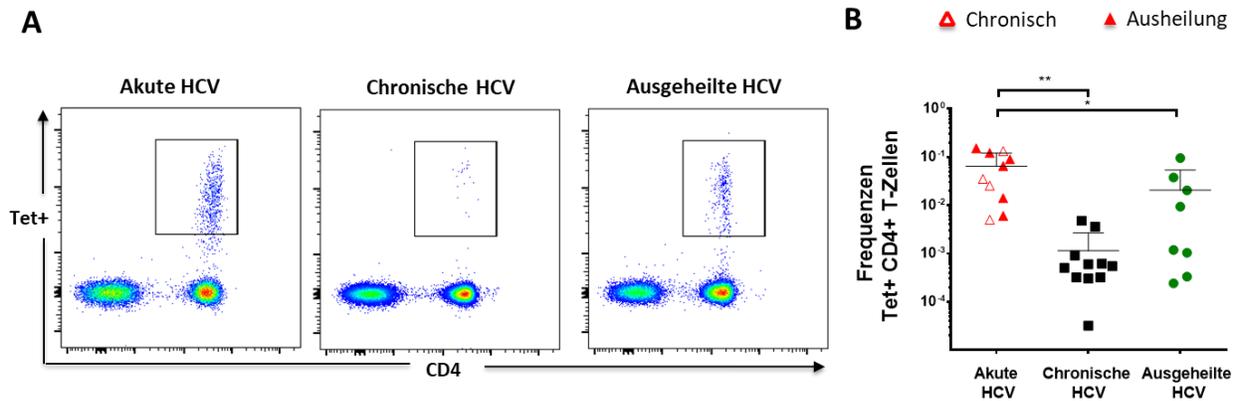


Abbildung 10: Frequenzen der HCV-spezifischen MHC-Klasse II Tetramer positiven CD4+ T-Zellen. (A) Repräsentative Dotplots zeigen die HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilter HCV Infektion. Vorausgehend wurden lebende CD3+ CD4+ Lymphozyten selektiert. (B) Frequenzen der HCV-spezifischen MHC-Klasse II Tetramer positiven CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter (n=10), chronischer (n=11) und spontan ausgeheilter (n=8) HCV Infektion wurden berechnet wie vormals beschrieben (Day et al., 2002) (Lucas et al., 2007). P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$. Dargestellt sind Mittelwerte und \pm Standardabweichungen (SD).

Es zeigt sich auch in dieser Studie eine starke und ausgeprägte CD4+ T-Zellantwort in der akuten (Frequenzen zwischen 0,005 %-0,15 %; median 0,05 %) und spontan ausgeheilten (Frequenzen zwischen 0,0003 %-0,1 %; median 0,005 %) HCV Infektion. Im Vergleich dazu, sind HCV-spezifische CD4+ T-Zellen in der chronischen (Frequenzen zwischen 0 %-0,005 %; median 0,0005 %) HCV Infektion nur in sehr geringer Frequenz detektierbar.

In **Abbildung 10B** ist die statistische Auswertung der vergleichenden Analyse der HCV-spezifischen MHC-Klasse II Tetramer positiven CD4+ T-Zellfrequenzen dargestellt. **Abbildung 10B** zeigt, dass eine signifikant höhere Frequenz an Tetramer positiven CD4+ T-Zellen bei Patienten mit akuter HCV Infektion verglichen zu Patienten mit chronischer (akut vs. chronisch: $p=0,0016$) und ebenfalls spontan ausgeheilten (akut vs. ausgeheilt: $p=0,0479$) HCV Infektion gemessen werden konnte. Um zu untersuchen, ob die Patienten bereits in der akuten Phase der HCV Infektion Unterschiede in der Frequenz der HCV-spezifischen MHC-Klasse II Tetramer positiven CD4+ T-Zellen aufwiesen, wurden die Patienten entsprechend des weiteren klinischen Verlaufs in der **Abbildung 10B** unterschiedlich ausgewiesen. Es konnte hierbei jedoch kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der Tetramer positiven CD4+ T-Zellen zwischen Patienten mit persistierendem Verlauf und spontaner Ausheilung der HCV Infektion aufgezeigt werden (akut-chronisch vs. akut-ausgeheilt: $p= 0,5197$).

Basierend auf den Differenzierungsmarkern CD45RO und CCR7 wurden HCV-spezifische CD4+ T-Zellen von HCV Patienten in unterschiedlichen Infektionsstadien in naïve- und Gedächtnis- T-Zellen eingeteilt (**Abbildung 11**).

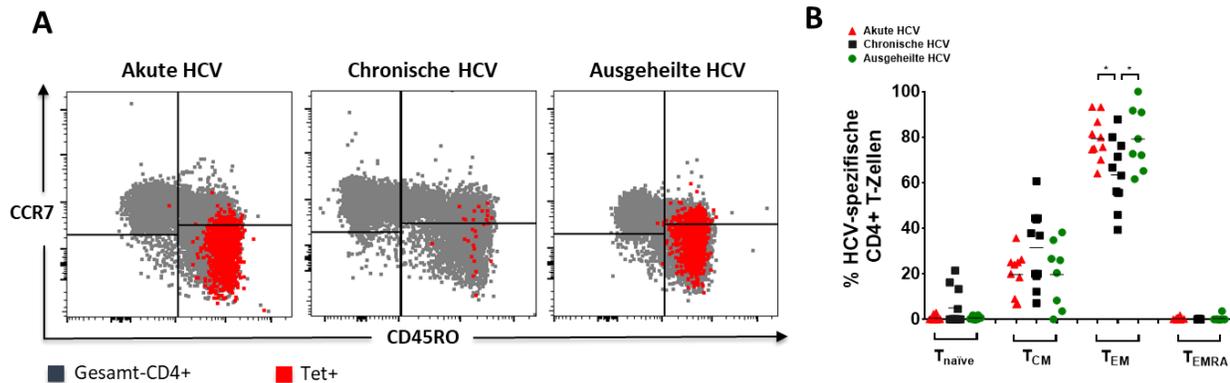


Abbildung 11: Differenzierungsstatus von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen. Basierend auf den Differenzierungsmarkern CD45RO und CCR7 wurden HCV-spezifische CD4+ T-Zellen in naïve und Gedächtnis-T-Zellsubpopulationen unterteilt (CCR7-CD45RO- – Terminale-Effektor-T-Zellen: T_{EMRA} ; CCR7+CD45RO- – naïve T-Zellen: T_{naive} ; CCR7-CD45RO+ – Effektor-Gedächtnis-T-Zellen – T_{EM} ; CCR7+CD45RO+ – Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen – T_{CM}) (A) Repräsentative Dotplots zeigen die Differenzierung von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen und (B) die Frequenz sowie Verteilung der CD4+ T-Zellsubpopulationen von Patienten mit akuter (n=10), chronischer (n=11) und ausgeheilte (n=8) HCV Infektion. P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$.

Repräsentative Dotplots zeigen die Verteilung der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellsubpopulationen von HCV Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilte Infektion (**Abbildung 11A**). In der **Abbildung 11B** sind Frequenzen der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellsubpopulationen Verteilung der HCV Patienten in unterschiedlichen Infektionsstadien dargestellt. Unabhängig von der Phase der Infektion der Patienten wies die überwiegende Mehrheit der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen einen Effektor-Gedächtnis Phänotyp auf. Interessanterweise konnte bei Patienten mit chronischer HCV Infektion eine leichte, jedoch signifikante Reduktion der Frequenz von CD4+ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ermittelt werden im Vergleich zu Patienten mit akuter (chronisch vs. akut: $p=0,0230$) und spontan ausgeheilte HCV Infektion (chronisch vs. ausgeheilte: $p=0,0365$). Innerhalb der weiteren CD4+ T-Zellsubpopulationen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

3.2.2 Expression verschiedener koinhibitorischer Rezeptoren auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen

Für die Charakterisierung der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen hinsichtlich des Expressionsmusters der koregulatorischen Rezeptoren wurden die Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern detektiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der inhibitorische Rezeptor TIGIT zeigte bereits in der Analyse der CD4+ T-Zellen eine signifikant höhere Expression bei Patienten mit akuter und chronischer Infektion im Vergleich zu HCV Patienten mit spontan ausgeheilter Infektion. Es zeigte sich ebenfalls, dass die Expression von TIGIT stark assoziiert mit der Expression von multiplen inhibitorischen Molekülen ist. In **Abbildung 12** sind repräsentative FACS Dotplots der inhibitorischen Rezeptor Expressionen TIGIT, PD-1, BTLA und Tim-3 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von HCV Patienten in unterschiedlichen Infektionsstadien dargestellt.

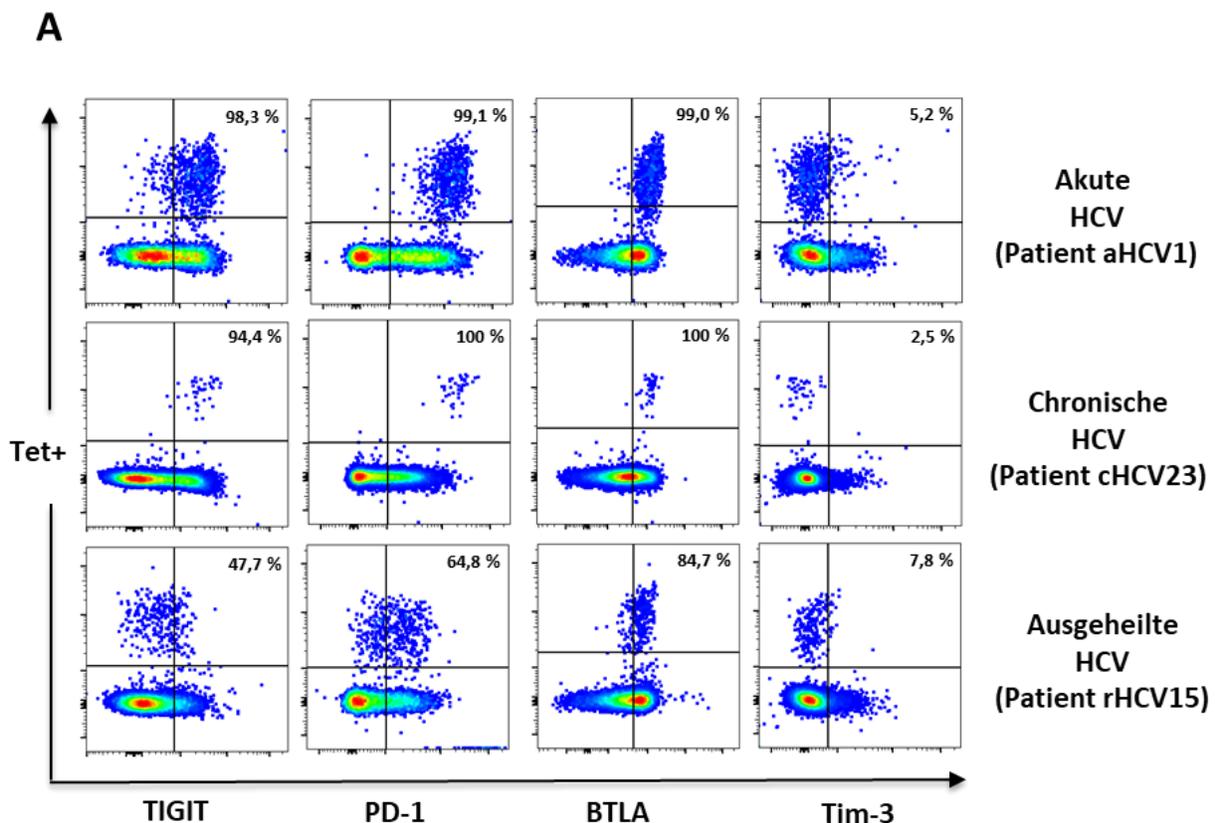


Abbildung 12: Inhibitorische Rezeptor Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen. Repräsentative FACS Dotplots zeigen die inhibitorische Rezeptor Expression von TIGIT, PD-1, BTLA und Tim-3 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilter HCV Infektion. P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$.

HCV-spezifische CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit akuter HCV Infektion zeigten eine hohe Expression der koinhibitorischen Moleküle TIGIT, PD-1 und BTLA, sowie eine geringe Expression von Tim-3. Dieses Expressionsmuster und die erhöhte Frequenz der inhibitorischen Moleküle war ebenfalls bei HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit chronischer HCV aufgezeigt worden, während Patienten, die in der Lage waren, die HCV Infektion spontan zu eliminieren, eine deutlich geringere Expression der inhibitorischen Rezeptoren auf HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aufwiesen. Insbesondere war die TIGIT und PD-1 Frequenz deutlich reduziert bei Patienten mit spontan ausgeheilter HCV Infektion.

Die statistische Auswertung der Frequenzanalyse der inhibitorischen Rezeptoren TIGIT, PD-1, BTLA und Tim-3 auf HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen von HCV Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilter Infektion zeigt, dass die Expression der inhibitorischen Rezeptoren auf HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen überwiegend signifikant höher war als auf der Gesamt-CD4⁺ T-Zellpopulation (**Abbildung 13**). Die vorangegangene phänotypische Charakterisierung von CD4⁺ T-Zellen ergab eine signifikant höhere inhibitorische Rezeptor Expression bei Patienten mit akuter und chronischer HCV Infektion im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit spontan ausgeheilter Infektion. Bei der Analyse von HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen konnte, im Einklang mit der vorangegangenen phänotypischen Charakterisierung von CD4⁺ T-Zellen, eine signifikant höhere TIGIT Expression bei Patienten mit akuter und chronischer HCV Infektion im Vergleich zu Patienten mit spontan ausgeheilter Infektion (akut vs. ausgeheilt: $p < 0,0001$) (chronisch vs. ausgeheilt: $p = 0,0061$) detektiert werden. Beim Vergleich der TIGIT Expression zwischen Patienten mit akuter und chronischer HCV Infektion konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (akut vs. chronisch: $p = 0,5607$).

Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Analyse der PD-1 Expression beobachtet. Sowohl bei Patienten mit akuter als auch mit chronischer HCV Infektion zeigten HCV-spezifische CD4⁺ T-Zellen signifikant höhere PD-1 Frequenzen im Vergleich zu Patienten mit spontan ausgeheilter HCV Infektion (akut vs. ausgeheilt: $p < 0,0001$) (chronisch vs. ausgeheilt: $p < 0,0001$). Hierbei konnte zusätzlich eine signifikant höhere PD-1 Expression auf HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit akuter Infektion im Gegensatz zu Patienten mit chronischer Infektion eruiert werden (akut vs. chronisch: $p = 0,0099$).

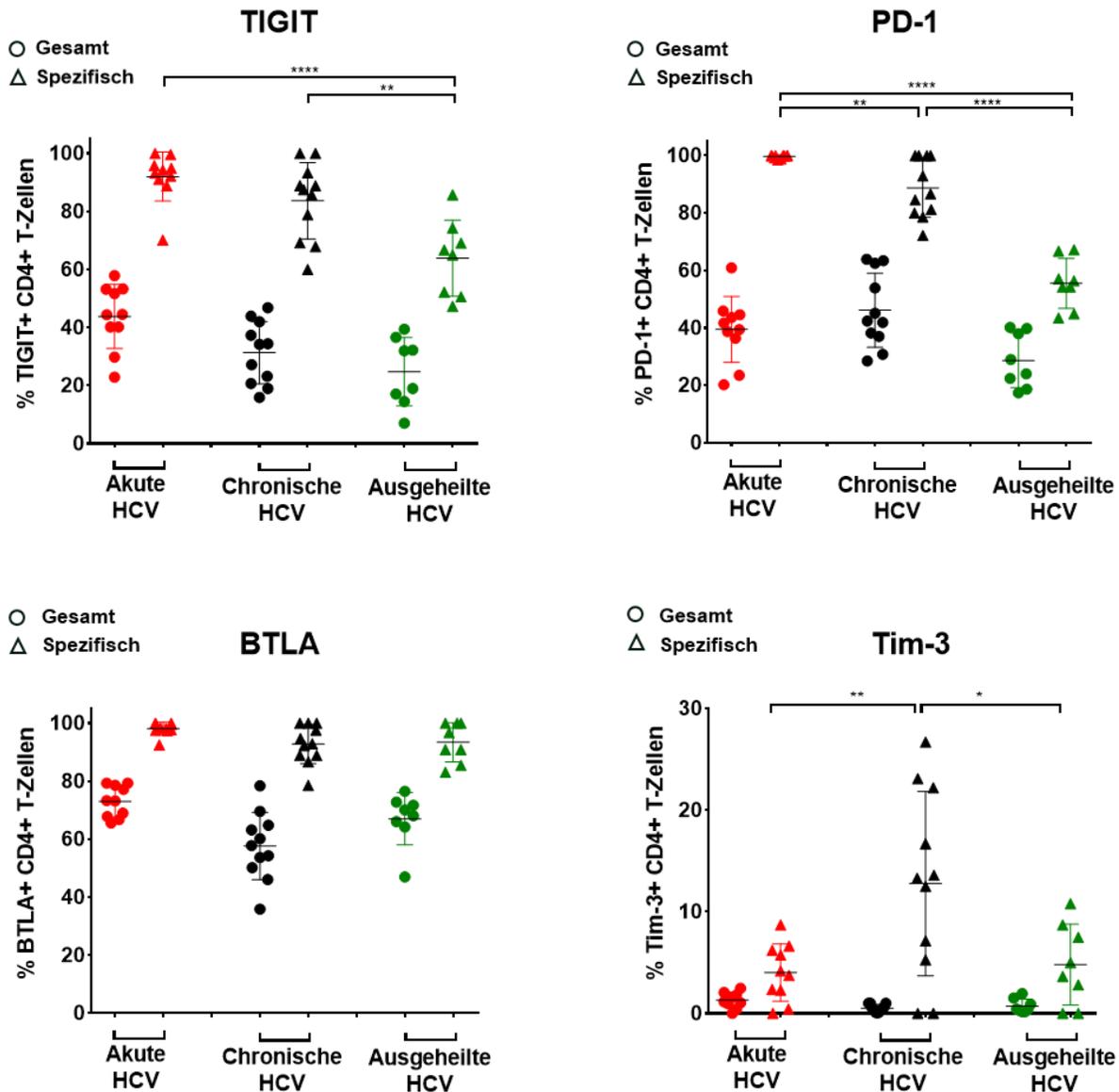


Abbildung 13: Expression inhibitorischer Rezeptoren auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen. Frequenzen der inhibitorischen Rezeptoren TIGIT, PD-1, BTLA und Tim-3 von Gesamt- und HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter (n=10), chronischer (n=11) und spontan ausgeheilte (n=8) HCV Infektion. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Signifikanzen zwischen Gesamt- und HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen nicht vermerkt. P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellem ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$. Dargestellt sind Mittelwerte und \pm Standardabweichungen (SD).

Die Analyse der BTLA Expression ergab, dass HCV-spezifische CD4+ T-Zellen aller Patienten mit HCV Infektion insgesamt sehr hohe Frequenzen des inhibitorischen Moleküls aufwiesen, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied in der Frequenz BTLA exprimierender HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen zwischen den Patienten in unterschiedlichen Infektionsstadien festgestellt werden (**Abbildung 13**).

Die Frequenzen von Tim-3 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen waren bei Patienten mit HCV insgesamt, unabhängig vom Infektionsstatus sehr gering. Eine signifikant höhere Expression von Tim-3 konnte dennoch auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit chronischer HCV Infektion aufgezeigt werden im Gegensatz zu Patienten mit akuter und spontan ausgeheilte HCV Infektion (chronisch vs. akut: $p=0,0005$) (chronisch vs. ausgeheilt: $p=0,0037$) (**Abbildung 13**).

3.2.2.1 SPICE Analyse

Um das Expressionsmuster und die Koexpressionen der inhibitorischen Moleküle auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen detaillierter zu veranschaulichen und darzustellen, wurden die durchflusszytometrischen Daten mit Hilfe der Software Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations (SPICE) analysiert. Die SPICE Software wurde zur Analyse der Oberflächenexpression der inhibitorischen Moleküle TIGIT, PD-1, BTLA und Tim-3 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen verwendet (**Abbildung 14**).

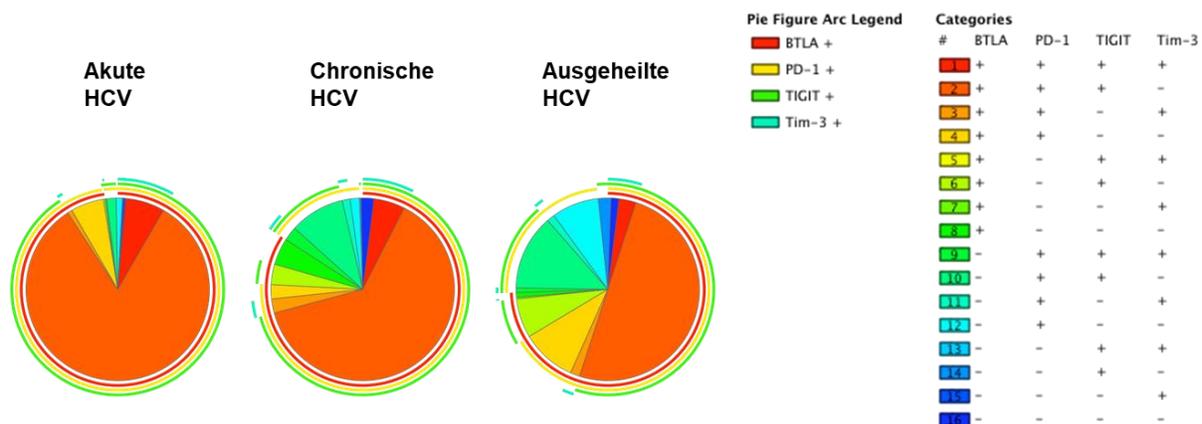


Abbildung 14: SPICE Analyse der inhibitorischen Rezeptoren. Das Expressionsmuster und die Kombination der inhibitorischen Rezeptoren TIGIT, PD-1, BTLA und Tim-3 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen bei Patienten mit akuter ($n=10$), chronischer ($n=11$) und spontan ausgeheilte ($n=8$) HCV Infektion wurde mit Hilfe von SPICE analysiert. SPICE vergleicht die Koexpression der inhibitorischen Rezeptoren und generiert Tortendiagramme, die die Ergebnisse veranschaulichen. Relative Skalen sind abgebildet, das heißt die Werte sind normalisiert und die Farbskala gibt prozentuale Werte in Relation zur Gesamtzellzahl wieder.

Mit Hilfe der SPICE Auswertung wurden Tortendiagramme generiert, die anhand des aufgeführten Farbschemas die Kombination der Expression inhibitorischer Moleküle aufzeigt (von blau=0 Koinhibitoren bis dunkel rot=4 Koinhibitoren). Die überwiegende Mehrheit der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen wiesen ein Expressionsmuster auf, das einer Kombination von TIGIT+PD-1+BTLA+Tim-3- (orange) entspricht. Zusätzlich zeigte sich, dass der Anteil an HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen, die eine Kombination aus TIGIT+PD-1+BTLA+Tim-3- aufwiesen, bei Patienten mit akuter und chronischer HCV Infektion bedeutend höher war als bei Patienten mit spontan ausgeheilter Infektion.

3.2.3 Differenzierungsstatus von HCV-spezifischen TIGIT+ CD4+ T-Zellen

Die Modulation sowohl der T-Zellaktivierung als auch der T-Zelldifferenzierung sind entscheidende Faktoren, die zur Entwicklung der T-Zellantwort beitragen. Durch diese Modifikation wird einerseits gewährleistet, dass das Gleichgewicht zwischen der Immunantwort gegen Pathogene und andererseits die Selbst-Toleranz erhalten bleibt. Um zu untersuchen, ob die erhaltenen Unterschiede aufgrund unterschiedlicher Expression in verschiedenen CD4+ T-Zellsubpopulationen erklärt werden können, wurde die TIGIT Expression auf naiven und CD4+ Gedächtnis-T-Zellpopulationen untersucht. (**Abbildung 15**).

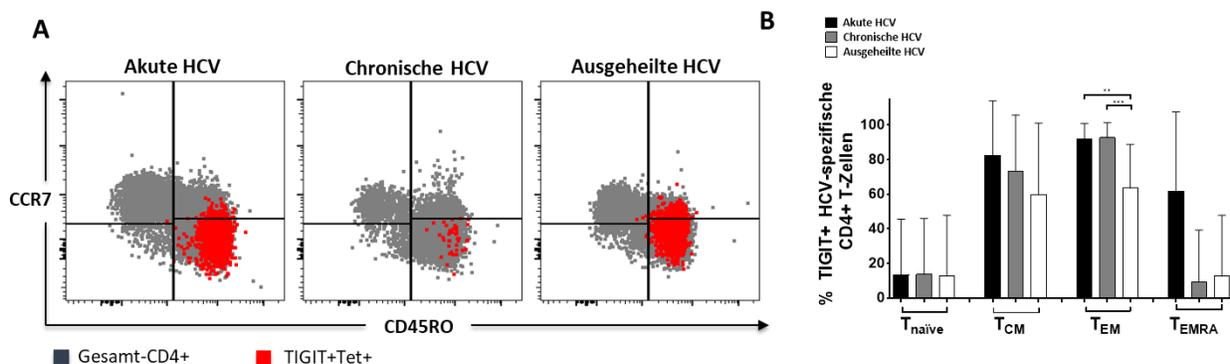


Abbildung 15: TIGIT Expression auf HCV-spezifischen naiven und CD4+ Gedächtnis-T-Zellsubpopulationen. Die Differenzierungsmarker CD45RO und CCR7 wurden verwendet um die TIGIT Expression auf naiven und Gedächtnis-T-Zellsubpopulationen (CCR7-CD45RO- – Terminale Effektor-T-Zellen: T_{EMRA}; CCR7+CD45RO- – naive T-Zellen: T_{naive}; CCR7-CD45RO+ – Effektor-Gedächtnis-T-Zelle – T_{EM}; CCR7+CD45RO+ – Zentrale Gedächtnis-T-Zellen – T_{CM}) zu analysieren. (**A**) Repräsentative Dotplots zeigen die TIGIT Expression und (**B**) die Frequenz auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellsubpopulationen von Patienten mit akuter (n=10), chronischer (n=11) und ausgeheilter (n=8) HCV Infektion. P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$. Dargestellt sind Mittelwerte und \pm Standardabweichungen (SD).

Abbildung 15A und **15B** zeigen repräsentative FACS Dotplots und die Frequenzen der TIGIT Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellsubpopulationen von Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilte HCV Infektion.

Der Vergleich der TIGIT Expression auf den unterschiedlichen CD4+ Gedächtnis-T-Zellsubpopulationen (CCR7-CD45RO- – Terminale Effektor-T-Zellen: T_{EMRA} ; CCR7+CD45RO- – naive T-Zellen: T_{naive} ; CCR7-CD45RO+ – Effektor-Gedächtnis-T-Zelle – T_{EM} ; CCR7+CD45RO+ – Zentrale Gedächtnis-T-Zellen – T_{CM}) zeigte eine signifikant höhere TIGIT Frequenz auf HCV-spezifischen CD4+ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) in akut und chronisch HCV infizierten Patienten im Gegensatz zu Patienten mit spontaner Ausheilung der HCV Infektion (akut vs. ausgeheilt: $p= 0,0004$) (chronisch vs. ausgeheilt: $p= 0,0021$). Die TIGIT Expression auf anderen Subpopulationen der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen ergab keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen.

3.2.4 TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen

Die Expression von TIGIT gemeinsam mit PD-1 wird in zahlreichen Studien als Marker für erschöpfte und dysfunktionale T-Zellen in chronisch viralen Infektionen und Krebserkrankungen beschrieben (Grogan et al., 2014) (Chauvin et al., 2015) (Chew et al., 2016). Johnsten et al. konnten auch zeigen, dass durch den gleichzeitigen Einsatz von anti-TIGIT anti-PD-1 Antikörpern die Effektor-T-Zellfunktion wieder hergestellt und die Erschöpfung aufgehoben werden konnte (Robert J. Johnston et al., 2014).

Um die gemeinsame Rolle von TIGIT und PD-1 in der HCV Infektion näher zu charakterisieren, wurde die TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten in unterschiedlichen Infektionsstadien untersucht (**Abbildung 16A-E**).

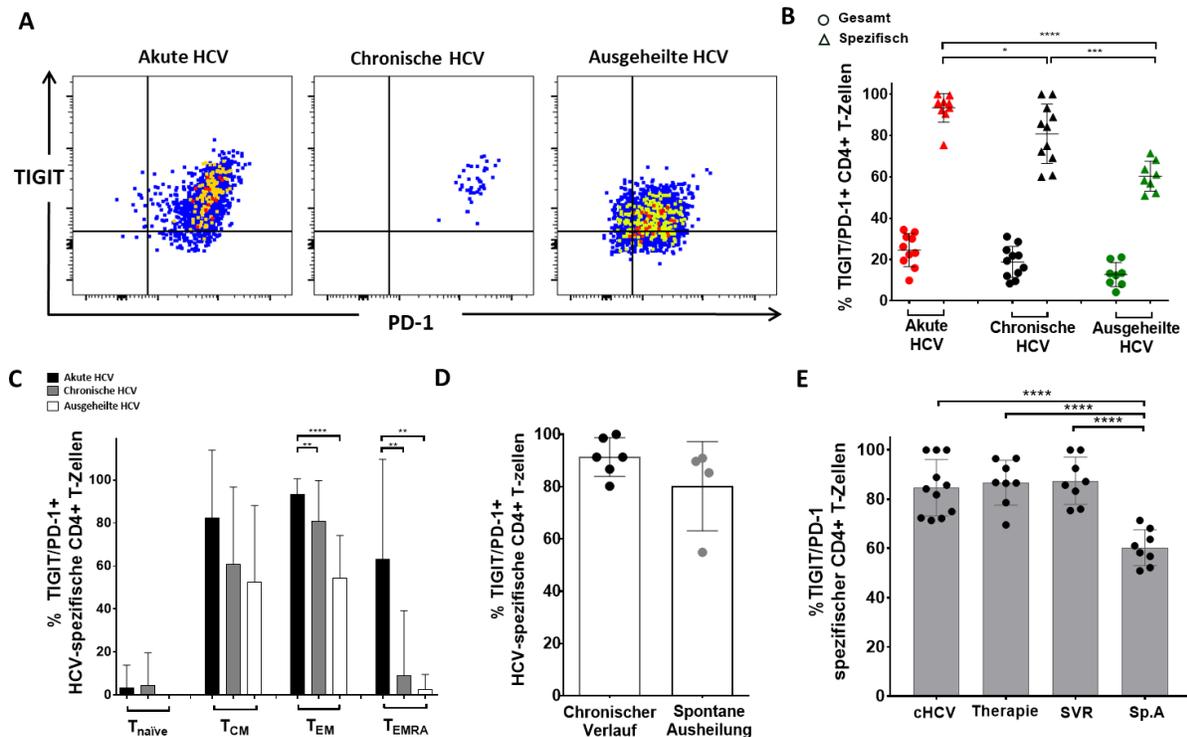


Abbildung 16: TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen. (A) Repräsentative FACS Dotplots zeigen die TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen und (B) die TIGIT/PD-1 Frequenz von Gesamt- und HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter (n=10), chronischer (n=11) und ausgeheilte (n=8) HCV Infektion. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Signifikanzen zwischen Gesamt- und HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen nicht vermerkt (C) Basierend auf den Differenzierungsmarkern CD45RO und CCR7 wurde die TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellsubpopulationen untersucht (CCR7-CD45RO- – Terminale Effektor-T-Zellen: T_{EMRA}; CCR7+CD45RO- – naive T-Zellen: T_{naive}; CCR7+CD45RO+ – Effektor- Gedächtnis-T-Zellen – T_{EM}; CCR7+CD45RO+ – Zentrale Gedächtnis-T-Zellen – T_{CM}). (D) Vergleich der TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen in der akuten Phase der Infektion zwischen Patienten mit einem chronischen Verlauf und Patienten mit spontaner Ausheilung. (E) TIGIT/PD-1 Frequenz im Vergleich bei Patienten mit chronischer HCV (cHCV), während der HCV Therapie (3 Patienten erhielten eine IFN und 5 eine DAA basierte Therapie), nach einer erfolgreichen Therapie mit dauerhaft virologischem Therapieansprechen (SVR: engl. Sustained virological response) (4 Patienten erhielten eine IFN und 4 eine DAA basierte Therapie) und Patienten mit spontaner Ausheilung der HCV Infektion (Sp.A). P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$. Dargestellt sind Mittelwert und \pm Standardabweichung (SD).

Zudem wurde die TIGIT/PD-1 Koexpression auf der Gesamt-CD4+ T-Zellpopulation separat analysiert. Repräsentative Dotplots zeigen die TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen bei akut, chronisch und spontan ausgeheilten HCV infizierten Patienten (Abbildung 16A). Bei Patienten mit akuter und chronischer HCV Infektion konnten signifikant höhere Frequenzen der TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen detektiert werden verglichen mit Patienten mit spontan ausgeheilte Infektion (akut vs. ausgeheilt: $p < 0,0001$) (chronisch vs. ausgeheilt: $p = 0,0001$) (Abbildung 16B).

Es konnte ebenfalls eine leichte, jedoch signifikant höhere TIGIT/PD-1 Koexpression bei Patienten mit akuter HCV Infektion im Gegensatz zu chronischer HCV Infektion ermittelt werden (akut vs. chronisch: $p=0,0287$). Besonders deutlich ersichtlich wurde die insgesamt signifikant höhere TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen verglichen mit der Gesamt-CD4⁺ T-Zellpopulation unabhängig vom Infektionsstatus (**Abbildung 16B**). In einem weiteren Schritt wurde die TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellsubpopulationen analysiert (**Abbildung 16C**). Es konnte hierbei eine signifikant erhöhte TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4⁺ T_{EM}-Zellen von Patienten mit akuter und chronischer HCV Infektion im Vergleich zu Patienten mit spontan ausgeheilter HCV Infektion (akut vs. ausgeheilt: $p<0,0001$) (chronisch vs. ausgeheilt: $p=0,0044$) aufgezeigt werden. Bei Patienten mit akuter HCV Infektion konnte zusätzlich eine erhöhte TIGIT/PD-1 Koexpression auf CD4⁺ T_{EMRA}-Zellen detektiert werden verglichen mit chronisch und spontan ausgeheilter HCV Infektion (akut vs. ausgeheilt: $p=0,0026$) (akut vs. chronisch: $p=0,0019$).

Um zu untersuchen, ob die TIGIT/PD-1 Koexpression als prädiktiver Marker fungiert oder einen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Infektion hat, wurde die Expression in der akuten Phase der HCV Infektion näher untersucht (**Abbildung 16D**). Von den insgesamt zehn akut infizierten Patienten entwickelten sechs Patienten eine chronische HCV Infektion und vier Patienten konnten die HCV Infektion spontan eliminieren. In der akuten Phase der HCV Infektion konnte eine Tendenz zu einer erhöhten TIGIT/PD-1 Koexpression bei Patienten mit einem chronischen Krankheitsverlauf verglichen mit Patienten mit anschließend spontaner Ausheilung beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen (akut-chronisch vs. akut-ausgeheilt: $p=0,0933$) (**Abbildung 16D**).

Anschließend wurde untersucht, wie sich die TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen während und nach einer HCV Therapie verhält (**Abbildung 16E**). Hierfür wurde die TIGIT/PD-1 Koexpression von Patienten mit chronischer HCV Infektion (cHCV), während einer HCV Therapie (peg-IFN: $n=3$; DAA: $n=5$), nach einer erfolgreichen Therapie mit SVR (24 Wochen nach Beendigung der Therapie; peg-IFN: $n=4$; DAA: $n=4$) und von Patienten mit spontan ausgeheilter (Sp.A) HCV Infektion verglichen. **Abbildung 16E** zeigt, dass keine Veränderungen der TIGIT/PD-1 Frequenz weder während, noch nach dem Ende einer erfolgreichen HCV-Therapie detektiert werden konnte. Weiterhin konnte eine signifikant höhere TIGIT/PD-1 Koexpression detektiert werden im Vergleich zu Patienten, die eine HCV Infektion spontan ausgeheilt haben (chronisch vs. ausgeheilt: $p<0,0001$) (Therapie vs. Sp.A: $p=0,0002$) (SVR vs. Sp.A: $p<0,0001$).

3.2.5 CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen

Über die Rolle des kostimulierenden Rezeptors CD226 auf T-Zellen ist in der HCV Infektion wenig bekannt. Aus diesem Grund wurde die CD226 Expression auf Gesamt- und HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen *ex vivo* von Patienten in unterschiedlichen Infektionsstadien mittels Durchflusszytometrie analysiert (**Abbildung 17A-E**).

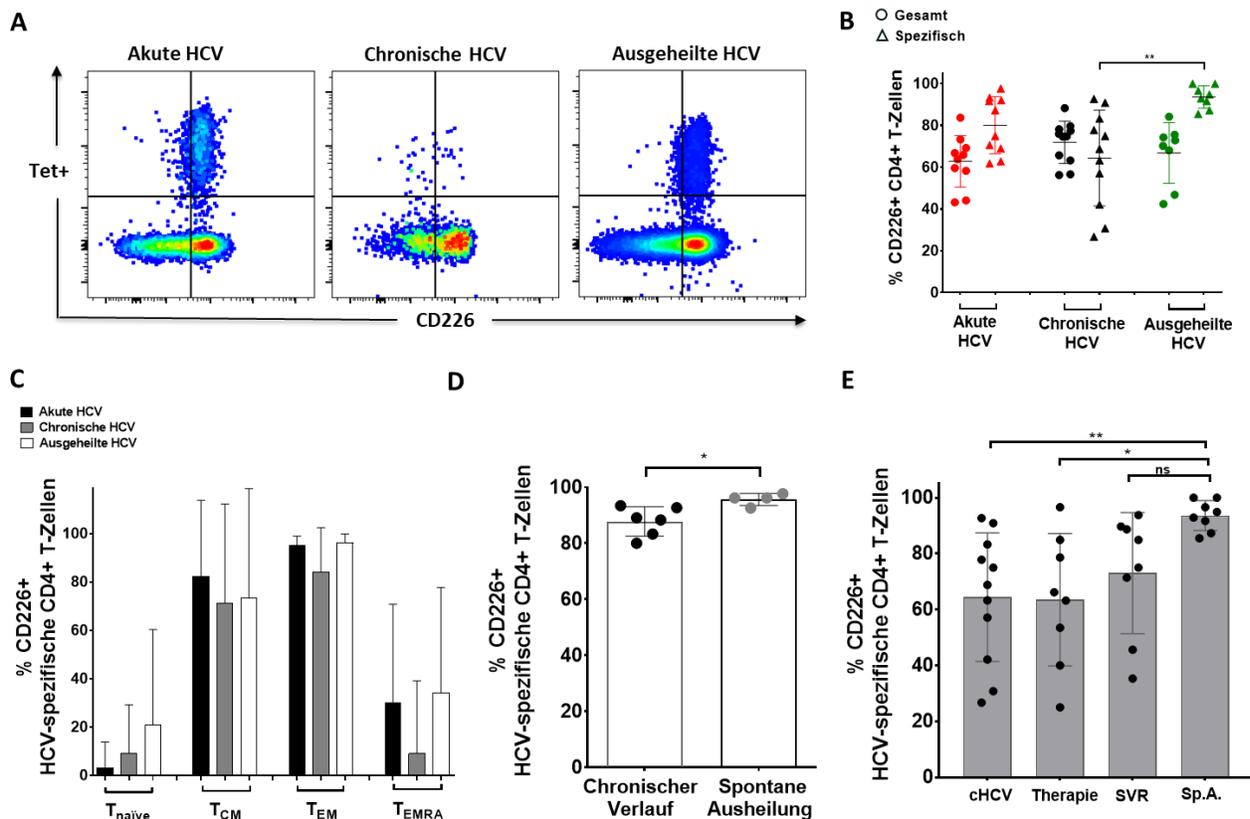


Abbildung 17: CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen. (A) Repräsentative FACS Dotplots zeigen die CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen und (B) die CD226 Frequenz auf Gesamt- und HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter (n=10), chronischer (n=11) und ausgeheilter (n=8) HCV Infektion. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Signifikanzen zwischen Gesamt- und spezifischen CD4+ T-Zellen nicht vermerkt. (C) Mittels der Differenzierungsmarker CD45RO und CCR7 wurde die CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellsubpopulationen untersucht (CCR7-CD45RO- – Terminale Effektor-T-Zellen: T_{EMRA}; CCR7+CD45RO- – naive T-Zellen: T_{naive}; CCR7-CD45RO+ – Effektor-Gedächtnis-T-Zellen – T_{EM}; CCR7+CD45RO+ – Zentrale Gedächtnis-T-Zellen – T_{CM}). (D) Vergleich der CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen in der akuten Phase der Infektion zwischen Patienten mit chronischem Verlauf und Patienten mit spontaner Ausheilung. (E) CD226 Frequenz im Vergleich zwischen Patienten mit chronischer HCV (cHCV), während einer HCV Therapie (3 Patienten erhielten eine peg-IFN und 5 eine DAA basierte Therapie), nach einer erfolgreichen Therapie mit dauerhaft virologischem Therapieansprechen (SVR: *engl.* Sustained virological response) (4 Patienten erhielten eine peg-IFN und 4 eine DAA basierte Therapie) und Patienten mit spontaner Ausheilung der Infektion (Sp.A). P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte ≤ 0,01 bzw. ≤ 0,001. Dargestellt sind Mittelwerte und ± Standardabweichungen (SD).

Repräsentative FACS Dotplots zeigen die CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilte HCV Infektion (**Abbildung 17A**). **Abbildung 17B** zeigt, dass eine signifikante Reduktion der CD226 Frequenz auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen bei Patienten mit chronischer Infektion vorlag verglichen mit Patienten, die eine HCV Infektion spontan ausgeheilt haben (chronisch vs. ausgeheilt: $p=0,0023$). Bei der Analyse der CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellsubpopulationen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (**Abbildung 17C**). Interessanterweise zeigte sich eine leichte, jedoch signifikant höhere CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von akut infizierten HCV Patienten, die im Krankheitsverlauf die Infektion spontan eliminieren konnten im Gegensatz zu Patienten, die einen persistierenden HCV Verlauf entwickeln (akut-ausgeheilt vs. akut-chronisch: $p=0,0234$) (**Abbildung 17D**).

Zusätzlich wurde die CD226 Expression von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen während und nach einer HCV Therapie (**Abbildung 17E**) analysiert. Dafür wurde die CD226 Expression von Patienten mit chronischer HCV Infektion (cHCV), während einer HCV Therapie (peg-IFN: $n=3$; DAA: $n=5$), nach einer erfolgreichen Therapie mit SVR (24 Wochen nach Beendigung der Therapie; peg-IFN: $n=4$; DAA: $n=4$) und von Patienten mit spontan ausgeheilte (Sp.A) HCV Infektion verglichen. Während in der vorigen Analyse keine Veränderung in der TIGIT/PD-1 Frequenz auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen während und nach dem Ende einer HCV Therapie detektiert wurde, konnte ein Anstieg der CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen vermerkt werden. Nach erfolgreicher Therapie mit SVR konnte eine nahezu gleiche CD226 Frequenz auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen verglichen mit Patienten mit spontan ausgeheilte HCV Infektion detektiert werden (SVR vs. Sp.A: $p=0,1632$).

3.2.6 Longitudinale Analysen der Korezeptor Expression

Um die Relevanz und Rolle der zuvor untersuchten Korezeptoren im Verlauf einer HCV Infektion zu untersuchen, wurde die MFI (*engl.* Mean fluorescence intensity) auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen longitudinal mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zunächst wurde die MFI von TIGIT, PD-1 und CD226 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von vier chronischen HCV Patienten im Verlauf einer DAA-Therapie untersucht (**Abbildung 18**).

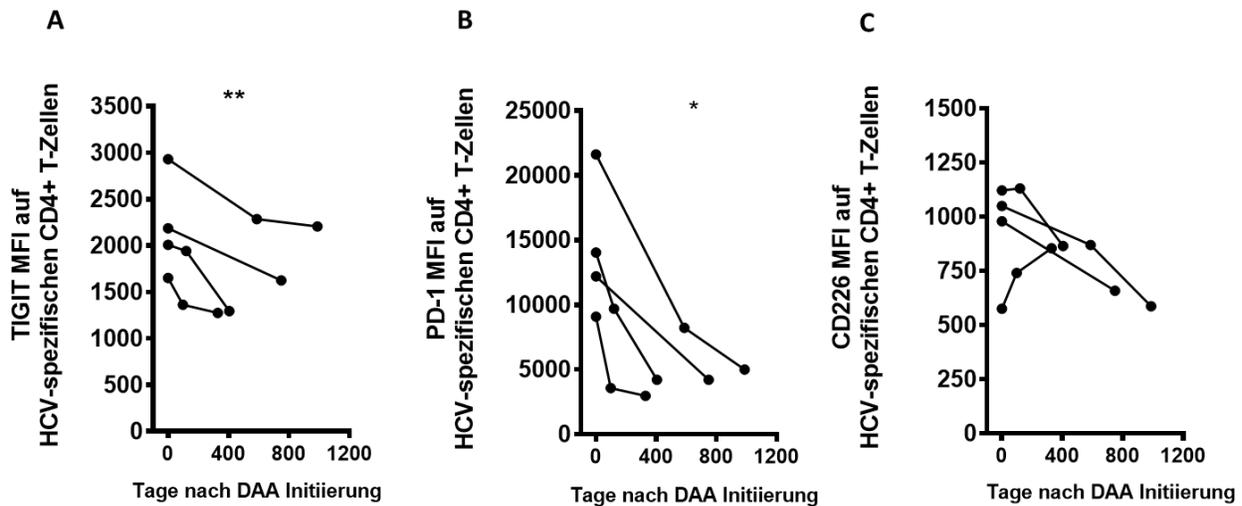


Abbildung 18: MFI der Korezeptoren TIGIT, PD-1 und CD226 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen im Verlauf einer DAA-Therapie. Longitudinale Darstellung der MFIs der inhibitorischen Rezeptoren (A) TIGIT und (B) PD-1 und der MFI des stimulierenden Rezeptors (C) CD226 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen. PBMC Proben von vier chronischen HCV Patienten (eine verbundene Linie repräsentiert einen Patienten) wurden entnommen am Tag 0 (Zeitpunkt ohne Therapie), während und nach dem Ende der Therapie. P-Werte wurden mit Hilfe eines gepaarten T-Tests berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$.

Sowohl bei der MFI von TIGIT (**Abbildung 18A**), als auch PD-1 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen (**Abbildung 18B**) ist eine deutliche und signifikante Reduktion bei allen vier Patienten nach Initiierung der DAA Therapie zu beobachten (TIGIT MFI: $p= 0,0054$; PD-1 MFI: $p= 0,0214$). Überraschenderweise war im Verlauf der DAA Therapie bei drei Patienten eine Reduktion der CD226 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen und bei einem Patienten ein Anstieg CD226 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen zu beobachten (**Abbildung 18C**). Anschließend wurde die MFI von TIGIT, PD-1 und CD226 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von zwei akut infizierten HCV Patienten mit chronischen Verlauf und einem akut infizierten HCV Patienten mit spontaner Ausheilung longitudinal analysiert (**Abbildung 19**).

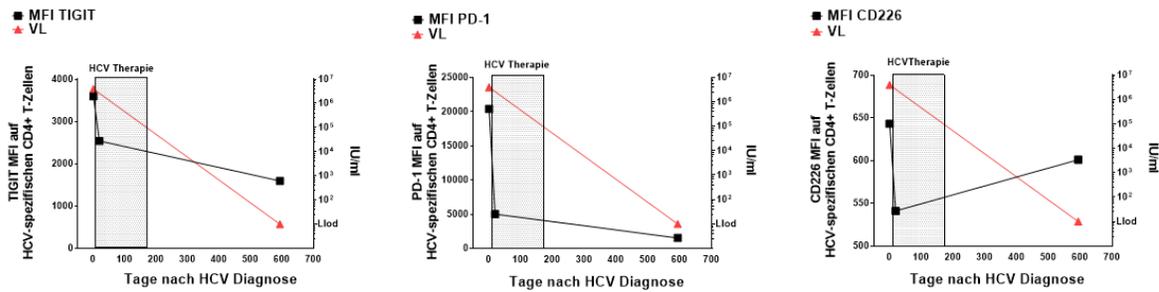
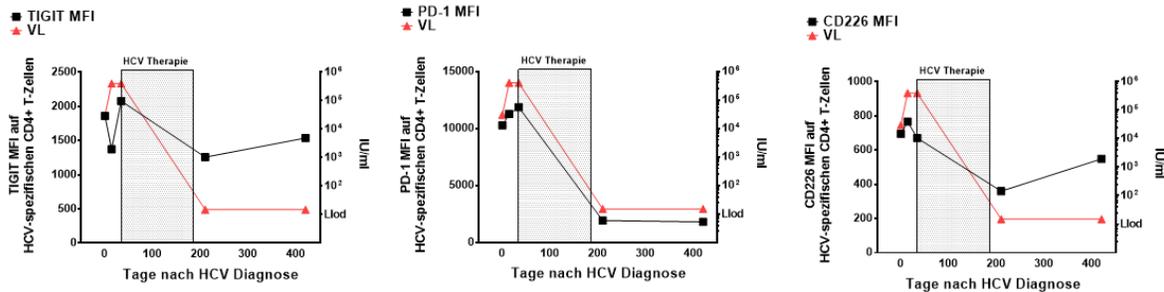
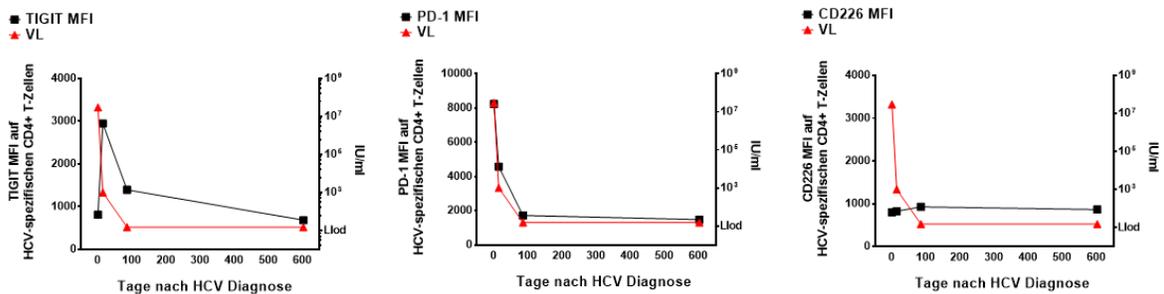
A Patient aHCV1**B Patient aHCV6****C Patient aHCV4**

Abbildung 19: Longitudinale Analyse der Korezeptor MFI in der frühen Phase der Infektion. Die MFI von TIGIT, PD-1 und CD226 wurde longitudinal analysiert von (A) Patient aHCV1 und (B) Patient aHCV6, behandelt in der frühen Phase der HCV Infektion und (C) Patient aHCV4 mit einer spontanen Ausheilung der HCV Infektion. PMBC von Patient aHCV1 und aHCV6 wurden analysiert in der akuten Phase, während (peg-IFN Therapie von insgesamt 24 W), sowie nach dem Ende der HCV Therapie. PBMC von Patient aHCV4 wurden analysiert vom akuten Zeitpunkt bis hin zur spontanen Ausheilung der HCV Infektion. Die MFI von TIGIT, PD-1 und CD226, sowie die korrespondierende Viruslast (VL) wurden in (A) für Patient aHCV1 (B) für Patient aHCV6 und (C) Patient aHCV4 dargestellt.

Bei den Patienten aHCV1 und aHCV6 wurde in der akuten Phase eine hohe TIGIT, PD-1 und CD226 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen detektiert, die mit beginnender HCV Therapie sank und zusätzlich mit der Viruslast korrelierte (**Abbildungen 19A** und **19B**). Ein ähnliches Bild ließ sich bei Patient aHCV4 bei der TIGIT und PD-1 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen beobachten.

Es konnte zunächst eine erhöhte TIGIT und PD-1 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen in der akuten Phase beobachtet werden, die jedoch ohne Therapie während der spontanen Ausheilung der HCV Infektion sank, parallel zur Abnahme der Viruslast (**Abbildung 19C**). Interessanterweise konnten keine Veränderungen in der CD226 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen bei Patient aHCV4 beobachtet werden.

3.3 **Ex vivo Analyse von HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen**

In der chronischen HCV Infektion konnten erschöpfte HCV-spezifische CD8+ T-Zellen mit verminderter Zytokinproduktion (z.B. IFN- γ), geringerer Proliferationsrate und einer Hochregulation von inhibitorischen Molekülen wie z.B. PD-1 assoziiert werden (Penna et al., 2007). Immuntherapeutische Strategien, die der HCV-spezifischen CD8+ T-Zellerschöpfung entgegenwirken und folglich die Funktion polyfunktioneller CD8+ T-Zellen reaktivieren können, gelten als vielversprechende Ansätze zur Bekämpfung oder Prävention chronischer Virusinfektionen beim Menschen. Neben dem Einsatz von Anti-PD-1 Antikörpern als mögliche Immun-Checkpoint Inhibitoren (Jang & Venna, 2017), sind weitere Adjuvanzien in den Fokus der Forschung gerückt. Erste humane klinische *in vivo* Studien zeigen einen vielversprechenden immuntherapeutischen Ansatz durch die Blockade von TIGIT (Park et al., 2018). Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der TIGIT und CD226 Untersuchungen auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen dargestellt.

3.3.1 **TIGIT/CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen**

Die Rolle von TIGIT und seinem komplementären Rezeptor CD226 wurde mit Hilfe von MHC-Klasse I Technologie, magnetischer Partikelanreicherung und Durchflusszytometrie auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen näher charakterisiert. Dafür wurde die TIGIT und CD226 Expression auf Gesamt- und HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen während der akuten, chronischen und der spontan ausgeheilten Phase der HCV Infektion untersucht (**Abbildung 20**).

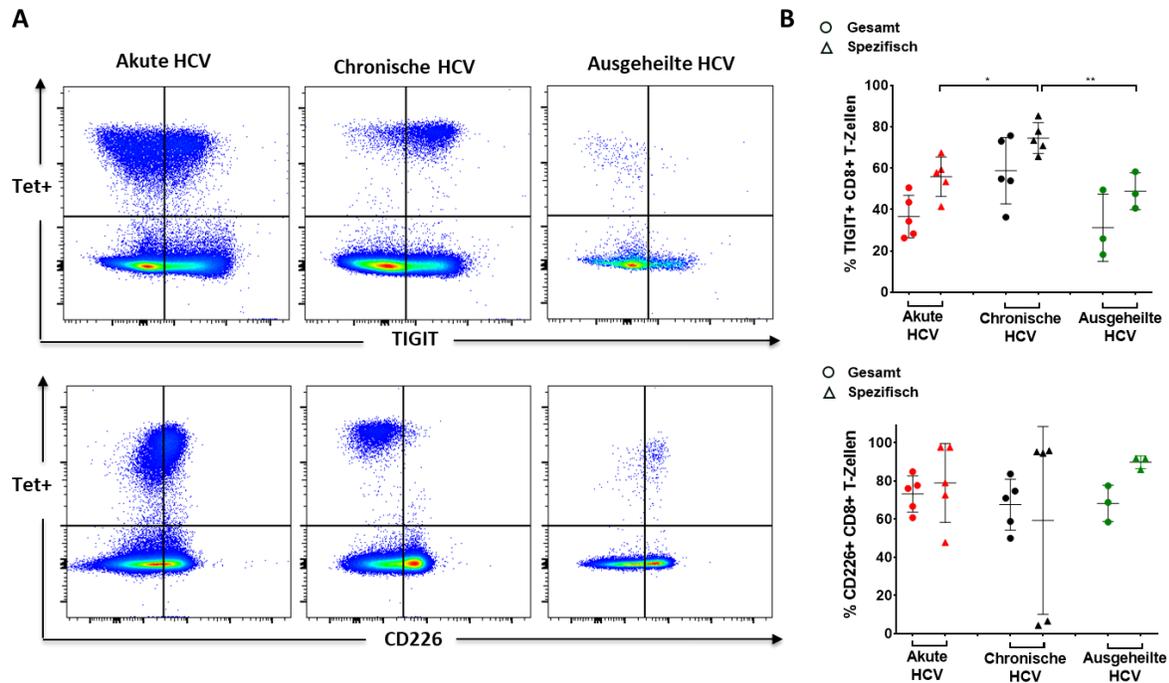


Abbildung 20: TIGIT und CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen. (A) Repräsentative FACS Dotplots zeigen die TIGIT und CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen (Tet+) und (B) die TIGIT und CD226 Frequenzen auf Gesamt- und HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen von Patienten mit akuter (n=5), chronischer (n=5) und ausgeheilter (n=3) HCV Infektion. P-Werte wurden berechnet mit Hilfe einer einfaktoriellem ANOVA, gefolgt von einem Tukey's multiple comparisons Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt. ** und *** repräsentieren p-Werte $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$. Dargestellt sind Mittelwerte und \pm Standardabweichungen (SD).

Im Gegensatz zu HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen, konnte auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen keine Hochregulation von TIGIT in der akuten Phase der Infektion detektiert werden. Hingegen konnte eine signifikant höhere Frequenz von TIGIT auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen bei Patienten mit chronischer Infektion verglichen mit Patienten mit akuter (chronisch vs. akut: $p=0,0162$) und spontan ausgeheilter HCV Infektion (chronisch vs. ausgeheilt: $p=0,0056$) beobachtet werden (**Abbildung 20A** und **20B**). Überraschenderweise zeigte sich, dass CD226 variierende Expressionslevel auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen in der chronischen Phase der HCV Infektion aufwies. Während einige Patienten CD226 auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen auf einem intermediären Level exprimierten, konnte eine komplette Herunterregulation der CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen bei weiteren Patienten aufgezeigt werden. Beim Vergleich der Patienten mit unterschiedlichen CD226 Expressionslevel in der chronischen HCV Infektion zeigte sich ein Unterschied im HLA-A-Typ. Patienten, die CD226 auf einem intermediären Level exprimierten, wiesen den HLA-A*02:01 Typ auf. Patienten mit dem HLA-A*24:02 Typ zeigten hingegen eine nahezu vollständige Herabregulation der CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen.

4 Diskussion

Bei einer akuten Infektion mit dem Hepatitis C Virus ist es einer Minderheit der Patienten möglich, das Virus eigenständig zu eliminieren und die Infektion spontan auszuheilen. Bei dem Großteil der HCV infizierten Patienten persistiert das Virus jedoch und sie entwickeln eine chronische Infektion (Lauer & Walker, 2001). Eine starke und multispezifische T-Zellantwort ist essenziell für die spontane Ausheilung der HCV Infektion. In der akuten Phase der Infektion kann bei allen Patienten, unabhängig vom weiteren Verlauf der Infektion, eine ausgeprägte HCV-spezifische T-Zellantwort detektiert werden (Holz & Rehmann, 2015). Bei Patienten mit persistierendem Verlauf sind diese jedoch nach kurzer Zeit nur noch in geringer Frequenz nachweisbar (Diepolder et al., 1995) (Day et al., 2002) (Schulze zur Wiesch et al., 2005). Der genaue Mechanismus, der zum Verlust der T-Zellantwort in der chronischen HCV Infektion führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass für eine spontane Ausheilung der HCV Infektion genetische Faktoren des Wirts mitentscheidend sind (McKiernan et al., 2004) (Ziegler et al., 2013) (Fitzmaurice et al., 2015). Dabei wurde aufgezeigt, dass bestimmte HLA-Klasse II Typen einen Einfluss auf den Verlauf einer HCV Infektion haben. Eine spontane Ausheilung der HCV Infektion konnte vermehrt bei Patienten mit den Allelen DQB1*03 und DRB1*11 beobachtet werden, während Patienten mit einem DQB1*02 Typ überwiegend einen chronischen Verlauf aufzeigten (Alric et al., 1997) (Thio et al., 2001) (Harris et al., 2008). Es konnte ebenfalls eine protektive Wirkung bei Patienten mit den Allelen HLA-B*27 und HLA-B*57 nachgewiesen werden, die bedingt durch eine schnelle Antigenfragmentierung und eine geringere Möglichkeit für virale Escapemutationen vermittelt wird (Neumann-Haefelin et al., 2006) (Dazert et al., 2009) (Schmidt et al., 2012). Zusätzlich konnten transkriptionelle Unterschiede der HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen in der akuten Phase der HCV Infektion ermittelt werden zwischen Patienten mit persistierendem Verlauf der HCV Infektion und Patienten mit spontaner Ausheilung. Diese Unterschiede wurden in der akuten Phase mit metabolischen Dysregulationen von Patienten mit anschließend persistierendem Verlauf assoziiert. Zudem konnte diese transkriptionelle Dysregulation der HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen mit der Präsenz von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen korreliert werden (Wolski et al., 2017). Diese Erkenntnisse stimmen mit früheren Studien überein, die in HCV infizierten Schimpansen gemacht wurden und zeigen, dass eine HCV-spezifische CD4+ T-Zellantwort essenziell für die spontane Ausheilung der HCV Infektion ist (Thimme et al., 2001) (Grakoui et al., 2003).

Im Vergleich dazu weisen HCV-spezifische CD4+ T-Zellen eine dysfunktionale Effektorfunktion in der chronischen HCV Infektion auf, welches durch proliferative Defekte gekennzeichnet und gefolgt von einer nahezu vollständigen Depletion der Zellen ist. Aufgrund der niedrigen *ex vivo* Frequenz der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen beruhen die vorangegangenen Analysen überwiegend auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen (Gruener et al., 2001) (Day et al., 2003) (Schulze zur Wiesch et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden *ex vivo* HCV-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen mit Hilfe einer MHC-Klasse I und II Tetramerfärbung in Kombination mit einer Oberflächen-Antikörperfärbung hinsichtlich ihres Expressionsmusters koregulatorischer Rezeptoren charakterisiert. Im Fokus dieser Arbeit stand die vergleichende Analyse der TIGIT, PD-1 und CD226 Expression auf HCV-spezifischen T-Zellen von HCV Patienten mit akuter, chronischer und spontan ausgeheilter Infektion. Die erhaltenen Resultate werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.1 TIGIT Expression auf CD4+ T-Zellen

Die vergleichende Analyse der TIGIT Expression auf CD4+ T-Zellen innerhalb dieser Promotionsarbeit ergab, dass TIGIT signifikant höher auf CD4+ T-Zellen exprimiert wurde von Patienten mit akuter HCV Infektion verglichen mit gesunden Probanden, Patienten mit chronischer Infektion und spontan ausgeheilter HCV Infektion. Es konnte ebenfalls eine signifikant höhere Expression von TIGIT auf CD4+ T-Zellen von Patienten mit chronischer HCV Infektion verglichen mit gesunden Probanden ermittelt werden. Dabei zeigte sich auch eine signifikant höhere TIGIT Expression auf CD4+ T_{EM}-Zellen von chronisch und akut HCV infizierten Patienten. Zahlreiche Studien beschreiben TIGIT als Marker für erschöpfte CD8+ T-Zellen in chronisch viralen Infektion und Krebserkrankungen (R. J. Johnston et al., 2009) (Yadav et al., 2016) (Chew et al., 2016) (Guillerey et al., 2018). Die Rolle und Funktion von TIGIT auf CD4+ T-Zellen ist jedoch nicht vollständig verstanden. TIGIT scheint bei CD4+ T-Zellen sowohl als Aktivierungs- als auch Marker für Dysfunktionalität zu fungieren. Bei gesunden Probanden wird TIGIT überwiegend auf aktivierten, nicht naiven CD4+ T-Zellen exprimiert (Lozano et al., 2012). Hierbei ist TIGIT gemeinsam mit dem kostimulierenden Rezeptor CD226 überwiegend für die T-Zellregulation zuständig. In chronisch viralen Infektion wie z.B. HIV wurde die Expression von TIGIT gemeinsam mit PD-1 und LAG-3 als Marker für HIV Reservoir CD4+ T-Zellen beschrieben (Fromentin et al., 2016).

Bei den hier vorgelegten Resultaten der Analyse von CD4⁺ T-Zellen von gesunden Probanden und HCV Patienten konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die TIGIT Expression stark assoziiert war mit der Expression der inhibitorischen Rezeptoren PD-1, BTLA und Tim-3.

PD-1 wurde bereits in vorigen Studien als Marker für dysfunktionale CD4⁺ T-Zellen in der HCV Infektion beschrieben (Kasprowicz et al., 2008) (W. Xiao et al., 2016), wie auch als Erschöpfungsmarker auf HCV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Urbani et al., 2006) (Nakamoto et al., 2008). In Einklang zu den hier erhaltenen Daten wurde gezeigt, dass eine Hochregulation von PD-1 bereits in der akuten Phase beobachtet werden konnte. Es konnte weiterhin eine erhöhte PD-1 Frequenz bei Patienten mit chronischer HCV Infektion aufgezeigt werden (Kasprowicz et al., 2008). Die inhibitorischen Moleküle BTLA und Tim-3 wurden ebenfalls in diversen chronisch viralen Infektionen mit der T-Zellerschöpfung assoziiert (Golden-Mason et al., 2009) (Moorman et al., 2012) (Barathan et al., 2017). Eine besondere Rolle für die Interaktion von Tim-3 mit dessen Liganden Galectin-9 konnte auf Tfh-Zellen beobachtet werden. Eine erhöhte Tim-3 Expression auf Tfh-Zellen korrelierte mit der HCV-Replikation und wurde vermehrt in Patienten mit chronischer HCV Infektion detektiert (Zhuo et al., 2017).

Überraschenderweise zeigten die Analysen der kostimulierenden Rezeptoren CD226 und OX40 keine oder nur sehr geringe Unterschiede bei der Expression auf CD4⁺ T-Zellen. Lediglich eine leichte, jedoch signifikante Herabregulation der OX40 Expression auf CD4⁺ T-Zellen konnte bei chronischen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet werden. Zum einem könnte das darauf schließen lassen, dass kostimulierende Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen eine weniger relevante Rolle spielen in der HCV Infektion als z.B. auf CD8⁺ T-Zellen im LCMV Mausmodell (Kopf et al., 1999) (Boettler et al., 2012) oder in der HIV Infektion (Q. Yu et al., 2006). Zum anderen könnte die niedrige *ex vivo* Frequenz der HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen einen zu berücksichtigenden Faktor für die CD4⁺ T-Zellanalyse darstellen, da diese einen zu geringen Anteil der CD4⁺ T-Zellpopulation ausmachen. HCV-spezifische CD4⁺ T-Zellen liegen in 10-fach niedrigerer Frequenz in peripheren Blut vor im Vergleich zu HIV-spezifischen T-Zellen (Kim et al., 2005). Die Korezeptor Expression auf der Gesamt-CD4⁺ T-Zellpopulation könnte somit nur einen geringen Rückschluss bezüglich der Relevanz der Moleküle in einer HCV Infektion wiedergeben. Um den Einfluss auf die koregulatorischen Rezeptoren im Zusammenhang mit der HCV Infektion detaillierter aufklären zu können, wurde die Expression der inhibitorischen Rezeptoren von HCV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen näher untersucht.

4.2 TIGIT/PD-1/CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen

Im Rahmen dieser Studie konnten erfolgreich HCV-spezifische CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter (n=10) chronischer (n=11) und spontan ausgeheilter (n=8) HCV Infektion mit Hilfe von HCV-spezifischen MHC-Klasse II Tetrameren analysiert werden. In Übereinstimmung mit vorigen Studien konnte eine signifikant höhere Frequenz an Tetramer positiven CD4+ T-Zellen bei Patienten mit akuter HCV Infektion verglichen mit chronischer und spontan ausgeheilter HCV Infektion ermittelt werden (Day et al., 2003) (Lucas et al., 2007) (Raziorrouh et al., 2011). Bei der Untersuchung zur Differenzierung von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen konnte eine geringe, jedoch signifikante Reduktion der CD4+ T_{EM}-Zellen bei chronischen HCV Patienten detektiert werden. Es wurde in vorigen Studien gezeigt, dass ein Ausheilen der HCV Infektion mit einem Th1-Zellprofil assoziiert ist, also mit der Sekretion von IFN- γ und IL-2. Hingegen wies das Zytokinprofil chronisch infizierter HCV Patienten in anderen Studien eine verminderte Sekretion von IL-2 auf (Tsai et al., 1997) (Gerlach et al., 1999) (Semmo et al., 2005) (Semmo & Klenerman, 2007). Der Verlust der Effektorfunktion der T-Zellen ist stark mit einer erhöhten Expression von inhibitorischen Rezeptoren assoziiert (Yi et al., 2010) (Wherry, 2011) (Anderson, Joller, & Kuchroo, 2016).

Die erhaltenen Ergebnisse im Rahmen dieser Promotionsarbeit zeigen, dass der inhibitorische Rezeptor TIGIT stark erhöht exprimiert wurde auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit akuter und chronischer HCV Infektion verglichen mit Patienten mit spontan kontrollierter HCV Infektion. Diese Resultate bestätigen zunächst die erhaltenen Ergebnisse der Analyse der Gesamt-CD4+ T-Zellpopulation und stehen auch in Einklang mit vorigen Studien zur TIGIT Expression auf CD8+ T-Zellen in chronisch viralen Infektion und Krebserkrankungen (Pauken & Wherry, 2015). Im LCMV Mausmodell wird TIGIT als Marker für erschöpfte und dysfunktionale CD8+ T-Zellen beschrieben (Robert J. Johnston et al., 2014). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von TIGIT zu einer Wiederherstellung der funktionellen Eigenschaften antiviraler und auch anti-tumoraler T-Zellantworten führen kann. Eine erhöhte TIGIT Expression auf erschöpften HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen konnte ebenfalls in der HIV Infektion gezeigt werden (Tauriainen et al., 2017). Für CD4+ T-Zellen wurde die TIGIT Expression überwiegend im Zusammenhang mit Treg-Zellen und als Regulator für die T-Zelldifferenzierung in gesunden Probanden beschrieben (Lozano et al., 2012). Studien, die TIGIT als Marker für dysfunktionale T-Zellen beschreiben, zeigen gleichzeitig eine massive Koexpression mit zahlreichen weiteren, inhibitorischen Rezeptoren. Eine kürzlich durchgeführte Studie über HIV infizierte Patienten zeigt, dass das inhibitorische Expressionsmuster zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen deutliche Unterschiede aufweist (Teigler et al., 2017).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnten ebenfalls Unterschiede zwischen den Expressionsmustern von HCV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen aufgezeigt werden. Auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen konnte eine Hochregulation von TIGIT in der akuten und chronischen Phase der HCV detektiert werden. Im Vergleich zu HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen war eine Hochregulation von TIGIT lediglich bei Patienten mit chronischer HCV Infektion und nicht bei Patienten mit akuter HCV Infektion zu beobachten. In der HIV Infektion wurde die TIGIT Expression mit einer massiven Koexpression von LAG-3 und Tim-3 auf CD4+ T-Zellen beschrieben. (Fromentin et al., 2016). Die Koexpression von TIGIT, LAG-3 und Tim-3 wurde dabei als HIV Reservoirmarker auf CD4+ T-Zellen unter ART assoziiert. Die hier durchgeführte SPICE Analyse der inhibitorischen Moleküle zeigte, dass der dominierende und charakteristische Phänotyp von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen eine Koexpression von TIGIT, PD-1 und BTLA, jedoch nicht Tim-3 aufweist.

4.2.1 TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied in der TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen zwischen akut und chronisch infizierten Patienten im Vergleich zu Patienten mit spontan ausgeheilte Infektion ermittelt werden. Die TIGIT/PD-1 Koexpression wurde in zahlreichen Analysen als Marker für dysfunktionale und erschöpfte T-Zellen beschrieben. In der HIV Infektion wurde eine erhöhte TIGIT/PD-1 Koexpression auf HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen von Patienten mit chronischer HIV Infektion aufgezeigt (Chew et al., 2016). Zudem wurde gezeigt, dass eine Einzelblockade von TIGIT oder PD-1 sowohl die Effektor-T-Zellfunktion wieder induzierte, der größte Erfolg jedoch durch eine parallele Blockade hervorgerufen werden konnte (Chew et al., 2016). Im Gegensatz zu den hier gemachten Beobachtungen ist eine erhöhte TIGIT Expression in der HIV Infektion erst in der chronischen Phase detektiert worden (Tauriainen et al., 2017). Das gilt sowohl für die erhöhte TIGIT Expression auf CD8+ als auch auf CD4+ T-Zellen. Die Autoren erwähnen jedoch auch, dass es signifikante Unterschiede in der CD8+ T-Zelldifferenzierung gab und innerhalb dieser Subpopulationen auch Unterschiede in der TIGIT Frequenz. Daraus folgt, dass eine Hochregulation bei einzelnen CD4+ und CD8+ T-Zellsubpopulationen bereits in der akuten Phase vorhanden sein könnte in der HIV Infektion und weiteren chronisch viralen Infektionen. Generell scheint die TIGIT Expression durch polyklonale TCR Stimulation induziert zu werden, dies ist bei den meisten inhibitorischen Molekülen zu beobachten (T. Fujita et al., 2014) (Rekik et al., 2015).

In der HIV Infektion wurden jedoch heterogene Resultate bei der Analyse der TIGIT Expression nach HIV-1 Gag Peptid Stimulation erzielt. Ein Teil der Patienten zeigte nach Stimulation der HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen einen Anstieg der TIGIT Expression, während ein weiterer Teil der Patienten eine konstante TIGIT Expression auf HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen aufwies (Chew et al., 2016).

Um zu untersuchen, ob die koregulatorischen Moleküle in der akuten Phase der HCV Infektion als prädiktive Biomarker für den weiteren Verlauf der HCV Infektion verwendet werden könnten, wurde in dieser Arbeit die TIGIT/PD-1 Koexpression bei Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverlauf vergleichend analysiert. In zuvor absolvierten Studien wurden unterschiedliche klinische Parameter bereits als prädiktive Biomarker in der HCV beschrieben, um z.B. das Fortschreiten einer Fibrose oder die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms frühzeitig zu diagnostizieren (Tokuhisa et al., 2007) (Valva, Ríos, De Matteo, & Preciado, 2016). Anhand der hier erhaltenen Ergebnisse konnte in der akuten Phase der HCV Infektion bei Patienten mit anschließend persistierendem Verlauf eine tendenziell höhere TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen verglichen mit Patienten mit spontan eliminiertes HCV Infektion aufgezeigt werden. Ähnliche Resultate wurden bereits in vorigen Studien bei der vergleichenden Analyse der PD-1 Expression in der akuten Phase der HCV Infektion erzielt (Kasprowicz et al., 2008). Hierbei konnte auch in der akuten und chronischen Phase der HCV Infektion eine erhöhte PD-1 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen im Vergleich zu spontan ausgeheilten HCV Patienten detektiert werden. In der akuten HCV Infektion ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der PD-1 Expression zwischen HCV Patienten mit unterschiedlichem klinischen Verlauf feststellen (Chronifizierung vs. spontane Ausheilung). Um eine abschließende Aussage darüber treffen zu können, ob und in welchem Maß TIGIT und/oder PD-1 als prädiktive Biomarker in HCV Infektion verwendet werden könnten, wäre eine erweiterte Analyse mit einer größeren Anzahl an Patienten notwendig. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen zwischen Patienten mit a) chronischer Infektion, b) bei Patienten unter HCV Therapie, c) 24 Wochen nach dem Ende einer erfolgreichen Therapie und d) bei Patienten mit spontan ausgeheilten HCV vergleichend untersucht.

Patienten, die unter einer Therapie die HCV Infektion mit dauerhaftem virologischem Ansprechen erfolgreich eliminieren konnten, zeigten weiterhin eine signifikant höhere TIGIT/PD-1 Koexpression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen verglichen mit Patienten, die die HCV Infektion spontan ausheilen konnten.

Diese erhaltenen Resultate lassen darauf schließen, dass die TIGIT/PD-1 Koexpression ein wichtiger Faktor für die spontane Ausheilung in der HCV Infektion darstellt und deuten darauf hin, dass eine Ausheilung unter HCV Therapie keine Änderung in der Dysfunktionalität der CD4+ T-Zellen mit sich bringt. Die essentielle Rolle einer starken und multispezifischen CD4+ T-Zellantwort konnte bei Untersuchungen in Schimpansen verdeutlicht werden, die zunächst in der Lage waren, die HCV Infektion spontan auszuheilen. Bei der anschließenden Depletion der CD4+ T-Zellen waren die Schimpansen, bei einer Reinfektion und trotz detektierbarer HCV-spezifischer CD8+ T-Zellantworten, nicht erneut in der Lage, die Infektion selbständig zu eliminieren (Grakoui et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei der longitudinalen Analyse der Korezeptor Expression unter DAA-Therapie kein signifikanter Unterschied weder in der Frequenz von TIGIT+ noch in der Frequenz von PD1+ HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen detektiert werden. Es wurde jedoch eine signifikante Reduktion der TIGIT und PD-1 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen ermittelt. Diese Reduktion der TIGIT und PD-1 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen konnte ebenfalls bei Patienten in der akuten HCV Infektion mit Einsetzen der Therapie und spontaner Ausheilung beobachtet werden. Diese erhaltenen Resultate stehen im Einklang mit zuvor durchgeführten humanen Studien der PD-1 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen. Dabei konnte in der akuten Phase der HCV Infektion eine Reduktion der PD-1 MFI auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen korrespondierend zum Verlust der Viruslast nach der Initiierung der HCV Therapie detektiert werden (Kasprowicz et al., 2008). Ebenfalls konnten bei zuvor durchgeführten Studien vielversprechende Erfolge bei der Blockade von PD-1 *in vitro* und *in vivo* erzielt werden. Durch den *in vivo* Einsatz von anti-PD-1 Antikörpern im LCMV Mausmodell konnten funktionelle Defekte und die Erschöpfung der CD8+ T-Zellen wieder aufgehoben werden (Barber et al., 2006). Überraschenderweise wurde hierbei auch gezeigt, dass selbst bei CD4+ T-Zell depletierten Mäusen durch eine PD-1 Blockade auf CD8+ T-Zellen eine gesteigerte und verbesserte Effektorfunktion induziert wurde. Bei humanen *in vitro* Analysen konnte durch die Blockade des PD-1-PD-1L Signalwegs auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen von HCV Patienten ebenfalls eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate und Effektorfunktion induziert werden (Urbani et al., 2006) (Kasprowicz et al., 2008).

Studien zur *in vivo* PD-1 Blockade in Schimpansen mit persistierender HCV Infektion zeigen, dass teilweise eine signifikante Reduktion der Virämie ohne hepatozelluläre Schädigung erzielt werden konnte (Grakoui et al., 2003). Nach Beendigung der Therapie konnte jedoch wieder ein Anstieg der Virämie beobachtet werden.

Anhand dieser Analysen wird deutlich, dass die Blockade von einzelnen inhibitorischen Rezeptoren bei viral persistierender Infektion nur teilweise oder unzureichend die T-Zell Erschöpfung *in vivo* aufheben und die Effektorfunktion rekonstruieren kann. Eine bedeutende Rolle spielen inhibitorische Rezeptoren in der Immuntherapie bei Krebserkrankungen. Der Einsatz der anti-PD-1 blockierenden Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab konnte bei vielen Tumorentitäten wie dem Melanom, dem Hodgkin-Lymphom sowie bei Blasen- und Lungenkrebs klinische Erfolge erzielen (Brahmer et al., 2012). Der das Immun-Checkpoint Molekül CTLA-4 blockierende Antikörper Ipilimumab kann als ein Meilenstein der neuen Therapiestrategie betrachtet werden. Durch den Einsatz von Ipilimumab in klinischen Studien konnten bei ca. 20 % der Patienten länger andauernde Remissionen erreicht werden, was zur klinischen Zulassung von Ipilimumab für die Behandlung des malignen Melanoms durch die amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel FDA (*engl. Food and drug administration*) im Jahre 2011 führte (Hodi et al., 2010). Ein besonderer Fokus liegt aktuell auf der Erforschung von Antikörpern gegen den Immun-Checkpoint TIGIT (Manieri et al., 2017). Zuvor gemachte Studien konnten eine massive Hochregulation von TIGIT auf Tumor-spezifischen und Tumor-infiltrierenden T-Zellen in diversen Krebserkrankungen wie z.B. der akuten myeloischen Leukämie (Kong et al., 2016) (Stamm et al., 2018), dem Multiplen Myelom (Guillerey et al., 2018) oder dem Hodgkin-Lymphom (Li et al., 2018) zeigen. *In vivo* Untersuchungen in Mausmodellen zeigten große Erfolge bei der Blockade von TIGIT allein oder gemeinsam mit PD-1 (Robert J. Johnston et al., 2014) (Hung et al., 2018) (Tian, 2018). Ebenfalls erzielten *in vitro* Analysen zur TIGIT und PD-1 Blockade bei humanen T-Zellen gute Resultate bei der Wiederherstellung der anti-Tumor Effektorfunktion (Chauvin et al., 2015) (Yadav et al., 2016) (Inozume et al., 2016). Die vielversprechenden Ergebnisse haben dazu geführt, dass erste klinische Studien zu TIGIT und PD-1 Blockade für die Krebstherapie initiiert wurden (Park et al., 2018). Die in dieser Promotionsarbeit erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Checkpoint-Inhibitor Blockade von TIGIT parallel mit PD-1 als Teil einer Kombinationstherapie eine wichtige Rolle zukünftiger Eradikationsstrategien („HIV cure“) chronisch viraler Infektionen wie HBV oder HIV darstellen könnte.

4.2.2 CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen

Der kostimulierende Rezeptor CD226 wird auf unterschiedlichen Immunzellpopulationen wie T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten exprimiert und bindet gemeinsam mit dem inhibitorischen Rezeptor TIGIT an die Liganden PVR und PVRL2 (Lozano et al., 2012) (Tahara-Hanaoka et al., 2004).

In der Literatur wurde CD226 vor allem im Zusammenhang mit autoimmunen Mausmodellen und humanen Autoimmunerkrankungen wie MS, rheumatoider Arthritis oder Lupus erythematoses beschrieben (Hafler et al., 2009) (Maiti et al., 2010) (Nie et al., 2016). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Lupus erythematoses konnte im Vergleich zu gesunden Individuen eine erhöhte CD226 Expression auf peripheren T-Zellen festgestellt werden (Tabata et al., 1989). Außerdem wurde gezeigt, dass der Prozentsatz an CD226 exprimierenden T-Zellen in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöht ist im Vergleich zum peripheren Blut (Du et al., 2012).

Neben seiner Rolle in Autoimmunerkrankungen wurde CD226 in seiner Funktion bei der Abwehr von entarteten Tumorzellen beschrieben. PVR und PVRL2 werden in hohem Maße von Tumorzellen exprimiert (Castriconi et al., 2004) (Pende et al., 2005) (Carlsten et al., 2007). Bei NK-Zellen oder CD8+ T-Zellen führt die Interaktion CD226 mit PVR/PVRL2 auf Tumorzellen zu einer Aktivierung der zytotoxischen Antwort seitens der Effektorzelle und letztendlich zur Eliminierung der PVR/PVRL2 exprimierenden Tumorzellen. Während in der Literatur vor allem ein Fokus auf Untersuchungen der Funktion der CD226 Expression von zytotoxischen CD8+ T-Zellen und NK-Zellen für die Immunantwort gegen entartete Tumorzellen gelegt wurde (Chan, Andrews, & Smyth, 2012), konzentrierte sich die vorliegende Arbeit überwiegend auf die Rolle von CD226 auf HCV-spezifischen T-Zellen in der HCV Infektion.

Bei der Analyse von HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen konnte eine signifikante Reduktion der CD226 Frequenz bei Patienten mit chronischer HCV Infektion verglichen mit akuter und spontan ausgeheilte HCV Infektion detektiert werden. Diese Resultate entsprechen zuvor publizierten Studien über die CD226 Expression in anderen chronisch viralen Infektionen. In der HIV Infektion wurde ebenfalls eine verminderte CD226 Expression auf erschöpften HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen beschrieben im Vergleich zu CMV-spezifischen CD8+ T-Zellen (Tauriainen et al., 2017). Zudem konnte in longitudinalen Analysen von langzeittherapierten HIV Patienten ein Anstieg der CD226 Frequenz auf HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen beobachtet werden. Wie bei den hier erhaltenen Resultaten in der chronischen HCV wurde eindrucksvoll gezeigt, dass eine niedrige CD226 Frequenz mit einer erhöhten TIGIT Frequenz auf HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen einhergeht. Diese Beobachtungen spiegeln die natürliche Interaktion von TIGIT und CD226 wider.

TIGIT und CD226 konkurrieren um die gleichen Liganden: PVR und PVRL2 welche auf APCs exprimiert werden, während TIGIT ein inhibierendes und CD226 ein stimulierendes Signal an die Immunzelle vermittelt (Robert J. Johnston et al., 2014) (Pauken & Wherry, 2014). Somit stellen TIGIT und CD226 wichtige Regulatoren von T-Zellen und auch NK-Zellen dar.

In der HIV Infektion konnte zusätzlich gezeigt werden, dass HIV-spezifische CD8+ T-Zellen mit erhöhter TIGIT und niedriger CD226 Frequenz eine verminderte funktionelle Kapazität aufweisen, bezogen auf die IFN- γ , TNF, Granzym B und CD107a Expression (Tauriainen et al., 2017). Eine erhöhte TIGIT und niedrige CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen lässt daher auf eine dysfunktionale Effektorfunktion und eine verminderte Fähigkeit der Zytokinausschüttung schließen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in der akuten Phase der HCV Infektion eine signifikant erhöhte CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit anschließender spontaner Ausheilung eruiert. Ebenfalls konnte eine Rekonstruktion der CD226 Expression mit Initiierung der HCV Therapie beobachtet werden. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass CD226 als ein möglicher prädiktiver Marker für den Verlauf einer HCV Infektion angesehen werden kann und die CD226 Expression, im Gegensatz zu der TIGIT/PD-1 Koexpression, nach Antigenreduktion wieder induziert wird. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Studien darauf hin, dass eine hohe CD226 Expression mit einer verbesserten Immunabwehr gegen entartete Tumorzellen und virale Infekte assoziiert ist. Gleichzeitig scheint sich eine hohe CD226 Expression vielmehr negativ auf den Verlauf von Autoimmunerkrankungen auszuwirken. Die hier erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine erfolgreiche Immunantwort gegen eine persistierende HCV Infektion von einer funktionalen CD226 Signaltransduktion abhängig zu sein scheint. Des Weiteren stellt eine verminderte CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen gemeinsam mit einer erhöhten TIGIT Frequenz ein wichtiges Korrelat bei dysfunktionaler Effektor-T-Zellfunktion dar.

4.3 TIGIT/CD226 Verhältnis auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen

In der chronischen HCV Infektion verlieren HCV-spezifische CD8+ T-Zellen unter stetiger Antigenstimulation zunehmend ihre Effektorfunktion (Wherry & Kurachi, 2015) (Wang & Ravetch, 2015). Dieses Phänomen wird als T-Zellerschöpfung bezeichnet (Wherry, 2011). Erstmals wurde die T-Zellerschöpfung in einem chronisch viralen LCMV Mausmodell für CD8+ T-Zellen beschrieben (Moskophidis et al., 1993). Die LCMV-spezifischen T-Zellen zeigen bei chronisch infizierten Mäusen dabei eine verminderte Effektorkapazität und geringere Zytokinausschüttung (Zajac et al., 1998).

Zudem konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte Expression verschiedener inhibitorischer Moleküle wie z.B. PD-1 oder LAG-3 stark assoziiert mit einem persistierenden Verlauf der Infektion ist (Richter, Agnellini, & Oxenius, 2010).

Der am genauesten beschriebene Rezeptor, der im Zusammenhang mit T-Zellerschöpfung beschrieben wurde, ist PD-1 (Su, 2007) (Sharpe & Pauken, 2017). In der chronischen HCV Infektion wurde das PD-1 Molekül auch eingehend als Marker für Erschöpfung und Dysfunktion untersucht und beschrieben (Urbani et al., 2006) (Radziewicz et al., 2008) (Kasprovicz et al., 2008). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde als ein Schwerpunkt die TIGIT Expression auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen untersucht. Zum anderen wurde die TIGIT und CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen von HCV Patienten mit unterschiedlichem Infektionsstatus untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass TIGIT im Gegensatz zu den HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen noch nicht in der akuten Phase auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen hochreguliert wurde. Erst bei Patienten mit chronischer HCV Infektion zeigten HCV-spezifische CD8+ T-Zellen eine signifikant höhere TIGIT Expression. Diese Resultate stehen im Einklang mit den Ergebnissen von T-Zelluntersuchungen in anderen chronisch viralen Infektionen (Robert J. Johnston et al., 2014) (Grogan et al., 2014). HCV-spezifische CD8+ T-Zellen in der HIV Infektion zeigen ebenfalls erst in der chronischen Phase der Infektion eine erhöhte TIGIT Frequenz (Chew et al., 2016) (Tauriainen et al., 2017).

Überraschenderweise zeigten sich große Diskrepanzen in der CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen. Ein Teil der chronisch infizierten HCV Patienten zeigte eine nahezu vollständige Herunterregulation der CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen. Der andere Teil der Patienten exprimierte CD226 auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen in einem intermediären Level. Bei der Analyse der chronischen Patientengruppe ergab sich ein Unterschied im HLA-A-Typ zwischen den Patienten, die CD226 in einem intermediären Level exprimieren und Patienten, die eine vollständige Herunterregulation der CD226 auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen zeigten. In der Literatur wurde ein Polymorphismus im CD226 Gen beschrieben, der eine verminderte Expression bedingt (G. Liu, Hu, Jin, & Jiang, 2017). Genomweite Assoziationsstudien zeigen, dass die Polymorphismen im CD226 Gen, nämlich rs727088G und rs763361T, eine entscheidende Rolle in verschiedenen Autoimmunerkrankungen spielen (Hafler et al., 2009). Hierbei bedingt ein rs763361-Haplotyp eine Reduktion der CD226 Zelloberflächenexpression in verschiedenen T-Zellsubpopulationen (G. Liu et al., 2017). Dieser rs763361-Haplotyp könnte somit ebenfalls auch eine weitere Erklärung für die gemessene unterschiedliche CD226 Expression auf HCV-spezifischen CD8+ T-Zellen darstellen.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die HCV Infektion ist ein einzigartiges Modellsystem zur Untersuchung der Immunkontrolle und des Immunversagens bei chronisch viralen Infektionen beim Menschen, nicht nur wegen der großen klinischen Relevanz der HCV Infektion, sondern auch wegen der Dichotomie des klinischen Verlaufes (Bukh, 2016). Die Mehrheit der HCV infizierten Patienten entwickelt eine chronische Infektion, während ca. 25-30 % der infizierten Personen das Virus spontan eliminieren können (Luxenburger et al., 2018). Diese unterschiedlichen Verläufe bieten die Möglichkeit zu untersuchen, welche Immunreaktionen zur spontanen Ausheilung oder Persistenz der HCV Infektion führen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von TIGIT, PD-1 und CD226 auf HCV-spezifischen T-Zellen mit dem klinischen Verlauf der HCV Infektion korreliert. Zusätzlich konnte aufgezeigt werden, dass TIGIT, PD-1 und CD226 in der akuten Phase der HCV Infektion als mögliche prädiktive Marker für den Ausgang der Infektion dienen könnten. Eine Limitation dieser Promotionsarbeit ist unter anderen die Größe der Patientenkohorte. Die Rekrutierung von akut infizierten HCV Patienten ist aufgrund des asymptomatischen Verlaufs und sinkender Neuinfektionen begrenzt. Zudem wiesen die Patienten Infektionen mit unterschiedlichen HCV Genotypen auf. Ein Aspekt, der in den Analysen nicht berücksichtigt wurde. Des Weiteren machen historisch bedingte Unterschiede der Behandlungsregime und die rasche Entwicklung der DAA-Therapien in der HCV Infektion eine standardisierte Analyse schwierig. Parallele Analysen zur Expression der untersuchten Moleküle auf z.B. CMV-spezifischen CD4+ T-Zellen, die ihre Effektorfunktion in der chronischen Infektion nicht verlieren, würden eine detailliertere Aufklärung über die Rolle und Funktion der koregulatorischen Moleküle in der HCV Infektion ermöglichen (Victor Appay et al., 2002). Aufgrund der geringen Frequenz der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen sind die Möglichkeiten der funktionellen Untersuchungen begrenzt. Eine Blockade von TIGIT allein oder parallel mit PD-1 würde eine detailliertere Aussage darüber geben, ob die erhaltenen phänotypischen Unterschiede auf funktionelle Unterschiede zurück zu führen sind, wie z.B. eine verminderte Produktion von IFN- γ oder eine geringere Proliferationsrate *in vitro* nach Antigen Stimulation. Ergänzend fehlen Untersuchungen zu intrahepatischen HCV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen. Hierbei wäre interessant, ob intrahepatische HCV-spezifische T-Zellen ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen, wie bei den hier erhaltenen HCV-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut. Zusammenfassend wurde in dieser Promotionsarbeit die Koexpression von TIGIT und PD-1 auf HCV-spezifischen CD4+ T-Zellen als potenzieller Marker für dysfunktionale CD4+ T-Zellen in der chronischen HCV Infektion identifiziert.

6 Anhang

Tabelle 9: Detaillierte demographische und klinische Daten der für die HCV MHC-Klasse II Tetramer Analyse benutzten HCV Patienten.

Patienten ID	Alter/ Geschlecht	HLA-Klasse II	Verwendete Tetramere (ID)	Genotyp	VL (IU/ml)	ALT (U/l)	Klinischer Verlauf	Therapie
Akute HCV Infektion								
aHCV 1	68/w	DRB1*01:01, *14:01	1	1a	4000000	51	cHCV/SVR	peg-IFN/RBV (24 W)
aHCV 2	42/m	DRB1*14:01, *15:01	4,5	1a	70000	558	cHCV	/
aHCV 3	51/w	DRB1*03:01, *15:01	4,5	2b	8000	798	Sp. A	/
aHCV 4	54/w	DRB1*01:02,*03:01	1	3a	30000000	1084	Sp. A	/
aHCV 5	47/w	DRB1*01:02, *15:01	4,5	n.a.	Llod	63	Sp. A	/
aHCV 6	22/w	DRB1*01:01, *03:01	1	1a	30000	40	cHCV/SVR	peg-IFN/RBV (24 W)
aHCV 7	32/m	DRB1*13:02,*15:01	4,5	n.a.	70000	91	Sp. A	/
aHCV 8	44/m	DRB1*01:01, *03:01	1	1a	90000	1762	cHCV/SVR	peg-IFN/RBV (24 W)
aHCV 9	38/w	DRB1*03:01, 15:06	4,5	3	30500	115	cHCV	/
aHCV 10	39/m	DRB1*04:01, *15:01	2,3	1a	140	51	cHCV/SVR	peg-IFN/RBV (24 W)
Chronische HCV Infektion								
rHCV 11	38/m	DRB1*11:01, *13:02	6	n.a.	Llod	22	/	/
rHCV 12	36/m	DRB1*01:01, *11:01	1	n.a.	Llod	23	/	/
rHCV 13	36/m	DRB1*07:01,*15:01	4,5	n.a.	Llod	43	/	/
rHCV 14	48/w	DRB1*01:01,*-	1	n.a.	Llod	10	/	/
rHCV15	51/w	DRB1*01:01,*14:01	1	n.a.	Llod	48	/	/
rHCV 16	26/m	DRB1*11:02, *12:01	6	n.a.	Llod	86	/	/
rHCV 17	44/m	DRB1*01:01, *27:05	1	n.a.	Llod	20	/	/
rHCV 18	68/m	DRB1*08:03, *11:01	6	n.a.	Llod	30	/	/
Ausgeheilte HCV Infektion								
cHCV 19	65/m	DRB1*11:01,*15:01	6	1a	800000	100	/	/
cHCV 20	60/w	DRB1*04:01, *15:01	2,3	1b	9000000	54	/	/
cHCV 21	28/w	DRB1*13:01, *15:01	4,5	1b	2000000	43	SVR	Ledipasvir/Sofusbuvir (12W)
cHCV 22	56/m	DRB1*11:02, *15:01	6	1a	10000	75	/	/
cHCV 23	63/w	DRB1*07:01, *15:01	4,5	1b	2000000	54	SVR	Ledipasvir/Sofusbuvir (12 W)
cHCV 24	43/m	DRB1*04:04,*15:01	4,5	1b	5230000	128	SVR	Ombitasvir / Paritaprevir / Ritonavir+Dasabuvir (12 W)
cHCV 25	43/w	DRB1*13:01, *15:03	4,5	1a	2884373	43	/	/
cHCV 26	55/m	DRB1*15:01, *13:01	4,5	3a	2775	65	/	/
cHCV 27	40/w	DRB1*03:01,*15:01	4,5	3	4330000	30	/	/
cHCV 28	39/w	DRB1*04:08, *15:02	4,5	3	24300000	50	/	/
cHCV 29	46/m	DRB1*07:01, *15:01	4,5	3	133000000	127	SVR	Sofusbuvir/Velpatasvir

tHCV 30	62/m	DRB1*01:01	1	n.a.	Llod	n.a.	SVR	peg-IFN/RBV (24 W)
tHCV 31	37/m	DRB1*01:01, *07:01	1	3	26	43	SVR	Sofusbuvir/Velpatasvir (12 W)
tHCV 32	37/m	DRB1*15:01, -	4,5	3	Llod	25	SVR	Sofusbuvir/Velpatasvir (12 W)
tHCV 33	52/m	DRB1*01:01, *11:01	6	1a	Llod	107	SVR	Peg-IFN/Ribavirin (48 W)
tHCV 34	39/m	DRB1*07:01, *11:01	6	3	Llod	25	SVR	Sofusbuvir/Velpatasvir (12 W)

Werte sind als Median (ranges) dargestellt; **aHCV**: akute HCV; **cHCV**: chronische HCV; **rHCV**: spontan ausgeheilte HCV **ALT**= Alanin-Aminotransferase; **ID**: Identifikationsnummer; **w/m**: weiblich/männlich; **VL**: Viruslast; **Llod**: unter der Nachweisgrenze (*engl.* Lower level of detection).

Tabelle 10: Detaillierte demographische und klinische Daten der für die HCV MHC-Klasse I Tetramer Analyse benutzten HCV Patienten.

Patienten ID	Alter/ Geschlecht	HLA-Kasse II	Verwendete Tetramere (ID)	Genotyp	VL (IU/ml)	ALT U/l	Klinischer Verlauf	Therapie
aHCV 4	54/w	A*01:01, *24:02	10	3a	30000000	1084	Sp. A	/
aHCV 5	47/w	A*01:01, *24:02	10	n.a.	Llod	63	Sp. A	/
aHCV 7	32/m	A*01:01P, *24:02P	10	n.a.	70000	91	Sp. A	/
aHCV35	36/m	A*02:01P, *32:01P	8,9	1a	60000000	815	cHCV	/
aHCV 10	44/m	A*01:01; -	7	1a	140	51	cHCV	/
rHCV 12	44/m	A*02:01, 25:01	8,9	n.a.	Llod	23	/	/
rHCV 13	43/m	A*01:01, *02:05	7	n.a.	Llod	43	/	/
rHCV 16	32/m	A*02:01, *03:01	8,9	n.a.	Llod	86	/	/
cHCV36	38/w	A*02:01, -	8,9	3a	70000	72	/	/
cHCV37	71/m	A*03:01P, *24:02P	10	1b	10000000	39	/	/
cHCV38	77/w	A*02:01P, *11:01P	8,9	1b	97000	194	/	/
cHCV39	39/w	A*02:01P, *11:01P	8,9	1a	1320000	67	/	/
cHCV 24	43/m	A*03:01P, *24:02P	10	1b	5230000	128	/	/

Werte sind als Median (ranges) dargestellt; **aHCV**: akute HCV; **cHCV**: chronische HCV; **rHCV**: spontan ausgeheilte HCV **ALT**= Alanin-Aminotransferase; **ID**: Identifikationsnummer; **w/m**: weiblich/männlich; **VL**: Viruslast; **Llod**: unter der Nachweisgrenze (*engl.* Lower level of detection).

Tabelle 11: Detaillierte demographische und klinische Daten der gesunden Probanden.

Patienten ID	Alter/ Geschlecht	Infektions- status	HLA-Kasse II	Genotyp	VL (IU/ml)	ALT (U/l)	Analyse im Verlauf	Klinischer Verlauf	Therapie
HC1	47/w	n.a.	DRB1*03:01P, *11	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/
HC2	26/m	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/
HC3	25/w	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/
HC4	26/m	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/
HC5	70/m	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/
HC6	55/w	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/
HC7	22/w	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/
HC8	22/w	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/
HC9	22/w	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/
HC10	51/m	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	nein	n.a.	/

Werte sind als Median (ranges) dargestellt; **ALT**= Alanin-Aminotransferase; **ID**: Identifikationsnummer; w/m: weiblich/männlich; **VL**: Viruslast; **Llod**: unter der Nachweisgrenze (*engl.* Lower level of detection).

7 Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende-Zelle (<i>engl.</i> Antigen presenting cells)
ART	antiretrovirale Therapie
AS	Aminosäuren
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Bp	Basenpaare
BTLA	<i>engl.</i> B- and T-lymphocyte attenuator
BV	Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
c-Maf	<i>engl.</i> Cellular homolog of the avian virus oncogene musculoaponeurotic fibrosarcoma
ca.	Zirka
Ceacam-1	<i>engl.</i> Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CTLA-4	<i>engl.</i> Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DC	Dendritische Zellen (<i>engl.</i> Dendritic cell)
DMSO	Dimethylsulfoxid
CPT	Zell-Präparations-Röhrchen (<i>engl.</i> Cell preparation tube)
DAA-Therapie	Direkt wirkende antivirale Therapie (<i>engl.</i> Direct acting antiviral Therapie)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> Deoxyribonucleic acid)
DNAM-1	<i>engl.</i> DNAX accessory molecule-1
Dep. Fraktion	Depletion Fraktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>engl.</i>	Englisch
Enr-Fraktion	Angereicherte Fraktion
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>engl.</i> Fluorescence-activated cell sorting
FDA	<i>engl.</i> Food and drug administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fötale Kälberserum (<i>engl.</i> Fetal calf serum)
FSC	<i>engl.</i> Forward scatter

g	Gramm
GATA-3	<i>engl.</i> GATA binding protein 3
GWAS	<i>engl.</i> Genome wide association study
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
h	Stunde
HBV	Hepatitis C Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (<i>engl.</i> Hepatocellular carcinoma)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HIV	humanes Immundefizienz Virus
IFN γ	Interferon- γ
IL-	Interleukin-
IU	Internationale Einheiten (<i>engl.</i> International Units)
IRES	<i>engl.</i> Internal ribosomal entry site
LIGHT	<i>engl.</i> Homologous to Lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpes virus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>engl.</i> Magnetic activated cell sorter)
MFI	<i>engl.</i> Mean fluorescence intensity
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl.</i> Major histocompatibility complex)
M	Molar
ml	Milliliter
MS	Multiple Sklerose
n.a.	nicht analysiert
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NS	Nichtstrukturprotein
NCR	nicht-kodierenden-Regionen (<i>engl.</i> Non-coding-region)
ORF	Offener Leserahmen (<i>engl.</i> Open reading frame)
OX40	auch bekannt unter CD134 und TNFRSF4 (<i>engl.</i> Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4)
p	statistische Wahrscheinlichkeit, pico, Protein
Pamps	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>engl.</i> Pathogen-associated molecular pattern)
PBMC	<i>engl.</i> Peripheral blood mononuclear cell

PBS	<i>engl.</i> Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCp-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Complex-Cy5.5®
PFA	Paraformaldehyd
PD-1	<i>engl.</i> Programmed cell death-1
PD-1L	<i>engl.</i> Programmed cell death-ligand 1
Pre-Fraktion	Zellfraktion vor der Tetrameranreicherung
PRR	<i>engl.</i> Pattern recognition receptor
PVR	Poliovirus Rezeptor (<i>engl.</i> Polivirus receptor)
PVRL2	Poliovirus Rezeptor-Ligand 2 (<i>engl.</i> Polivirus receptor-related 2)
RGMb	<i>engl.</i> Repulsive guidance molecule BMP co-receptor b
RPM	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> Revolutions per minute)
RPMI	Zellkultur Medium (<i>engl.</i> Roswell Park Memorial Institute)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> Ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
SNP	<i>engl.</i> Single nucleotide polymorphism
Sp.A	Spontan Ausgeheilt
SSC	<i>engl.</i> Side scatter
STAT	<i>engl.</i> Signal transducer and activator of transcription
TGF- β	<i>engl.</i> Transforming growth factor β
TIGIT	<i>engl.</i> T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
Tim-3	<i>engl.</i> T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3
TNF α	Tumornekrosefaktor α
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
V	Volt
VL	Viruslast
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

8 Referenzen

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), 787–793. <https://doi.org/10.1038/383787a0>
- Abdelwahab, K. S., & Ahmed Said, Z. N. (2016). Status of hepatitis C virus vaccination: Recent update. *World Journal of Gastroenterology*, 22(2), 862–873. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.862>
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Ahmed, R., & Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5258), 54–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600537>
- Ait-Goughoulte, M., Hourieux, C., Patient, R., Trassard, S., Brand, D., & Roingeard, P. (2006). Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. *Journal of General Virology*, 87(4), 855–860. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81664-0>
- Akbar, A. N., Terry, L., Timms, A., Beverley, P. C., & Janossy, G. (1988). Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(7), 2171–2178. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2965180>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. Garland Science.
- Alfei, F., & Zehn, D. (2017). T Cell Exhaustion: An Epigenetically Imprinted Phenotypic and Functional Makeover. *Trends in Molecular Medicine*, 23(9), 769–771. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2017.07.006>
- Ali, N., & Rosenblum, M. D. (2017). Regulatory T cells in skin. *Immunology*, 152(3), 372–381. <https://doi.org/10.1111/imm.12791>
- Alric, L., Fort, M., Izopet, J., Vinel, J. P., Charlet, J. P., Selves, J., ... Abbal, M. (1997). Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 113(5), 1675–1681. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352872>
- Alter, H. J., Purcell, R. H., Shih, J. W., Melpolder, J. C., Houghton, M., Choo, Q.-L., & Kuo, G. (1989). Detection of Antibody to Hepatitis C Virus in Prospectively Followed Transfusion Recipients with Acute and Chronic Non-A, Non-B Hepatitis. *New England Journal of Medicine*, 321(22), 1494–1500. <https://doi.org/10.1056/NEJM198911303212202>
- Anderson, A. C., Joller, N., & Kuchroo, V. K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, 44(5), 989–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>
- André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., ... Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of Virology*, 76(14), 6919–6928. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072493>
- Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B., & Rao, A. (2006). REGULATION OF TH2 DIFFERENTIATION AND *IL4* LOCUS ACCESSIBILITY. *Annual Review of Immunology*, 24(1), 607–656. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115821>
- Araujo, A. C., Astrakhantseva, I. V., Fields, H. A., & Kamili, S. (2011). Distinguishing acute from chronic hepatitis C virus (HCV) infection based on antibody reactivities to specific HCV structural and nonstructural proteins. *J Clin Microbiol*, 49(1).
- Armstrong, G. L., Wasley, A., Simard, E. P., McQuillan, G. M., Kuhnert, W. L., & Alter, M. J. (2006). The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Annals of Internal Medicine*, 144(10), 705–714. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702586>
- Asano, T., Kishi, Y., Meguri, Y., Yoshioka, T., Iwamoto, M., Maeda, Y., ... Matsuoka, K.-I. (2015). PD-1 Signaling Has a Critical Role in Maintaining Regulatory T Cell Homeostasis; Implication for Treg Depletion Therapy By PD-1 Blockade. *Blood*, 126(23). Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/848?sso-checked=true>
- Aujla, S. J., Dubin, P. J., & Kolls, J. K. (2007). Th17 cells and mucosal host defense. *Seminars in Immunology*, 19(6), 377–382. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2007.10.009>
- Azizi, G., Yazdani, R., & Mirshafiey, A. (2015). Th22 cells in autoimmunity: a review of current knowledge. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 47(4), 108–117. Retrieved

from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26159476>

- Bailey, S. R., Nelson, M. H., Himes, R. A., Li, Z., Mehrotra, S., & Paulos, C. M. (2014). Th17 Cells in Cancer: The Ultimate Identity Crisis. *Frontiers in Immunology*, 5, 276. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00276>
- Barathan, M., Mohamed, R., Vadivelu, J., Chang, L. Y., Vignesh, R., Krishnan, J., ... Shankar, E. M. (2017). CD8+ T cells of chronic HCV-infected patients express multiple negative immune checkpoints following stimulation with HCV peptides. *Cellular Immunology*, 313, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.12.002>
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., ... Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077), 682–687. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T., & Koch, J. O. (1995). Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *Journal of Virology*, 69(12), 7519–7528. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7494258>
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., & André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology*, 19(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.005>
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., ... Cosset, F.-L. (2003). Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41624–41630. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305289200>
- Basu, R., O'Quinn, D. B., Silberger, D. J., Schoeb, T. R., Fouser, L., Ouyang, W., ... Weaver, C. T. (2012). Th22 Cells Are an Important Source of IL-22 for Host Protection against Enteropathogenic Bacteria. *Immunity*, 37(6), 1061–1075. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2012.08.024>
- Bedoui, S., Gebhardt, T., Gasteiger, G., & Kastenmüller, W. (2016). Parallels and differences between innate and adaptive lymphocytes. *Nature Immunology*, 17(5), 490–494. <https://doi.org/10.1038/ni.3432>
- Belkaid, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews*

- Immunology*, 7(11), 875–888. <https://doi.org/10.1038/nri2189>
- Bensch, B., Martin, B., & Thimme, R. (2014). Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. *Journal of Hepatology*, 61(6), 1212–1219. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2014.07.005>
- Benham, H., Norris, P., Goodall, J., Wechalekar, M. D., FitzGerald, O., Szentpetery, A., ... Gaston, H. (2013). Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Research & Therapy*, 15(5), R136. <https://doi.org/10.1186/ar4317>
- Bergmann, C., Strauss, L., Wang, Y., Szczepanski, M. J., Lang, S., Johnson, J. T., & Whiteside, T. L. (2008). T Regulatory Type 1 Cells in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Mechanisms of Suppression and Expansion in Advanced Disease. *Clinical Cancer Research*, 14(12), 3706–3715. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5126>
- Bixler, S. L., & Mattapallil, J. J. (2013). Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013, 852418. <https://doi.org/10.1155/2013/852418>
- Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., ... Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, 10(1), 29–37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>
- Boehm, T., & Bleul, C. C. (2006). Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends in Immunology*, 27(10), 477–484. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2006.08.004>
- Boettler, T., Moeckel, F., Cheng, Y., Heeg, M., Salek-Ardakani, S., Crotty, S., ... von Herrath, M. G. (2012). OX40 Facilitates Control of a Persistent Virus Infection. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002913. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002913>
- Bolacchi, F., Sinistro, A., Ciapriani, C., Demin, F., Capozzi, M., Carducci, F. C., ... Bergamini, A. (2006). Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25 + regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clinical and Experimental Immunology*, 144(2), 188–196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03048.x>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Born, W. K., Kemal Aydintug, M., & O'Brien, R. L. (2013). Diversity of $\gamma\delta$ T-cell antigens. *Cellular and Molecular Immunology*, 10(1), 13–20. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.45>

- Bowen, D. G., & Walker, C. M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, *436*(7053), 946–952. <https://doi.org/10.1038/nature04079>
- Braciale, T. J., Morrison, L. A., Sweetser, M. T., Sambrook, J., Gething, M.-J., & Braciale, V. L. (1987). Antigen Presentation Pathways to Class I and Class II MHC-Restricted T Lymphocytes. *Immunological Reviews*, *98*(1), 95–114. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1987.tb00521.x>
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q. M., Hwu, W.-J., Topalian, S. L., Hwu, P., ... Wigginton, J. M. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine*, *366*(26), 2455–2465. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200694>
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F. A., & De Francesco, R. (2002). Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *Journal of Virology*, *76*(7), 3482–3492. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884572>
- Brodin, P., & Davis, M. M. (2017). Human immune system variation. *Nature Reviews. Immunology*, *17*(1), 21–29. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.125>
- Brooks, D. G., Trifilo, M. J., Edelmann, K. H., Teyton, L., McGavern, D. B., & Oldstone, M. B. A. (2006). Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature Medicine*, *12*(11), 1301–1309. <https://doi.org/10.1038/nm1492>
- Buchbinder, E. I., & Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American Journal of Clinical Oncology*, *39*(1), 98–106. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000239>
- Bukh, J., Miller, R., & Purcell, R. (1995). Genetic Heterogeneity of Hepatitis C Virus: Quasispecies and Genotypes. *Seminars in Liver Disease*, *15*(01), 41–63. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007262>
- Butcher, E. C., & Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science (New York, N. Y.)*, *272*(5258), 60–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600538>
- Butler, N. S., Moebius, J., Pewe, L. L., Traore, B., Doumbo, O. K., Tygrett, L. T., ... Harty, J. T. (2012). Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nature Immunology*, *13*(2), 188–195. <https://doi.org/10.1038/ni.2180>
- Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R. J., Rosen, H. R., Liu, C., & Nelson, D. R. (2004). An

- immunomodulatory role for CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 40(5), 1062–1071. <https://doi.org/10.1002/hep.20454>
- Cacoub, P., Comarmond, C., Domont, F., Savey, L., Desbois, A. C., & Saadoun, D. (2016). Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), 3–14. <https://doi.org/10.1177/2049936115585942>
- Cacoub, P., Poynard, T., Ghillani, P., Charlotte, F., Olivi, M., Charles Piette, J., & Opolon, P. (1999). Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. *Arthritis & Rheumatism*, 42(10), 2204–2212. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199910\)42:10<2204::AID-ANR24>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199910)42:10<2204::AID-ANR24>3.0.CO;2-D)
- Cai, C. W., Blase, J. R., Zhang, X., Eickhoff, C. S., & Hoft, D. F. (2016). Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 12(10), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005902>
- Campbell, J. J., Murphy, K. E., Kunkel, E. J., Brightling, C. E., Soler, D., Shen, Z., ... Wu, L. (2001). CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(2), 877–884. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145663>
- Carlsten, M., Björkström, N. K., Norell, H., Bryceson, Y., van Hall, T., Baumann, B. C., ... Malmberg, K.-J. (2007). DNAX Accessory Molecule-1 Mediated Recognition of Freshly Isolated Ovarian Carcinoma by Resting Natural Killer Cells. *Cancer Research*, 67(3), 1317–1325. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2264>
- Carrasco, J., Godelaine, D., Van Pel, A., Boon, T., & van der Bruggen, P. (2006). CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. *Blood*, 108(9), 2897–2905. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-007237>
- Casey, L. C., & Lee, W. M. (2013). Hepatitis C virus therapy update 2013. *Current Opinion in Gastroenterology*, 29(3), 1. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32835ff972>
- Castriconi, R., Dondero, A., Corrias, M. V., Lanino, E., Pende, D., Moretta, L., ... Moretta, A. (2004). Natural Killer Cell-Mediated Killing of Freshly Isolated Neuroblastoma Cells. *Cancer Research*, 64(24), 9180–9184. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2682>
- Caza, T., & Landas, S. (2015). Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *BioMed Research International*, 2015, 521957. <https://doi.org/10.1155/2015/521957>

- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., & Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine*, *5*(8), 919–923. <https://doi.org/10.1038/11360>
- Cella, M., Presti, R., Vermi, W., Lavender, K., Turnbull, E., Ochsenbauer-Jambor, C., ... NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology. (2010). Loss of DNAM-1 contributes to CD8⁺ T-cell exhaustion in chronic HIV-1 infection. *European Journal of Immunology*, *40*(4), 949–954. <https://doi.org/10.1002/eji.200940234>
- Chan, C. J., Andrews, D. M., & Smyth, M. J. (2012). Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Current Opinion in Immunology*, *24*(2), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.01.009>
- Chang, J. T., Wherry, E. J., & Goldrath, A. W. (2014). Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nature Immunology*, *15*(12), 1104–1115. <https://doi.org/10.1038/ni.3031>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 Suppl 2), S3-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). Principles of innate and adaptive immunity. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>
- Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J.-M., ... Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*, *34*(4), 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>
- Chauvin, J.-M., Pagliano, O., Fourcade, J., Sun, Z., Wang, H., Sander, C., ... Zarour, H. M. (2015). TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(5), 2046–2058. <https://doi.org/10.1172/JCI80445>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, *13*(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chew, G. M., Fujita, T., Webb, G. M., Burwitz, B. J., Wu, H. L., Reed, J. S., ... Ndhlovu, L. C. (2016). TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLOS Pathogens*, *12*(1), e1005349. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005349>
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation

- of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science (New York, N.Y.)*, *244*(4902), 359–362. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2523562>
- Ciofani, M., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2010). Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development. *Nature Reviews Immunology*, *10*(9), 657–663. <https://doi.org/10.1038/nri2820>
- Cooper, A. M. (2009). T cells in mycobacterial infection and disease. *Current Opinion in Immunology*, *21*(4), 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.06.004>
- Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell*, *124*(4), 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>
- Core Concepts - Natural History of Hepatitis C Infection - Evaluation, Staging, and Monitoring of Chronic Hepatitis C - Hepatitis C Online. (n.d.). Retrieved February 21, 2019, from <https://www.hepatitisc.uw.edu/go/evaluation-staging-monitoring/natural-history/core-concept/all#summary-points>
- Cox, A. L., Mosbruger, T., Lauer, G. M., Pardoll, D., Thomas, D. L., & Ray, S. C. (2005). Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology*, *42*(1), 104–112. <https://doi.org/10.1002/hep.20749>
- Cox, A. L., Netski, D. M., Mosbruger, T., Sherman, S. G., Strathdee, S., Ompad, D., ... Thomas, D. L. (2005). Prospective Evaluation of Community- Acquired Acute- Phase Hepatitis C Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*, *40*(7), 951–958. <https://doi.org/10.1086/428578>
- Crawford, A., Angelosanto, J. M., Kao, C., Doering, T. A., Odorizzi, P. M., Barnett, B. E., & Wherry, E. J. (2014). Molecular and Transcriptional Basis of CD4+ T Cell Dysfunction during Chronic Infection. *Immunity*, *40*(2), 289–302. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.005>
- Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}). *Annual Review of Immunology*, *29*(1), 621–663. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>
- Curiel, T. J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., ... Zou, W. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nature Medicine*, *9*(5), 562–567. <https://doi.org/10.1038/nm863>
- da Costa Lima Caniatti, M. C., Borelli, S. D., Guilherme, A. L. F., & Tsuneto, L. T. (2017). Association between HLA genes and dust mite sensitivity in a Brazilian population. *Human Immunology*, *78*(2), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.10.014>

- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., ... Kuchroo, V. K. (2008). IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3+T cells and, together with TGF- β , generates IL-9+IL-10+Foxp3-effector T cells. *Nature Immunology*, 9(12), 1347–1355. <https://doi.org/10.1038/ni.1677>
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., ... Walker, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443(7109), 350–354. <https://doi.org/10.1038/nature05115>
- Day, C. L., Lauer, G. M., Robbins, G. K., McGovern, B., Wurcel, A. G., Gandhi, R. T., ... Walker, B. D. (2002). Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, 76(24), 12584–12595. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438584>
- Day, C. L., Seth, N. P., Lucas, M., Appel, H., Gauthier, L., Lauer, G. M., ... Wucherpfennig, K. W. (2003). Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *Journal of Clinical Investigation*, 112(6), 831–842. <https://doi.org/10.1172/JCI18509>
- Dazert, E., Neumann-Haefelin, C., Bressanelli, S., Fitzmaurice, K., Kort, J., Timm, J., ... Thimme, R. (2009). Loss of viral fitness and cross-recognition by CD8+ T cells limit HCV escape from a protective HLA-B27-restricted human immune response. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(2), 376–386. <https://doi.org/10.1172/JCI36587>
- De Luca, A., Bianco, C., & Rossetti, B. (2014). Treatment of HCV infection with the novel NS3/4A protease inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.07.016>
- Di Martino, V., Richou, C., Cervoni, J.-P., Sanchez-Tapias, J. M., Jensen, D. M., Mangia, A., ... Thévenot, T. (2011). Response-guided peg-interferon plus ribavirin treatment duration in chronic hepatitis C: Meta-analyses of randomized, controlled trials and implications for the future. *Hepatology*, 54(3), 789–800. <https://doi.org/10.1002/hep.24480>
- Diefenbach, A., Colonna, M., & Koyasu, S. (2014). Development, Differentiation, and Diversity of Innate Lymphoid Cells. *Immunity*, 41(3), 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.005>
- Diepolder, H. M., Zachoval, R., Hoffmann, R. M., Wierenga, E. A., Santantonio, T., Jung, M. C., ... Pape, G. R. (1995). Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-

- structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet (London, England)*, 346(8981), 1006–1007. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7475549>
- Diller, M. L., Kudchadkar, R. R., Delman, K. A., Lawson, D. H., & Ford, M. L. (2016). Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/6309219>
- Djuretic, I. M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., & Ansel, K. M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nature Immunology*, 8(2), 145–153. <https://doi.org/10.1038/ni1424>
- Dong, C. (2008). TH17 cells in development: An updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 337–348. <https://doi.org/10.1038/nri2295>
- Douek, D. C., Picker, L. J., & Koup, R. A. (2003). T CELL DYNAMICS IN HIV-1 INFECTION. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 265–304. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141053>
- Du, Y., Shen, L.-X., Yu, L.-K., Song, Y., Zhu, J.-F., & Du, R. (2012). The CD226 gene in susceptibility of rheumatoid arthritis in the Chinese Han population. *Rheumatology International*, 32(5), 1299–1304. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-1796-z>
- Duggal, P., Thio, C. L., Wojcik, G. L., Goedert, J. J., Mangia, A., Latanich, R., ... Thomas, D. L. (2013). Genome-Wide Association Study of Spontaneous Resolution of Hepatitis C Virus Infection: Data From Multiple Cohorts. *Annals of Internal Medicine*, 158(4), 235. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-4-201302190-00003>
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*, 10(8), 857–863. <https://doi.org/10.1038/ni.1767>
- Dusheiko, G. (1997). Side effects of ? interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 26(S3), 112S–121S. <https://doi.org/10.1002/hep.510260720>
- Dyavar Shetty, R., Velu, V., Titanji, K., Bosinger, S. E., Freeman, G. J., Silvestri, G., & Amara, R. R. (2012). PD-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. *Journal of Clinical Investigation*, 122(5), 1712–

1716. <https://doi.org/10.1172/JCI60612>
- Eaves, C. J. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, *125*(17), 2605–2613. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>
- Eckels, D. D., Wang, H., Bian, T. H., Tabatabai, N., & Gill, J. C. (2000). Immunobiology of hepatitis C virus (HCV) infection: the role of CD4 T cells in HCV infection. *Immunological Reviews*, *174*, 90–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807509>
- El-Sherbiny, Y. M., Meade, J. L., Holmes, T. D., McGonagle, D., Mackie, S. L., Morgan, A. W., ... Cook, G. P. (2007). The Requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the Natural Killer Cell-Mediated Killing of Myeloma Cells. *Cancer Research*, *67*(18), 8444–8449. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4230>
- Elsaesser, H., Sauer, K., & Brooks, D. G. (2009). IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5934), 1569–1572. <https://doi.org/10.1126/science.1174182>
- Falade-Nwulia, O., Sutcliffe, C., Moon, J., Chander, G., Wansom, T., Keruly, J., ... Sulkowski, M. (2017). High hepatitis C cure rates among black and nonblack human immunodeficiency virus-infected adults in an urban center. *Hepatology*, *66*(5), 1402–1412. <https://doi.org/10.1002/hep.29308>
- Farnik, H., Lange, C. M., Sarrazin, C., Kronenberger, B., Zeuzem, S., & Herrmann, E. (2010). Meta-analysis Shows Extended Therapy Improves Response of Patients With Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *8*(10), 884–890. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.06.019>
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J., & Holland, P. V. (1975). Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *New England Journal of Medicine*, *292*(15), 767–770. <https://doi.org/10.1056/NEJM197504102921502>
- Fitzmaurice, K., Hurst, J., Dring, M., Rauch, A., McLaren, P. J., Günthard, H. F., ... Swiss HIV Cohort Study. (2015). Additive effects of HLA alleles and innate immune genes determine viral outcome in HCV infection. *Gut*, *64*(5), 813–819. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306287>
- Fleming, V. M., Harcourt, G., Barnes, E., & Klenerman, P. (2010). Virological footprint of CD4+ T-cell responses during chronic hepatitis C virus infection. *Journal of General Virology*, *91*(6), 1396–1406. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017699-0>

- Forns, X., Lee, S. S., Valdes, J., Lens, S., Ghalib, R., Aguilar, H., ... Mensa, F. J. (2017). Glecaprevir plus pibrentasvir for chronic hepatitis C virus genotype 1, 2, 4, 5, or 6 infection in adults with compensated cirrhosis (EXPEDITION-1): a single-arm, open-label, multicentre phase 3 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(10), 1062–1068. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30496-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30496-6)
- Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3015–3029. <https://doi.org/10.1084/jem.20090847>
- Freeman, G. J., Wherry, E. J., Ahmed, R., & Sharpe, A. H. (2006). Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1–PD-1 ligand blockade. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), 2223–2227. <https://doi.org/10.1084/JEM.20061800>
- Frohlich, A., Kisielow, J., Schmitz, I., Freigang, S., Shamshiev, A. T., Weber, J., ... Kopf, M. (2009). IL-21R on T Cells Is Critical for Sustained Functionality and Control of Chronic Viral Infection. *Science*, 324(5934), 1576–1580. <https://doi.org/10.1126/science.1172815>
- Fromentin, R., Bakeman, W., Lawani, M. B., Khoury, G., Hartogensis, W., DaFonseca, S., ... Chomont, N. (2016). CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLOS Pathogens*, 12(7), e1005761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005761>
- Fu, H., Ward, E. J., & Marelli-Berg, F. M. (2016). Mechanisms of T cell organotropism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(16), 3009–3033. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2211-4>
- Fuertes Marraco, S. A., Neubert, N. J., Verdeil, G., & Speiser, D. E. (2015). Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Frontiers in Immunology*, 6, 310. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00310>
- Fuhrman, C. A., Yeh, W.-I., Seay, H. R., Saikumar Lakshmi, P., Chopra, G., Zhang, L., ... Brusko, T. M. (2015). Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226. *The Journal of Immunology*, 195(1), 145–155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402381>
- Fujii, Y., Okumura, M., Inada, K., Nakahara, K., & Matsuda, H. (1992). CD45 isoform expression during T cell development in the thymus. *European Journal of Immunology*, 22(7), 1843–

1850. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220725>
- Fujita, H. (2012). [Role of IL-22 in the pathogenesis of skin diseases]. *Nihon Rinsho Men'eki Gakkai Kaishi = Japanese Journal of Clinical Immunology*, 35(3), 168–175. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790576>
- Fujita, T., Burwitz, B. J., Chew, G. M., Reed, J. S., Pathak, R., Seger, E., ... Ndhlovu, L. C. (2014). Expansion of dysfunctional Tim-3-expressing effector memory CD8+ T cells during simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(11), 5576–5583. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400961>
- Fuller, M. J., Khanolkar, A., Tebo, A. E., & Zajac, A. J. (2004). Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(7), 4204–4214. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.172.7.4204>
- Fuller, M. J., Shoukry, N. H., Gushima, T., Bowen, D. G., Callendret, B., Campbell, K. J., ... Walker, C. M. (2010). Selection-driven immune escape is not a significant factor in the failure of CD4 T cell responses in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 51(2), 378–387. <https://doi.org/10.1002/hep.23319>
- Gagliani, N., Magnani, C. F., Huber, S., Gianolini, M. E., Pala, M., Licona-Limon, P., ... Roncarolo, M.-G. (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature Medicine*, 19(6), 739–746. <https://doi.org/10.1038/nm.3179>
- Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A. C., Plückthun, A., Elliott, T., ... Zinkernagel, R. (1998). Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-specific Cytotoxic T Lymphocytes Visualized Using Soluble Tetrameric Major Histocompatibility Complex Class I–Peptide Complexes. *Journal of Experimental Medicine*, 187(9), 1383–1393. <https://doi.org/10.1084/JEM.187.9.1383>
- Gattinoni, L., Klebanoff, C. A., & Restifo, N. P. (2012). Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 671–684. <https://doi.org/10.1038/nrc3322>
- Gay, C. L., Bosch, R. J., Ritz, J., Hataye, J. M., Aga, E., Tressler, R. L., ... AIDS Clinical Trials 5326 Study Team. (2017). Clinical Trial of the Anti-PD-L1 Antibody BMS-936559 in HIV-1 Infected Participants on Suppressive Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(11), 1725–1733. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix191>

- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., ... Goldstein, D. B. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, *461*(7262), 399–401. <https://doi.org/10.1038/nature08309>
- Geem, D., Harusato, A., Flannigan, K., & Denning, T. L. (2015). Harnessing Regulatory T Cells for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(6), 1. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000343>
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., ... Pape, G. R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, *117*(4), 933–941. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500077>
- Golden-Mason, L., Palmer, B. E., Kassam, N., Townshend-Bulson, L., Livingston, S., McMahon, B. J., ... Rosen, H. R. (2009). Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4+ and CD8+ T Cells. *Journal of Virology*, *83*(18), 9122–9130. <https://doi.org/10.1128/JVI.00639-09>
- Golden-Mason, L., Palmer, B., Klarquist, J., Mengshol, J. A., Castelblanco, N., & Rosen, H. R. (2007). Upregulation of PD-1 Expression on Circulating and Intrahepatic Hepatitis C Virus-Specific CD8+ T Cells Associated with Reversible Immune Dysfunction. *Journal of Virology*, *81*(17), 9249–9258. <https://doi.org/10.1128/JVI.00409-07>
- Goswami, R. (2017). Th9 Cells: New Member of T Helper Cell Family. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1585, pp. 1–19). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6877-0_1
- Grabmeier-Pfistershammer, K., Stecher, C., Zettl, M., Roskopf, S., Rieger, A., Zlabinger, G. J., & Steinberger, P. (2017). Antibodies targeting BTLA or TIM-3 enhance HIV-1 specific T cell responses in combination with PD-1 blockade. *Clinical Immunology*, *183*, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.09.002>
- Grakoui, A., Shoukry, N. H., Woollard, D. J., Han, J.-H., Hanson, H. L., Ghayeb, J., ... Walker, C. M. (2003). HCV Persistence and Immune Evasion in the Absence of Memory T Cell Help. *Science*, *302*(5645), 659–662. <https://doi.org/10.1126/science.1088774>
- Grebely, J., Prins, M., Hellard, M., Cox, A. L., Osburn, W. O., Lauer, G., ... International Collaboration of Incident HIV and Hepatitis C in Injecting Cohorts (InC3). (2012). Hepatitis C virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: towards a vaccine. *The Lancet Infectious Diseases*, *12*(5), 408–414.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70010-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70010-5)

- Grogan, J., Johnston, R., Comps-Agrar, L., Hackney, J., Yu, X., Huseni, M., ... Park, S. (2014). TIGIT inhibits CD8+ T cell effector function during chronic viral infection and cancer (TUM7P.933). *The Journal of Immunology*, 192(1 Supplement).
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652), 737–742. <https://doi.org/10.1038/39614>
- Gruener, N. H., Lechner, F., Jung, M.-C., Diepolder, H., Gerlach, T., Lauer, G., ... Klenerman, P. (2001). Sustained Dysfunction of Antiviral CD8+ T Lymphocytes after Infection with Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 75(12), 5550–5558. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5550-5558.2001>
- Grüner, N. H., Gerlach, T. J., Jung, M., Diepolder, H. M., Schirren, C. A., Schraut, W. W., ... Pape, G. R. (2000). Association of Hepatitis C Virus–Specific CD8 + T Cells with Viral Clearance in Acute Hepatitis C. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1528–1536. <https://doi.org/10.1086/315450>
- Guillerey, C., Harjunpää, H., Carrié, N., Kassem, S., Teo, T., Miles, K., ... Smyth, M. J. (2018). TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8 + T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood*, 132(16), 1689–1694. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-825265>
- Hadziyannis, S. J., Sette, H., Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., ... Ackrill, A. M. (2004). Peginterferon- α 2a and Ribavirin Combination Therapy in Chronic Hepatitis C. *Annals of Internal Medicine*, 140(5), 346. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-5-200403020-00010>
- Hafler, J. P., Maier, L. M., Cooper, J. D., Plagnol, V., Hinks, A., Simmonds, M. J., ... Todd, J. A. (2009). CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes & Immunity*, 10(1), 5–10. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.82>
- Hajarizadeh, B., Grebely, J., & Dore, G. J. (2012). Case definitions for acute hepatitis C virus infection: A systematic review. *Journal of Hepatology*, 57(6), 1349–1360. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.07.007>
- Hajarizadeh, B., Grebely, J., & Dore, G. J. (2013). Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(9), 553–562.

- <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.107>
- Hallager, S., Brehm Christensen, P., Ladelund, S., Rye Clausen, M., Lund Laursen, A., Møller, A., ... Weis, N. (2016). Mortality in patients with Chronic Hepatitis C and cirrhosis compared to the general population – a Danish cohort study. *Journal of Infectious Diseases*, 215(2), jiw527. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw527>
- Han, S., Asoyan, A., Rabenstein, H., Nakano, N., & Obst, R. (2010). Role of antigen persistence and dose for CD4+ T-cell exhaustion and recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(47), 20453–20458. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008437107>
- Hao, C., Zhou, Y., He, Y., Fan, C., Sun, L., Wei, X., ... Jia, Z. (2014). Imbalance of regulatory T cells and T helper type 17 cells in patients with chronic hepatitis C. *Immunology*, 143(4), 531–538. <https://doi.org/10.1111/imm.12330>
- Harris, R. A., Sugimoto, K., Kaplan, D. E., Ikeda, F., Kamoun, M., & Chang, K. (2008). Human leukocyte antigen class II associations with hepatitis C virus clearance and virus-specific CD4 T cell response among Caucasians and African Americans. *Hepatology*, 48(1), 70–79. <https://doi.org/10.1002/hep.22287>
- Heintges, T., & Wands, J. R. (1997). Hepatitis C virus: Epidemiology and transmission. *Hepatology*, 26(3), 521–526. <https://doi.org/10.1002/hep.510260338>
- Herod, M. R., Jones, D. M., McLauchlan, J., & McCormick, C. J. (2012). Increasing Rate of Cleavage at Boundary between Non-structural Proteins 4B and 5A Inhibits Replication of Hepatitis C Virus. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 568–580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.311407>
- Hewitt, E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, 110(2), 163–169. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2567.2003.01738.X>
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., ... Urba, W. J. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(8), 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- Hoe, E., Anderson, J., Nathanielsz, J., Toh, Z. Q., Marimla, R., Balloch, A., & Licciardi, P. V. (2017). The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease. *Microbiology and Immunology*, 61(2), 49–56. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12471>

- Holz, L., & Rehermann, B. (2015). T cell responses in hepatitis C virus infection: Historical overview and goals for future research. *Antiviral Research*, *114*, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.11.009>
- Hori, Shohei Nomura, Taskashi Sakagchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*, *299*(February), 1057–1061. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>
- Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., ... Lohoff, M. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8⁺ Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *European Journal of Immunology*, *39*(7), 1716–1725. <https://doi.org/10.1002/eji.200939412>
- Hung, A. L., Maxwell, R., Theodros, D., Belcaid, Z., Mathios, D., Luksik, A. S., ... Lim, M. (2018). TIGIT and PD-1 dual checkpoint blockade enhances antitumor immunity and survival in GBM. *Oncoimmunology*, *7*(8), e1466769. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1466769>
- Inozume, T., Yaguchi, T., Furuta, J., Harada, K., Kawakami, Y., & Shimada, S. (2016). Co-blockade of TIGIT and PD-1 signals in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes is an effective anti-melanoma therapy. *Journal of Dermatological Science*, *84*(1), e155. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.08.461>
- Irvine, B., Yap, P. L., Kolberg, J., Chan, S.-W., Cha, T.-A., Simmonds, P., ... McOmish, F. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology*, *74*(11), 2391–2399. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-11-2391>
- Itose, I., Kanto, T., Kakita, N., Takebe, S., Inoue, M., Higashitani, K., ... Hayashi, N. (2009). Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis*, *16*(12), 844–852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01131.x>
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., ... Littman, D. R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells. *Cell*, *126*(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.07.035>
- Iwai, Y., Terawaki, S., & Honjo, T. (2004). PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International Immunology*, *17*(2), 133–144. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh194>

- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- Jacobson, I. M., McHutchison, J. G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A. M., Reddy, K. R., Bzowej, N. H., ... ADVANCE Study Team. (2011). Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine*, 364(25), 2405–2416. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012912>
- Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E., & Kuchroo, V. K. (2009). Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. *The Journal of Immunology*, 183(11), 7169–7177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901906>
- Jameson, S. C., & Masopust, D. (2018). Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*, 48(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.010>
- Janeway, C. A. (1991). The co-receptor function of CD4. *Seminars in Immunology*, 3(3), 153–160. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1716173>
- Jang, S., & Venna, S. (2017). Antitumor and Anti-Hepatitis C Viral Response After Administration of the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab. *Journal of Oncology Practice*, 13(7), 462–464. <https://doi.org/10.1200/JOP.2016.019224>
- Jia, L., & Wu, C. (2014). The Biology and Functions of Th22 Cells (pp. 209–230). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9487-9_8
- Jin, H.-T., Ahmed, R., & Okazaki, T. (2010). Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 350, pp. 17–37). https://doi.org/10.1007/82_2010_116
- Jo, J., Aichele, U., Kersting, N., Klein, R., Aichele, P., Bisse, E., ... Thimme, R. (2009). Analysis of CD8+ T-Cell-Mediated Inhibition of Hepatitis C Virus Replication Using a Novel Immunological Model. *Gastroenterology*, 136(4), 1391–1401. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.034>
- Johnston, R. J., Comps-Agrar, L., Hackney, J., Yu, X., Huseni, M., Yang, Y., ... Grogan, J. L. (2014). The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8+ T Cell Effector Function. *Cancer Cell*, 26(6), 923–937. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2014.10.018>
- Johnston, R. J., Poholek, A. C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., ... Crotty, S. (2009).

- Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science*, 325(5943), 1006–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1175870>
- Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., ... Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunology*, 2(4), 301–306. <https://doi.org/10.1038/86302>
- Kaech, S. M., & Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 12(11), 749–761. <https://doi.org/10.1038/nri3307>
- Kahan, S. M., Wherry, E. J., & Zajac, A. J. (2015). T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*, 479–480, 180–193. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.12.033>
- Kalams, S. A., & Walker, B. D. (1998). The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(12), 2199–2204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858506>
- Kaplan, M. H., Hufford, M. M., & Olson, M. R. (2015). The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(5), 295–307. <https://doi.org/10.1038/nri3824>
- Kared, H., Fabre, T., Bédard, N., Bruneau, J., & Shoukry, N. H. (2013). Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C. *PLoS Pathogens*, 9(6), e1003422. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003422>
- Kasprowicz, V., Schulze Zur Wiesch, J., Kuntzen, T., Nolan, B. E., Longworth, S., Berical, A., ... Lauer, G. M. (2008). High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *Journal of Virology*, 82(6), 3154–3160. <https://doi.org/10.1128/JVI.02474-07>
- Keck, M.-L., Wrensch, F., Pierce, B. G., Baumert, T. F., & Fong, S. K. H. (2018). Mapping Determinants of Virus Neutralization and Viral Escape for Rational Design of a Hepatitis C Virus Vaccine. *Frontiers in Immunology*, 9, 1194. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01194>
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*, 26(1), 677–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
- Kersey, J. H., & Gajl-Peczalska, J. (1975). T and B lymphocytes in humans. A review. *The American Journal of Pathology*, 81(2), 446–458. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1081344>
- Khader, S. A., Gaffen, S. L., & Kolls, J. K. (2009). Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunology*, 2(5), 403–411. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.100>
- Kim, A. Y., Lauer, G. M., Ouchi, K., Addo, M. M., Lucas, M., Schulze Zur Wiesch, J., ... Walker, B. D. (2005). The magnitude and breadth of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells depend on absolute CD4+ T-cell count in individuals coinfecting with HIV-1. *Blood*, 105(3), 1170–1178. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2336>
- Klenerman, P., & Hill, A. (2005). T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nature Immunology*, 6(9), 873–879. <https://doi.org/10.1038/ni1241>
- Kogure, T., Ueno, Y., Kanno, N., Fukushima, K., Yamagiwa, Y., Nagasaki, F., ... Shimosegawa, T. (2006). Sustained viral response of a case of acute hepatitis C virus infection via needle-stick injury. *World Journal of Gastroenterology*, 12(29), 4757–4760. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16937453>
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *Journal of Virology*, 74(4), 2046–2051. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10644379>
- Kong, Y., Zhu, L., Schell, T. D., Zhang, J., Claxton, D. F., Ehmann, W. C., ... Zheng, H. (2016). T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8+ T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients. *Clinical Cancer Research*, 22(12), 3057–3066. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2626>
- Kopf, M., Ruedl, C., Schmitz, N., Gallimore, A., Lefrang, K., Ecabert, B., ... Bachmann, M. F. (1999). OX40-Deficient Mice Are Defective in Th Cell Proliferation but Are Competent in Generating B Cell and CTL Responses after Virus Infection. *Immunity*, 11(6), 699–708. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80144-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80144-2)
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K., & von Boehmer, H. (2006). Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunological Reviews*, 212(1), 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00411.x>
- Kroy, D. C., Ciuffreda, D., Cooperrider, J. H., Tomlinson, M., Hauck, G. D., Aneja, J., ... Lauer, G.

- M. (2014). Liver Environment and HCV Replication Affect Human T-Cell Phenotype and Expression of Inhibitory Receptors. *Gastroenterology*, *146*(2), 550–561. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.022>
- Kuang, D.-M., Peng, C., Zhao, Q., Wu, Y., Zhu, L.-Y., Wang, J., ... Zheng, L. (2010). Tumor-Activated Monocytes Promote Expansion of IL-17-Producing CD8+ T Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients. *The Journal of Immunology*, *185*(3), 1544–1549. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904094>
- Kugelberg, E. (2016). Immune memory: Lingering human T cells. *Nature Reviews Immunology* *2016* 16:2.
- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, *48*(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., ... Stevens, C. E. (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science (New York, N.Y.)*, *244*(4902), 362–364. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2496467>
- Kwo, P. Y., Mantry, P. S., Coakley, E., Te, H. S., Vargas, H. E., Brown, R., ... Forns, X. (2014). An Interferon-free Antiviral Regimen for HCV after Liver Transplantation. *New England Journal of Medicine*, *371*(25), 2375–2382. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408921>
- Lala, P. K., Johnson, G. R., Batty, F. L., & Nossal, G. J. (1979). Maturation of B lymphocytes. I. Concurrent appearance of increasing Ig, Ia, and mitogen responsiveness. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *122*(1), 334–341. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/368238>
- Langhans, B., Nischalke, H. D., Krämer, B., Hausen, A., Dold, L., van Heteren, P., ... Spengler, U. (2017). Increased peripheral CD4 + regulatory T cells persist after successful direct-acting antiviral treatment of chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, *66*(5), 888–896. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.12.019>
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., ... Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, *2*(3), 261–268. <https://doi.org/10.1038/85330>

- Lauer, G. M., Ouchi, K., Chung, R. T., Nguyen, T. N., Day, C. L., Purkis, D. R., ... Walker, B. D. (2002). Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *Journal of Virology*, 76(12), 6104–6113. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.12.6104-6113.2002>
- Lauer, G. M., & Walker, B. D. (2001). Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine*, 345(1), 41–52. <https://doi.org/10.1056/NEJM200107053450107>
- Lazarus, J. V., Wiktor, S., Colombo, M., & Thursz, M. (2017). Micro-elimination – A path to global elimination of hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 67(4), 665–666. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.06.033>
- Leavy, O. (2016). Sequential evolution of B cell memory. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), 73–73. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.15>
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570–1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
- Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., ... Walker, B. D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(9), 1499–1512. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10790425>
- Leung, S., Liu, X., Fang, L., Chen, X., Guo, T., & Zhang, J. (2010). The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cellular & Molecular Immunology*, 7(3), 182–189. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.22>
- Li, W., Blessin, N. C., Simon, R., Kluth, M., Fischer, K., Hube-Magg, C., ... Hirsch, A. (2018). Expression of the immune checkpoint receptor TIGIT in Hodgkin's lymphoma. *BMC Cancer*, 18(1), 1209. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5111-1>
- Licona-Limón, P., Henao-Mejia, J., Temann, A. U., Gagliani, N., Licona-Limón, I., Ishigame, H., ... Flavell, R. A. (2013). Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. *Immunity*, 39(4), 744–757. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2013.07.020>
- Lindenbach, B. D. (2013). Virion Assembly and Release. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 369, pp. 199–218). https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_8
- Lingel, H., Wissing, J., Arra, A., Schanze, D., Lienenklaus, S., Klawonn, F., ... Brunner-Weinzierl, M. C. (2017). CTLA-4-mediated posttranslational modifications direct cytotoxic T-lymphocyte

- differentiation. *Cell Death and Differentiation*, 24(10), 1739–1749. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.102>
- Liu, G., Hu, Y., Jin, S., & Jiang, Q. (2017). Genetic variant rs763361 regulates multiple sclerosis CD226 gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(6), E906–E907. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618520114>
- Liu, J., Zhang, E., Ma, Z., Wu, W., Kosinska, A., Zhang, X., ... Roggendorf, M. (2014). Enhancing virus-specific immunity in vivo by combining therapeutic vaccination and PD-L1 blockade in chronic hepadnaviral infection. *PLoS Pathogens*, 10(1), e1003856. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003856>
- Lohmann, V. (2013). Hepatitis C Virus RNA Replication. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 369, pp. 167–198). https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_7
- Loser, K., Vogl, T., Voskort, M., Lueken, A., Kupas, V., Nacken, W., ... Beissert, S. (2010). The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. *Nature Medicine*, 16(6), 713–717. <https://doi.org/10.1038/nm.2150>
- Lozano, E., Dominguez-Villar, M., Kuchroo, V., & Hafler, D. A. (2012). The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(8), 3869–3875. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103627>
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., ... Yi, Q. (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 4160–4171. <https://doi.org/10.1172/JCI65459>
- Lucas, M., Ulsenheimer, A., Pfafferot, K., Heeg, M. H. J., Gaudieri, S., Grüner, N., ... Diepolder, H. M. (2007). Tracking Virus-Specific CD4+ T Cells during and after Acute Hepatitis C Virus Infection. *PLoS ONE*, 2(7), e649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000649>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4 + T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Luxenburger, H., Neumann-Haefelin, C., Thimme, R., & Boettler, T. (2018). HCV-Specific T Cell Responses During and After Chronic HCV Infection. *Viruses*, 10(11), 645. <https://doi.org/10.3390/v10110645>
- MacLeod, M. K. L., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2010). Memory CD4 T cells: generation,

- reactivation and re-assignment. *Immunology*, 130(1), 10–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03260.x>
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M., & Lugli, E. (2013). The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *European Journal of Immunology*, 43(11), 2797–2809. <https://doi.org/10.1002/eji.201343751>
- Maiti, A. K., Kim-Howard, X., Viswanathan, P., Guillen, L., Qian, X., Rojas-Villarraga, A., ... Nath, S. K. (2010). Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatology*, 49(7), 1239–1244. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep470>
- Manieri, N. A., Chiang, E. Y., & Grogan, J. L. (2017). TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends in Immunology*, 38(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.002>
- Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., ... Albrecht, J. K. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet (London, England)*, 358(9286), 958–965. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583749>
- Martinello, M., Hajarizadeh, B., Grebely, J., Dore, G. J., & Matthews, G. V. (2018). Management of acute HCV infection in the era of direct-acting antiviral therapy. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(7), 412–424. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0026-5>
- Masopust, D., & Schenkel, J. M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 309–320. <https://doi.org/10.1038/nri3442>
- McKiernan, S. M., Hagan, R., Curry, M., McDonald, G. S. A., Kelly, A., Nolan, N., ... Kelleher, D. (2004). Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(1), 108–114. <https://doi.org/10.1002/hep.20261>
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., & Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO Journal*, 21(15), 3980–3988. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf414>
- Micallef, J. M., Kaldor, J. M., & Dore, G. J. (2006). Spontaneous viral clearance following acute

- hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *Journal of Viral Hepatitis*, 13(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00651.x>
- Mitrovic, N., Delic, D., Markovic Denic, L., Nikolic, N., Bojovic, K., Simonovic Babic, J., ... Barac, A. (2018). The prevalence and the risk factors for hepatitis C virus infection in Serbia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 12(03), 171–177. <https://doi.org/10.3855/jidc.10172>
- Mittrücker, H. W., Visekruna, A., & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>
- Moorman, J. P., Wang, J. M., Zhang, Y., Ji, X. J., Ma, C. J., Wu, X. Y., ... Yao, Z. Q. (2012). Tim-3 Pathway Controls Regulatory and Effector T Cell Balance during Hepatitis C Virus Infection. *The Journal of Immunology*, 189(2), 755–766. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200162>
- Moradpour, D., & Penin, F. (2013). Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 369, pp. 113–142). https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_5
- Morou, A., Palmer, B. E., & Kaufmann, D. E. (2014). Distinctive features of CD4⁺ T cell dysfunction in chronic viral infections. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 9(5), 446–451. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000094>
- Morozov, V. A., & Lagaye, S. (2018). Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World Journal of Hepatology*, 10(2), 186–212. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i2.186>
- Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., & Zinkernagel, R. M. (1993). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*, 362(6422), 758–761. <https://doi.org/10.1038/362758a0>
- Mosmann, T. R., & Rebhahn, J. A. (2016). T Lymphocytes: Plasticity of Subsets. In *eLS* (pp. 1–8). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0026253>
- Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Dawson, G. J., Erker, J. C., ... Mushahwar, I. K. (1995). Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *Journal of Virology*, 69(9), 5621–5630. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637008>

- Nakamoto, N., Cho, H., Shaked, A., Olthoff, K., Valiga, M. E., Kaminski, M., ... Chang, K.-M. (2009). Synergistic Reversal of Intrahepatic HCV-Specific CD8 T Cell Exhaustion by Combined PD-1/CTLA-4 Blockade. *PLoS Pathogens*, 5(2), e1000313. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000313>
- Nakamoto, N., Kaplan, D. E., Coleclough, J., Li, Y., Valiga, M. E., Kaminski, M., ... Chang, K.-M. (2008). Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology*, 134(7), 1927–1937, 1937.e1-2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.033>
- Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/nri3084>
- Netea, M. G., Joosten, L. A. B., Latz, E., Mills, K. H. G., Natoli, G., Stunnenberg, H. G., ... Xavier, R. J. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352(6284), aaf1098-aaf1098. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1098>
- Neumann-Haefelin, C., McKiernan, S., Ward, S., Viazov, S., Spangenberg, H. C., Killinger, T., ... Thimme, R. (2006). Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(3), 563–572. <https://doi.org/10.1002/hep.21049>
- Neumann-Haefelin, C., & Thimme, R. (2013). Adaptive Immune Responses in Hepatitis C Virus Infection. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 369, pp. 243–262). https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_10
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., & Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5386), 103–107. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9756471>
- Nie, D., Li, H., Yan, G., Wang, Z., He, Z., & Zhou, W. (2016). Gene–gene interaction between CD40 and CD226 gene on systemic lupus erythematosus in the Chinese Han population. *Rheumatology International*, 36(12), 1657–1662. <https://doi.org/10.1007/s00296-016-3570-8>
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Bevitt, D. J., & Toms, G. L. (2004). Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver.

- Journal of General Virology*, 85(6), 1497–1507. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79967-0>
- Niepmann, M. (2013). Hepatitis C Virus RNA Translation. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 369, pp. 143–166). https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_6
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., ... Dong, C. (2009). Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science*, 325(5943), 1001–1005. <https://doi.org/10.1126/science.1176676>
- Offergeld, R., Faensen, D., Ritter, S., & Hamouda, O. (2005). Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Eurosurveillance*, 10(2), 13–14. <https://doi.org/10.2807/esm.10.02.00522-en>
- Ogonek, J., Kralj Juric, M., Ghimire, S., Varanasi, P. R., Holler, E., Greinix, H., & Weissinger, E. (2016). Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in Immunology*, 7, 507. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00507>
- Okada, R., Kondo, T., Matsuki, F., Takata, H., & Takiguchi, M. (2008). Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation. *International Immunology*, 20(9), 1189–1199. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn075>
- Okazaki, T., & Honjo, T. (2006). The PD-1–PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in Immunology*, 27(4), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.02.001>
- Okoye, I. S., Houghton, M., Tyrrell, L., Barakat, K., & Elahi, S. (2017). Coinhibitory Receptor Expression and Immune Checkpoint Blockade: Maintaining a Balance in CD8+ T Cell Responses to Chronic Viral Infections and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 8, 1215. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01215>
- Park, Y.-J., Kuen, D.-S., & Chung, Y. (2018). Future prospects of immune checkpoint blockade in cancer: from response prediction to overcoming resistance. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(8). <https://doi.org/10.1038/S12276-018-0130-1>
- Pauken, K. E., & Wherry, E. J. (2014). TIGIT and CD226: tipping the balance between costimulatory and coinhibitory molecules to augment the cancer immunotherapy toolkit. *Cancer Cell*, 26(6), 785–787. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.016>
- Pauken, K. E., & Wherry, E. J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends in Immunology*, 36(4), 265–276. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2015.02.008>

- Pende, D., Bottino, C., Castriconi, R., Cantoni, C., Marcenaro, S., Rivera, P., ... Moretta, A. (2005). PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Molecular Immunology*, 42(4), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.028>
- Penna, A., Pilli, M., Zerbini, A., Orlandini, A., Mezzadri, S., Sacchelli, L., ... Ferrari, C. (2007). Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 45(3), 588–601. <https://doi.org/10.1002/hep.21541>
- Petri, H. T., Scollay, R., & Shortman, K. (1992). Commitment to the T cell receptor- $\alpha\beta$ or - $\gamma\delta$ lineages can occur just prior to the onset of CD4 and CD8 expression among immature thymocytes. *European Journal of Immunology*, 22(8), 2185–2188. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220836>
- Petrovas, C., Price, D. A., Mattapallil, J., Ambrozak, D. R., Geldmacher, C., Cecchinato, V., ... Koup, R. A. (2007). SIV-specific CD8+ T cells express high levels of PD1 and cytokines but have impaired proliferative capacity in acute and chronic SIVmac251 infection. *Blood*, 110(3), 928–936. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-069112>
- Piédavent-Salomon, M., Willing, A., Engler, J. B., Steinbach, K., Bauer, S., Eggert, B., ... Friese, M. A. (2015). Multiple sclerosis associated genetic variants of CD226 impair regulatory T cell function. *Brain*, 138(11), 3263–3274. <https://doi.org/10.1093/brain/awv256>
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., ... Bartenschlager, R. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), 7408–7413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504877103>
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., & Bartenschlager, R. (2001). Characterization of Cell Lines Carrying Self-Replicating Hepatitis C Virus RNAs. *Journal of Virology*, 75(3), 1252–1264. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1252-1264.2001>
- Polaris Observatory HCV Collaborators, S., Zeuzem, S., Manns, M., Altraif, I., Duberg, A.-S., Muljono, D. H., ... Razavi, H. (2017). Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 2(3), 161–176. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30181-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30181-9)
- Polywka, S., Schroter, M., Feucht, H.-H., Zollner, B., & Laufs, R. (1999). Low Risk of Vertical Transmission of Hepatitis C Virus by Breast Milk. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5), 1327–

1329. <https://doi.org/10.1086/313473>
- Poordad, F., McCone, J., Bacon, B. R., Bruno, S., Manns, M. P., Sulkowski, M. S., ... SPRINT-2 Investigators. (2011). Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *New England Journal of Medicine*, *364*(13), 1195–1206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1010494>
- Poorolajal, J., Hooshmand, E., Mahjub, H., Esmailnasab, N., & Jenabi, E. (2016). Survival rate of AIDS disease and mortality in HIV-infected patients: a meta-analysis. *Public Health*, *139*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2016.05.004>
- Porichis, F., & Kaufmann, D. E. (2012). Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. *Current HIV/AIDS Reports*, *9*(1), 81–90. <https://doi.org/10.1007/s11904-011-0106-4>
- Porichis, F., Kwon, D. S., Zupkosky, J., Tighe, D. P., McMullen, A., Brockman, M. A., ... Kaufmann, D. E. (2011). Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood*, *118*(4), 965–974. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-12-328070>
- Puchades Renau, L., & Berenguer, M. (2018). Introduction to hepatitis C virus infection: Overview and history of hepatitis C virus therapies. *Hemodialysis International*, *22*, S8–S21. <https://doi.org/10.1111/hdi.12647>
- Puchner, K. P., & Berg, T. (2009). [Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection]. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, *47*(5), 446–456. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1109296>
- Quinn, E. R., Chan, C. H., Hadlock, K. G., Fount, S. K., Flint, M., & Levy, S. (2001). The B-cell receptor of a hepatitis C virus (HCV)-associated non-Hodgkin lymphoma binds the viral E2 envelope protein, implicating HCV in lymphomagenesis. *Blood*, *98*(13), 3745–3749. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739181>
- Radziewicz, H., Ibegbu, C. C., Hon, H., Osborn, M. K., Obideen, K., Wehbi, M., ... Grakoui, A. (2008). Impaired Hepatitis C Virus (HCV)-Specific Effector CD8+ T Cells Undergo Massive Apoptosis in the Peripheral Blood during Acute HCV Infection and in the Liver during the Chronic Phase of Infection. *Journal of Virology*, *82*(20), 9808–9822. <https://doi.org/10.1128/JVI.01075-08>
- Raff, M. C. (1973). T and B lymphocytes and immune responses. *Nature*, *242*(5392), 19–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4571632>
- Ramirez, J.-M., Brembilla, N. C., Sorg, O., Chicheportiche, R., Matthes, T., Dayer, J.-M., ...

- Chizzolini, C. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *European Journal of Immunology*, *40*(9), 2450–2459. <https://doi.org/10.1002/eji.201040461>
- Rao, D. A. (2018). T Cells That Help B Cells in Chronically Inflamed Tissues. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1924. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01924>
- Rao, M., Valentini, D., Dodoo, E., Zumla, A., & Maeurer, M. (2017). Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm. *International Journal of Infectious Diseases*, *56*, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.028>
- Raziorrouh, B., Ulsenheimer, A., Schraut, W., Heeg, M., Kurktschiev, P., Zachoval, R., ... Grüner, N. H. (2011). Inhibitory Molecules That Regulate Expansion and Restoration of HCV-Specific CD4+ T Cells in Patients With Chronic Infection. *Gastroenterology*, *141*(4), 1422–1431.e6. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2011.07.004>
- Rekik, R., Belhadj Hmida, N., Ben Hmid, A., Zamali, I., Kammoun, N., & Ben Ahmed, M. (2015). PD-1 induction through TCR activation is partially regulated by endogenous TGF- β . *Cellular & Molecular Immunology*, *12*(5), 648–649. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.104>
- Richter, K., Agnellini, P., & Oxenius, A. (2010). On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *International Immunology*, *22*(1), 13–23. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp107>
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*, *148*(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Roberts, E. A., & Yeung, L. (2002). Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology*, *36*(5B), s106–s113. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36792>
- Roederer, M., Nozzi, J. L., & Nason, M. C. (2011). SPICE: Exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry Part A*, *79A*(2), 167–174. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21015>
- Rosendahl Huber, S., van Beek, J., de Jonge, J., Luytjes, W., & van Baarle, D. (2014). T cell responses to viral infections - opportunities for Peptide vaccination. *Frontiers in Immunology*, *5*, 171. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00171>
- Saeidi, A., Zandi, K., Cheok, Y. Y., Saeidi, H., Wong, W. F., Lee, C. Y. Q., ... Shankar, E. M. (2018). T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and

- Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 9, 2569. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02569>
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., ... Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Reviews*, 182, 18–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722621>
- Salimzadeh, L., Le Bert, N., Dutertre, C.-A., Gill, U. S., Newell, E. W., Frey, C., ... Bertoletti, A. (2018). PD-1 blockade partially recovers dysfunctional virus-specific B cells in chronic hepatitis B infection. *Journal of Clinical Investigation*, 128(10), 4573–4587. <https://doi.org/10.1172/JCI121957>
- Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 745–763. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
- Sallusto, F., Langenkamp, A., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2000). Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 251, 167–171. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11036772>
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708–712. <https://doi.org/10.1038/44385>
- Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J. J. C., ... Farber, D. L. (2013). Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets. *Immunity*, 38(1), 187–197. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2012.09.020>
- Sattler, S. (2017). The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 1003, pp. 3–14). https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_1
- Scheurich, C., Schulze zur Wiesch, J., Kim, A. Y., Lewis-Ximenez, L., Meyer, T., Polywka, S., ... Lauer, G. M. (2016). Breadth of the HCV-specific CD4+ T-cell response in spontaneous resolvers is independent of the IL-28 haplotype. *Journal of Viral Hepatitis*, 23(10), 831–832. <https://doi.org/10.1111/jvh.12560>

- Schmidt, A., Oberle, N., & Krammer, P. H. (2012). Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Frontiers in Immunology*, 3, 51. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00051>
- Schmitt, E., Hoehn, P., Huels, C., Goedert, S., Palm, N., Rude, E., & Germann, T. (1994). T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon- γ and is inhibited by transforming growth factor- β . *European Journal of Immunology*, 24(4), 793–798. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240403>
- Schmitt, E., Klein, M., & Bopp, T. (2014). Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends in Immunology*, 35(2), 61–68. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2013.10.004>
- Schulze zur Wiesch, J., Ciuffreda, D., Lewis-Ximenez, L., Kasprovicz, V., Nolan, B. E., Streeck, H., ... Lauer, G. M. (2012). Broadly directed virus-specific CD4 + T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(1), 61–75. <https://doi.org/10.1084/jem.20100388>
- Schulze zur Wiesch, J., Lauer, G. M., Day, C. L., Kim, A. Y., Ouchi, K., Duncan, J. E., ... Walker, B. D. (2005). Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(6), 3603–3613. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148104>
- Seidel, J. A., Otsuka, A., & Kabashima, K. (2018). Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Frontiers in Oncology*, 8, 86. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086>
- Semmo, N., Day, C. L., Ward, S. M., Lucas, M., Harcourt, G., Loughry, A., & Klenerman, P. (2005). Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology*, 41(5), 1019–1028. <https://doi.org/10.1002/hep.20669>
- Semmo, N., & Klenerman, P. (2007). CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, 13(36), 4831–4838. <https://doi.org/10.3748/WJG.V13.I36.4831>
- Sen, D. R., Kaminski, J., Barnitz, R. A., Kurachi, M., Gerdemann, U., Yates, K. B., ... Haining, W. N. (2016). The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science*, 354(6316), 1165–1169. <https://doi.org/10.1126/science.aae0491>
- Sharpe, A. H., & Pauken, K. E. (2017). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature*

- Reviews Immunology* 2017 18:3, 18(3), 153. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>
- Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., & Freeman, G. J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, 8(3), 239–245. <https://doi.org/10.1038/ni1443>
- Sheiko, M. A., Golden-Mason, L., Giugliano, S., Hurtado, C. W., Mack, C. L., Narkewicz, M. R., & Rosen, H. R. (2016). CD4+ and CD8+ T Cell Activation in Children with Hepatitis C. *The Journal of Pediatrics*, 170, 142–8.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.11.055>
- Shevach, E. M., DiPaolo, R. A., Andersson, J., Zhao, D., Stephens, G. L., & Thornton, A. M. (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 212(1), 60–73. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00415.x>
- Shoukry, N. H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D. Y., Ghrayeb, J., Reimann, K. A., & Walker, C. M. (2003). Memory CD8 + T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(12), 1645–1655. <https://doi.org/10.1084/jem.20030239>
- Shrikant, P. A., Rao, R., Li, Q., Kesterson, J., Eppolito, C., Mischo, A., & Singhal, P. (2010). Regulating functional cell fates in CD8 T cells. *Immunologic Research*, 46(1–3), 12–22. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8130-9>
- Simmonds, P., Alberti, A., Alter, H. J., Bonino, F., Bradley, D. W., Brechot, C., ... Chen, D. S. (1994). A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 19(5), 1321–1324. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8175159>
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., ... Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42(4), 962–973. <https://doi.org/10.1002/hep.20819>
- Simon, A. K., Hollander, G. A., & McMichael, A. (2015). Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings. Biological Sciences*, 282(1821), 20143085. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3085>
- Simons, J. N., Leary, T. P., Dawson, G. J., Pilot-Matias, T. J., Muerhoff, A. S., Schlauder, G. G., ... Mushahwar, I. K. (1995). Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Medicine*, 1(6), 564–569. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585124>
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., & Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annual Review of Immunology*, 27, 591–619. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132706>
- Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T., & Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 59(1), 318–327. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>
- Sonnenberg, G. F., Fouser, L. A., & Artis, D. (2010). Functional Biology of the IL-22-IL-22R Pathway in Regulating Immunity and Inflammation at Barrier Surfaces. *Advances in Immunology*, 107, 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381300-8.00001-0>
- Stamm, H., Klingler, F., Grossjohann, E.-M., Muschhammer, J., Vettorazzi, E., Heuser, M., ... Fiedler, W. (2018). Immune checkpoints PVR and PVRL2 are prognostic markers in AML and their blockade represents a new therapeutic option. *Oncogene*, 37(39), 5269–5280. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0288-y>
- Stanietsky, N., Rovis, T. L., Glasner, A., Seidel, E., Tsukerman, P., Yamin, R., ... Mandelboim, O. (2013). Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR. *European Journal of Immunology*, 43(8), 2138–2150. <https://doi.org/10.1002/eji.201243072>
- Stavnezer, J., Guikema, J. E. J., & Schrader, C. E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual Review of Immunology*, 26, 261–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248>
- Steinmann, E., & Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C Virus P7—A Viroporin Crucial for Virus Assembly and an Emerging Target for Antiviral Therapy. *Viruses*, 2(9), 2078–2095. <https://doi.org/10.3390/v2092078>
- Stengel, K. F., Harden-Bowles, K., Yu, X., Rouge, L., Yin, J., Comps-Agrar, L., ... Grogan, J. L. (2012). Structure of TIGIT immunoreceptor bound to poliovirus receptor reveals a cell-cell adhesion and signaling mechanism that requires cis-trans receptor clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5399–5404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120606109>
- Stoll-Keller, F., Barth, H., Fafi-Kremer, S., Zeisel, M. B., & Baumert, T. F. (2009). Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress. *Expert Review of Vaccines*, 8(3), 333–

345. <https://doi.org/10.1586/14760584.8.3.333>
- Su, L. (2007). PD-1+ T cells: exhausted and premature? *Blood*, *109*(11), 4593–4594. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079434>
- Sumida, K., Shimoda, S., Iwasaka, S., Hisamoto, S., Kawanaka, H., Akahoshi, T., ... Akashi, K. (2013). Characteristics of splenic CD8⁺ T cell exhaustion in patients with hepatitis C. *Clinical & Experimental Immunology*, *174*(1), 172–178. <https://doi.org/10.1111/cei.12158>
- Sun, C., Mezzadra, R., & Schumacher, T. N. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*, *48*(3), 434–452. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>
- Suzuki, T. (2017). Hepatitis C Virus Replication (pp. 199–209). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4567-7_15
- Syriopoulou, V., Nikolopoulou, G., Daikos, G. L., Theodoridou, M., Pavlopoulou, I., Nicolaidou, P., & Manolaki, N. (2005). Mother to child transmission of hepatitis C virus: Rate of infection and risk factors. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, *37*(5), 350–353. <https://doi.org/10.1080/00365540510032105>
- Tabata, H., Hara, M., Kitani, A., Hirose, T., Norioka, K., Harigai, M., ... Nakamura, H. (1989). Expression of TLISA1 on T cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology and Immunopathology*, *52*(3), 366–375. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2788052>
- Taghon, T., & Rothenberg, E. V. (2008). Molecular mechanisms that control mouse and human TCR- $\alpha\beta$ and TCR- $\gamma\delta$ T cell development. *Seminars in Immunopathology*, *30*(4), 383–398. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0134-3>
- Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Onoda, Y., Zhang, H., Yamazaki, S., Miyamoto, A., ... Shibuya, A. (2004). Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *International Immunology*, *16*(4), 533–538. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039383>
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., ... Rehermann, B. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease twodecades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nature Medicine*, *6*(5), 578–582. <https://doi.org/10.1038/75063>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, *140*(6),

- 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tang, Q., & Bluestone, J. A. (2008). The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology*, *9*(3), 239–244. <https://doi.org/10.1038/ni1572>
- Tang, Y., Guan, S. P., Chua, B. Y. L., Zhou, Q., Ho, A. W. S., Wong, K. H. S., ... Kemeny, D. M. (2012). Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *129*(6), 1611–1620.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.976>
- Taniuchi, I. (2018). CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annual Review of Immunology*, *36*(1), 579–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411>
- Tauriainen, J., Scharf, L., Frederiksen, J., Naji, A., Ljunggren, H.-G., Sönnberg, A., ... Karlsson, A. C. (2017). Perturbed CD8+ T cell TIGIT/CD226/PVR axis despite early initiation of antiretroviral treatment in HIV infected individuals. *Scientific Reports*, *7*(1), 40354. <https://doi.org/10.1038/srep40354>
- Teigler, J. E., Zelinsky, G., Eller, M. A., Bolton, D. L., Marovich, M., Gordon, A. D., ... Streeck, H. (2017). Differential Inhibitory Receptor Expression on T Cells Delineates Functional Capacities in Chronic Viral Infection. *Journal of Virology*, *91*(23), e01263-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01263-17>
- Thieu, V. T., Yu, Q., Chang, H.-C., Yeh, N., Nguyen, E. T., Sehra, S., & Kaplan, M. H. (2008). Signal Transducer and Activator of Transcription 4 Is Required for the Transcription Factor T-bet to Promote T Helper 1 Cell-Fate Determination. *Immunity*, *29*(5), 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.017>
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C., & Chisari, F. V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, *194*(10), 1395–1406. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714747>
- Thio, C. L., Thomas, D. L., Goedert, J. J., Vlahov, D., Nelson, K. E., Hilgartner, M. W., ... Carrington, M. (2001). Racial Differences in HLA Class II Associations with Hepatitis C Virus Outcomes. *The Journal of Infectious Diseases*, *184*(1), 16–21. <https://doi.org/10.1086/321005>
- Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O’Huin, C., ... Carrington, M. (2009).

- Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 461(7265), 798–801. <https://doi.org/10.1038/nature08463>
- Thompson, A. J. (2012). Genetic Factors and Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology*, 142(6), 1335–1339. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.046>
- Thomson, E. C., Smith, J. A., & Klenerman, P. (2011). The natural history of early hepatitis C virus evolution; lessons from a global outbreak in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 10), 2227–2236. <https://doi.org/10.1099/vir.0.033910-0>
- Tian, Z. (2018). TIGIT blockade prevents CTL and NK cell exhaustion and leads to tumor rejection in mice. *The Journal of Immunology*, 200(1 Supplement).
- Tibbs, C. J. (1995). Methods of transmission of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 2(3), 113–119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7493305>
- Timm, J., Lauer, G. M., Kavanagh, D. G., Sheridan, I., Kim, A. Y., Lucas, M., ... Allen, T. M. (2004). CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(12), 1593–1604. <https://doi.org/10.1084/jem.20041006>
- Tokuhisa, Y., Iizuka, N., Sakaida, I., Moribe, T., Fujita, N., Miura, T., ... Oka, M. (2007). Circulating cell-free DNA as a predictive marker for distant metastasis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 97(10), 1399–1403. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604034>
- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., & Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells. *Nature Immunology*, 10(8), 864–871. <https://doi.org/10.1038/ni.1770>
- Tsai, S., Liaw, Y., Chen, M., Huang, C., & Kuo, G. C. (1997). Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: Implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology*, 25(2), 449–458. <https://doi.org/10.1002/hep.510250233>
- Tungol, A., Rademacher, K., & Schafer, J. A. (2011). Formulary Management of the Protease Inhibitors Boceprevir and Telaprevir for Chronic Hepatitis C Virus. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 17(9), 685–694. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2011.17.9.685>
- Ulsenheimer, A., Lucas, M., Seth, N. P., Tilman Gerlach, J., Gruener, N. H., Loughry, A., ...

- Klenerman, P. (2006). Transient immunological control during acute hepatitis C virus infection: ex vivo analysis of helper T-cell responses. *Journal of Viral Hepatitis*, *13*(10), 708–714. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00747.x>
- Urata, S., Kenyon, E., Nayak, D., Cubitt, B., Kurosaki, Y., Yasuda, J., ... McGavern, D. B. (2018). BST-2 controls T cell proliferation and exhaustion by shaping the early distribution of a persistent viral infection. *PLOS Pathogens*, *14*(7), e1007172. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007172>
- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G., & Ferrari, C. (2006). PD-1 Expression in Acute Hepatitis C Virus (HCV) Infection Is Associated with HCV-Specific CD8 Exhaustion. *Journal of Virology*, *80*(22), 11398–11403. <https://doi.org/10.1128/JVI.01177-06>
- Usui, T., Preiss, J. C., Kanno, Y., Yao, Z. J., Bream, J. H., O’Shea, J. J., & Strober, W. (2006). T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on *IFNG* gene acetylation and transcription. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(3), 755–766. <https://doi.org/10.1084/jem.20052165>
- Valva, P., Ríos, D. A., De Matteo, E., & Preciado, M. V. (2016). Chronic hepatitis C virus infection: Serum biomarkers in predicting liver damage. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(4), 1367–1381. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i4.1367>
- Vasconcelos, J. R., Dominguez, M. R., Araújo, A. F., Ersching, J., Tararam, C. A., Bruna-Romero, O., & Rodrigues, M. M. (2012). Relevance of long-lived CD8+ T effector memory cells for protective immunity elicited by heterologous prime-boost vaccination. *Frontiers in Immunology*, *3*, 358. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00358>
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., ... Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor- β “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology*, *9*(12), 1341–1346. <https://doi.org/10.1038/ni.1659>
- Velu, V., Titanji, K., Zhu, B., Husain, S., Pladevega, A., Lai, L., ... Amara, R. R. (2009). Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature*, *458*(7235), 206–210. <https://doi.org/10.1038/nature07662>
- Villano, S. A., Vlahov, D., Nelson, K. E., Cohn, S., & Thomas, D. L. (1999). Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology*, *29*(3),

- 908–914. <https://doi.org/10.1002/hep.510290311>
- Virgin, H. W., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2009). Redefining Chronic Viral Infection. *Cell*, *138*(1), 30–50. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.06.036>
- Visekruna, A., Ritter, J., Scholz, T., Campos, L., Guralnik, A., Poncette, L., ... Huber, M. (2013). Tc9 cells, a new subset of CD8⁺ T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *European Journal of Immunology*, *43*(3), 606–618. <https://doi.org/10.1002/eji.201242825>
- von Wagner, M., Huber, M., Berg, T., Hinrichsen, H., Rasenack, J., Heintges, T., ... Zeuzem, S. (2005). Peginterferon- α -2a (40KD) and Ribavirin for 16 or 24 Weeks in Patients With Genotype 2 or 3 Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*, *129*(2), 522–527. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2005.05.008>
- Vyas, J. M., Van der Veen, A. G., & Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, *8*(8), 607–618. <https://doi.org/10.1038/nri2368>
- Walton, S., Mandaric, S., & Oxenius, A. (2013). CD4 T cell responses in latent and chronic viral infections. *Frontiers in Immunology*, *4*, 105. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00105>
- Wang, T. T., & Ravetch, J. V. (2015). Immune Complexes: Not Just an Innocent Bystander in Chronic Viral Infection. *Immunity*, *42*(2), 213–215. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.01.022>
- Weber, P. C., Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., & Mannarino, A. F. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nature Structural Biology*, *6*(10), 937–943. <https://doi.org/10.1038/13305>
- Welch, M. J., Teijaro, J. R., Lewicki, H. A., Colonna, M., & Oldstone, M. B. A. (2012). CD8 T cell defect of TNF- α and IL-2 in DNAM-1 deficient mice delays clearance in vivo of a persistent virus infection. *Virology*, *429*(2), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.04.006>
- Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nature Immunology*, *12*(6), 492–499. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>
- Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., & Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *Journal of Virology*, *77*(8), 4911–4927. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663797>
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 486–499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>
- WHO | Global hepatitis report, 2017. (2017). WHO.
- Wieland, D., Hofmann, M., & Thimme, R. (2017). Overcoming CD8+ T-Cell Exhaustion in Viral Hepatitis: Lessons from the Mouse Model and Clinical Perspectives. *Digestive Diseases*, 35(4), 334–338. <https://doi.org/10.1159/000456584>
- Wieland, D., Kemming, J., Schuch, A., Emmerich, F., Knolle, P., Neumann-Haefelin, C., ... Thimme, R. (2017). TCF1+ hepatitis C virus-specific CD8+ T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation. *Nature Communications*, 8, 15050. <https://doi.org/10.1038/ncomms15050>
- Wölk, B., Sansonno, D., Kräusslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E., & Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of Virology*, 74(5), 2293–2304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666260>
- Wolski, D., Foote, P. K., Chen, D. Y., Lewis-Ximenez, L. L., Fauvelle, C., Aneja, J., ... Lauer, G. M. (2017). Early Transcriptional Divergence Marks Virus-Specific Primary Human CD8+ T Cells in Chronic versus Acute Infection. *Immunity*, 47(4), 648–663.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.006>
- Worbs, T., & Förster, R. (2007). A key role for CCR7 in establishing central and peripheral tolerance. *Trends in Immunology*, 28(6), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.04.002>
- Wykes, M. N., & Lewin, S. R. (2017). Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 91–104. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.112>
- Wyles, D. L. (2013). Antiviral Resistance and the Future Landscape of Hepatitis C Virus Infection Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(suppl_1), S33–S39. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis761>
- Xiao, W., Jiang, L. F., Deng, X. Z., Zhu, D. Y., Pei, J. P., Xu, M. L., ... Yue, M. (2016). PD-1/PD-L1 signal pathway participates in HCV F protein-induced T cell dysfunction in chronic HCV infection. *Immunologic Research*, 64(2), 412–423. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8680-y>

- Xiao, Y., Yu, S., Zhu, B., Bedoret, D., Bu, X., Francisco, L. M., ... Freeman, G. J. (2014). RGMb is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(5), 943–959. <https://doi.org/10.1084/jem.20130790>
- Yadav, M., Green, C., Ma, C., Robert, A., Glibicky, A., Nakamura, R., ... Venstrom, J. M. (2016). Tigit, CD226 and PD-L1/PD-1 Are Highly Expressed By Marrow-Infiltrating T Cells in Patients with Multiple Myeloma. *Blood*, 128(22). Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/2102?sso-checked=true>
- Yatim, K. M., & Lakkis, F. G. (2015). A Brief Journey through the Immune System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1274–1281. <https://doi.org/10.2215/CJN.10031014>
- Ye, B., Liu, X., Li, X., Kong, H., Tian, L., & Chen, Y. (2015). T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death and Disease*, 6(3), e1694. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.42>
- Yi, J. S., Cox, M. A., & Zajac, A. J. (2010). T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*, 129(4), 474–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x>
- Yu, Q., Yue, F. Y., Gu, X. X., Schwartz, H., Kovacs, C. M., & Ostrowski, M. A. (2006). OX40 ligation of CD4+ T cells enhances virus-specific CD8+ T cell memory responses independently of IL-2 and CD4+ T regulatory cell inhibition. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(4), 2486–2495. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456009>
- Yu, X., Harden, K., C Gonzalez, L., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., ... Grogan, J. L. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology*, 10(1), 48–57. <https://doi.org/10.1038/ni.1674>
- Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J. D., Suresh, M., Altman, J. D., & Ahmed, R. (1998). Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *Journal of Experimental Medicine*, 188(12), 2205–2213. <https://doi.org/10.1084/JEM.188.12.2205>
- Zein, C. O., Levy, C., Basu, A., & Zein, N. N. (2005). Chronic Hepatitis C and Type II Diabetes

- Mellititus: A Prospective Cross-Sectional Study. *The American Journal of Gastroenterology*, 100(1), 48–55. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.40429.x>
- Zeisel, M., Fafi-Kremer, S., Robinet, E., Habersetzer, F., Baumert, T., & Stoll-Keller, F. (2009). Adaptive Immunity to Hepatitis C Virus. *Viruses*, 1(2), 276–297. <https://doi.org/10.3390/v1020276>
- Zhang, E., Zhang, X., Liu, J., Wang, B., Tian, Y., Kosinska, A. D., ... Lu, M. (2011). The Expression of PD-1 Ligands and Their Involvement in Regulation of T Cell Functions in Acute and Chronic Woodchuck Hepatitis Virus Infection. *PLoS ONE*, 6(10), e26196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026196>
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>
- Zhao, F., Hoechst, B., Gamrekelashvili, J., Ormandy, L. A., Voigtlander, T., Wedemeyer, H., ... Greten, T. F. (2012). Human CCR4+CCR6+Th17 Cells Suppress Autologous CD8+ T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, 188(12), 6055–6062. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102918>
- Zhao, J., Dang, X., Zhang, P., Nguyen, L. N., Cao, D., Wang, L., ... Yao, Z. Q. (2018). Insufficiency of DNA repair enzyme ATM promotes naive CD4 T-cell loss in chronic hepatitis C virus infection. *Cell Discovery*, 4(1), 16. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0015-4>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*, 28(1), 445–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>
- Zhu, Y. (2014). Immune Checkpoint Drug Goes Viral: Developing New Treatment Paradigm for Chronic Viral Infection. *Journal of Human Virology & Retrovirology*, 1(1), 1–0. <https://doi.org/10.15406/JHVRV.2014.1.00004>
- Zhuo, Y., Zhang, Y.-F., Wu, H.-J., Qin, L., Wang, Y.-P., Liu, A.-M., & Wang, X.-H. (2017). Interaction between Galectin-9/TIM-3 pathway and follicular helper CD4+ T cells contributes to viral persistence in chronic hepatitis C. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.134>

- Ziegler, S., Ruhl, M., Tenckhoff, H., Wiese, M., Heinemann, F. M., Horn, P. A., ... East-German HCV Study Group. (2013). Susceptibility to chronic hepatitis C virus infection is influenced by sequence differences in immunodominant CD8+ T cell epitopes. *Journal of Hepatology*, 58(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.016>
- Zignego, A. L., Ferri, C., Giannelli, F., Giannini, C., Caini, P., Monti, M., ... Gentilini, P. (2002). Prevalence of *bcl-2* Rearrangement in Patients with Hepatitis C Virus–Related Mixed Cryoglobulinemia with or without B-Cell Lymphomas. *Annals of Internal Medicine*, 137(7), 571. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-7-200210010-00008>
- Zimmerman, L. M., Vogel, L. A., & Bowden, R. M. (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(5), 661–671. <https://doi.org/10.1242/jeb.038315>

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Mentor PD Dr. Julian Schulze zur Wiesch ganz herzlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das innovative und spannende Projekt bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner bedanken, der das Gutachten dieser Arbeit seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät vertrat und Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker und PD Dr. Johannes Kluwe als Mitglieder meiner Betreuungskommission im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 841.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei allen Teilnehmern der Studie, seien es Patienten oder gesunde Probanden, bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zudem gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schulze zur Wiesch. Ohne diese Unterstützung ob im Labor und auch mental, hätte ich nicht die Kraft gehabt durchzuhalten. Besonders danken möchte ich hierbei Robin Woost, der eine große Hilfe im Labor war und wir als Team herausragend zusammen arbeiten konnten.

Besonders danken möchte ich auch Johannes Held, Melanie Wittner und Raluca Wroblewski für das Korrekturlesen meiner Dissertation. Ich weiß das sehr zu schätzen, dass ihr euch die Zeit dafür genommen habt.

Des Weiteren möchte ich meiner Familie danken, für die vor allem finanzielle aber auch alltags Unterstützung.

Mein größter Dank gilt aber meinem Partner Johannes Held und meinen Freunden. Ohne eure emotionale Unterstützung, die mir in einigen Tiefpunkten meines Lebens geholfen hat, wäre diese Abschlussarbeit nicht möglich gewesen. Vor allem möchte ich mich dabei bei Timo Gäth bedanken. Ohne deine Unterstützung, deine Hilfe und dein Verständnis wäre ich komplett verloren gewesen. Du warst für mich da und hast mir so viel geholfen, ohne dass ich überhaupt etwas sagen oder fragen musste. Du hast mir in jeder Form den Rücken gestärkt.