

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin  
I. Medizinische Klinik

Direktor Prof. Dr. A.W. Lohse

## **Charakterisierung der Antwortbreite und Kreuzreaktivität von HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantworten in Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Christoph Scheurich  
aus Wertheim

Hamburg, März 2015

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.07.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Thomas Jacobs**

Meinen Eltern gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I Einleitung</b> .....	<b>6</b>
I.1 Das Hepatitis C Virus.....	6
I.1.1 Struktur und Replikation.....	6
I.1.2 HCV-Genotypen.....	9
I.1.3 Krankheitsverlauf der HCV-Infektion und Diagnostik.....	9
I.1.4 Therapie und Stadieneinteilung.....	10
I.2 Die Immunantwort gegen HCV.....	11
I.2.1 Angeborene Immunantwort.....	11
I.2.2 Adaptive Immunantwort.....	12
I.2.2.1 Humorale Immunantwort.....	12
I.2.2.2 Zelluläre Immunantwort.....	13
I.2.2.2.1 CD8+ T Zellantwort.....	13
I.2.2.2.2 CD4+ T Zellantwort.....	14
I.2.2.2.3. Versagen der HCV-spezifischen CD4+ T Zellantwort.....	17
I.2.3 Kreuzreaktivität HCV-spezifischer T Lymphozyten.....	18
I.2.4 HCV-Vakzine.....	20
I.2.5 Einfluss der HLA-Merkmale auf die HCV-spezifische Immunantwort.....	21
I.2.6 Einfluss des IL28B-Polymorphismus auf die HCV-Infektion.....	22
I.3 Fragestellung.....	23
<b>II Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
II.1 Probanden.....	24
II.1.1 HCV Kohorte.....	24
II.1.2 HCV Serotypisierung.....	27
II.1.3 HLA-Daten und IL28B-Polymorphismus der Probanden.....	27
II.2 Material.....	28
II.2.1 Labor- und Verbrauchsmaterial.....	28
II.2.2 Reagenzien.....	28
II.2.3 Medien und Lösungen.....	29
II.2.4 Antikörper.....	29
II.2.5 Peptide.....	29
II.2.5.1 GT1 Peptide.....	29
II.2.5.2 Genotyp-spezifische Peptide.....	30
II.2.6 Software.....	31
II.2.7 Laborgeräte.....	31

---

II.3 Methoden.....	32
II.3.1 Zellaufbereitung.....	33
II.3.2 HCV-spezifische Stimulation in <i>in vitro</i> Zellkulturen.....	34
II.3.3 Enzyme-linked Immunospot Assay – ELISPOT.....	34
II.3.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung – Der ICS Assay.....	36
II.4 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....	38
<b>III Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
III.1 Detektion HCV-spezifischer CD4+ T Zellantworten in den verschiedenen Patientengruppen.....	41
III.1.1 Anzahl der HCV spezifischen CD4+ T Zellantworten.....	42
III.1.2 Detektionsfrequenz der 24 HCV-Peptide.....	43
III.2 Auswirkungen der Kombinationstherapie auf die CD4+ T Zellantwort.....	44
III.3 Einfluss des IL28B-Polymorphismus auf die Anzahl HCV-spezifischer CD4+ T Zellantworten.....	46
III.4 Feincharakterisierung von Epitopsequenzen.....	47
III.4.1 p094.....	47
III.4.2 p212.....	48
III.5 Kreuz-Genotyp-Reaktivität ausgewählter Peptide.....	50
III.5.1 p180.....	52
III.5.2 p212.....	54
III.5.3 p227.....	55
III.5.4 p257.....	57
III.5.5 p294.....	59
<b>IV Diskussion.....</b>	<b>61</b>
<b>V Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
<b>VI Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>VII Literaturverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>VIII Anhang.....</b>	<b>82</b>
<b>IX Danksagung.....</b>	<b>87</b>
<b>X Lebenslauf.....</b>	<b>88</b>
<b>XI Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>89</b>

## **I Einleitung**

### **I.1 Das Hepatitis C Virus**

Das Hepatitis C Virus ist mit insgesamt mehr als 170 Millionen chronisch infizierten Patienten ein weltweit sehr stark verbreitetes Virus (Lauer & Walker 2001). Es ist jedes Jahr für circa 500.000 Todesfälle verantwortlich und eine der Hauptursachen für Leberzirrhose, Leberzellkarzinom und Lebertransplantation (Lozano et al. 2012). Die Prävalenz der Infektion beträgt etwa 2,4 % (ca. zwölf Millionen Erkrankte) für West- und Zentraleuropa. In Deutschland werden je nach Studie Prävalenzraten von ca. 0,3 % bis 0,6 % (ca. 250.000 bis 500.000 Erkrankte) angegeben (Poethko-Müller et al. 2013; Mohd Hanafiah et al. 2013; Gower et al. 2014). Die höchsten Prävalenzraten mit bis zu 10 % der Bevölkerung finden sich in Südost- und Zentralasien, sowie im Nahen Osten und Nordafrika (Mohd Hanafiah et al. 2013).

Das Virus wurde im Jahr 1989 erstmals mittels PCR im Blut nachgewiesen und als Hauptursache der chronischen Non-A-Non-B-Hepatitis identifiziert, die bis dahin hauptsächlich bei Patienten nach Bluttransfusionen beobachtet worden war (Feinstone et al. 1975; Choo et al. 1989). Durch die Einführung von Antikörpersuchtests und PCR-Untersuchungen ist die Wahrscheinlichkeit einer Ansteckung durch Bluttransfusionen in der westlichen Welt seit 1992 auf 1 : > 4.000.000 gesunken (Kuo et al. 1989; Offergeld et al. 2005). Die HCV Übertragung erfolgt vor allem parenteral, Infektionen nach heterosexuellen Kontakten sind sehr selten. Das höchste Infektionsrisiko besteht dementsprechend für i.v.-Drogenabhängige und Personen, die vor 1992 eine Bluttransfusion erhielten (Armstrong et al. 2006).

#### **I.1.1 Struktur und Replikation**

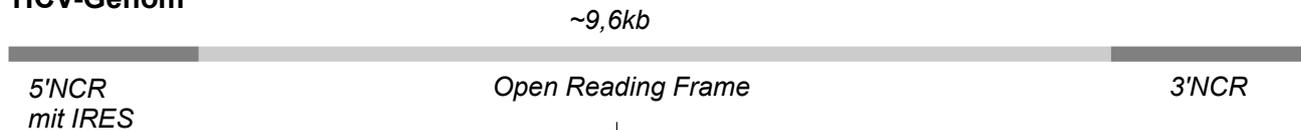
Das Hepatitis C Virus ist ein positiv-einsträngiges RNA-Virus und ist eine eigene Gattung (Gattung Hepaciviridae) der Familie der Flaviviridae. Andere Viren der Familie der Flaviviridae sind unter anderem das Gelbfieber- und das Dengue-Virus, sowie das West-Nile-Virus (King et al 2012).

Eine Übersicht über Struktur und Organisation der HCV-RNA und -Proteine ist in Abbildung I.1 dargestellt. Im Folgenden wird die Struktur des Virions, die Internalisierung und Replikation, sowie die Funktion der verschiedenen Proteine erläutert.

Die in einer Doppellipidmembran verankerten Hüllproteine E1 und E2 sind Teil der Außenhülle des Virions, die mehrere Kopien des Kernproteins und die genomische RNA umschließt. Im Blut liegen die Viruspartikel gebunden an Lipoproteine vor, welche die ersten Schritte der Endozytose in Hepatozyten vermitteln. Weitere dabei beteiligte Moleküle sind CD81, SRB1, Claudin 1, Occludin und der Cholesterinaufnahmerezeptor NPC1L1 (Lindenbach & Rice 2013). Nach der Internalisierung wird das Virion enthüllt und die virale RNA ins Cytosol freigegeben. Der circa 9.600 Basen lange RNA-Strang umfasst eine nicht kodierende Region (NCR; engl: non-coding-region) am 5'-Ende, die eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES; engl: internal ribosomal entry site) enthält, ein offenes Leseraster, welches für ein etwa 3.000 Aminosäuren langes Polyprotein kodiert, und eine 3'-NCR. Die IRES erleichtert die Bindung der RNA an Ribosomen und damit die Translation des Polyproteins. Mithilfe zellulärer als auch Virus-eigener Proteasen wird das Polyprotein in drei strukturelle (E1, E2, Core) und sieben nicht-strukturelle Proteine (p7, NS2, NS3, NS4A und B, NS5A und B) gespalten. Die nicht-strukturellen Proteine haben unterschiedliche Funktionen im Replikationszyklus: NS2 fungiert als Autoprotease, NS3 als RNA-Helicase und Serinprotease, NS4A dient der NS3 Serinprotease als Ko-Faktor. NS4B nimmt, im Zusammenspiel mit dem NS5A Protein, eine wichtige Rolle in der Formation eines membranösen Netzwerkes ein, welches für die Funktion des Replikationskomplexes benötigt wird. Dieser Komplex besteht neben anderen viralen Proteinen vor allem aus NS5B, einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RaRP) (Lohmann 2013; Moradpour et al. 2007). Durch Ausknospung in das endoplasmatische Retikulum beginnt die Formation neuer Virionen, bestehend aus RNA und strukturellen Proteinen. Diese verlassen dann über sekretorische Mechanismen die Zelle. P7 scheint dabei als Ionenkanal zu fungieren, der saures Milieu puffert (Lindenbach & Rice 2013).

Die Replikationsrate des Hepatitis C Virus wird auf circa  $10^{12}$  Virionen/Tag geschätzt (Neumann et al. 1998). Da die RaRP keine Korrekturlesefunktion besitzt und aufgrund der hohen Aktivität zu Fehlern in der RNA-Synthese neigt, existieren in einer infizierten Person Virionen mit unterschiedlichen RNA-Sequenzen, sogenannte Quasispezies (Pawlotsky 2003).

## HCV-Genom



↓  
Translation

## HCV-Polyprotein

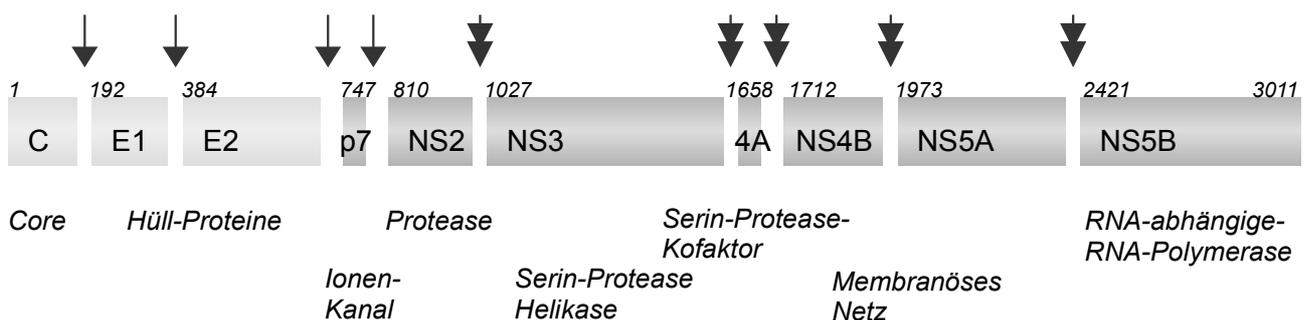


Strukturproteine

Nicht-strukturelle Proteine

↓  
Polyprotein-Prozessierung

## HCV-Proteine

**Abbildung I.1:** Struktur und Organisation des HCV-Genoms und der HCV-Proteine

Der Open-Reading-Frame des ca. 9,6 kb großen HCV-Genoms wird IRES-vermittelt translatiert und ko- sowie posttranskriptional weiterprozessiert. Das ca. 3011 Aminosäuren lange Polyprotein wird durch wirtseigene (einfache Pfeile) als auch viruseigene (Doppelpfeile) Proteasen in drei strukturelle und sieben nicht-strukturelle (NS) Proteine geschnitten. Die Zahlen geben die Aminosäureposition der jeweiligen Proteine in Bezug auf das Polyprotein an, wobei sich die Nummerierung auf einen GT1-Virusstrang (GenBank: M62321) bezieht. Zu den jeweiligen Proteinen sind die bisher bekannten Hauptfunktionen angegeben. NCR, nicht kodierende Region; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle. Eigene Darstellung, modifiziert nach Moradpour et al. 2007.

### **I.1.2 HCV-Genotypen**

Weltweit werden sechs Genotypen (GT1-6) unterschieden, die sich in bisher 67 weitere bestätigte Subtypen gliedern lassen. Diese Einteilung basiert auf phylogenetischen Analysen unterschiedlicher HCV-Genome, beziehungsweise auf der für die Einteilung verwendeten kodierenden Regionen innerhalb der Core-, E1- und NS5- Proteine. Hierbei unterscheiden sich einzelne Genotypen in 30–35 % der Nukleotide der genannten Regionen (Simmonds et al. 2005; Smith et al. 2014). Deutliche Unterschiede fallen in der geografischen Verteilung der Genotypen auf. In Deutschland, wie auch in Westeuropa und Nordamerika, sind die Mehrzahl der Patienten mit den Genotypen 1 und 3 infiziert, während GT2 und GT4 Infektionen selten erfasst wurden (Hüppe et al. 2008). Eine Häufung von Infektionen mit GT4 findet sich im Mittleren Osten, Ägypten und Zentralafrika. Die GT5 Infektion ist häufig in Südafrika anzutreffen, die GT6 Infektion vor allem in Südostasien, Hong Kong und Australien (Gower et al. 2014).

### **I.1.3 Krankheitsverlauf der HCV-Infektion und Diagnostik**

In der Mehrzahl der Fälle läuft eine akute HCV-Infektion klinisch inapparent ab. Nach einer Inkubationszeit von sieben bis acht Wochen (2-26 Wochen) zeigen sich nur selten Symptome wie Ikterus, Übelkeit und Unwohlsein. Obwohl laborchemisch ein Anstieg der Transaminasen beobachtet werden kann, ist die Diagnosestellung in der akuten Phase erschwert. Sehr selten sind fulminante Verläufe zu beobachten (Lauer & Walker 2001).

Während etwa 25-45 % der akut HCV-Infizierten das Virus spontan eliminieren können, entwickeln etwa 55-75 % der Patienten unbehandelt eine chronische Hepatitis, die im Verlauf bei circa 15% zu einer Leberzirrhose und in 0,7-1,3 % zu einem Leberzellkarzinom (HCC) führt (Seeff 2002). Der Zeitraum der Krankheitsprogression von Erstinfektion bis zum HCC variiert zwischen 20 und 30 Jahren. Begünstigend wirken sich ein junges Lebensalter zum Zeitpunkt der Infektion, sowie weibliches Geschlecht aus. Faktoren, die den Verlauf beschleunigen sind Alkoholkonsum, hohes Alter zum Zeitpunkt der Infektion, männliches Geschlecht und Koinfektionen mit HIV oder HBV (Lauer & Walker 2001).

Zu einer relativ häufigen extrahepatischen Manifestation der chronischen HCV-Infektion zählt die gemischte Kryoglobulinämie. Ebenso wurden lymphoproliferative, renale (vor allem die membranoproliferative Glomerulonephritis), Schilddrüsen-, Haut-, und

kardiovaskuläre Erkrankungen in Zusammenhang mit der HCV-Infektion beschrieben (Zignego et al. 2012).

Die Diagnose der HCV-Infektion erfolgt zunächst über den Nachweis von anti-HCV IgG in enzymatischen Immunsorptionsverfahren (EIA). Zur weiteren Unterscheidung zwischen einer chronischen oder spontan ausgeheilten HCV-Infektion dient der direkte Nachweis von HCV-RNA mittels PCR, welche zudem Aussagen über den Therapieverlauf zulässt. Unklare Antikörper-Befunde in EIAs können in weiteren anti-HCV-Immunoblots genauer untersucht werden (Kamili et al. 2012).

#### **I.1.4 Therapie und Stadieneinteilung**

Die Standardtherapie der HCV Infektion bestand bis zum Jahr 2011 aus pegyliertem Interferon- $\alpha$  (PEG-IFN) und dem Nukleosidanalogen Ribavirin. Die Dauer der Behandlung lag dabei zwischen 24 und 48 Wochen und konnte je nach Ansprechrate, gemessen an der RNA-Konzentration, verkürzt, oder verlängert werden (Farnik et al. 2010; Di Martino et al. 2011). Die Therapie mit PEG-IFN und Ribavirin ist mit vielen, teils schwerwiegenden, Nebenwirkungen verbunden, die, auch durch die lange Therapiedauer bedingt, eine stetige ärztliche Kontrolle erfordern und in einigen Fällen auch zum Abbruch der Therapie führen. Ist 24 Wochen nach Therapieende keine virale RNA mehr nachweisbar, spricht man von einem dauerhaft virologischem Therapieansprechen (SVR; engl: sustained virological response), was letztendlich als Heilung bezeichnet und damit dem Ende einer HCV-Infektion gleichgesetzt werden kann (Pearlman & Traub 2011).

Durch die Zulassung der ersten beiden direkt antiviral wirkenden Medikamente (DAAs) Boceprevir und Telaprevir konnte die Standardtherapie für GT1 Patienten 2011 auf eine Triple-Therapie erweitert werden. Beide Substanzen inhibieren direkt die HCV NS3/4A-Protease und konnten die Ausheilungsraten bei Therapie-naiven Patienten im Vergleich zur Standardtherapie von 38-44 % auf 63-75 % steigern (Poordad et al. 2011; Jacobson et al. 2011). In einer Hamburger „real-life“ Kohorte, die neben Therapie-naiven auch vorbehandelte Patienten, und solche mit fortgeschrittener Lebererkrankung einschloss, konnte eine SVR-Rate von 60 % erreicht werden (Wehmeyer et al. 2014). Die Entwicklung und Zulassung neuer DAAs, die auch andere virale Enzyme zum Ziel haben, hat eine Interferon-freie Behandlung der HCV-Infektion zum derzeitigen Standard gemacht (Casey & Lee 2013; De Luca et al. 2014). Trotz aller Fortschritte in der Behandlung der HCV-

Infektion bleibt eine prophylaktische Vakzine erstrebenswert. Unerkannte Infektionen bei klinisch unauffälligem Verlauf bergen weiterhin die Gefahren fortgeschrittener Lebererkrankungen, sodass ein generell präventiver Ansatz von Vorteil erscheint. Auch die hohen Kosten der Therapie sind dabei ein nicht zu vernachlässigender Faktor.

## **I.2 Die Immunantwort gegen HCV**

Das Immunsystem des Menschen dient zum Schutz des Körpers vor pathogenen Organismen, wie Pilzen, Parasiten, Bakterien und Viren. Es ist unterteilbar in ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem. Diese beiden Arme unterscheiden sich vor allem durch ihre Spezifität gegenüber einzelnen Krankheitserregern. Während das native Immunsystem unmittelbar nach Antigenkontakt aktiviert wird (frühe Phase der Immunantwort), jedoch unspezifisch reagiert, benötigen die Zellen des adaptiven Immunsystems (späte Phase) drei bis fünf Tage um eine gezielte Pathogen-spezifische Antwort zu erzeugen. An der Immunantwort gegen das Hepatitis C Virus sind beide Komponenten beteiligt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellen als Teil der adaptiven Immunantwort. Im Folgenden wird zunächst ein Überblick über die angeborene Immunantwort gegeben, in einem zweiten Teil wird dann detailliert auf das adaptive Immunsystem und die Rolle der CD4<sup>+</sup> T Zellen eingegangen.

### **I.2.1 Angeborene Immunantwort**

Als erste Barriere gegenüber pathogenen Keimen dienen Haut und Schleimhäute. Sind diese überwunden, ist der entsprechende Krankheitserreger mit zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems, wie Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen, als auch nicht-zellulären Mechanismen konfrontiert. Hierzu gehört das Komplementsystem, welches in der Lage ist Bakterien zu lysieren und Viren zu neutralisieren (Murphy et al 2008a). Des Weiteren sind vor allem intrazelluläre Vorgänge an der Abwehr von Viren beteiligt. Es spielen dabei zytosolische als auch membranständige Rezeptoren eine Rolle, die durch virale Proteine oder virale RNA/DNA aktiviert werden und die Produktion von Interferonen (IFN) zur Folge haben. Diese wiederum führen nach deren Bindung an IFN-Rezeptoren zur Hochregulierung Interferon-stimulierter-Gene (ISGs). Die entsprechenden Genprodukte destabilisieren oder

degradieren virale RNA, behindern die Translation viraler als auch wirtseigener RNA und verhindern damit die weitere Ausbreitung der Viren. Im Falle der HCV-Infektion sind hauptsächlich Rezeptoren der Rig-I-Rezeptor-Familie beteiligt. Intrazellulär ist vor allem eine Aktivierung der JAK/STAT-Kaskade zu beobachten (Schoggins & Rice 2013). Die intrazellulären Vorgänge werden jedoch teilweise durch virale Proteine gestört. Besonders die HCV NS3/4A-Serinprotease zerstört einzelne an den Kaskaden beteiligte Enzyme und schwächt dadurch die Immunantwort und trägt zur Persistenz des Virus bei (Morikawa et al. 2011).

Eine wichtige Rolle in der Initiierung der adaptiven Immunantwort nehmen Makrophagen und dendritische Zellen in ihrer Funktion als Antigen-präsentierende-Zellen (APC) ein. Nach der Phagozytose von Pathogenen werden diese in Lysosomen zu Proteinfragmenten und Peptiden zerkleinert. Einzelne Peptide werden im Folgenden auf MHC-II-Moleküle geladen und auf der Oberfläche der APC präsentiert. Dadurch wird eine Aktivierung von T Zellen ermöglicht und damit die adaptive Immunantwort eingeleitet (Murphy et al 2008b).

## **1.2.2 Adaptive Immunantwort**

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch seine Spezifität gegenüber Pathogenen aus. Beteiligte Zellen sind B und T Lymphozyten, sowie die für deren Aktivierung benötigten Antigen-präsentierenden Zellen (APC). B Lymphozyten produzieren die für die humorale Immunantwort charakteristischen Antikörper und sezernieren diese in Körperflüssigkeiten (humoral, lateinisch: flüssig). T Lymphozyten lassen sich weiter in zytotoxische T Lymphozyten (CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten) und T Helferzellen (CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten) unterteilen. Sie sind der zelluläre Teil der adaptiven Immunantwort, bei der die Immunaktivität vor allem durch direkten Zellkontakt zustande kommt (Murphy et al 2008c).

### **1.2.2.1 Humorale Immunantwort**

Nach ihrer Ausreifung im Knochenmark zirkulieren B Zellen im Blut und den peripheren lymphatischen Organen. Nach Antigenkontakt und Aktivierung des B-Zellrezeptors kommt es zur massiven Proliferation und Ausdifferenzierung zu Plasmazellen. Ein Teil der Ausdifferenzierung ist ein sogenannter Immunglobulin-Klassenwechsel (von IgM zu z.B.

IgG). Hierzu werden kostimulatorische Signale von T Lymphozyten und Zytokine (vor allem IL-4) benötigt. Immunglobuline binden Epitop-spezifisch an Pathogene und wirken auf vielfältige Weise. Sie erhöhen unter anderem die Phagozytose, aktivieren das Komplementsystem oder können Viren und Toxine neutralisieren (Murphy et al 2008d).

HCV-spezifische Antikörper sind schon in der frühen Phase der Infektion nachweisbar. Allerdings besitzt nur ein kleiner Teil der Antikörper die Fähigkeit eine weitere Ausbreitung des Virus zu verhindern. Eine frühe Produktion dieser sogenannten neutralisierenden Antikörper korreliert mit dem spontanen Ausheilen der HCV Infektion (Pestka et al. 2007). Durch Bindung der Antikörper an die strukturellen Proteine E1 und E2 des Virions wird die Bindung an und der Eintritt in die Zelle verhindert (Sabo et al. 2011). Durch Neumutationen und den damit vorliegenden Quasispezies kann es dem Virus jedoch gelingen, der Immunantwort durch neutralisierende Antikörper zu entgehen (Farci et al. 1996). Es bleibt zur Zeit unklar, inwieweit Antikörper Schutz vor Reinfektionen (vor allem mit heterologen Virussträngen) bieten. Zehn bis 20 Jahre nach spontanem Ausheilen sind HCV-spezifische Antikörper bei vielen Patienten nur stark erniedrigt oder gar nicht nachweisbar (Takaki et al. 2000; Pestka et al. 2007). Von großer Bedeutung ist zudem die Tatsache, dass ein spontanes Ausheilen einer HCV-Infektion auch ohne neutralisierende Antikörper möglich ist, wie ein Bericht über Patienten mit angeborener Agammaglobulinämie zeigt (Adams et al. 1997).

### **I.2.2.2 Zelluläre Immunantwort**

Der zelluläre Teil der adaptiven Immunantwort wird durch T Lymphozyten hervorgebracht. Allen T Lymphozyten ist der Oberflächenmarker CD3 gemeinsam. Eine weitere Aufteilung in Helfer oder zytotoxische T Zellen erlauben die Marker CD4 beziehungsweise CD8.

#### **I.2.2.2.1 CD8<sup>+</sup> T Zellantwort**

CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten, auch als zytotoxische Lymphozyten (CTL) bezeichnet, haben ihre Hauptaufgabe in der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene durch zytotoxische sowie nicht-zytotoxische Aktivitäten. Zellfremde Peptide werden den CTL durch MHC-I Moleküle präsentiert und führen zur Sekretion von Granzymen, Perforinen und Granulysin, die in der Zelle die Apoptose auslösen oder sie direkt abtöten. Es werden jedoch auch Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sezerniert, wodurch der virale Replikationszyklus gehemmt wird ohne

Zellen zu zerstören, MHC-I Moleküle verstärkt exprimiert und Makrophagen aktiviert werden (Murphy et al 2008e).

In der HCV-Infektion sind CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten die Haupteffektorzellen. Sie sind vier bis sechs Wochen nach Infektion im Blut von akut HCV Erkrankten nachweisbar und in ihrer Aktivität gegen multiple Epitope gerichtet (Lauer et al. 2002). Wichtigster Effektor-mechanismus ist die Sekretion von IFN- $\gamma$ , während die zytotoxische Aktivität der CD8<sup>+</sup> T Zellen für die HCV Elimination eher untergeordnet bleibt (Jo et al. 2009). Die Bedeutung der CD8<sup>+</sup> T Zellantwort für das spontane Ausheilen der HCV Infektion konnte in Studien mit Schimpansen gezeigt werden, deren HCV-Viruslast nach Depletion der CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten auf einem hohen Level persistierte und erst nach Regeneration der CD8<sup>+</sup> T Zellen absank und im weiteren Verlauf auf Dauer nicht mehr nachweisbar war (Shoukry et al. 2003). Chronisch infizierte HCV-Patienten besitzen sowohl deutlich weniger als auch ineffektive CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten als Patienten, die die Infektion spontan ausheilen (Lechner et al. 2000; Grüner et al. 2000; Cox et al. 2005). Als Ursachen für dieses T Zellversagen gilt zum einen das Auftreten von Escape-Mutationen (begünstigt durch die fehlerhafte Replikation des Hepatitis C Virus), welche die Peptid-Präsentation durch HLA-I-Moleküle oder die Aktivierung des T Zellrezeptors behindert (Timm et al. 2004; Grakoui et al. 2003). Ebenso wird die T Zellerschöpfung, gemessen an Oberflächenmarkern wie PD1, 2B4, CD160 und anderen, als Ursache für das Versagen der CD8<sup>+</sup> T Zellantwort diskutiert, die zur verminderten Effektivität und Zytokinausschüttung führt (Neumann-Haefelin & Thimme 2013). Voraussetzung für eine funktionierende zytotoxische Immunantwort ist jedoch eine begleitende T Helferzellantwort (Kalams & Walker 1998), die bei chronisch HCV infizierten Patienten fehlt.

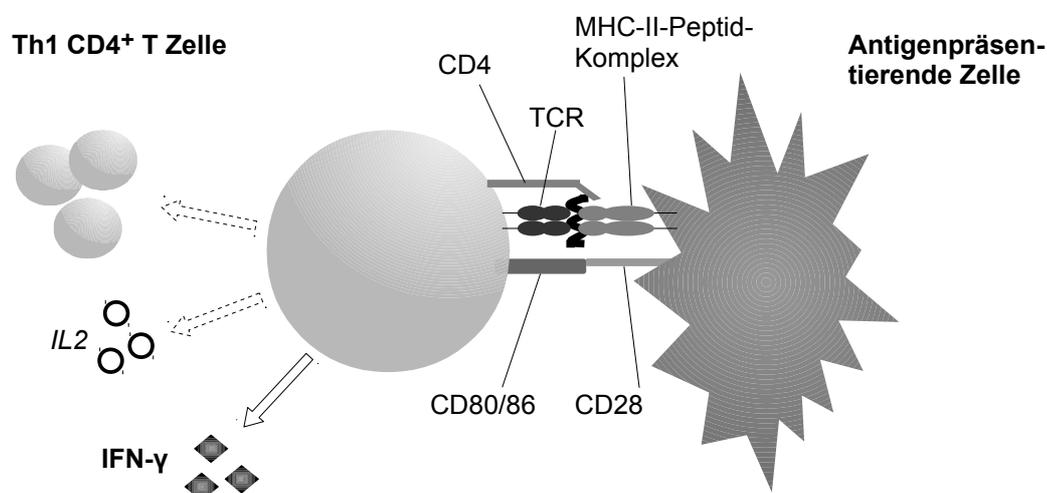
#### **1.2.2.2.2 CD4<sup>+</sup> T Zellantwort**

CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten, auch als T Helferzellen (Th-Zellen) bezeichnet, haben durch die Sekretion ihrer jeweiligen Zytokine vor allem eine unterstützende Funktion auf andere Zellen des adaptiven Immunsystems. Sie können in unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden, die sich hinsichtlich ihres Zytokinprofils und damit ihrer Wirkfunktion unterscheiden. Neben Th1 Zellen, deren charakteristisches Zytokinprofil vor allem IL-2 und IFN- $\gamma$  aufweist, und Th2 Zellen, mit IL-4 und IL-5 als Leitzytokinen, wurden Th17-Zellen und regulatorische T Zellen (T<sub>reg</sub>) beschrieben (Abbas et al. 1996).

Der erste Schritt in der Ausdifferenzierung naiver T Zellen ist die Aktivierung des T Zellrezeptors und CD4 als Ko-Rezeptor durch antigenbeladene MHC-II-Komplexe Antigenpräsentierender Zellen (APC). Weitere ko-stimulatorische Moleküle sind CD80 und CD86 auf der Oberfläche der T Zellen und CD28 auf den APC. Je nach vorherrschendem Zytokin-Milieu differenzieren die Zellen zu den jeweiligen Subtypen (Abbildung I.2).

Die Differenzierung naiver T Zellen zu Th1 Zellen läuft über die Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren (u.a. T-bet, STAT1, STAT4) unter dem Einfluss von IL-12 und IFN- $\gamma$ . Die Haupteffektor-Zytokine sind IFN- $\gamma$  und IL-2. IFN- $\gamma$  wirkt neben einer Aktivierung von phagozytierenden Zellen über die Aktivierung IFN- $\gamma$  responsiver Gene, die an der Abwehr intrazellulärer Pathogene beteiligt sind. IL-2 fördert die Proliferation zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten (Abbas et al. 1996).

Zur Entwicklung von Th2-Zellen wird vornehmlich IL-4 benötigt. Zusammen mit IL-5 ist IL-4 auch das von Th2-Zellen hauptsächlich sezernierte Zytokin. Beide fördern die humorale Immunantwort durch aktivierende Einflüsse auf B-Lymphozyten.



**Abbildung I.2:** CD4<sup>+</sup> T Zell Aktivierung

Die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T Zelle erfolgt nach der Epitop-spezifischen Bindung des T Zellrezeptors (TCR) und des ko-stimulatorischen Moleküls CD4 an den MHC-II-Peptidkomplex auf einer antigenpräsentierenden Zelle und der zusätzlichen ko-stimulatorischen Bindung von CD80/86 (CD4<sup>+</sup> T Zelle) an CD28 (APC). Dies führt zur klonalen Expansion der Zelle und zur Synthese und Sekretion von populations-spezifischen Zytokinen. Hier dargestellt ist die Stimulation einer Th1 CD4<sup>+</sup> T Zelle, deren Leitzytokine IL2 und IFN- $\gamma$  sind. Letzteres wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit zur Detektion reaktiver CD4<sup>+</sup> T Zellen genutzt. Eigene Darstellung, modifiziert nach Abbas et al. 1996.

Th17-Zellen entstehen unter dem Einfluss von IL-6, IL-21, IL-23 und TGF- $\beta$ . Durch Sekretion von IL-17 ist dieser Zelltyp an der Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze beteiligt (Murphy et al 2008f).

Die sogenannten regulatorischen T Zellen ( $T_{reg}$ ) spielen eine große Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz gegen körpereigene aber auch fremde Antigene. Charakterisiert wird dieser Zelltyp durch die Oberflächenmarker CD4, CD25 und den intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead-Box-Protein 3). Die Sekretion von IL-10 wirkt sich immunsuppressiv aus und schützt vor überschießenden Immunreaktionen. Ein Mangel an  $T_{reg}$  scheint bei der Pathogenese vieler Autoimmunerkrankungen eine Rolle zu spielen. (Luckheeram et al. 2012).

Die wichtigste Rolle in der HCV Infektion, besonders für das spontane Ausheilen, spielen Virus-spezifische CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vom Th1 Typ, die auch im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen. In Patienten mit spontan ausgeheilter HCV-Infektion sind HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> Zellen in höherer Zahl nachweisbar als in chronisch Infizierten und bleiben auch nach bis zu 20 Jahren im Blut nachweisbar. (Diepolder et al. 1995; Takaki et al. 2000; Schulze zur Wiesch et al. 2005) Neben einer höheren Anzahl detektierter CD4<sup>+</sup> Epitope bei einer erfolgreichen Immunantwort (Day et al. 2002; Schulze zur Wiesch et al. 2005), bestehen auch in der Funktionalität der CD4<sup>+</sup> T Zellen erhebliche Unterschiede: Während ein Ausheilen mit einem Th1-Profil, also mit der Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2, assoziiert ist, zeigt das Zytokinprofil chronisch Infizierter eine verminderte Sekretion von IL-2 beziehungsweise ein Th2-Profil (Tsai et al. 1997; Gerlach et al. 1999; Semmo et al. 2005; Semmo & Klenerman 2007). Zudem zeigt sich nach *in vitro* Stimulation mit HCV-Antigenen eine fehlende CD4<sup>+</sup> T Zellantwort.

Die essentielle Rolle von T Zellantworten konnte in Experimenten verdeutlicht werden, in denen die CD4<sup>+</sup> T Zellen von Schimpansen, die zunächst erfolgreich eine HCV-Infektion ausheilen konnten, mithilfe von Antikörpern depletiert wurden. Bei folgenden Reinfektionen waren die CD4<sup>+</sup> T Zell-depletierten Tiere trotz detektierbarer HCV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T Zellantworten nicht mehr in der Lage, das Virus zu eliminieren. Als Ursache dessen konnten Escape-Mutationen der MHC-I Epitope identifiziert werden, deren Auftreten durch die fehlende T Helferzellantwort begünstigt wurden (Grakoui et al. 2003).

Zum Nachweis HCV-spezifischer CD4<sup>+</sup> Zellen gehören klassischerweise Lymphoproliferationsassays, in denen CD4<sup>+</sup> Zellen von Patienten mit einer selbstlimitierenden Infektion höhere Proliferationsraten nach Stimulation mit rekombinanten HCV-Antigenen als CD4<sup>+</sup> T Zellen von chronisch Infizierten zeigen (Diepolder et al. 1995; Missale et al. 1996; Chang et al. 2001; Schulze zur Wiesch et al. 2005). Andere Möglichkeiten sind der ELISPOT (Enzyme-linked Immunospot Assay), sowie die Durchflusszytometrie, bei denen stimulierte Zellen auf die Sekretion von Zytokinen und damit auf ihre Reaktivität gegenüber spezifischen Antigenen getestet werden (Day et al. 2002). Die sensibelste Möglichkeit HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellen *ex vivo* zu visualisieren, bietet der Einsatz von MHC-II Tetrameren. Hierzu werden HLA-II Moleküle mit einem CD4<sup>+</sup> Epitop-spezifischen Peptid beladen und an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (Day et al. 2003). Durchflusszytometrisch können damit Antigen-spezifische T Zellen nachgewiesen und weiter untersucht werden. Für die Synthese von MHC-II-Tetrameren ist jedoch die Kenntnis über die exakte Peptidlänge, sowie die HLA-Restriktion notwendig, die für einige häufige detektierte Epitope bereits beschrieben wurden (Diepolder et al. 1997; Gerlach et al. 2005; Schulze zur Wiesch et al. 2005). Eine weitere Option zur Detektion Antigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T Zellen bietet der Oberflächenmarker CD154. Dieser wird nach Stimulation mit dem entsprechenden Antigen auf Antigen-spezifischen Zellen hochreguliert, und kann ebenfalls durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Mueller et al. 2010).

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit kamen ELISPOT und Durchflusszytometrie zum Einsatz. Beide Methoden werden im Detail in Kapitel II.3 beschrieben.

#### **I.2.2.2.3. Versagen der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantwort**

Unabhängig vom weiteren Krankheitsverlauf werden in der akuten Phase der HCV-Infektion spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellen generiert. Bei Patienten mit persistierendem Verlauf sind diese jedoch innerhalb weniger Monate nicht mehr nachweisbar (Schulze Zur Wiesch et al. 2012). Als Gründe für das Versagen der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort und der damit assoziierten Chronifizierung einer HCV-Infektion werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert.

Die bei MHC-I Epitopen beobachteten Escape-Mutationen scheinen für den Verlust der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort eine geringe Rolle zu spielen: Obwohl Mutationen in MHC-II Epitopen

auftreten und auch die Immunantwort abschwächen können, ist dies nicht dem Selektionsdruck, sondern der fehlerhaften Replikation geschuldet (Fuller et al. 2010; Fleming et al. 2010).

Ähnlich wie bei CD8<sup>+</sup> T Zellen beobachtet, konnten auch auf CD4<sup>+</sup> T Zellen Erschöpfungsmarker (hier vor allem Tim-3) nachgewiesen werden (Golden-Mason et al. 2009). In welchem Umfang diese Erschöpfungsmarker am Versagen der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort beteiligt sind, muss noch genauer untersucht werden.

Für eine Beteiligung von regulatorischen CD4<sup>+</sup> T Zellen (T<sub>reg</sub>) an der Chronifizierung gibt es mehrere Hinweise. In Patienten mit chronischer Infektion wurden höhere Frequenzen von T<sub>reg</sub> gemessen als in Patienten die spontan ausheilen (Cabrera et al. 2004). In der akuten Infektion konnte zwar zu Beginn kein Unterschied in der Ausprägung der T<sub>reg</sub> gefunden werden, im Verlauf sank jedoch die immunsuppressive Aktivität in der Gruppe der spontanen Resolver, während die T<sub>reg</sub> der Patienten mit persistierender Infektion gleichbleibende oder höhere Immunsuppression hervorriefen (Smyk-Pearson et al. 2008). Andererseits wird den T<sub>reg</sub> in der chronischen HCV Infektion auch eine protektive Funktion zugeschrieben. Durch Suppression der Immunantwort wird die inflammatorische Komponente der Infektion und damit auch die Progression der Leberschädigung vermindert. In Studien wiesen chronisch Infizierte mit normalen Leberenzymwerten höhere T<sub>reg</sub>-Frequenzen und -Aktivitäten auf, als Patienten mit erhöhten Leberenzymen (Bolocchi et al. 2006; Itose et al. 2009).

### **1.2.3 Kreuzreaktivität HCV-spezifischer T Lymphozyten**

Die Existenz unterschiedlicher HCV-Genotypen und Subtypen, und die damit verbundene Möglichkeit der Reinfektion mit einem heterologen Hepatitis C Virus stellt eine große Herausforderung für das Immunsystem dar. Die Frage, ob ein Patient nach einer erfolgreichen Ausheilung einer ersten HCV Infektion eine erneute Infektion mit demselben oder sogar einem anderen Genotyp ebenfalls ausheilt, ist nicht nur aus immunologischer Sicht von Bedeutung, sondern auch für die praktische Umsetzung einer therapeutischen oder prophylaktischen HCV-Vakzine wichtig. Eine Studie mit i.v.-Drogenabhängigen, die einem erhöhten Risiko für mehrfache Infektionen ausgesetzt sind, konnte zeigen, dass nach einer ausgeheilten Infektion ein teilweiser Schutz vor Reinfektionen besteht (Mehta

et al. 2002). Ebenso wurde bei Schimpansen, die GT1-Infektionen ausheilten, auch nach Reinfektion mit anderen Genotypen ein Schutz vor Chronifizierung beobachtet (Lanford et al. 2004). Andere Gruppen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduzieren und beschreiben einen stark von Genotyp, beziehungsweise Subtyp, abhängigen Schutz, der selten Reinfektionen verhindert (Farci et al. 1992; Bukh et al. 2008). Um die Ursachen dafür zu verstehen, ist es notwendig, auf Epitop-Niveau die Frage der Kreuz-Genotyp-Reaktivität zu stellen.

Für CD4<sup>+</sup> T Zellen existieren hierfür wenige Daten. Harcourt *et al.* untersuchten die CD4<sup>+</sup> T Zellantworten eines chronisch Infizierten und fanden dabei keine Kreuz-Genotyp-Reaktivität für zwei NS4-Epitope (AA1686-1705 und AA1746-1765) zwischen den Genotypen 1a und 3a (Harcourt et al. 2003). Weitere Studien bestätigten diese ersten Ergebnisse und zeigten, dass HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellantworten, die in chronisch Infizierten messbar sind, oftmals ein Relikt von zuvor ausgeheilten Infektionen darstellen und sich nicht gegen die aktuelle Infektion richten (Sugimoto et al. 2005; Schulze Zur Wiesch et al. 2007).

CD8<sup>+</sup> T Zellen mit Kreuz-Genotyp-Reaktivität wurden in einer Arbeit von Giugliano *et al.* beschrieben (Giugliano et al. 2009). Dabei kamen NS3 Peptidsätze der Genotypen 1b und 3a zum Einsatz. 29 % der beschriebenen Epitope zeigten eine teilweise oder vollständige Kreuzreaktivität. Interessanterweise konnten für die Varianten eines Epitopes zwei eigenständige (nicht kreuzreaktive) Zellpopulationen detektiert werden. Fytilli *et al.* testeten 28 Varianten des HLA-A2 restringierten Epitopes NS3<sub>46</sub> (AA 1073), wobei ebenfalls teilweise oder vollständige Kreuzreaktivität zu beobachten war (Fytilli et al. 2008). Die dabei gewonnenen ELISPOT-Daten konnten später in einer *in silico* Arbeit mit den elektrostatischen Auswirkungen der einzelnen Peptidvarianten auf die Bindungsstelle des T Zellrezeptors an den Peptid-MHC-I-Komplex korreliert werden (Antunes et al. 2011).

Mögliche Kreuzreaktivitäten bestehen jedoch nicht nur zu anderen HCV-Genotypen, sondern auch zu anderen Pathogenen, mit damit verbundenen Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf. Für das Epitop NS3<sub>46</sub> wurde eine heterologe Kreuzreaktivität mit einem Influenza A Virus Epitop beschrieben (Wedemeyer et al. 2001), welche in einer weiteren Arbeit mit einem schweren klinischen Verlauf der akuten Hepatitis C Virus Infektion in Zusammenhang gebracht wurde (Urbani et al. 2005). Genauere Untersuchungen hierzu

ergaben aber eine schwache Kreuzreaktivität, die vornehmlich nach einer HCV-Infektion auftritt und eine eher untergeordnete Bedeutung für den klinischen Verlauf darstellt (Kasprowicz et al. 2008). Weitere Kreuzreaktionen wurden zu Epitopen des Humanen Herpes Virus 1 (Kennedy et al. 2006) und HIV beschrieben, wobei in letzterer Studie ein Einfluss auf das Ausmaß der Leberschädigung beschrieben wurde (Vali et al. 2011).

Grundsätzlich besteht also eine teilweise Kreuzimmunität zwischen den verschiedenen HCV Genotypen, die für eine HCV-Vakzine genutzt werden kann. Da diese Kreuz-Genotyp-Reaktivität jedoch allenfalls einen relativ verbesserten Schutz bietet, ist eine sorgfältige Untersuchung der einzelnen CD8<sup>+</sup>, als auch CD4<sup>+</sup> T Zellepitope vor Zusammenstellung einer Vakzine sinnvoll und notwendig.

#### **I.2.4 HCV-Vakzine**

Den besten Schutz vor einer HCV-Infektion und deren Folgen bietet die Prävention. Neben Maßnahmen, die das Ansteckungsrisiko minimieren (steriles Spritzbesteck für i.v.-Drogenkonsumenten, Benutzung von Kondomen bei sexuellen Risikokontakten, konsequentes Vermeiden von „Recapping“, etc.), könnte vor allem eine prophylaktische Impfung Schutz vor einem chronischen Verlauf bieten. Ein Impfstoff muss in der Lage sein, eine starke, möglichst breite und kreuzreaktive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellantwort, sowie neutralisierende Antikörper zu induzieren. Unterschiedlichste Test-Impfstoffe befinden sich derzeit in Studien mit Tiermodellen oder in klinischen Studien. Die Ansätze reichen dabei unter anderem von rekombinanten Proteinen, synthetischen Peptiden, Virosomen, HCV-Protein exprimierenden Hefen, DNA-Vakzinen bis hin zu adenoviralen Vektoren (Torresi et al. 2011). Letztere zeigten in ersten Studien gute Ergebnisse: Die mehrmalige Applikation von adenoviralen Vektoren, welche die nicht-strukturellen Proteine NS3-5 eines GT1b-Stammes exprimieren, konnte bei vier von fünf Schimpansen eine Infektion mit einem heterologen GT1A Stamm verhindern (A. Folgori et al. 2006; Capone et al. 2006). In gesunden Versuchspersonen, denen die gleichen Vektoren appliziert wurden, konnten T Zellantworten gemessen werden, welche der Immunantwort in spontan ausgeheilten HCV-Infektionen glich und funktionale Zytokinprofile und eine teilweise Kreuzreaktivität gegenüber Antigenen der Genotypen 1a und 3a zeigten (Barnes et al. 2012). Durch die Ergänzung der adenoviralen Vektoren durch Modifizierte Vaccinia-Ancara-Vektoren, die ebenfalls die nicht-strukturellen Proteine NS3-5 desselben GT1b-Stammes exprimieren,

konnte die immunologische Antwort gegenüber HCV-Peptiden noch weiter verbessert werden (Swadling et al. 2014).

### **I.2.5 Einfluss der HLA-Merkmale auf die HCV-spezifische Immunantwort**

In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einigen HLA Merkmalen und einer spontanen Ausheilung gezeigt werden. So wird neben den HLA-II-Molekülen DRB1\*01, \*04, \*11, \*15 und DQB1\*05 auch DQB1\*03 mit einem selbstlimitierten Infektionsverlauf assoziiert (Neumann-Haefelin & Thimme 2007; Duggal et al. 2013). HLA-II-Moleküle haben ihre Funktion in der Antigenpräsentation auf Antigen-präsentierenden Zellen (wie z.B. Makrophagen, dendritische Zellen) und sind zusammen mit Ko-Faktoren maßgeblich an der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T Zellen beteiligt. HLA-II-Moleküle präsentieren Peptide mit einer Mindestlänge von 13 Aminosäuren, können jedoch theoretisch Peptide unbegrenzter Länge binden, die aber meist durch Peptidasen auf eine Länge von 13-17 Aminosäuren gekürzt werden. Jedes HLA-II-Molekül präsentiert Peptidsequenzen mit spezifischer Aminosäureanordnung. Das Repertoire möglicher detektierbarer Epitope ist von Mensch zu Mensch unterschiedlich (Murphy et al 2008g). Wie gut ein Peptid an ein HLA-Molekül bindet und so theoretisch auf der Zelloberfläche präsentiert werden könnte, kann in *in silico* HLA Bindungsassays untersucht werden. Dabei wird die Konzentration eines Peptids bestimmt, bei der die Hälfte der HLA-Moleküle besetzt sind. Bei hoher Affinität des HLA-Moleküls zum untersuchten Peptid sind nur niedrige Peptidkonzentrationen notwendig. Die Affinität einiger HCV CD4<sup>+</sup> Epitope zu häufig vorkommenden HLA-Allelen wurde bereits experimentell von einigen Gruppen bestimmt (Diepolder et al. 1997; Lamonaca et al. 1999; Schulze zur Wiesch et al. 2005). Mittlerweile besteht die Möglichkeit mithilfe von Computerprogrammen mögliche Peptid-HLA-Interaktionen vorherzusagen. Für die vorliegende Arbeit wurde das Programm netMHCIIpan-3.0 der Arbeitsgruppe um Nielsen *et al.* für die Vorhersage der Affinität unterschiedlicher Genotyp-spezifischer Peptidvarianten zu HLA-Merkmalen einzelner Probanden verwendet (Karosiene et al. 2013). Das Programm basiert auf künstlichen neuronalen Netzen, die mit experimentell gewonnenen Bindungsdaten gespeist und *in silico* trainiert wurden. Dabei wird die Affinität (in nM) eines 9mer-Bindungsbereichs eines Peptids oder Proteins berechnet und der Bereich mit der höchsten Affinität angegeben.

### **I.2.6 Einfluss des IL28B-Polymorphismus auf die HCV-Infektion**

Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS, engl: Genome wide association study) konnte ein Zusammenhang zwischen dem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, engl: Single Nucleotide Polymorphism) rs12979860 im Bereich des Interleukin-28B Gens und einer um den Faktor 2 erhöhten Ausheilungsrate von GT1 Infektionen unter PegInterferon- $\alpha$  und Ribavirin Therapie festgestellt werden (Ge et al. 2009). Der SNP liegt in den Allelvarianten C oder T vor, wobei die günstige homozygote Allelvariante CC auch die Chance auf spontane Ausheilung einer GT1 Infektion um den Faktor 2 erhöht. (Thomas et al. 2009). Auf den Verlauf einer Infektion mit einem anderen Genotyp hat die CC Variante ebenfalls positive Auswirkung, wobei der Einfluss des IL28B-Polymorphismus bei GT2/3 Infektionen wahrscheinlich durch die generell hohen Therapie-Ansprechraten keine Signifikanz erreicht (Thompson 2012). Das IL28B Gen auf Chromosom 19 kodiert für IFN- $\lambda$ 3, ein Typ III Interferon, das ähnliche Rezeptorkaskaden aktiviert wie Typ I Interferone. Über welche exakten Mechanismen sich der SNP rs12979860 auf die Immunantwort und den Infektionsverlauf auswirkt, ist noch nicht bekannt. Bisher konnte auch keine Verbindung zwischen dem SNP und der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantwort gefunden werden.

### I.3 Fragestellung

Eine breite und starke CD4<sup>+</sup> T Zellantwort gilt als notwendige immunologische Voraussetzung für das spontane Ausheilen einer Hepatitis C Virus Infektion. Ein detailliertes Verständnis über einzelne erkannte Epitope, deren minimale Aminosäuresequenz, sowie Genotyp-spezifische Variabilität und Reaktivität, ist unerlässlich für die Entwicklung einer protektiven Vakzine. Auch für die Etablierung neuer MHC-II-Tetramere, mit denen eine noch exaktere Untersuchung der HCV-spezifischen Immunantwort möglich sein wird, sind diese Kenntnisse vonnöten.

Mithilfe hoch sensitiver Methoden wurde in der vorliegenden Arbeit die Interferon- $\gamma$ -Produktion als Marker für die Reaktivität HCV-spezifischer CD4<sup>+</sup> Th1 Zellen unterschiedlicher Patientengruppen gemessen. Damit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellantwortbreite zeigt sich in verschiedenen Patienten mit unterschiedlichem klinischem Verlauf unter Verwendung eines Peptidsatzes, der die 24 am häufigsten beschriebenen HCV-GT1 Epitope enthält? Reicht dieser auf 24 Peptide reduzierte Peptidsatz aus, um signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen aufzuzeigen?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Breite der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellantwort und dem IL-28B Polymorphismus?
- Mit Peptid-Trunkierungen soll ein Fine-Mapping von HCV CD4<sup>+</sup> Epitopen durchgeführt werden, um die optimale Peptidlänge einzelner Epitope zu bestimmen.
- Wie groß ist die Variabilität der verwendeten Peptide/Epitope zwischen den unterschiedlichen Genotypen? Besteht bei ausgewählten HCV CD4<sup>+</sup> T Zellepitopen eine Kreuz-Genotyp-Reaktivität?

## II Material und Methoden

### II.1 Probanden

Zur Untersuchung der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden PBMC direkt nach der Blutentnahme aus den Proben von anti-HCV-positiven Patienten isoliert. Diese wurden in den Fachabteilungen Infektiologie und Virushepatologie des Ambulanzentrums des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) rekrutiert. Alle Patienten wurden über den Zweck der Blutentnahme informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Der dafür eingesetzten Einverständniserklärung wurde von der zuständigen Ethikkommission zugestimmt (Antrag WF-014/09).

#### II.1.1 HCV Kohorte

Abhängig vom Verlauf der HCV Infektion, der Therapie und dem Zeitpunkt der Infektion erfolgte die Einteilung der Probanden in 4 Gruppen:

Patientengruppe	n	HCV-Antikörper	HCV-RNA	Bemerkung
Spontanresolver	18	positiv	negativ	Spontan ausgeheilte HCV Infektion
SVR (Erfolgreich Therapierte)	14	positiv	negativ	Abgeschlossene Therapie
• Frühe Therapie	3			
• Späte Therapie	7			
Chronisch Infizierte	14	positiv	positiv	Keine Therapie / nicht erfolgreiche Therapie + Serokonversion vor mehr als 6 Monaten
Akut Infizierte	7	positiv	positiv/ negativ/ schwankend	Keine Therapie + Serokonversion innerhalb der letzten 6 Monate

Die Daten der Patientengruppen sind in den Tabellen II.1-4 dargestellt.

Für die Kontrollgruppe wurden PBMC von 10 gesunden Probanden verwendet. SVR Probanden, deren PBMC in Experimenten für die vorliegende Arbeit eingesetzt wurden, wurden ausschließlich mit der Kombinationstherapie aus PEG-IFN und Ribavirin behandelt. Es erfolgte eine weitere Einteilung der SVR-Gruppe in Patienten mit früher

Therapie (Beginn der Therapie innerhalb von sechs Monaten nach Infektion/akute Phase) und später Therapie (Beginn der Therapie später als sechs Monate nach Infektion/chronische Infektion).

**Tabelle II.1**  
Spontanresolver

Proband	Alter	Geschlecht	Serotyp	CD4+Antworten	HLA II	IL28
R1	26	f	2	5	DRB1*0101,*1501 DQA1*0102,*-	DRB5*0101 DQB1*0504,*0602 CC
R2	47	m	1	8	DRB1*1101,*1303 DQA1*05xx,*-	DRB3*0101,*0202 DQB1*0301,*- CC
R3	38	m	n.b.	5	DRB1*1101,*1302 DQA1*0102,*05xx	DRB3*0202,*0301 DQB1*0301,*0604 CC
R4	48	m	3	5	DRB1*1401,*- DQA1*0104,*-	DRB3*0202 DQB1*0503,*- CT
R5	51	m	1+3	13	DRB1*0404,*0701 DQA1*03xx,*0201	DQB1*0202,*0302 TT
R6	58	m	n.b.	1	DRB1*1104,*1302 DQA1*0102,*05xx	DRB3*0301,*0202 DQB1*0301,*0604 CT
R7	43	m	1+3	5	DRB1*0301,*1302 DQA1*0102,*05XX	DRB3*0202,*0301 DQB1*0201,*0609 CC
R8	37	m	3	4	DRB1*0101,*1101 DQA1*0101,*05xx	DRB3*0202 DQB1*0301,*0501 CC
R9	49	m	2	7	DRB1*0101,*1101 DQA1*0101,*05xx	DRB3*0202 DQB1*0301,*0501 TT
R10	36	m	1	8	DRB1*0701,*1501 DQA1*0102,*0201	DQB1*0202,*0602 CC
R11	48	f	2	13	DRB1*0101,*- DQA1*0101,*-	DQB1*0501,*- CC
R12	47	f	1	2	n.b.	TT
R13	51	f	1	12	DRB1*0101,*1401 DQA1*0101,*0104	DQB1*0501,*0503 CC
R14	36	f	n.b.	10	DRB1*0404,*1501 DQA1*0102,*03xx	DQB1*0302,*0602 TT
R15	26	m	1	8	DRB1*1101,*1201 DQA1*05xx,*-	DQB1*0301,*- CC
R16	54	f	1a*	2	DRB1*0101,*1302 DQA1*0101,*0102	DQB1*0501,*0604 TT
R17	52	f	1	5	n.b.	CC
R18	41	m	1	5	n.b.	TT

n.b., nicht bekannt; \* Genotypisierung in der akuten Phase

**Tabelle II.2**

Chronisch Erkrankte

Proband	Alter	Geschlecht	Genotyp	HCV VL IU/ml	CD4+ Antworten	Übertragung
C1	48	m	1b	3.000.000	0	Operation
C2	49	m	1a	20.000.000	0	n.b.
C3	42	m	3a	3.000.000	0	IVDA
C4	38	f	3a	70.000	2	IVDA
C5	25	m	1a	2.000.000	0	Transfusion
C6 <sup>^</sup>	36	f	3	300.000	0	IVDA
C7	33	m	3a	200.000	0	IVDA
C8	31	f	3a	400.000	1	IVDA
C9	52	m	4a	200.000	0	n.b.
C10	62	f	1b	n.b.	0	Transfusion
C11*	62	f	1	5.000.000	0	Operation
C12	67	f	2	3000	0	Transfusion
C13	55	m	2a	500.000	0	n.b.
C14	29	f	3a	700.000	0	IVDA

\*Relapse nach Therapie; <sup>^</sup>HIV-koinfiziert; n.b., nicht bekannt

**Tabelle II.3**

Erfolgreich Therapierte

Proband	Alter	Geschlecht	Genotyp	CD4+ Antworten	Übertragung	Zeit zwischen Infektion und Therapie / Monate
SVR1	40	m	1a	0	n.b.	n.b.
SVR2	70	f	1a	7	OP	2
SVR3	51	m	2	1	n.b.	n.b.
SVR4	53	f	3	0	OP	>12
SVR5	49	m	1a	0	IVDA	>12
SVR6	35	f	3a	1	OP	5
SVR7	33	m	n.b.	0	IVDA	>12
SVR8	63	m	1	0	n.b.	>12
SVR9	41	m	1a	0	Transfusion	>12
SVR10	46	m	3a	0	IVDA	n.b.
SVR11	63	f	3a	0	n.b.	>12
SVR12	46	m	4e	0	OP	>12
SVR13	53	m	3a	6	n.b.	5
SVR14	36	f	n.b.	1	IVDA	n.b.

n.b., nicht bekannt

**Tabelle II.4**

Akut HCV Infizierte

Proband	Alter	Geschlecht	Genotyp	CD4+ Antworten	Übertragung
A1	22	m	n.b.	6	n.b.
A2	25	f	1a	1	Rasierklinge
A3	42	m	1a	4	n.b.
A4	51	f	2b	2	n.b.
A5	54	f	3a	6	n.b.
A6	22	f	1a	0	n.b.
SVR2	70	f	1a	8	OP

n.b., nicht bekannt

### II.1.2 HCV Serotypisierung

Da bei Patienten mit spontan ausgeheilter HCV-Infektion eine Genotypisierung mittels RNA-Analyse nicht möglich war, wurde eine Serotypisierung mit dem „Murex HCV Serotyping 1-6 Assay“ durchgeführt (Schulze zur Wiesch et al. 2007). Dieser basiert auf der Bindung von Serum-Antikörpern an Genotyp-spezifischen Peptiden aus dem NS4 Bereich, welche mittels eines ELISA-Readers sichtbar gemacht wurde (Kobayashi et al. 1999). Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

### II.1.3 HLA-Daten und IL28B-Polymorphismus der Probanden

Die HLA-Daten wurden freundlicherweise durch das Institut für Transfusionsmedizin des UKE ermittelt.

Die Bestimmung des IL28B-Polymorphismus erfolgte freundlicherweise durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE. Zur Verwendung kam ein kommerzielles Kit der Firma TIB MOLBIOL GmbH (Berlin, D), bei der die Analyse des DNA-Schmelzpunktes zur Bestimmung des rs12979860-Genotyps genutzt wird.

## II.2 Material

### II.2.1 Labor- und Verbrauchsmaterial

24 Well Platte, flat bottom	TPP, Schweiz
96 Well Platte, U bottom	TPP, Schweiz
BD Vacutainer CPT	BD Biosciences, Heidelberg, D
Falcon Tubes 15ml, 50ml	BD FALCON™, Heidelberg, D
Multi Screen Filter Plates, MAIPS4510	Millipore
Nunc Cryotubes 1,8ml	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Parafilm M	Bemis, Solgnies, Belgium
Plastic Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, D
Polystyrene Tubes, 5ml	BD FALCON™, Heidelberg, D
Serological Pipette Tips	BD FALCON™, Heidelberg, D

### II.2.2 Reagenzien

BD Cytotfix/Cytoperm Kit	BD Biosciences, Kalifornien, USA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fixations-/Permeabilisierungslösung 1x</li> <li>• Fix-Perm-Puffer 10x</li> </ul>	
BCIP/NBT, B1911	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's PBS, 1x	GIBCO, Invitrogen Corp, New York, USA
FCS	Biochrom AG, Berlin, D
HEPES-Puffer, 1M	GIBCO, Invitrogen Corp, New York, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin	GIBCO, Invitrogen Corp, New York, USA
PFA	Merck, Darmstadt, D
PMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RPMI mit L-Glutamin	GIBCO, Invitrogen Corp, New York, USA
Streptavidin-AP, Code 3310-8	MABTECH, Stockholm, Schweden
Trypanblau, 0,4%	GIBCO, Invitrogen Corp, New York, USA

### II.2.3 Medien und Lösungen

FCS, inaktiviert	500ml FCS für 30min in 56°C Wasserbad inaktiviert
Einfriermedium	25ml FCS (inaktiviert), 15ml RPMI, 10ml DMSO
R10 Medium	440ml RPMI, 5ml PenStrep, 50ml FCS, 5ml HEPES-Puffer
R+ Medium	50ml RPMI, 0,5ml HEPES-Puffer, 0,5ml PenStrep
PFA-Gebrauchslösung	0,5% PFA in PBS

### II.2.4 Antikörper

#### *ELISPOT-Antikörper*

Anti-hu-IFN- $\gamma$ D1K	MABTECH, Stockholm, Schweden
Anti-hu-IFN- $\gamma$ 7-B6-1-Biotin	MABTECH, Stockholm, Schweden

#### *ICS-Antikörper*

CD3-PerCP, Klon UCHT1	BioLegend, San Diego, USA
CD4-BD-H-V500, Klon RPA-T4	BD Biosciences, San Jose, USA
CD8-PE, Klon SK1	BD Biosciences, San Jose, USA
IFN- $\gamma$ -PE-Cy7, Klon 4S.B3	BD Biosciences, San Jose, USA

### II.2.5 Peptide

Sämtliche Peptide wurden von peptides&elephants (Potsdam, Deutschland) nach der Festphasensynthese-Methode synthetisiert und in lyophilisierter Form in einer Reinheit von mindestens 75% geliefert. Die Peptide wurden jeweils in R+ mit 10% DMSO in einer Konzentration von circa 2mg/ml gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

#### II.2.5.1 GT1 Peptide

Für die Untersuchung der CD4<sup>+</sup> T Zell Antwortbreite wurden 24 Peptide (siehe **Tabelle III.1**) mit der Länge von 20aa ausgewählt, die in früheren Studien häufig detektiert wurden und mögliche Bestandteile einer Peptidvakzine darstellen (Diepolder et al. 1997; Schulze zur Wiesch et al. 2005; Lamonaca et al. 1999). Die Sequenzen der Peptide entsprechen einem HCV Genotyp 1a Stamm (GenBank Zugangsnummer: M62321). Für die Nummerierung gilt, dass die Zahl multipliziert mit zehn plus eins, die Aminosäure im HCV-

Polyprotein angibt, mit der das 20mer Peptid beginnt (Beispiel: p117 entspricht den Aminosäuren 1171-1190).

Für die Stimulation in Zellkulturen wurden jeweils 12 der 24 Peptide in gleicher Konzentration zu einem Pool zusammengefasst (siehe Tabelle II.5). Bei einer eingesetzten Menge von 30µl je Pool entsprach die Endkonzentration jedes Peptids im Stimulationsansatz 10µg/ml.

Peptide für die Versuche zur Feincharakterisierung mit Peptidtrunkierungen (p094 und p212, variierende Peptidlänge, 12 bis 20aa) wurden ebenfalls von peptides&elephants synthetisiert und ausgewogen. Die Peptide wurden in R+ mit 10 % DMSO in einer Konzentration von 2mg/ml aufgelöst und bei -20°C aufbewahrt.

**Tabelle II.5**

Peptidsequenzen der 24 genutzten GT1a Peptide. GenBank Zugangsnr.: M62321. (Schulze zur Wiesch et al. 2005)

Pool 1			Pool 2		
Peptid	Sequenz	Protein	Peptid	Sequenz	Protein
p094	LGALTGTYYVYNHLTPLRDWA	NS2	p187	GEVPSTEDLVNLLPAILSPG	NS4B
p117	CPAGHAVGIFRAAVCTRQVA	NS3	p191	GAVQWMNRLIAFASRGNHVS	
p120	LETTMRSPVFTDNSPVPVVP		p212	FFTELDGVRLHRFAPPCKPL	NS5A
p124	PAAYAAQGYKVLVLNPSVAA		p227	PAEILRKSRRFAQALPVWAR	
p132	TDATSIILGIGTVLDQAETAG		p242	SMSYSWTGALVTPCAAEEQK	NS5B
p141	GINAVAYYRGLDVSVIPTSG		p244	LPINALSNSLLRHHNLVYST	
p149	TGRGKPGIYRFVAPGERPSG		p252	FGYGAKDVRCHARKAVTHIN	
p153	TPAETTVRLRAYMNTPGLPV		p257	KGGRKPARLIVFPDLGVRVC	
p158	ENLPYLVAYQATVCARAQAP		p266	QCCDLDPQARVAIKSLTERL	
p162	PTPLLYRLGAVQNEITLTHP		p267	VAIKSLTERLYVGGPLTNSR	
p177	GIQYLAGLSTLPGNPAIASL	NS4B	p280	VYYLTRDPTTPLARAAWETA	
p180	LTTSQTLLFNILGGWVAAQL		p294	CGKYLFWAVRTRKTKLTPIA	

**II.2.5.2 Genotyp-spezifische Peptide**

Zum Vergleich Genotyp-spezifischer Peptidsequenzen wurden vollständige HCV-Genome von der öffentlich zugänglichen Website <http://www.hcvdb.org> (Zugriff am 15.12.2010) heruntergeladen und mit der SeAl Software (Andrew Rambaut; Version: v2.0a11; <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>) bearbeitet.

Für die Vergleiche wurden 19 GT2a, 25 GT2b, 8 GT3a und 16 GT4a Sequenzen genutzt. Als GT1a Sequenz wurde das Genom mit der Zugangsnummer M62321 genutzt, für GT1b wurde die Konsenssequenz aus allen 355 zugänglichen Sequenzen gebildet. Die

GenBank-Zugangsnummern der jeweiligen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (Tabelle VIII.1).

Für Experimente zur Kreuz-Genotyp-Reaktivität wurden Varianten (20mer-Peptide) von p180, p212, p227, p257 und p294 ausgewählt. Diese wurden ebenfalls von peptides&elephants synthetisiert und ausgewogen. Die Peptide wurden in R+ mit 10 % DMSO in einer exakten Konzentration von 2 mg/ml aufgelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Für die Verdünnungsreihe einer Peptidvariante wurden mit R+ Konzentrationen von 0,8 mg/ml, 0,16 mg/ml, 0,016 mg/ml, bzw. 1,6 µg/ml erzeugt, die in den Versuchsansätzen konkrete Konzentrationen von 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, bzw. 0,1 µg/ml Peptid ergaben.

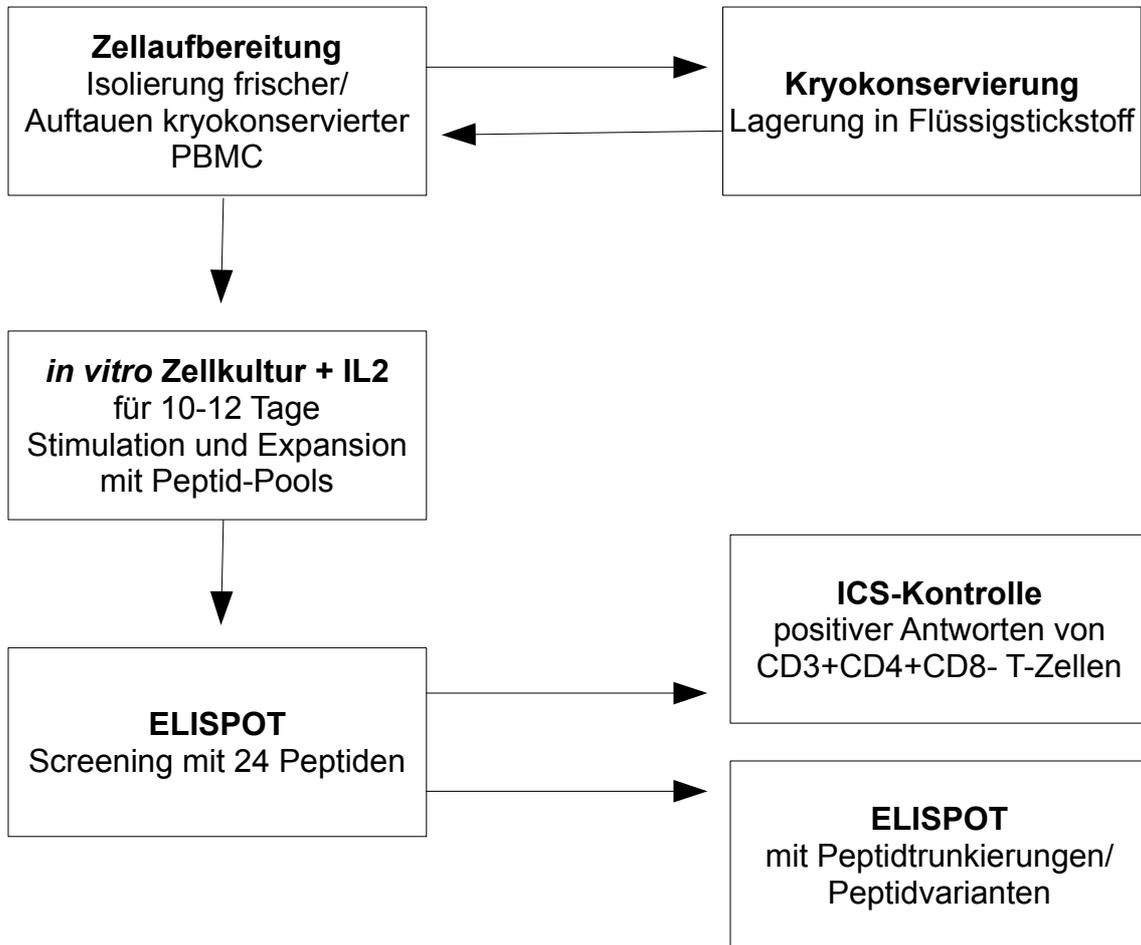
### II.2.6 Software

Se-AI	Version v2.0a11, Andrew Rambaut, <a href="http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/">http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/</a>
FACS Diva	Version 5, BD Biosciences, Heidelberg, D
FlowJo	Version 9.3, Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism	Version 5.0b für Mac OS X, GraphPad Software, San Diego, California, USA
netMHCIIpan-3.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-3.0">www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-3.0</a> , (Karosiene et al. 2013)

### II.2.7 Laborgeräte

BD FACS LSR II	BD Biosciences, Heidelberg, D
Eppendorf Research Pro	Eppendorf AG, Hamburg, D
Hera-Cell Wärmeschrank	Heraeus, Hannover, D
Mikroskop Olympus CK2	Olympus Europa SE, Hamburg, D
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, D
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, D
HeraSafe KS15	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte D
Sigma 4K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, D
Stratacooler	Stratagene Corp., La Jolla, CA, USA
Vortexer Lab Dancer, S40	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Wasserbad, Model WNE-7	Memmert GmbH, Büchenbach, D

## II.3 Methoden



**Abbildung II.1:** Schematische Darstellung der Versuchsreihenfolge.

Die einzelnen Arbeitsschritte umfassten zunächst die Aufbereitung und Isolierung der PBMC aus Blutproben, sowie deren zeitweise Lagerung in Flüssigstickstoff. Nach Stimulation und Expansion der Zellen in *in vitro* Zellkulturen wurde die Reaktivität gegenüber den 24 eingesetzten HCV GT1 20mer Peptiden in ELISPOT-Assays getestet. Positive Antworten wurden im Anschluss mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) kontrolliert. Für weitere Experimente mit Peptidtrunkierungen und -varianten wurden ELISPOTs verwendet (Abbildung II.1).

### II.3.1 Zellaufbereitung

Die Zellaufbereitung umfasste die Schritte der 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 8ml Vollblut und enthalten Natriumcitrat als Antikoagulans, sowie eine Gelmatrix zur Zellseparation. Durch Zentrifugation der befüllten Röhrchen bei 1999xg bei 20°C für 20 Minuten gelangen Erythrozyten und Granulozyten durch die Gelmatrix hindurch, während sich oberhalb die Plasma- und Interphase mit Lymphozyten und Monozyten absetzen. Von der Plasmaphase wurden 2ml abgenommen und in einem Cryotube bei -80°C eingefroren. Das verbliebene Plasma und die Interphase mit den PBMC wurden in ein Falcon Tube überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 450xg bei 4°C zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands und Lösen des Zellpellets konnten die PBMC für weitere Arbeitsschritte verwendet werden.

Die frisch isolierten PBMC wurden zunächst in flüssigem Stickstoff konserviert. Hierzu wurden die aufgereinigten Zellen aus Arbeitsschritt II.3.2. in RPMI und Einfriermedium im Verhältnis 1:1 aufgenommen und in 2ml Cryotubes überführt. Diese wurden zunächst 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 Cryotube zunächst in 37°C warmem Wasser geschwenkt. Anschließend wurden die PBMC durch mehrmaliges Pipettieren mit warmem RPMI aufgetaut und in ein Falcontube mit 40 ml RPMI überführt. Nach Zentrifugation (450xg bei 4°C für 10 Minuten) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet gelöst, um die PBMC in weiteren Arbeitsschritten zu verwenden.

Für die Zellzählung 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

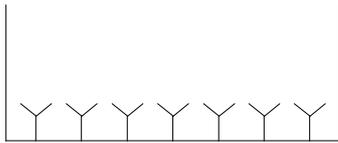
Eckfeldes (0,1 µl) und Verdünnung (1:10). Dementsprechend ergibt sich die Zellkonzentration pro Milliliter aus dem Mittelwert multipliziert mit  $1 \times 10^5$ .

### II.3.2 HCV-spezifische Stimulation in *in vitro* Zellkulturen

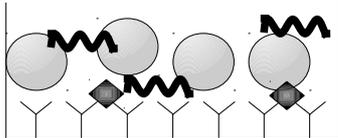
Um HCV-spezifische T Zellen zu expandieren, wurden PBMC nach Isolierung oder Auftauen mit HCV-spezifischen Peptiden *in vitro* stimuliert und für 10 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Hierzu wurden an Tag 1 in einer 24-well Platte  $3 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  PBMC je well in 0,5 ml R10 ausplattiert und mit 30µl eines Peptid-Pools (10 µg/ml je Peptid) stimuliert. An Tag 2 wurde je Ansatz 1ml R10 zugegeben und die PBMC mit rekombinantem humanem IL-2 (Endkonzentration 50 IU/ml) versorgt. An den Tagen 5 und 8 wurde je Ansatz 1 ml des Überstandes abgenommen und verworfen, durch frisches R10 ersetzt und erneut mit IL-2 versetzt. An Tag 11 wurden die PBMC zunächst in 40 ml warmem RPMI und anschließend in 20 ml warmem R10 gewaschen (Zentrifugation jeweils 450xg für 8 Minuten bei 21°C), gezählt und in 2 ml R10 wieder in eine 24-well Platte überführt. Nach einer Inkubationsphase von mindestens 6 Stunden im Brutschrank wurden die PBMC in den im Folgenden beschriebenen Versuchen eingesetzt.

### II.3.3 Enzyme-linked Immunospot Assay – ELISPOT

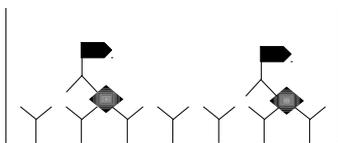
Mit dem ELISPOT können, unter anderem, die von stimulierten Immunzellen sezernierten Moleküle, wie Zytokine oder Antikörper, nachgewiesen werden. Hierzu werden diese zunächst durch membrangebundene Antikörper („Coating“-Antikörper) immobilisiert. In einem weiteren Schritt binden an die immobilisierten Moleküle die sogenannten „Detection“-Antikörper, die wiederum an ein Enzym binden, welches das Ausfällen von Farbstoffen katalysiert. In den Experimenten dieser Studie wurde im ELISPOT die Sekretion von IFN-γ als Reaktivitätsmarker der PBMC nach Stimulation mit HCV-spezifischen Peptiden gemessen. Als Enzym kam die alkalische Phosphatase (AP) zum Einsatz, welche die Umsetzung von BCIP/NBT zu einem violetten Farbstoff, der in unmittelbarer Nähe zur AP ausfällt, katalysiert. An Stellen, an denen sich zuvor IFN-γ sezernierende, also reaktive, PBMC befanden, können auf der Membran Punkte detektiert werden und die Anzahl der Punkte gezählt werden. In Abbildung II.2 ist das Prinzip des ELISPOT Assays schematisch dargestellt.



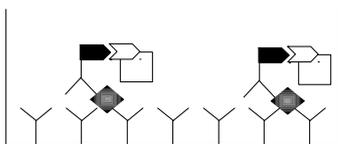
1) Eine mit anti-IFN- $\gamma$ -Antikörpern („Coating“-Antikörper) beschichtete Filterplatte.



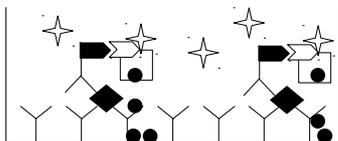
2) T-Zellen und Peptide werden hinzugefügt. Reaktive Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , welches von den Antikörpern gebunden wird.



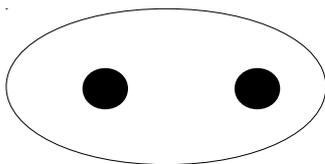
3) Zellen und Peptide werden gewaschen. Biotinylierte Antikörper („Detection“-Antikörper) werden hinzugefügt und binden an IFN- $\gamma$ .



4) Streptavidin-Alkalische-Phosphatase wird hinzugefügt und bindet an Biotin.



5) Substrat wird hinzugefügt, reagiert mit der Alkalischen Phosphatase und fällt aus.



6) Ausgefallener Farbstoff ist in Form von Punkten sichtbar und zählbar. Das Verhältnis aus Punkten und ausplattierten Zellen entspricht dem Anteil reaktiver T-Zellen.

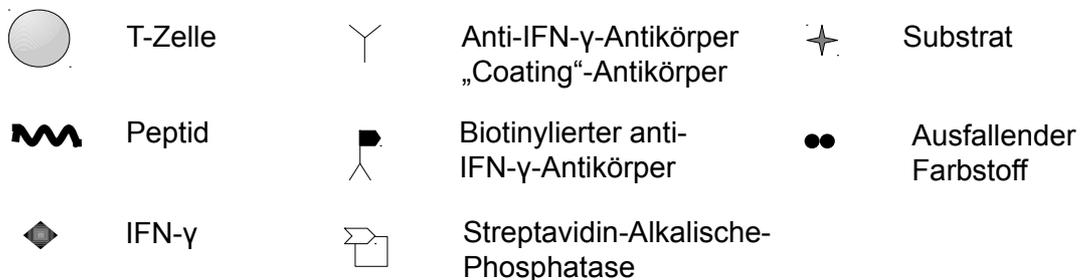


Abbildung II.2: Prinzip des ELISPOT

Für die jeweiligen Experimente dieser Arbeit wurde zunächst eine 96-well Multiscreen-Filterplatte für mindestens 24 Stunden mit anti-human-IFN- $\gamma$  Antikörpern („Coating“-Antikörper; Verdünnung 1:2.000 mit PBS; 100  $\mu$ l/Well) beschichtet. Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Coating-Antikörper entfernt, die Platte sechsmal mit PBS (200  $\mu$ l/Well) gewaschen und mit 2% FCS (100  $\mu$ l/Well) für mindestens eine Stunde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank geblockt.

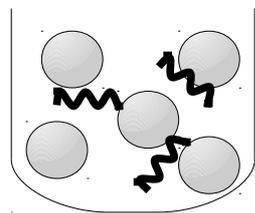
Vor dem Pipettieren der PBMC wurde das FCS verworfen und je Well 50  $\mu$ l R10 vorgelegt. Je Ansatz wurden 5.000 bis 20.000 Zellen in 100  $\mu$ l R10 und die entsprechende Menge der zu testenden Peptidlösung in die Wells pipettiert. Als Negativkontrolle diente R+ mit 10 % DMSO, als Positivkontrolle 2  $\mu$ l frisch angesetzte PMA/Ionomycin-Lösung. Die Platte wurde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht (14-16 Stunden) inkubiert.

Zur Entwicklung des ELISPOT wurden die Zellen verworfen, die Platte sechsmal mit PBS (200  $\mu$ l/Well) gewaschen und mit biotinyliertem anti-human-IFN- $\gamma$ -Antikörpern („Detection“-Antikörper; Verdünnung 1:2.000 mit PBS; 100  $\mu$ l/Well) für 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Nach erneutem sechsmaligen Waschen mit PBS (200  $\mu$ l/Well) wurde an Streptavidin gekoppelte Alkalische Phosphatase (Verdünnung 1:1.000; 100  $\mu$ l/Well) zugegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Als Substrat der Alkalischen Phosphatase wurde nach sechsmaligem Waschen mit PBS (200 $\mu$ l/Well) BCIP/NBT (50 $\mu$ l/Well) zugegeben und für 5 – 20 Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte unter fließendem Wasser ausgewaschen, für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und unter einem Auflichtmikroskop ausgezählt.

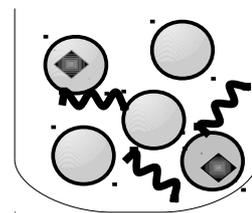
### II.3.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung – Der ICS Assay

Im ICS-Assay wurde die IFN- $\gamma$  Produktion stimulierter PBMC mittels Durchflusszytometrie (FACS, engl: Fluorescence Activated Cell Sorting) erfasst. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einzelner Zellen oder Partikel, die in Suspension an einem Laserstrahl vorbei geleitet werden. Anhand von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserstrahls können Größe beziehungsweise Granularität der Zellen festgestellt werden und damit Zellpopulationen voneinander abgegrenzt werden. Zusätzlich können durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte-Antikörper spezifische Zelloberflächenmoleküle markiert werden. Die jeweilige Fluoreszenz wird über Detektoren gemessen und erlaubt Aussagen

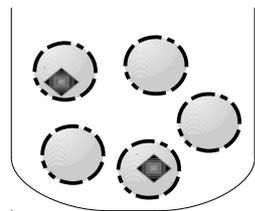
über Populationszugehörigkeit und Aktivität einzelner Zellen. Intrazelluläre Moleküle können nach Permeabilisierung der Zellmembran ebenfalls markiert werden. Sollen Moleküle untersucht werden die von den Zellen sezerniert werden, so muss die Sekretion dieser durch Zugabe von Reagenzien verhindert werden. Für die Experimente dieser Arbeit wurde Brefeldin A, ein Lacton-Antibiotikum welches den Golgi-Apparat zerstört, verwendet um die Sekretion von IFN- $\gamma$  zu unterbinden. Das Prinzip des ICS ist in Abbildung II.3 schematisch dargestellt.



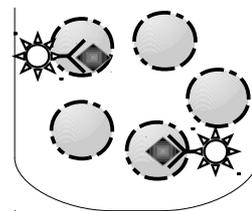
1) Stimulation der PBMC mit HCV-spezifischen Peptiden.



2) Reaktive Zellen beginnen mit der Produktion von IFN- $\gamma$ , die Sekretion wird jedoch durch die Zugabe von Brefeldin A verhindert. IFN- $\gamma$  bleibt somit in den Zellen.



3) Nach der Inkubationszeit werden die Peptide gewaschen. Die Zellmembran wird durch eine Fixations-/Permeabilisierungslösung permeabilisiert.



4) Intrazelluläres IFN- $\gamma$  wird mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern markiert und kann durchflusszytometrisch gemessen werden.



T-Zelle



Peptid



Anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper, gekoppelt an Fluoreszenzfarbstoff



IFN- $\gamma$

**Abbildung II.3:** Prinzip der Intrazellulären Zytokin-Färbung (ICS)  
Die Markierung der Oberflächenmoleküle ist nicht dargestellt.

Für die Versuche wurden je Ansatz 500.000 Zellen in 500 µl R10 mit 2,5 µl der entsprechenden Peptidlösung (2 mg/ml) stimuliert (Peptidkonzentration: 10 µg/ml) und für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz 10 µl Brefeldin A zugegeben und die Inkubation im Brutschrank über Nacht fortgesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der mit 2,5 µl R+ (10 % DMSO) stimuliert wurde.

Nach der Stimulation wurden die Zellen zunächst mit 2 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (450xg bei 4°C für 10 Minuten). Zur Markierung der Zelloberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 wurden 5 µl PerCP-, 2,5 µl V500- beziehungsweise 10 µl PE-Antikörper eingesetzt und die Ansätze für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 2 ml PBS (Zentrifugation: 450xg bei 4°C für 10 Minuten) wurden die Zellen mit 2 ml der Fixations-/Permeabilisierungslösung für 25 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Um intrazelluläres IFN-γ anzufärben, wurden die Ansätze nach dem Waschen mit 2 ml Fix-Perm-Puffer (Zentrifugation: 850xg bei 4°C für 8 Minuten) mit 2,5 µl PE-Cy7-Antikörpern für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem abschließenden Waschen mit 2 ml Fix-Perm-Puffer (Zentrifugation: 850xg bei 4°C für 8 Minuten) wurden die Ansätze mit 200 µl 0,5% PFA fixiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Diese erfolgte nach spätestens sechs Stunden an einem BD LSR II.

### II.4 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Als Einheit für die Auswertung der ELISPOT-Assays wurde die Anzahl der Spot-Forming-Cells (SFC, engl: Punkt-erzeugende-Zellen) pro 100.000 PBMC gewählt. Ausgeschlossen wurden Proben deren Positivkontrolle keine Antworten zeigten.

Als positive Antworten wurden Wells gewertet, die mindestens dreimal so viele SFC aufwiesen wie die Negativkontrolle, mindestens jedoch 30 SFC/100.000 PBMC. Alle positiven Antworten wurden in einem folgenden ICS-Assay überprüft.

Da keine Selektion der CD4<sup>+</sup> T Zellen oder eine Depletierung der CD8<sup>+</sup> T Zellen durchgeführt wurde, wurden alle im ELISPOT erfassten positiven Antworten im ICS kontrolliert. Hierdurch konnte eine Unterscheidung der T Zellen in CD3-positive (CD3<sup>+</sup>)CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> bzw. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> unternommen werden.

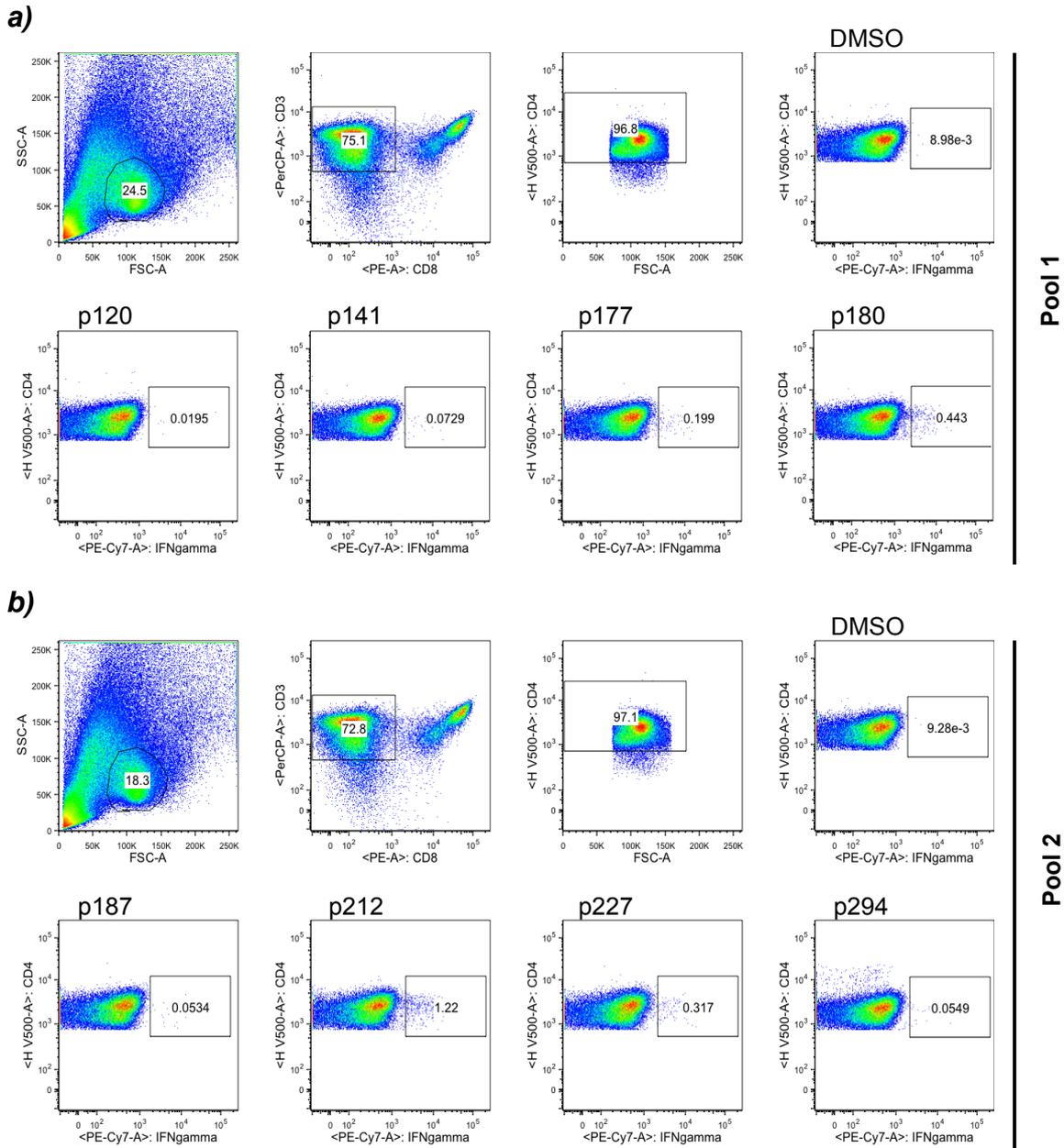
Die Messung am BD LSR II erfolgte mit Hilfe der FACS-Diva Software.

Für die Auswertung wurde das Programm FloJo genutzt. Mithilfe von Vorwärts- und Seitwärtsscatter wurde zunächst ein Lymphozyten-Gate gesetzt. Darauf folgte die Unterteilung der Lymphozyten gemäß ihrer Oberflächenmarker. Das erste Gate erfasste gleichzeitig CD3-positive (CD3<sup>+</sup>) als auch CD8<sup>-</sup> Lymphozyten. Die entsprechenden Zellen wurden durch ein weiteres Gate auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten beschränkt, welche dann auf ihre IFN- $\gamma$ -Produktion untersucht wurden.

Das Verhältnis der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen zu CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen wurde in Prozent angegeben und Frequenzen, die dreimal höher waren als die der Negativkontrolle und mindestens 0,05 % betragen, wurden als positiv gewertet.

Abbildung II.4 zeigt beispielhaft die Auswertung der ICS-Assays für R9.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism (Version 5.0b für Mac OS X), für die statistische Auswertung wurde der t-Test (Konfidenzintervall 95 %) gewählt.



**Abbildung II.4:** Auswertung der Intrazellulären Zytokinfärbung am Beispiel von R9. In der jeweils oberen Zeile ist die Gating-Strategie dargestellt: Auf das Lymphozyten-Gate folgt ein Gate, das CD3<sup>+</sup> sowie CD8<sup>-</sup> Zellen umfasst. Von diesen werden nur CD4<sup>+</sup> T Zellen auf ihre IFN- $\gamma$  Produktion untersucht. Die DMSO-Kontrolle ist jeweils rechts oben dargestellt, in der jeweils unteren Reihe wurde mit den angegeben Peptiden stimuliert. **a)** PBMC von R9 aus der Zellkultur mit Pool 1 Peptiden. Restimulation mit Peptiden p141, p177 und p180 erzeugt positive Antworten; **b)** PBMC von R9 aus der mit Pool 2 Peptiden angelegten Zellkultur. Restimulation mit Peptiden p187, p212, p227 und p294 erzeugt positive Antworten.

## III Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kenntnisse über die Hepatitis C Virus-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellantwort zu vertiefen. Dabei sollte zunächst die Aussagekraft eines aus 24 20mer Peptiden bestehenden Peptidsatzes zur Differenzierung und Beschreibung unterschiedlicher HCV Patientengruppen untersucht werden. Darüber hinaus wurden Experimente durchgeführt, die den Einfluss äußerer (Kombinationstherapie) und innerer (IL28B-Polymorphismus) Faktoren auf die HCV spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellantwort darstellen sollten. Da HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellen nur in sehr geringer Frequenz im Blut nachweisbar sind, wurden für diese Arbeit PBMC unterschiedlicher Patientengruppen mit 24 Peptiden *in vitro* Antigen-spezifisch stimuliert und unter Addition von rekombinantem IL2 in Zellkulturen für 10-12 Tage expandiert. Die HCV Peptide hatten eine Länge von 20 Aminosäuren und entsprechen der Sequenz des HCV GT1-Stammes mit der GenBank Zugangsnummer M62321. Nach Expansion wurden die PBMC erneut mit Peptiden stimuliert und ihre Reaktivität anhand der Sekretion von IFN- $\gamma$  in ELISPOTs gemessen und mit ICS-Experimenten durchflusszytometrisch verifiziert. Zur genaueren Beschreibung einzelner CD4<sup>+</sup> T Zellepitope und deren Genotyp-spezifischer Kreuzreaktivität wurden neben den 24 Peptiden auch Peptid-Trunkierungen und Genotyp-spezifische Varianten für die Re-Stimulation eingesetzt.

Die für einige Patienten mehrfach angelegten Zellkulturen unterschiedlicher Blutentnahmezeitpunkte zeigten eine gute Intertestvariabilität mit vergleichbaren Ergebnissen (Daten nicht dargestellt).

### III.1 Detektion HCV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T Zellantworten in den verschiedenen Patientengruppen

Zur Beantwortung der Frage, ob der Einsatz eines auf 24 Peptide begrenzten Peptidsatzes ausreicht, um Unterschiede zwischen Patientengruppen mit unterschiedlichem Infektionsverlauf (spontan-angewiesen, chronisch, therapiert oder akut) zu erkennen, wurden zunächst aufbereitete PBMC in *in vitro* Zellkulturen mit zwei Peptidpools, bestehend aus jeweils 12 GT1-Peptiden, stimuliert und expandiert. Danach wurde die



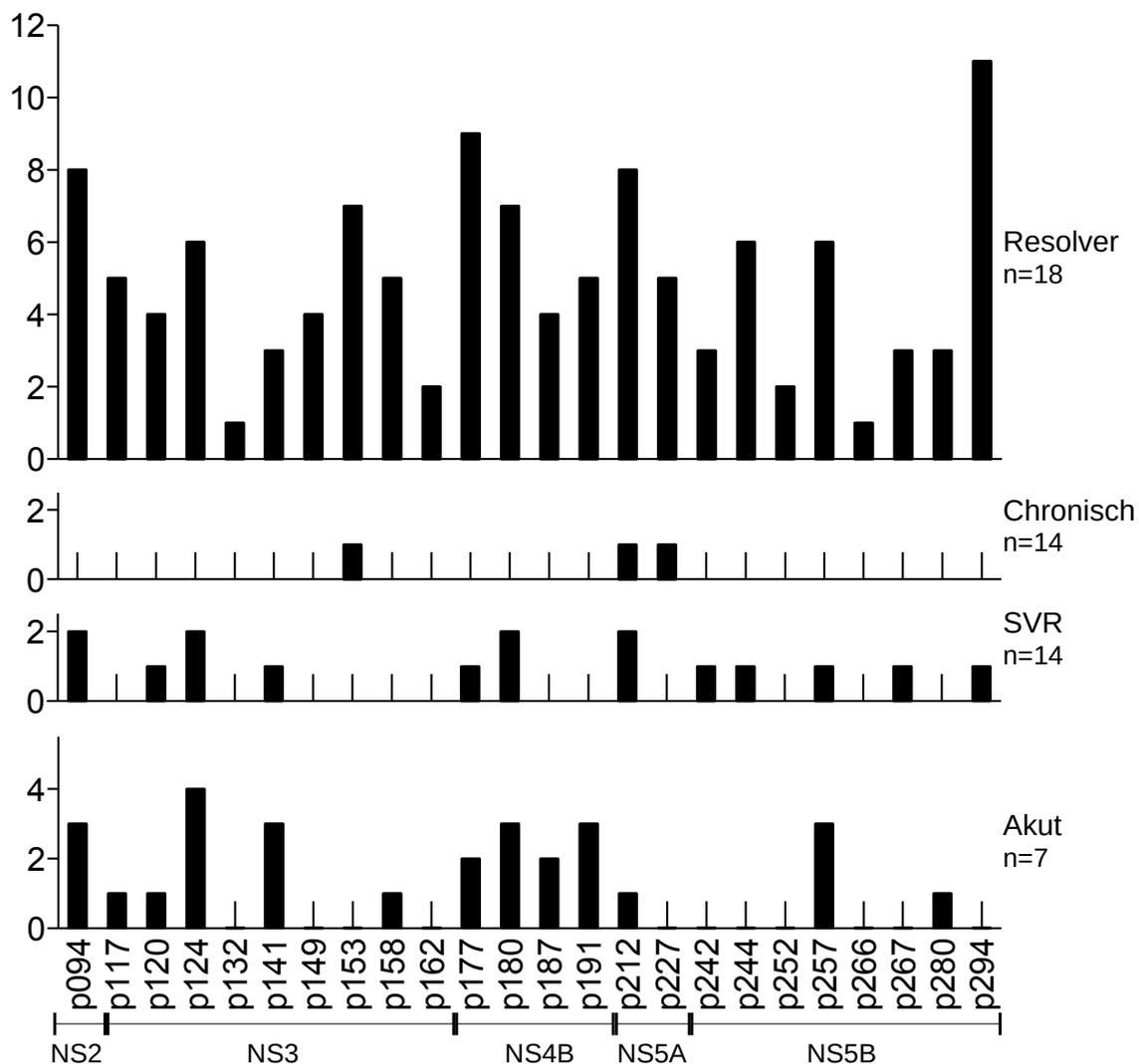
Die SVR-Gruppe zeigte mit rund 1 (1,14) detektierten Peptid (SEM:0,62; n=14) einen signifikanten Unterschied zu den Spontanresolvern ( $p < 0,0001$ ), jedoch mit einem p-Wert von 0,16 keinen signifikanten Unterschied zu den chronisch Infizierten. Hierbei zeigten neun der Probanden keine Antworten, bei fünf der SVR-Probanden konnten eine bis maximal sieben Antworten detektiert werden.

Die Gruppe der akute Erkrankten zeigte mit über 3 (3,71) erkannten Peptiden (SEM:1,06; n=7) signifikante Unterschiede zur SVR-Gruppe ( $p = 0,04$ ), mit einem p-Wert von 0,08 erreichte der Unterschied der Akut-Gruppe zu den Resolvern keine Signifikanz. Mit Ausnahme von A6 wurden zwischen 1 und 8 Peptiden erkannt.

In der Kontrollgruppe wurde bei keinem der 10 HCV-negativen Probanden eine HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellantwort gefunden.

#### III.1.2 Detektionsfrequenz der 24 HCV-Peptide

Abbildung III.2 zeigt die Detektionsfrequenz der einzelnen Peptide in den jeweiligen Gruppen. In der Gruppe der Spontanresolver wurde jedes der Peptide zumindest einmal erkannt. Das meist detektierte Peptid p294 wurde von elf Patienten erkannt (61 %), während die Peptide p132 und p266 jeweils nur von einem Patienten detektiert wurden. Die drei Peptide p094, p177 und p212 wurden in dieser Gruppe von mehr als 40 % der Patienten erkannt. Von mehr als 30 % der Patienten wurden zudem die Peptide p124, p153, p180, p244 und p257 detektiert. Die bei chronisch Infizierten reaktiven Peptide waren p153, p212 und p227. In der SVR-Gruppe ergab sich eine gleichmäßige Verteilung der reaktiven Peptide über die eingesetzten Antigene, wobei die Peptide p094, p124, p180 und p212 jeweils von zwei Probanden, acht weitere Peptide (p120, p141, p177, p242, p244, p257, p267, p294) von jeweils einem Probanden detektiert wurden. Auch in der Akut-Gruppe zeigte sich in jedem Antigen-Bereich zumindest eine Antwort. Auffällig ist hier, dass das meist erkannte Peptide der Resolver-Gruppe p294 bei keinem der akut infizierten Patienten positive Antworten hervorrief, während die weitere Verteilung reaktiver Peptide Ähnlichkeit zur Resolver-Gruppe besitzt.



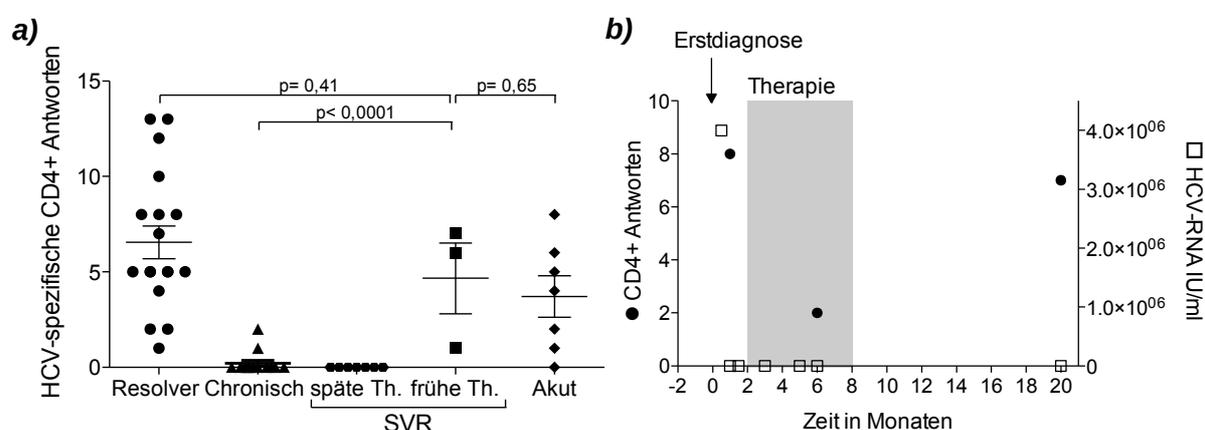
**Abbildung III.2:** Detektionsfrequenz der 24 HCV-Peptide in den Kohorten. Die Kohorte ist rechts angegeben. Die Balken geben an, von wie vielen Probanden das jeweilige Peptid innerhalb einer Kohorte detektiert wurde. SVR, Sustained Virological Response (Dauerhaft virologisches Therapieansprechen).

### III.2 Auswirkungen der Kombinationstherapie auf die CD4<sup>+</sup> T Zellantwort

Um den Einfluss der antiviralen Kombinationstherapie auf die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T Zellantworten zu untersuchen, wurde eine Stratifizierung der SVR-Gruppe in Patienten, die ihre Therapie innerhalb von sechs Monaten nach Beginn der akuten HCV-Infektion begannen (frühe Therapie) und Patienten, die erst in der chronischen Phase therapiert

wurden (späte Therapie), unternommen. Dies erbrachte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung III.3a). Für vier Patienten konnte der Infektionszeitpunkt nicht eruiert werden.

Die drei Patienten mit frühem Therapiebeginn zeigten eine, sechs bzw. sieben CD4<sup>+</sup> T Zellantworten (Durchschnitt: 4,67; SEM 1,86) und damit eine mit der Akut-Gruppe ( $p=0,65$ ) und der Resolver-Gruppe ( $p=0,41$ ) vergleichbare Anzahl an Antworten. Zur Gruppe der chronisch Erkrankten ergab sich damit ein signifikanter Unterschied ( $p<0,0001$ ). In der Gruppe der Spättherapierten konnte keine HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellantwort nachgewiesen werden.



**Abbildung III.3:** **a)** Anzahl der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten, wobei die SVR-Kohorte in Patienten mit frühem (<6 Monate nach Infektion) und spätem (>6 Monate nach Infektion) Therapiebeginn unterteilt wurde. **b)** Anzahl der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten von SVR2 in der akuten Phase, während der Therapie und 12 Monate nach Therapieende. Linke y-Achse und ● zeigen die CD4<sup>+</sup> Antworten, Rechte y-Achse und □ zeigen die HCV-Viruslast in IU/ml. SVR, Sustained Virological Response (Dauerhaft virologisches Therapieansprechen).

Zur Erzeugung longitudinaler Daten über den Verlauf der Anzahl der CD4<sup>+</sup> T Zellantworten während der Kombinationstherapie, konnten PBMC von SVR2 verwendet werden. Diese waren von Zeitpunkten aus der akuten Phase, während und nach Therapie vorhanden (Abbildung III.3b). In der akuten Phase waren acht Antworten detektierbar, 16 Wochen nach Therapiebeginn zeigte sich eine Reduktion auf zwei Antworten, sowie zum Zeitpunkt zwölf Monate nach abgeschlossener Therapie ein Wiederanstieg der erkannten Peptide

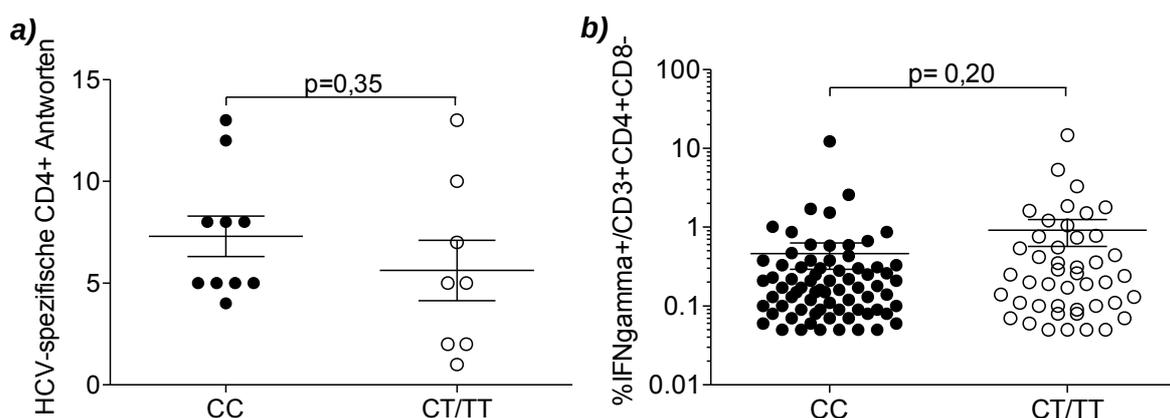
auf sieben. Die HCV-Viruslast sank noch vor dem eigentlichen Therapiebeginn auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze.

### III.3 Einfluss des IL28B-Polymorphismus auf die Anzahl HCV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T Zellantworten

Zur Beurteilung des Einflusses des IL28B-Polymorphismus (rs12979860) auf die Anzahl der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantworten, wurden die durch ELISPOT und ICS ermittelten positiven Antworten in der Patientengruppe der Spontanresolver in Abhängigkeit des IL28B Genotyps gegenübergestellt.

Zunächst wurde die Anzahl der detektierten Peptide verglichen (Abbildung III.4a). Hier zeigten sich bei den Probanden, die homozygot für das C Allel waren, vergleichbare Antwortzahlen wie bei Probanden mit dem Haplotyp CT/TT (7,30; SEM: 0,99; n=10 vs 5,63; SEM: 1,49; n=8; p=0,35).

Im Vergleich der Antwortstärken zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier bestanden, gemessen an der Frequenz der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen, keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der CT/TT Probanden und den Probanden mit der CC Ausprägung (0,46; SEM: 0,17; n=73 vs. 0,91; SEM: 0,35; n=44; p=0,2; Abbildung III.4b).



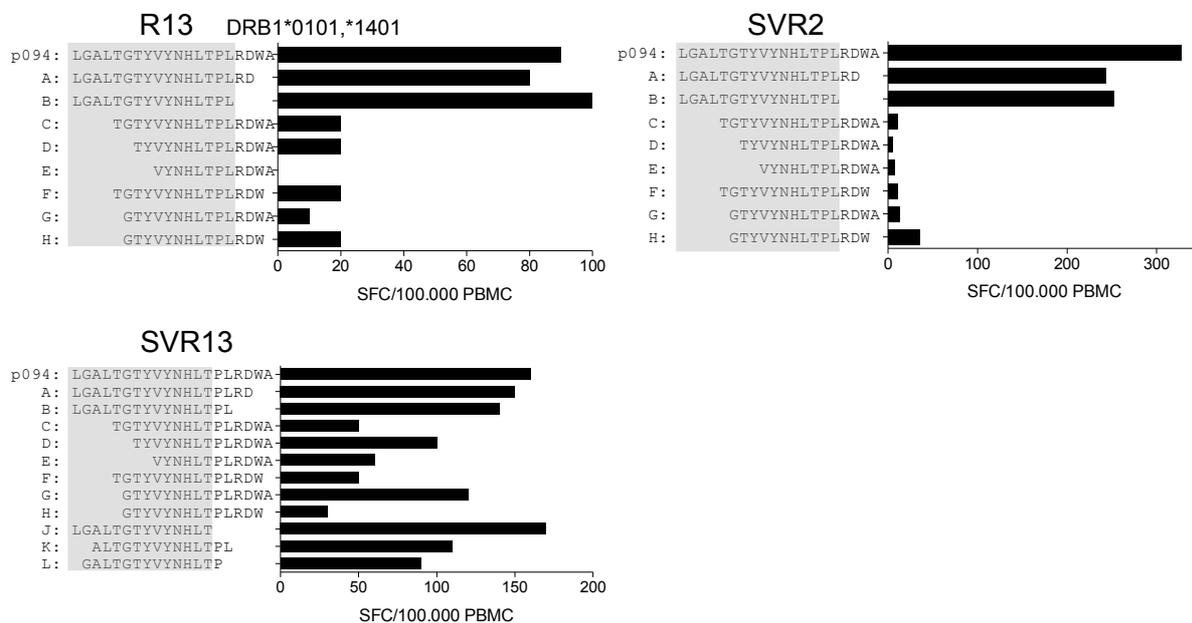
**Abbildung III.4:** Einfluss des IL28B-Genotyps auf die HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten der Resolver-Kohorte. **a)** Anzahl der T-Zellantworten in Abhängigkeit der IL28B-Ausprägung (CC vs. CT/TT). Jedes Symbol repräsentiert die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten eines Probanden. **b)** Antwortstärke in Abhängigkeit der IL28B-Ausprägung gemessen in % IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen. Jedes Symbol zeigt die Antwortstärke gegenüber eines einzelnen Peptides.

### III.4 Feincharakterisierung von Epitopsequenzen

Mit den PBMC einiger Probanden konnten in ELISPOT Experimenten die Länge der Aminosäuresequenzen dreier Epitope charakterisiert werden. Diese sind für die Herstellung neuer Klasse-II-Tetramere notwendig, für die Peptide mit einer maximalen Länge von 11-14 AA eingesetzt werden. Hierzu wurden neben den eigentlichen 20mer-Peptiden p094 beziehungsweise p212 zusätzliche, an C- und N-Terminus verkürzte Peptide (Trunkierungen) eingesetzt. Ergänzend wurde mit netMHCIIpan-3.0 der 9mer Kernbereich des Epitops und die Affinität zum jeweiligen HLA-Molekül berechnet (Tabelle III.1).

#### III.4.1 p094

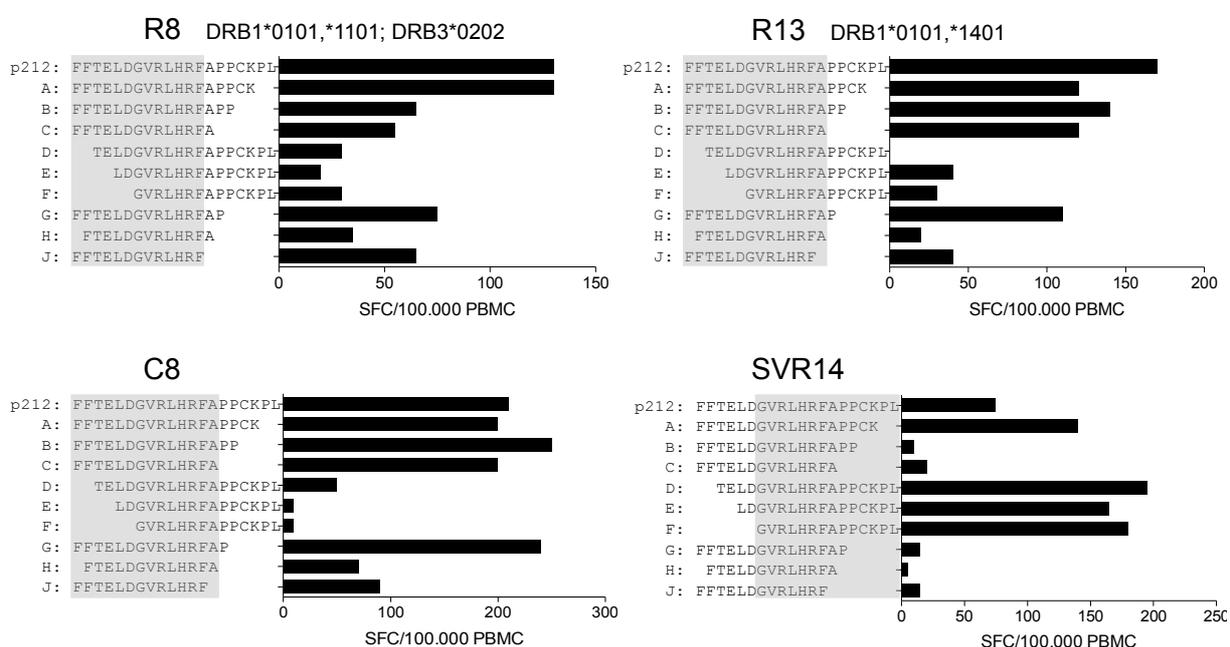
Die Experimente ergaben für p094 die 16AA-Sequenz LGALTGTYYVYNHLLTPL für R13 und SVR2, beziehungsweise nach dem Einsatz weiterer Trunkierungen die 14AA-Sequenz LGALTGTYYVYNHLLT für SVR13 (Abbildung III.5). Die *in silico* Analyse gab YVYNHLLTPL als das genaue Epitop an, welches mit hoher Affinität (9,80nM) an DRB1\*0101 und mit schwacher Affinität (66,77nM) an DRB1\*1401 band (Tabelle III.1).



**Abbildung III.5:** p094-Feincharakterisierung durch Stimulation von PBMC unterschiedlicher Patienten mit dem 20mer-Peptid (p094) und Peptidtrunkierungen (A-L) in ELISPOT-Assays. Die reaktive Region ist grau hinterlegt. SVR, Sustained Virological Response (Dauerhaft virologisches Therapieansprechen).

## III.4.2 p212

Für p212 konnten zwei separate Epitope ermittelt werden. Es zeigte sich in Experimenten mit PBMC von R8 die 13AA-Sequenz FFTELDGVLHRF, bei den Proben von R13 und C8 die 14AA-Sequenz FFTELDGVLHRFA. Im Versuchsansatz mit PBMC von SVR14 konnte ein 12mer Peptid mit der AA-Sequenz GVRLHRFAPPCK ermittelt werden (Abbildung III.6). NetMHCIIpan-3.0 gab die 9mer Kernbereiche FTELDGVRL und LHRFAPPCK an, die je nach HLA-Molekül präsentiert wurden (Tabelle III.1).



**Abbildung III.6:** p212-Feincharakterisierung durch Stimulation von PBMC unterschiedlicher Patienten mit dem 20mer-Peptid (p212) und Peptidtrunkierungen (A-J) in ELISPOT-Assays. Die reaktive Region ist grau hinterlegt. SVR, Sustained Virological Response.

Tabelle III.1: Ermittelte Epitopsequenzen

Peptid/Epitop	AA-Sequenz	Kommentar
<b>p094</b>		
AA941-960*	LGALTGTYVYNHLTPLRDWA	
Experimentell	LGALTGTYVYNHLTPL LGALTGTYVYNHLT LGALTGTYVYNHLT	R13: DRB1*0101,*1401 SVR1 SVR13
NetMHCIIpan <sup>^</sup>	YVYNHLTPL YVYNHLTPL	DRB1*0101 (9,80nM) DRB1*1401 (66,77nM)
<b>p212</b>		
AA2121-2140*	FFTELDGVRLLHRFAPPCKPL	
Experimentell	FFTELDGVRLLHRF FFTELDGVRLLHRFA FFTELDGVRLLHRFA GVRLLHRFAPPCK	R8: DRB1*0101,*1101; DRB3*0202 R13: DRB1*0101,*1401 C8 SVR14
NetMHCIIpan <sup>^</sup>	FFTELDGVRLL LHRFAPPCK LHRFAPPCK	DRB1*0101 (31,06nM) DRB1*1101 (115,19nM) DRB3*0202 (280,68nM)

\*bezieht sich auf GT1a, GenBank M62321.

<sup>^</sup>netMHCIIpan-3.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-3.0>

### III.5 Kreuz-Genotyp-Reaktivität ausgewählter Peptide

Sowohl für das Verständnis der immunologischen Mechanismen bei HCV-Reinfektionen, als auch für die Auswahl von Epitopen für eine optimale HCV-Vakzine, ist die Aufklärung der Kreuz-Genotyp-Reaktivität einzelner Epitope wichtig. Aus diesem Grund wurden zunächst die Genotyp-spezifische Aminosäuresequenzen (Genotypen 1a, 1b, 2a, 2b, 3a und 4a) der 24 verwendeten Peptide analysiert. Einen Überblick über die Genotyp-spezifischen Unterschiede der Peptidsequenzen gibt Tabelle III.2. Die Varianten aller 24 Peptide sind im Anhang dargestellt (Tabelle VIII.2). In weitergehenden Experimenten wurden die Varianten von fünf Peptiden zur Stimulation von PBMC eingesetzt und deren Reaktivität anhand der IFN- $\gamma$  Sekretion in ELISPOT-Assays gemessen. Im Folgenden sind die Aminosäuresequenzen und Varianten, die Feincharakterisierungen und HLA-Restriktionen, sowie die Ergebnisse der ELISPOTs der Peptide p180, p212, p227, p257 und p294 dargestellt. Ebenso wurde die Affinität der Peptidvarianten zu den HLA-II-Molekülen der jeweiligen positiv getesteten Probanden *in silico* mithilfe des netMHCIIpan Servers (Version 3.0; (Karosiene et al. 2013)) bestimmt und angegeben.

	n	94	117	120	124	132	141	149	153	158	162	177	180
<b>GT1a</b>													
<b>GT1b</b>	Cons.	10	5	10	0	10	5	15	10	10	5	0	10
<b>GT2a</b>	19	40	20	40	15	25	20	35	15	25	20	25	40
<b>GT2b</b>	25	40	25	50	10	15	15	30	10	25	10	10	40
<b>GT3a</b>	8	55	15	35	10	5	15	25	20	20	15	10	25
<b>GT4a</b>	16	40	20	15	5	10	15	25	20	35	15	5	15
		NS2					NS3						NS4B
	n	187	191	212	227	242	244	252	257	266	267	280	294
<b>GT1a</b>													
<b>GT1b</b>	Cons.	5	0	15	25	15	10	30	0	20	20	0	5
<b>GT2a</b>	19	25	10	45	55	35	30	60	20	45	25	25	20
<b>GT2b</b>	25	25	5	45	55	20	25	45	15	45	30	25	20
<b>GT3a</b>	8	20	5	20	55	15	15	50	15	35	35	15	25
<b>GT4a</b>	16	10	5	30	45	10	25	30	25	35	40	15	25
		NS4B		NS5A				NS5B					

**Tabelle III.2:** Analyse der GT-spezifischen Peptidsequenzen

Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Aminosäuren am 20mer an, die sich von der GT1a Sequenz unterscheiden. n, Anzahl der einbezogenen Virusstränge je Genotyp, für GT1b wurde eine Consensus-Sequenz aus 355 Strängen gebildet.

III.5.1 p180

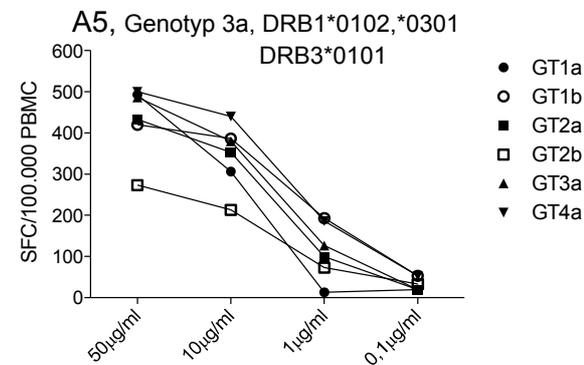
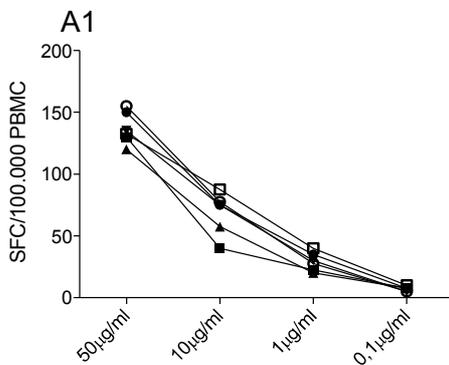
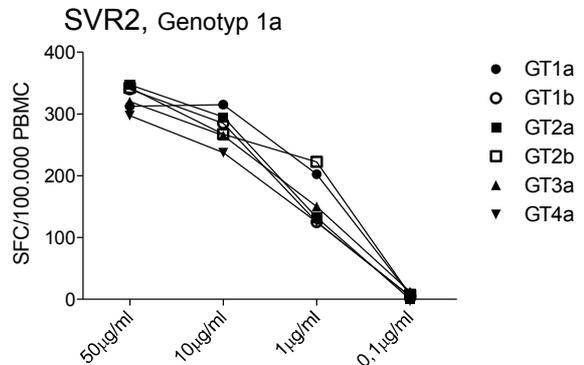
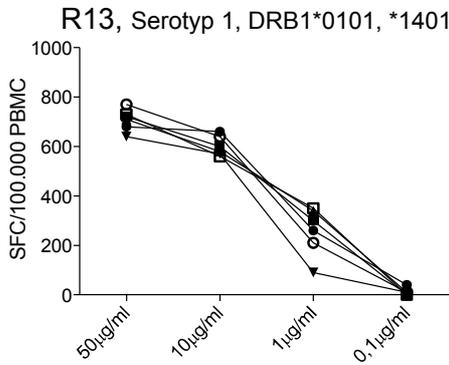
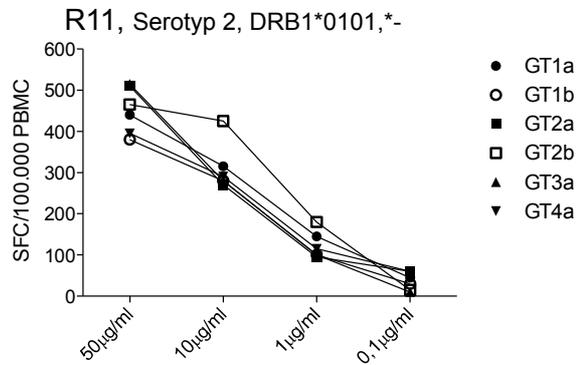
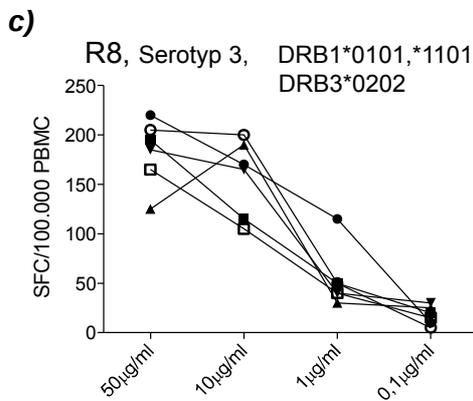
a)

p180	
GT1a	L T T S Q T L L F N I L G G W V A A Q L ←
GT1b	. . . Q H . . . . . . . . . . . . . . . . ←
GT2a	. S . . T . I . L . . . . . . L . S . I 17/19 ←
	. S . . T . I . L . . M . . . . L . S . I 1/19 ←
	. S . . T . I . L . . . R . L . S . I 1/19 ←
GT2b	. P . . T . I . L . . M . . . . L . S . I 22/25 ←
	. S . . T . I . L . . M . . . . L . S . I 3/25 ←
GT3a	. . . N . . M F . . . . . . . . . T H . 6/8 ←
	. . . N . . V F . . . . . . . . . T H . 2/8 ←
GT4a	. . . Q . . . . . . . . . . . . . S . I 16/16 ←

b)

Epitop	HLA-Restriktion
LFNILGGWVA	DRB1*0101, *0102
FNILGGWVAAQL	DRB1*0101/*1301
FNILGGWVA	DRB1*0101/*0701

Gerlach et al. 2005



Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite

d)

DRB1*0101		DRB1*0102		DRB1*0301		DRB1*1101		
Epitop	Affinität	Epitop	Affinität	Epitop	Affinität	Epitop	Affinität	
GT1a	FNILGGWVA	26,67nM	FNILGGWVA	12,03nM	LTTSQTLLE	2239,25nM	FNILGGWVA	678,94nM
GT1b	FNILGGWVA	25,71nM	FNILGGWVA	11,58nM	LTTQHTLLE	2315,86nM	FNILGGWVA	548,85nM
GT2a	LNILGGWLA	32,67nM	LNILGGWLA	10,37nM	ILGGWLASQ	3340,99nM	LNILGGWLA	811,69nM
GT2b	LNIMGGWLA	28,49nM	LNIMGGWLA	9,86nM	IMGGWLASQ	3688,68nM	LNIMGGWLA	828,44nM
GT3a	FNILGGWVA	25,37nM	FNILGGWVA	12,97nM	LTTNQTMEF	1986,27nM	FNILGGWV	552,77nM
GT4a	FNILGGWVA	30,30nM	FNILGGWVA	13,18nM	LTTQQTLE	2669,37nM	FNILGGWVA	763,86nM

DRB1*1401		DRB3*0101		DRB3*0202		
Epitop	Affinität	Epitop	Affinität	Epitop	Affinität	
GT1a	LFNILGGWV	1092,64nM	LTTSQTLLE	1980,82nM	FNILGGWVA	1269,95nM
GT1b	LFNILGGWV	984,65nM	ILGGWVAAQ	2029,50nM	LTTQHTLLE	1130,9nM
GT2a	LNILGGWLA	1043,95nM	ILGGWLASQ	2871,99nM	LNILGGWLA	1778,93nM
GT2b	LNIMGGWLA	1172,13nM	IMGGWLASQ	3167,38nM	LNIMGGWLA	1613,63nM
GT3a	ILGGWVATH	1174,88nM	LTTNQTMEF	1371,01nM	LTTNQTMEF	1018,94nM
GT4a	LFNILGGWV	1068,36nM	ILGGWVASQ	2231,92nM	LTTQQTLE	1176,4nM

**Abbildung III.7:** p180 (AA 1801-1820)

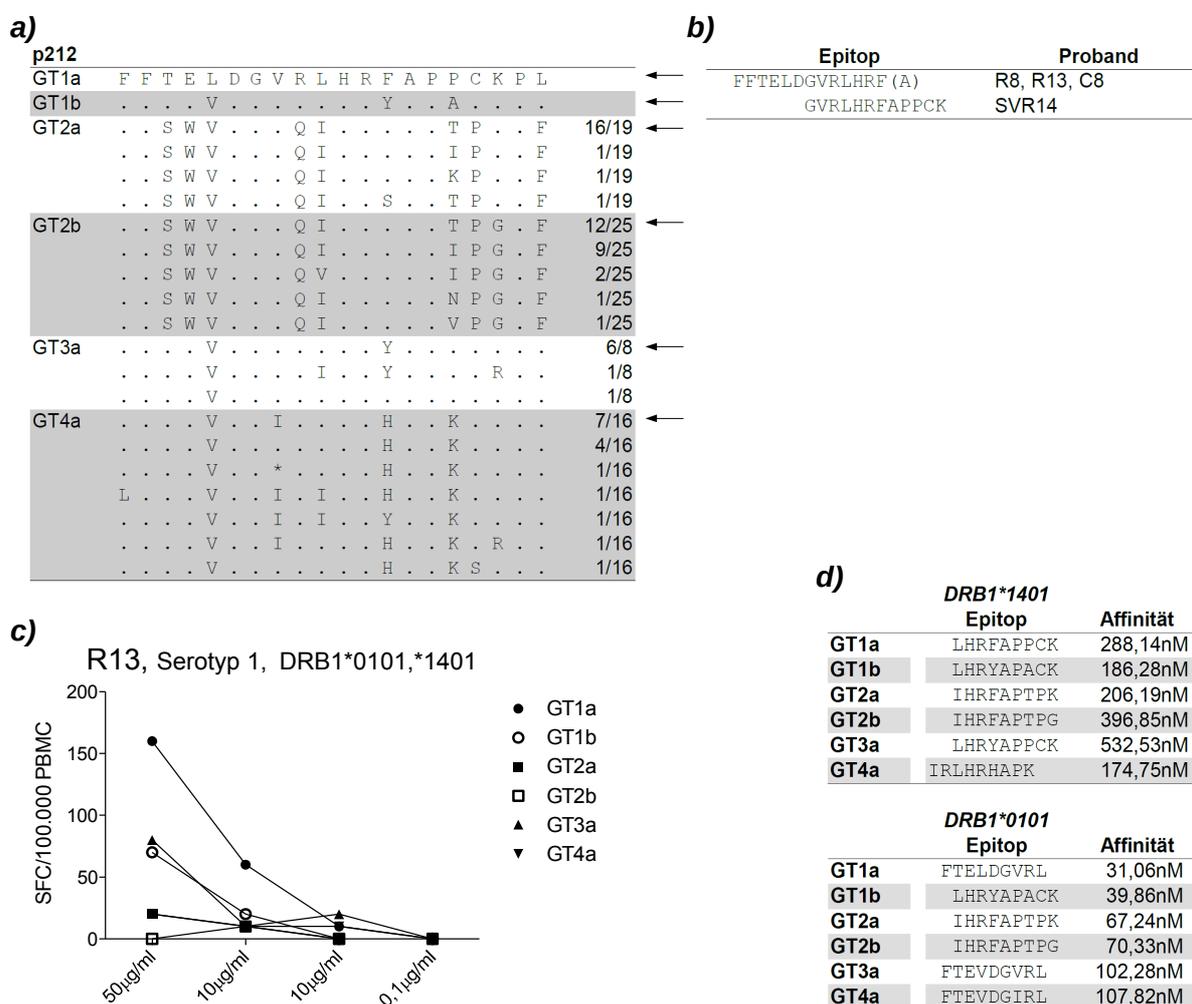
**a)** Vergleich Genotyp-spezifischer Aminosäuresequenzen. Punkte repräsentieren die jeweils gleiche Aminosäure wie im GT1a-Peptid (GenBank M62321). Pfeile markieren die ausgewählten Peptidvarianten. **b)** Publierte Epitop-Feincharakterisierung und zugehörige HLA-Restriktion. **c)** ELISPOT-Assays mit PBMC der jeweiligen Probanden mit Peptidvarianten in unterschiedlichen Konzentrationen. **d)** *In silico* Bestimmung der Epitopsequenz der Peptidvarianten und Bindungsaffinität an die HLA-II-Moleküle der Probanden.

Die Analyse der Aminosäuresequenzen von p180 ergab für die Genotypen 2a/b die größte Divergenz zur GT1a Sequenz mit bis zu 40% veränderten Aminosäuren im 20mer Peptid. Betrachtet man das von Gerlach und Kollegen feincharakterisierte 9mer Epitop FNILGGWVA, so sind auch hier die Genotyp 2a/b Varianten diejenigen mit dem größten Unterschied zur GT1a Referenz (Gerlach et al. 2005). Die weiteren Genotypen wiesen keine Veränderungen zum beschriebenen 9mer auf, wobei auf 20mer Ebene jedoch Unterschiede (GT1b 10%, GT3a 25%, GT4a 15%) bestanden. In den ELISPOT-Assays, in denen PBMC von sechs Probanden mit den Varianten stimuliert wurden, zeigten sich vergleichbare IFN- $\gamma$  Antworten für alle eingesetzten Peptide. Diese vollständige Kreuz-Genotyp-Reaktivität bestand unabhängig vom klinischen Status, da sie in allen Gruppen vergleichbar auftrat und auch der Genotyp der Primärinfektion geringen bis keinen Einfluss zu haben schien. Lediglich Proband A5 zeigte eine schwächere Reaktivität gegenüber dem GT2b Peptid.

Als restringierende HLA-Moleküle für das Epitop wurden von Gerlach *et al.* DRB1\*0101 und \*0102 beschrieben. Alle vier Probanden, für die die HLA-Merkmale bestimmt werden konnten, besaßen eines dieser Moleküle. Auch die *in silico* Bestimmung der HLA-Affinität ergab mögliche Bindungen nur für diese beiden Merkmale, während keines der anderen

getesteten Moleküle die eingesetzten Peptide binden konnte. DRB1\*0101 und \*0102 konnten alle Peptidvarianten mit hoher Affinität binden (Abbildung III.7). Der Grund für die bei A5 gemessenen eingeschränkten Reaktivität der GT2b Variante des Epitopes p180 blieb unklar. Die einzige ausschließlich im GT2b Peptid auftretende Veränderung ist die L→M Veränderung an der zwölften Stelle des 20mer Peptids.

### III.5.2 p212



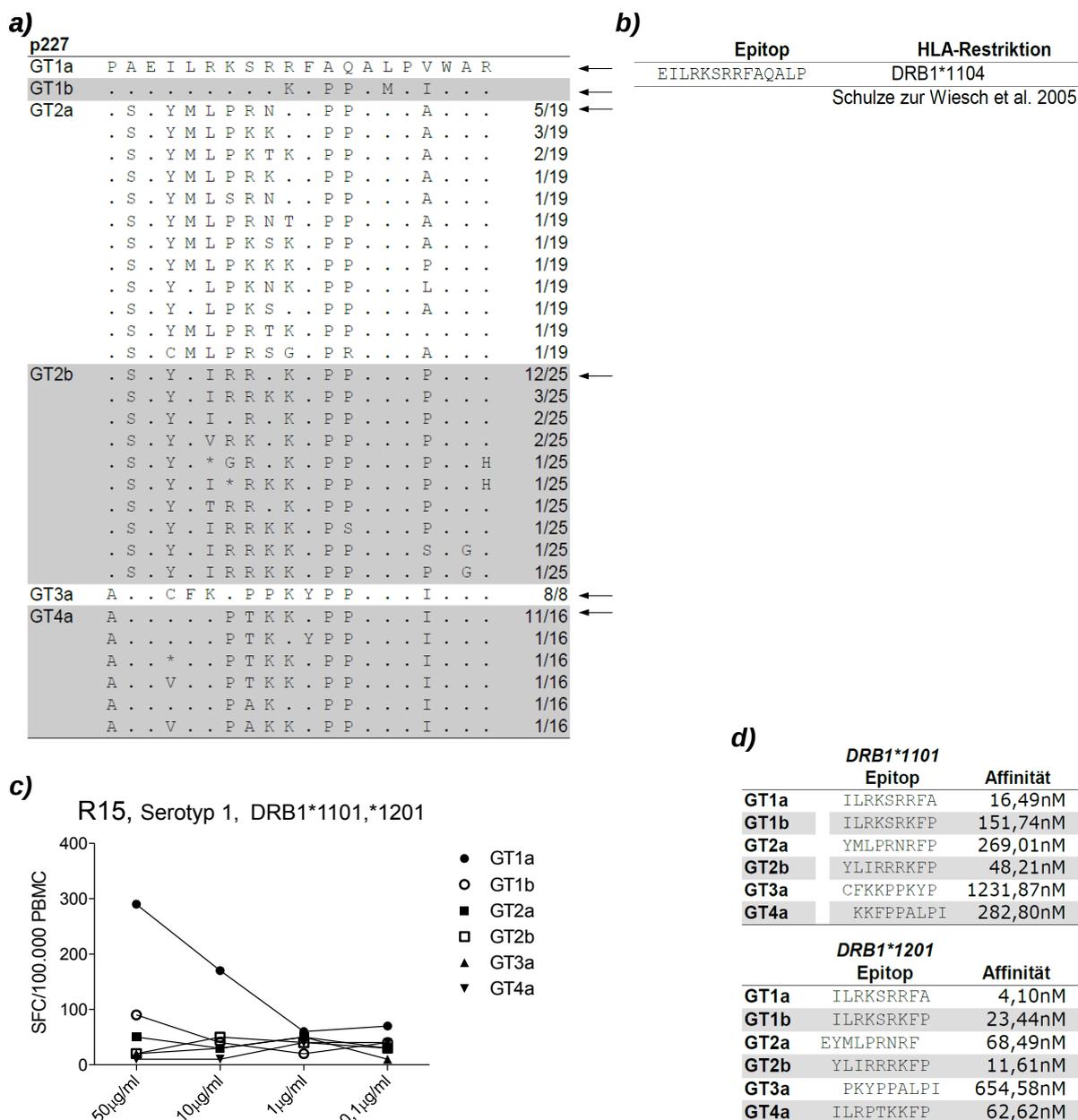
**Abbildung III.8:** p212 (AA 2121-2140)

**a)** Vergleich Genotyp-spezifischer Aminosäuresequenzen. Punkte repräsentieren die jeweils gleiche Aminosäure wie im GT1a-Peptid (GenBank M62321). Pfeile markieren die ausgewählten Peptidvarianten. **b)** Ermittelte Epitop-Feincharakterisierung für die zugehörigen Probanden. **c)** ELISPOT-Assays mit PBMC von R13 mit Peptidvarianten in unterschiedlichen Konzentrationen. **d)** *In silico* Bestimmung der Epitopsequenz der Peptidvarianten und Bindungsaffinität an die HLA-II-Moleküle des Probanden.

Die Sequenzen von p212 unterschieden sich im Fall von GT1b in maximal 15%, GT2a/b in 45%, GT3a in 20% und GT4a in 30% der Aminosäuren von der GT1a Referenzsequenz. Auch innerhalb der einzelnen Genotypen bestand eine große Variabilität. Im ELISPOT konnten nur PBMC von R13 mit den ausgewählten Varianten getestet werden, wobei keine Variante gleich starke Antworten wie das GT1a Peptid hervorrief. In der höchsten Konzentrationsstufe konnten die GT1b und GT3a Peptide etwa 45% der Spots der GT1a Variante erzeugen. Bei einer Peptidkonzentration von 10µg/ml führte nur das GT1a Peptid zu einer Aktivierung der PBMC.

#### III.5.3 p227

Die maximalen Unterschiede im Bereich von p227 beliefen sich für GT1b auf 25%, GT2a/b und GT3a auf 55% und GT4 auf 45% auf Aminosäure-Niveau. Mit Ausnahme von GT3a bestand auch innerhalb der Genotypen eine große Divergenz. Besonders im Bereich des von Schulze zur Wiesch und Kollegen charakterisierten Epitops traten in den Genotypen 2 – 4 Veränderungen auf, die zu fehlender Kreuz-Reaktivität führten (Schulze zur Wiesch et al. 2005). Das von Schulze zur Wiesch *et al.* veröffentlichte restringierende HLA-Molekül DRB1\*1104 ist kein Merkmal von R15, jedoch zeigte die *in silico* Bestimmung, dass die DRB1\*1101 und \*1201 Moleküle des Probanden mit hoher Affinität das GT1a Peptid binden und präsentieren konnten. Die Affinität zur GT1b-Variante war geringer, jedoch für DRB1\*1201 noch im Bereich starker Bindung (<50nM).



**Abbildung III.9:** p227 (AA 2271-2290)

**a)** Vergleich Genotyp-spezifischer Aminosäuresequenzen. Punkte repräsentieren die jeweils gleiche Aminosäure wie im GT1a-Peptid (GenBank M62321). Pfeile markieren die ausgewählten Peptidvarianten. **b)** Publiizierte Epitop-Feincharakterisierung und zugehörige HLA-Restriktion. **c)** ELISPOT-Assays mit PBMC von R15 mit Peptidvarianten in unterschiedlichen Konzentrationen. **d)** *In silico* Bestimmung der Epitopsequenz der Peptidvarianten und Bindungsaffinität an die HLA-II-Moleküle des Probanden.

### III.5.4 p257

p257 stellte sich im Vergleich der Aminosäuresequenzen mit maximal 25% Unterschied einer GT4a Variante zur GT1a Referenz als gut konservierter Bereich dar. Das von Schulze zur Wiesch *et al.* feincharakterisierte Epitop beinhaltete in den Genotypen 2 – 4 eine F→Y Veränderung an zwölfter Stelle. Die zwei eingesetzten Peptidvarianten, die sich im Bereich des Epitop nur durch diese F→Y Veränderung unterschieden (GT2ab und GT3a/4a), erzeugten bei R10, R14 und R18 gleich starke Antworten wie das GT1ab Peptid. Bei R5 konnten GT2ab und GT3a/4a bei einer Konzentration von 10µg/ml relativ zu GT1ab nur etwa 66% der T Zellen aktivieren. Weitere Veränderungen innerhalb des Epitops traten bei lediglich 5 von 78 Sequenzen auf. Die außerhalb des beschriebenen Epitops liegenden Mutationen waren für die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T Zellen unbedeutend: Die Varianten von GT2ab und GT3a/4a, die sich in zwei Aminosäuren voneinander unterschieden, stimulierten die PBMC aller Probanden gleich stark. Die einzige getestete Variante (GT2a) mit einer innerhalb des Epitops liegenden Mutation stimulierte die PBMC aller Probanden am wenigsten. Diese G→S Veränderung an Aminosäureposition 2586 lag bei 2 von 19 GT2a Sequenzen vor. Nur zwei der Probanden besaßen das publizierte restringierende HLA-II-Molekül DRB1\*0404. Die von R10 exprimierten HLA-Merkmale DRB1\*0701 und \*1501 hatten jedoch laut *in silico* Prädiktion etwa die gleiche Affinität zur GT1ab Sequenz wie DRB1\*0404. Die auftretenden Mutationen hatten geringen Einfluss auf die Bindung an die HLA-Moleküle. Im Fall der verwendeten GT2a Sequenz erhöhte sich die Affinität zu allen drei Molekülen, eine Kreuz-Genotyp-Reaktivität war dennoch nicht zu beobachten.

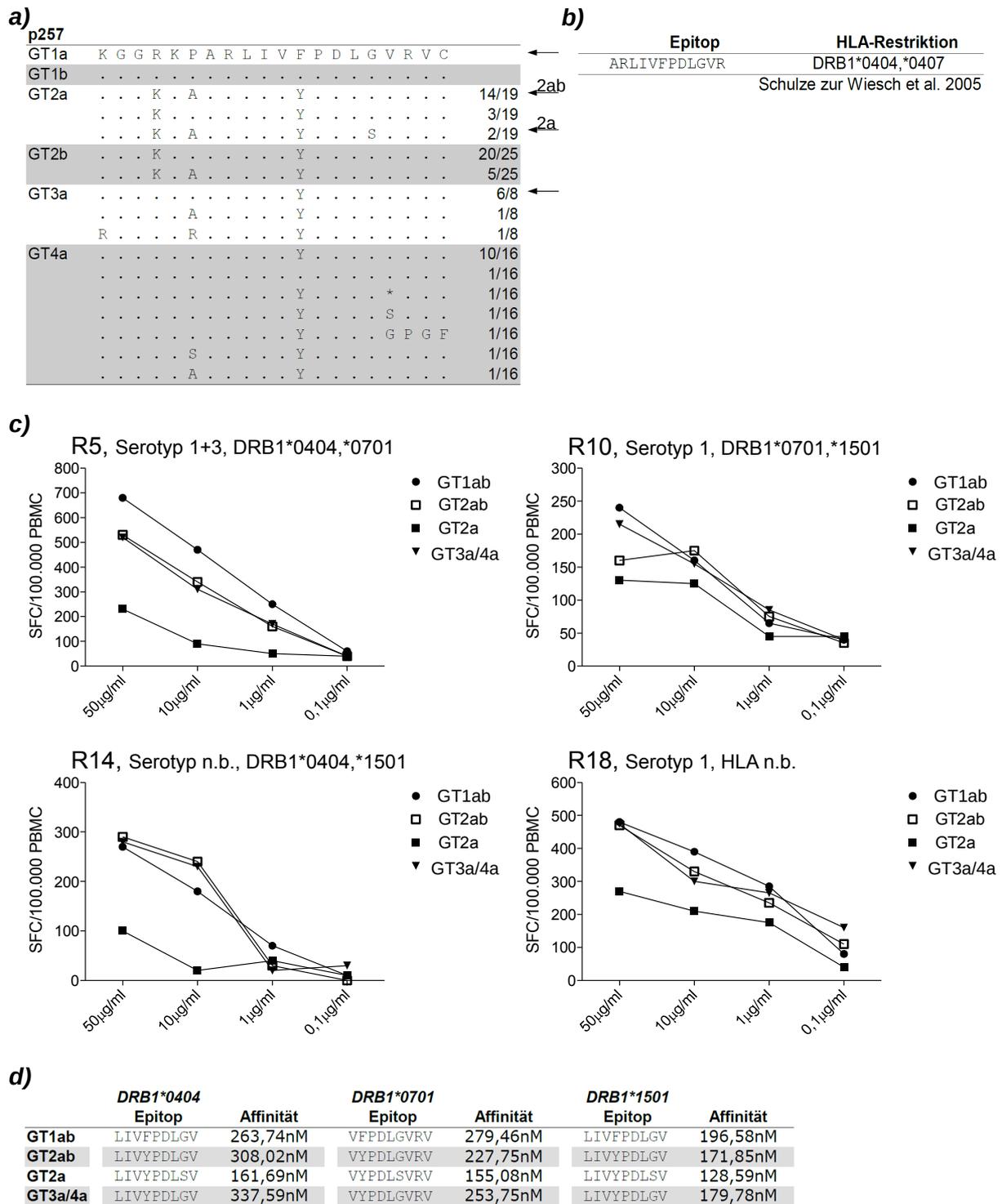
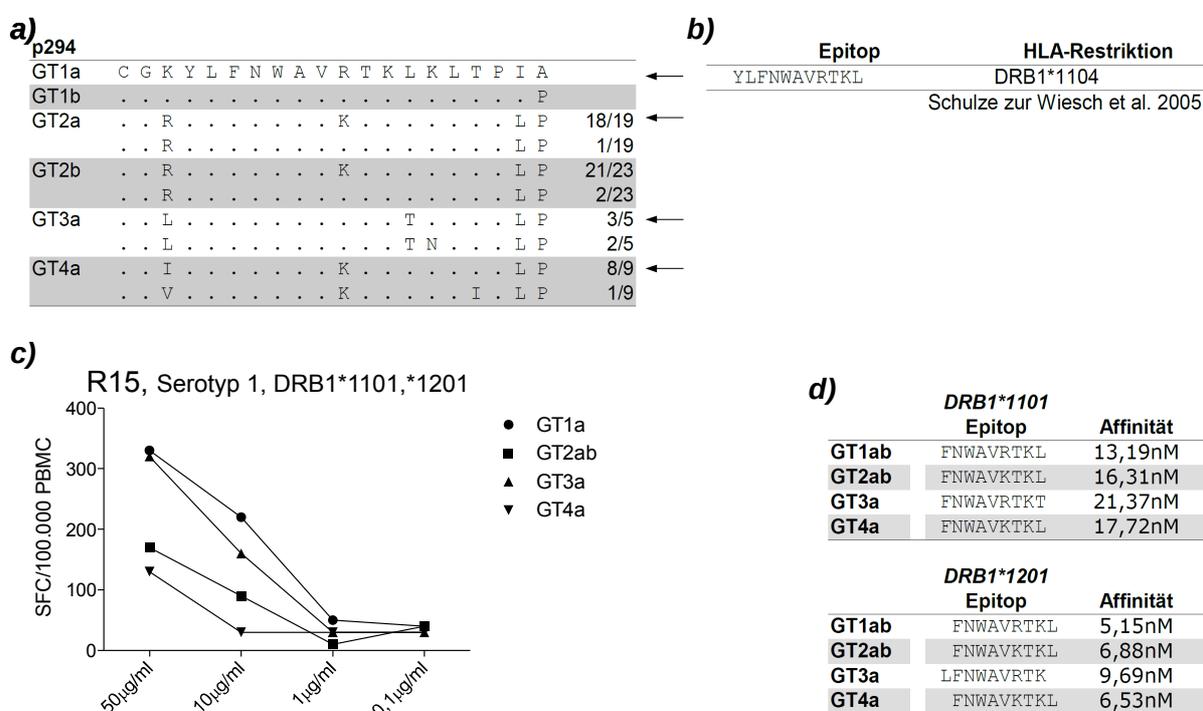


Abbildung III.10, Beschreibung auf der nächsten Seite

**Abbildung III.10:** p257 (AA 2571-2590)

**a)** Vergleich Genotyp-spezifischer Aminosäuresequenzen. Punkte repräsentieren die jeweils gleiche Aminosäure wie im GT1a-Peptid (GenBank M62321). Pfeile markieren die ausgewählten Peptidvarianten. **b)** Publierte Epitop-Feincharakterisierung und zugehörige HLA-Restriktion. **c)** ELISPOT-Assays mit PBMC der jeweiligen Probanden mit Peptidvarianten in unterschiedlichen Konzentrationen. **d)** *In silico* Bestimmung der Epitopsequenz der Peptidvarianten und Bindungsaffinität an die HLA-II-Moleküle der Probanden.

III.5.5 p294



**Abbildung III.11:** p294 (AA 2941-2960)

**a)** Vergleich Genotyp-spezifischer Aminosäuresequenzen. Punkte repräsentieren die jeweils gleiche Aminosäure wie im GT1a-Peptid (GenBank M62321). Pfeile markieren die ausgewählten Peptidvarianten. **b)** Publierte Epitop-Feincharakterisierung und zugehörige HLA-Restriktion. **c)** ELISPOT-Assays mit PBMC von R15 mit Peptidvarianten in unterschiedlichen Konzentrationen. **d)** *In silico* Bestimmung der Epitopsequenz der Peptidvarianten und Bindungsaffinität an die HLA-II-Moleküle des Probanden.

Die Aminosäuresequenz von p294 zeigte im Vergleich der Genotypen nur wenige Veränderungen. Bei zwei von fünf GT3a und einer von neun GT4a Varianten lagen 25 % der Aminosäuren verändert vor. Im beschriebenen Epitopbereich wiesen die Genotypen 2ab und 4 eine R→K Veränderung an Position 2951 auf, die sich im ELISPOT als hemmend auf die IFN- $\gamma$  Sekretion erwies. Genotyp 3a war an Position 2954 abweichend von GT1a (L→T), zeigte im ELISPOT jedoch bei höchster Peptidkonzentration keinen Unterschied zu GT1a, bei 10 $\mu$ g/ml wurden 80 % der von GT1a aktivierten PBMC stimuliert. Die beiden HLA-Moleküle von R15, DRB1\*1101 und \*1201, banden in der *in silico* Untersuchung alle p294 Varianten mit hoher Affinität.

## IV Diskussion

Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass eine starke und multi-spezifische proliferative CD4<sup>+</sup> T Zellantwort in Patienten nach spontaner Elimination des Hepatitis C Virus detektierbar ist. In Patienten mit chronischer Infektion fehlt diese Antwort fast vollständig. Die Qualität und Quantität der HCV-spezifischen T Zellantwort könnte ein gutes Korrelat für den Grad der Protektion sein, den eine HCV-Vakzine erzeugen kann. Dies und das Verhalten der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantwort während der frühen Phase der akuten Infektion sind noch nicht abschließend aufgeklärt. Auch sind bisher erst wenige HCV-spezifische Epitope auf HLA-Restriktion und optimale Peptidlänge feincharakterisiert worden.

Für die Untersuchung HCV-spezifischer T Zellen wurden für die vorliegende Arbeit 24 häufig detektierte 20mer Peptide des Genotyps 1a ausgewählt, um HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellen aus PBMC von Patienten mit unterschiedlichem klinischen Verlauf zu expandieren. Durch anschließende Re-Stimulationen mit HCV-spezifischen Peptiden wurden anhand der IFN- $\gamma$  Sekretion reaktive Zellen identifiziert. Neben Versuchsansätzen zur Bestimmung der Anzahl der Epitope wurden Experimente zu Feincharakterisierung (d.h. Bestimmung der minimalen Epitoplänge) und HCV-Kreuz-Genotyp-Reaktivität durchgeführt.

Mithilfe der 24 ausgewählten GT1a 20mer Peptide konnten in dieser Arbeit signifikante Unterschiede in der Anzahl HCV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T Zellantworten zwischen den verschiedenen Patientengruppen gemessen werden. Erwartungsgemäß zeigten alle Patienten mit spontan ausgeheilte HCV-Infektion (Resolver) die größte Anzahl an HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantworten (Diepolder et al. 1995; Missale et al. 1996; Day et al. 2002; Schulze zur Wiesch et al. 2005). Jedes einzelne der 24 eingesetzten HCV Peptide konnte mindestens in einem der 18 Resolver eine positive Antwort erzeugen. Insgesamt zeigte sich bezüglich der Detektionsfrequenz der Peptide eine ähnliche Verteilung wie in zuvor durchgeführten Studien (Schulze zur Wiesch et al. 2005). Die Identifizierung und Bestätigung häufig detektierter Epitope ist eine Voraussetzung für die Zusammenstellung einer Vakzine. Diepolder und Kollegen beschrieben 1997 erstmals ein 14AA-HCV CD4<sup>+</sup> T Zellepitop im Bereich der Aminosäuren 1248-1261 des HCV-Polyproteins (in dieser Arbeit

in Peptid p124 enthalten) als immundominantes Epitop (Diepolder et al. 1997). Daten anderer Arbeitsgruppen zeigen aber auch Patienten, die eine HCV-Infektion ausheilen ohne dieses als immundominant beschriebene Epitop zu erkennen (Wertheimer et al. 2003; Schulze zur Wiesch et al. 2005). Ursächlich für die häufige Detektion einzelner Epitope sind die Bindungsmöglichkeiten an multiple MHC-II-Moleküle und die über viele Genotypen hinweg konservierten Aminosäure-Sequenzen (siehe hierzu auch Anhang: Analyse der genotyp-spezifischen AA-Sequenzen der 24 verwendeten Peptide, Tabelle VIII.2). Die geringe Anzahl von CD4<sup>+</sup> T Zellantworten bei chronisch Infizierten ist ebenfalls gut beschrieben. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass ein Teil der bei chronisch Infizierten detektierten CD4<sup>+</sup> T Zellantworten auf Gedächtniszellen zuvor ausgeheilte HCV-Infektionen mit heterologen Genotypen beruhen und somit nicht im Zusammenhang mit der jeweiligen aktuellen Infektion stehen (Sugimoto et al. 2005; Schulze Zur Wiesch et al. 2007). Gleiches gilt möglicherweise für die in dieser Arbeit gemessenen positiven Antworten von Ch8: Bei diesem chronisch Infizierten Probanden konnten in der Serotypisierung Antikörper gegen die Genotypen 1 und 3 festgestellt werden, während die Genotypisierung im Verlauf der ambulanten Behandlung eine GT3a Infektion erbrachte. Man kann somit davon ausgehen, dass die detektierte Antwort gegen p212 keinen Bezug zur aktuellen Infektion hat.

Die Serotypisierung für Ch4 erbrachte kein Ergebnis. Die erkannten Peptide p153 und p227 zeigten aber in den später durchgeführten Variantentests eine eingeschränkte (p153) bzw. negative (p227) Kreuz-Genotyp-Reaktivität bei anderen Probanden. Eine Bedeutung für die aktuelle GT3a Infektion scheint daher ebenfalls sehr unwahrscheinlich.

Es gilt jedoch zu beachten, dass die in einigen Studien beschriebenen HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantworten chronischer Patienten hauptsächlich im Bereich der strukturellen Proteine (v.a. im Core-Protein) liegen, welche im hier verwendeten Peptidsatz nicht zum Einsatz kamen (Barnes et al. 2002; Ruys et al. 2008; Fleming et al. 2010). Dies könnte auch zur geringen Zahl der detektierten reaktiven Epitope in der Gruppe chronisch Erkrankter beigetragen haben. Zudem muss angemerkt werden, dass relativ wenige Patienten in jeder Patientengruppe untersucht wurden.

Eine Ursache der Chronifizierung ist der Verlust der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort, in dessen Folge die direkten antiviralen Effekte der ausgeschütteten Zytokine und die für CD8<sup>+</sup> T Zellen notwendige Hilfe abnehmen. Studien zeigen, dass HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellen

zunächst ihre Funktionalität (gemessen an Zytokinsekretion) und im Folgenden ihre Proliferationsfähigkeit verlieren, bevor sie auch mit sensitiven Methoden wie Klasse-II-Tetrameren nicht mehr nachweisbar sind (Grakoui et al. 2003; Semmo et al. 2005; a Folgori et al. 2006; Schulze Zur Wiesch et al. 2012). Möglichkeiten zur Untersuchung von eingeschränkt funktionsfähigen CD4<sup>+</sup> T Zellantworten chronisch Infizierter könnten neben dem Einsatz von Klasse-II-Tetrameren, wie von Müller *et al.* gezeigt, auf der Messung des Oberflächenmarkers CD154 beruhen (Mueller et al. 2010). Welche Mechanismen allerdings zum Verlust der Funktionalität führen, bleibt weiterhin eine zu beantwortende Frage.

Insgesamt ist jedoch davon auszugehen, dass die Anzahl der peripheren funktionellen CD4<sup>+</sup> T Zellantworten in der späten chronifizierten HCV Infektion fast zu vernachlässigen ist.

Als Grund für den in der chronischen Phase beobachteten Mangel an reaktiven CD4<sup>+</sup> T Zellantworten wurden neben Erschöpfung und Suppression durch regulatorische T Zellen (T<sub>reg</sub>) auch ein fehlendes Priming in der akuten Phase diskutiert (Gerlach et al. 1999). In einer Studie mit akut Infizierten konnte jedoch in allen Probanden unabhängig vom weiteren Verlauf in der frühen Phase der Infektion eine breite CD4<sup>+</sup> T Zellantwort festgestellt werden (Schulze Zur Wiesch et al. 2012). Erst in den folgenden Monaten nahm die Anzahl der positiven Antworten bei chronifizierendem Verlauf signifikant ab. Die hier gewonnenen Daten, die für sechs der sieben Probanden der Akut-Gruppe positive CD4<sup>+</sup> T Zellantworten zeigen, unterstützen diese These und lassen ein fehlendes Priming von CD4<sup>+</sup> T Zellen unwahrscheinlich erscheinen. Durch den oftmals klinisch inapparenten Verlauf ist es schwierig, Probanden zu erkennen, die sich wirklich erst kürzlich mit dem Hepatitis C Virus ansteckten, was zu Ungenauigkeiten in der Beobachtung der Immunantwort führen kann.

Die akute Phase kann in Bezug auf die CD4<sup>+</sup> T Zellantwort als entscheidende Phase der HCV Infektion betrachtet werden und eine exakte und engmaschige Untersuchung des weiteren Verlaufs kann wichtige Informationen über das „Schicksal“ der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort liefern.

Der Effekt der bisherigen Kombinationstherapie, bestehend aus pegIFN und Ribavirin, auf die HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellantwort ist bisher noch nicht genau aufgeklärt, die Daten hierzu sind kontrovers. Dabei ist anzumerken, dass peg-IFN für sich alleine verschiedene Effekte bei den T Zellen hervorruft. Zudem muss zwischen Patienten unterschieden werden, die in der akuten Infektion behandelt werden (Schulze Zur Wiesch et al. 2012) und Patienten, die in der chronischen HCV Infektion behandelt werden. Bei Ersteren ist es gut vorstellbar, dass die CD4<sup>+</sup> T Zellantwort durch die frühe Therapie vor der weiteren Extinktion gerettet werden kann. Bei Letzteren bleibt die Erwägung, ob nach langjähriger Infektion überhaupt CD4<sup>+</sup> T Zellen erhalten bleiben und inwieweit eine Therapie zu einem Wiedererstarren der CD4<sup>+</sup> T Zellen führen kann.

Eine Studie zeigte die Erholung der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort während der Therapie mit pegIFN und einen mit der Stärke der T Zellantwort korrelierenden Therapieerfolg (Kamal et al. 2002). Allerdings werden die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe in der Literatur stark kritisiert. Eine weitere *in vitro* Studie mit T Zellklonen von chronischen HCV-Patienten konnte zum einen die Abnahme der IL10 Produktion durch T<sub>reg</sub>, als auch die Zunahme der IFN- $\gamma$  Produktion durch Th1-Zellen als T Zell-spezifische Wirkung von Ribavirin identifizieren (Langhans et al. 2012). Die Autoren folgern hieraus, dass die CD4<sup>+</sup> T Zellantwort durch die Kombinationstherapie gestärkt und ähnlich wie bei der spontanen Eliminierung des Virus eine tragende Rolle spielen könnte.

Weitere Arbeiten zur Thematik zeigen jedoch keine Korrelation zwischen der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort während der Kombinationstherapie und dem Therapieausgang. Zwar kann teilweise ein Anstieg der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort gemessen werden, jedoch ist dieser nicht zwingend notwendig für das Erreichen eines SVR-Status (Aberle et al. 2007; Kaplan et al. 2005; Barnes et al. 2002).

Weiterführende Ergebnisse sind in zukünftigen Studien bei Patienten, die mit neuen DAA basierten und Interferon-freien Kombinationstherapien behandelt werden, zu erwarten. Die Interferenz mit Interferon kann so vermieden werden.

Die in dieser Arbeit beobachtete CD4<sup>+</sup> T Zellantwort der gesamten erfolgreich behandelten SVR-Gruppe unterscheidet sich in der Anzahl der reaktiven Epitope signifikant von der Gruppe der spontanen Resolver und weist mit durchschnittlich 1,14 Antworten eher Ähnlichkeiten zu chronisch Erkrankten auf. Die Unterteilung der SVR-

Gruppe in früh- und spättherapierte Patienten (Therapiebeginn innerhalb von sechs Monaten nach Infektion bzw. später) zeigte, dass spättherapierte Patienten, also mit Therapiebeginn in der chronischen Phase der Erkrankung, keine positiven CD4<sup>+</sup> Antworten aufwiesen. Die Therapie scheint also die CD4<sup>+</sup> Antwort nicht, oder zumindest nicht auf Dauer, gestärkt zu haben und auch ohne diese zu einem dauerhaften Erfolg geführt zu haben.

In der Gruppe der Frühtherapierten zeigten sich ähnlich viele Antworten wie in den hier ebenfalls beschriebenen Gruppen der akut Erkrankten und Resolver. Der frühe Beginn der Therapie scheint Mechanismen, die in einigen Fällen zum Verlust der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort führen, unterbunden zu haben und die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T Zellantworten erhalten zu haben.

In einem einzelnen Patienten (SVR2) konnte die Entwicklung der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort longitudinal beobachtet werden. Mit den vorhandenen PBMC dreier unterschiedlicher Zeitpunkte (prä-, intra- und posttherapeutisch) konnte die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T Zellantworten im Verlauf der Kombinationstherapie bestimmt werden. Es zeigte sich jedoch zu einem Zeitpunkt während der Therapie keine Steigerung der Antwortbreite. Eine Abnahme der zellulären Immunantwort während und bis zu 24 Wochen nach Ende der antiviralen Therapie konnte auch in einer Arbeit von Rahman und Kollegen in einer kleinen Kohorte akut Infizierter beobachtet werden (Rahman et al. 2004). Und auch andere Studien zeigten eine Abnahme der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantwort während der Kombinationstherapie (Burton et al. 2008; Arends et al. 2010). Ein möglicher Mechanismus für die Abnahme der Immunantworten ist die bekannte antiproliferative Wirkung von Interferon- $\alpha$ , die in einigen Studien neben der HCV-spezifischen auch zur Abnahme der Cytomegalie Virus-spezifischen Immunantwort und der Lymphozytenzahl führte (Barnes et al. 2009; Lee et al. 2010). Ein Einfluss der Therapie auf Funktionalität oder Kompartimentalisierung der T Zellen, welche auch zur Abnahme der peripheren CD4<sup>+</sup> Immunantwort führen kann, konnte mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden nicht eruiert werden, sollte aber Bestandteil zukünftiger Studien sein.

In der Zusammenschau der in dieser Arbeit gewonnenen Daten hat die antivirale Therapie mit Ribavirin und pegyliertem Interferon- $\alpha$  auf lange Sicht eine auf den Zeitpunkt des

Therapiebeginns bezogene konservierende Wirkung auf die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T Zellantworten.

Der Wirkmechanismus des erst kürzlich beschriebenen IL28B-Polymorphismus (rs12979860) konnte noch nicht aufgeklärt werden. Um der Frage nachzugehen, ob die günstigere CC-Variante mit einer stärkeren HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantwort einhergeht, wurden die in der Resolver-Gruppe beobachteten Antworten in Abhängigkeit der IL28B-Ausprägung (CC vs. CT/TT) gegenübergestellt. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen der Breite der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort und dem IL-28B Polymorphismus gefunden werden. Auch die durch Anzahl der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen beschriebene Stärke der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass durch den Einsatz von Zellkulturen die Anzahl reaktiver PBMC erheblich verändert und Relationen zwischen unterschiedlichen Peptiden und Patientengruppen verzerrt werden. Eine exakte Beschreibung der Antwortstärke sollte mithilfe von *ex vivo* Untersuchungen durchgeführt werden.

Bes *et al.* nutzten die HCV-spezifischen Proteine Core, NS3 und NS3-Helikase um in ELISPOT-Assays die Reaktivität von PBMC unterschiedlicher Patientengruppen zu stimulieren (Bes et al. 2012). Dabei konnten in Bezug auf die IL28B-Ausprägung in der Gruppe der Spontanresolver keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Immunantwort gefunden werden. Auch Resolver und chronisch Kranke mit CC-Genotyp zeigten keine signifikanten Unterschiede. Nur Träger des non-CC Allels, welche die Infektion spontan ausheilten, hatten eine signifikant stärkere CD4<sup>+</sup> Antwort als chronisch infizierte non-CC Allelträger. Daraus zog die Gruppe um Bes den Schluss, dass die CD4<sup>+</sup> Immunantwort bei Patienten mit ungünstigem IL28B-Genotyp (CT/TT) von größerer Bedeutung als bei Patienten mit der CC-Variante sein könnte. Zur Bestätigung dieser These müssen jedoch weiterführende Studien mit weitreichenderen Techniken durchgeführt werden. Ein Vergleich zwischen Resolvieren und chronisch Erkrankten mit non-CC Ausprägung konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund der niedrigen Antwortzahlen in der Gruppe der chronisch Erkrankten nicht durchgeführt werden.

Weitere Studien zur Aufklärung des Wirkmechanismus des IL28B-Polymorphismus beschreiben einerseits Unterschiede in der Höhe von Markern der angeborenen Immunantwort unter Therapie, die keine Auswirkung auf Interferon-stimulierte-Gene (ISG) haben (Naggie et al. 2012). Andererseits werden sowohl in gesundem Lebergewebe als auch in der chronisch infizierten Leber unterschiedliche ISG-Level in Abhängigkeit des IL28B-Polymorphismus beschrieben (Urban et al. 2010; Raglow et al. 2013). Eine neue Arbeit zeigt die Induktion von Mikro-RNAs (miRNA) durch HCV, die zu einer schnelleren Degradation der mRNA von IL28B führt. Verlangsamt wird diese Degradation durch den SNP rs4803217, der in starkem Kopplungsungleichgewicht („Linkage Disequilibrium“) zu dem in dieser Arbeit verwendeten rs12979860 steht (McFarland et al. 2014). Höhere IL28B-Level könnten zu einer stärkeren intrazellulären antiviralen Antwort und damit zum spontanen Ausheilen führen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten und andere Studien zeigen, dass der IL28B-Polymorphismus und die CD4<sup>+</sup> T Zellantwort voneinander unabhängige Variablen für das spontane Ausheilen der HCV-Infektion zu sein scheinen.

Durch ELISPOT-Experimente mit Peptid-Trunkierungen konnten die AA-Sequenzen dreier Epitope feincharakterisiert werden. Die Kenntnis der exakten Aminosäuresequenz des Epitops innerhalb des 20mer Peptids ist notwendig für die Erstellung neuer HLA-II-Tetramere, mit denen Untersuchungen Peptid-spezifischer CD4<sup>+</sup> T Zellen unabhängig von der Funktionalität der jeweiligen Zellen durchgeführt werden können (Day et al. 2003). Bisher wurden in Studien nur eine begrenzte Anzahl an Tetrameren eingesetzt, was zum Einen an der durch die HLA-Restriktion bedingten beschränkten Einsetzbarkeit in großen Kohorten, zum Anderen am Mangel exakter Epitop-Sequenzen liegt. In der vorliegenden Arbeit konnten nun drei Epitope genauer charakterisiert werden, von denen zwei interessanterweise im gleichen 20mer-Peptid liegen.

Die beiden in p212 liegenden Epitope werden in Abhängigkeit des jeweiligen HLA-Moleküls präsentiert und werden auch bei der *in silico* Analyse von netMHCIIpan-3.0 angegeben (Karosiene et al. 2013). Der Vergleich der experimentell gewonnenen Daten mit den auf Computerprogrammen basierenden Epitopvorhersagen zeigt die zunehmende Bedeutung von *in silico* Methoden, beispielsweise für das Design von Impfstoffen. Es liegen bereits Arbeiten vor, die auf diese Weise mögliche regionale Vakzine, angepasst an

auftretende Genotypen und HLA-Merkmale, berechnen (Prabdi-Sing et al. 2012; Idrees & Ashfaq 2013). Experimentelle Feincharakterisierungen sollten jedoch auch weiterhin zur Verifizierung durchgeführt werden. Die so gewonnenen Daten können dann auch für die Verbesserung und den Ausbau von *in silico* Ansätzen eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Peptid-HLA-Bindungen ausschließlich mithilfe der genannten *in silico* Methoden bestimmt. Auch hier sollte in weiterführenden Studien auf eine experimentelle Bestätigung nicht verzichtet werden.

Die Kreuz-Genotyp-Reaktivität HCV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T Zellklone wurde in ELISPOTs mit Peptid-Varianten der Peptide p180, p212, p227, p257 und p294 untersucht. Zum Vergleich wurde die Reaktivität des GT1a Peptids, die auch für die 10- bis 12-tägige Expansion der PBMC eingesetzt wurde, herangezogen. Vergleichbare Studien, die gezielt und systematisch Genotyp-spezifische Veränderungen und deren Auswirkungen auf die CD4<sup>+</sup> T Zellantwort untersuchen, liegen derzeit nicht vor.

Eine vollständige Kreuz-Reaktivität aller Genotyp-spezifischen Peptidvarianten wurde für p180 festgestellt. Trotz der Unterschiede im bereits beschriebenen Epitop führten alle eingesetzten Varianten zu einer vollständigen Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T Zellen. In einer Arbeit von Lucas und Ulsenheimer wurden p180-reaktive CD4<sup>+</sup> T Zellen mittels Tetramertechnik bei vielen DRB1\*0101-positiven HCV-Patienten, unabhängig vom HCV-Genotyp, nachgewiesen und als ein für diese Patientengruppe wichtiges Epitop beschrieben (Lucas et al. 2007). Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Abschwächung der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort durch die GT2b-Variante bestätigt bereits publizierte Beobachtungen von Schulze zur Wiesch und Kollegen (Schulze Zur Wiesch et al. 2007), bleibt hier jedoch auf einen (A5) von sechs getesteten Patienten beschränkt. Insgesamt erscheint p180 als idealer Kandidat für eine protektive HCV-Vakzine.

Die Experimente mit Varianten der Peptide p212 und p227 zeigten bestenfalls eine eingeschränkte bis vollkommen fehlende Kreuz-Genotyp-Reaktivität. Bei p227 konnte keine der nicht-GT1 Varianten T Zellen stimulieren, im Fall von p212 konnten nur bei höchster Peptidkonzentration zwei Varianten einen Teil der CD4<sup>+</sup> T Zellen aktivieren. Beide Peptide zeigen im Vergleich eine große Variabilität der Aminosäuren zwischen und innerhalb der verschiedenen Genotypen, welche die Präsentation durch HLA-II-Moleküle unterbindet, oder die Interaktion mit dem T Zellrezeptor stört.

Bisher wurden keine HLA-Restriktionen für p212 veröffentlicht. Das hier ermittelte Epitop enthält das für DRB1\*0101 *in silico* vorhergesagte Epitop, das mit hoher Affinität (31,06nM) an das HLA-Molekül binden konnte. Da DRB1\*1401 nur eine geringe Affinität zum GT1a Peptid besaß (288,14nM), kann man davon ausgehen, dass p212 hier nur von DRB1\*0101 präsentiert wurde. Dieses HLA-Molekül band ebenfalls mit hoher Affinität an die GT1b Variante, allerdings erscheint dabei der Kernbereich der Bindung innerhalb des 20mer Peptids um 8 Aminosäuren verschoben, wodurch der T Zellrezeptor wahrscheinlich nicht mehr aktiviert werden konnte. Der Kernbereich des GT3a Peptids, der ebenfalls im GT1b 20mer enthalten ist, wurde mit niedriger Affinität (102,28nM) vom HLA-Molekül gebunden. Dies könnte eine Erklärung für die schwache Kreuz-Genotyp-Reaktivität der p212 GT1b und GT3a Varianten darstellen.

Die fehlende Kreuz-Reaktivität der p227 GT1b Variante, die auf Aminosäure-Ebene eine hohe Ähnlichkeit zu GT1a besitzt und laut *in silico* Vorhersage eine ebenfalls hohe Affinität zu den präsentierenden HLA-Molekülen zeigte, ist vermutlich durch die Veränderung an zehnter (R→K) oder zwölfter (A→P) Position des 20mer Peptids zu erklären. Letztere war interessanterweise im Vergleich zu GT1a in allen Genotypen stabil vorhanden. Die fehlende Reaktivität zwischen p227 GT1a und einer GT4a Variante konnte von Schulze zur Wiesch bereits gezeigt werden und unterstützt die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten (Schulze zur Wiesch et al. 2007).

Die teilweise Kreuz-Genotyp-Reaktivität der Varianten von p257 und p294 könnte ebenfalls für die Herstellung einer Vakzine hilfreich sein. Beide Epitope sind über die Genotypen hinweg relativ gut konserviert. Die von p257 eingesetzten Varianten, die ähnlich starke CD4<sup>+</sup> T Zellantworten wie die GT1a Variante erzeugten, repräsentieren die große Mehrzahl der auftretenden Genotyp-spezifischen Variationen. Die Variante, die am schlechtesten stimulieren konnte (GT2a), repräsentiert hingegen nur zwei der 68 verglichenen GT2 – 4 Stränge. Ähnliches gilt für p294, wobei hier jedoch eine Mutation in den Genotypen 2 und 4 auftritt, welche die Reaktivität deutlich beeinträchtigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die „Direktionalität“ der Kreuz-Genotyp-Reaktivität weitestgehend vernachlässigt. Unabhängig davon, mit welchem Genotyp die Probanden infiziert sind oder waren, wurden zur Expansion der PBMC und primären Testung GT1a Peptide eingesetzt. Dabei könnten Kreuzreaktivitäten übersehen worden sein, zum Beispiel bei PBMC, die nicht auf GT1a Peptide, jedoch auf GT2 – 4 Peptide reagieren.

Auch das eventuelle Vorliegen sogenannter Quasispecies und Varianten innerhalb eines Genotyps sind mögliche Fehlerquellen in der Analyse der Ergebnisse. Optimale Voraussetzungen für die Testung der Kreuz-Genotyp-Reaktivität bieten Studien zur Testung von HCV-Vakzinen (Barnes et al. 2012; Swadling et al. 2014), bei denen die primäre Sequenz der HCV Proteine bekannt ist. In einer Studie mit natürlich auftretenden Varianten dreier CD8<sup>+</sup> T Zellepitope, konnte für zwei der Epitope eine gute Kreuz-Genotyp-Reaktivität gezeigt werden, während das dritte Epitop nur zu einem geringen Grad kreuzreaktive CD8<sup>+</sup> T Zellen induzierte (Kelly et al. 2014). Untersuchungen zur Kreuz-Genotyp-Reaktivität von CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden dabei jedoch nicht durchgeführt.

Peptidvarianten können in einigen Fällen als sogenannte altered-peptide-ligands (APLs; engl.: veränderte Peptid-Liganden) nicht nur zu einer abgeschwächten Immunantwort und fehlender Proliferation, sondern über unvollständige Aktivierung des T Zellrezeptors zu unterschiedlichen Effektormechanismen der T Zelle führen (Sloan-Lancaster & Allen 1996). So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Varianten des HCV-spezifischen Peptids NS3<sub>358-375</sub> (AA 1384-1401) zu einer Abschwächung der CD8<sup>+</sup> T Zellantwort führen und regulatorische T Zellen induzieren (Cusick, Schiller, et al. 2011; Cusick, Yang, et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die IFN- $\gamma$  Sekretion als Marker für die Funktionalität und Reaktivität der Zellen herangezogen und auf Tests zur Proliferation oder Sekretion anderer Zytokine verzichtet. In weiterführenden Studien sollte dies jedoch durchgeführt werden, um eine eventuelle Wirkung der Peptidvarianten als APLs zu untersuchen. Es ist nicht auszuschließen, dass die hier beschriebenen Genotyp-spezifischen Varianten von p212, p227, p257 und p294 regulatorische Zellen induzieren und zu einer Abschwächung der Immunantwort führen. Epitope, deren natürlich vorkommende Varianten als APLs auf T Zellen wirken, sollten nicht in einer Vakzine enthalten sein. Ebenso müssen die untersuchten Kreuz-reaktiven Epitope auf ihre vollständige Aktivierung des T Zellrezeptors überprüft werden, denkbar wären hier zusätzliche Proliferationsassays.

Zusammenfassend zeigt sich der auf 24 HCV-spezifische 20mer Peptide begrenzte Peptidsatz als ausreichend, um signifikante Unterschiede der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort zwischen unterschiedlichen HCV Patientengruppen zu beschreiben und bekannte Beobachtungen zu bestätigen (Schulze zur Wiesch et al. 2005). Zudem konnten

Erkenntnisse über die Unabhängigkeit der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort von Kombinationstherapie und IL28B-Polymorphismus erweitert werden.

Basierend auf den Beobachtungen der spontan ausgeheilten HCV Infektion sollte eine Vakzine mehrere Epitope beinhalten, die kreuzreagierend für die verschiedenen HCV-Genotypen sind und von multiplen HLA-Molekülen präsentiert werden. Die durchgeführten Experimente der vorliegenden Arbeit liefern hierzu erstmals Erkenntnisse über die Reaktivität einzelner Genotyp-spezifischer Peptidvarianten. Sie beschreiben jedoch nur einen kleinen Teil der möglichen reaktiven Epitope und Kreuzreaktionen, die sich aufgrund des Zusammenspiels zwischen HCV Genotypen und den individuellen HLA-Merkmalen eines Patienten ergeben. In weiterführenden Studien sollten weitere Epitope und deren Reaktivitäten definiert werden, um eine optimale Auswahl für eine effektive prophylaktische HCV-Vakzine zu ermöglichen.

## V Zusammenfassung

Die spontane Elimination des Hepatitis C Virus ist mit einer starken und multispezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellantwort assoziiert, während bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion nur schwache bis keine Virus-spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellantwort nachweisbar ist. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Peptidsatz, bestehend aus 24 häufig detektierten 20mer Peptiden, gewählt, um nach einer 10- bis 12-tägigen Expansion von PBMC mithilfe von ELISPOT-Assays und Intrazellulärer Zytokinfärbung reaktive CD4<sup>+</sup> T Zellen darzustellen. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Probanden mit spontaner Viruselimination und chronischem Verlauf. In der Gruppe akut Infizierter waren ähnlich viele Antworten wie in der Resolver-Gruppe messbar, was ein fehlendes Priming von T Zellantworten als Ursache der Chronifizierung ausschließen lässt. Bei Patienten mit anhaltendem Therapieerfolg waren Immunantworten darstellbar, die, abhängig vom Therapiebeginn, den Antworten in der Akut- beziehungsweise der Chronisch-Gruppe glichen. Dies lässt darauf schließen, dass durch die Kombinationstherapie keine neuen CD4<sup>+</sup> T Zellantworten induziert, sondern vorbestehende Antworten konserviert werden.

Eine Analyse der CD4<sup>+</sup> T Zellantworten in der Resolver-Gruppe in Anhängigkeit des kürzlich beschriebenen IL28B-Polymorphismus (SNP rs12979860) zeigte keinen signifikanten Einfluss des SNP auf die Anzahl der detektierten Epitope. IL28B-Polymorphismus und CD4<sup>+</sup> T Zellantwort sind voneinander unabhängige Variablen der spontanen Viruselimination.

Für zwei HCV-spezifische 20mer Peptide konnten genaue Epitop-Bereiche feincharakterisiert werden. Für Untersuchungen zur Kreuz-Genotyp-Reaktivität wurden die Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Genotypen im Bereich der 24 Peptide analysiert und für fünf Peptide Varianten synthetisiert und getestet. Die Varianten von p180 erwiesen sich als vollständig kreuzreaktiv, während keine der Varianten von p212 oder p227 ähnliche Antworten wie die GT1a Variante erzeugte. Teilweise Kreuz-Genotyp-Reaktivität war bei den Peptiden p257 und p294 zu beobachten.

Die vorgelegten Daten erweitern die Kenntnisse über den Verlauf der CD4<sup>+</sup> T Zellantwort in der Hepatitis C Virus Infektion. Zudem werden erstmals gezielt Untersuchungen zur Kreuz-Genotyp-Reaktivität durchgeführt, die für das Design einer effektiven Vakzine von großer Bedeutung sind.

## VI Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäuren
AP	Alkalische Phosphatase
APL	Altered Peptide Ligand (engl.: veränderter Peptid-Ligand)
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
CTL	Zytotoxische T Zellen, CD8 <sup>+</sup> T Lymphozyten
DAA	Direkt antiviral wirkendes Medikament (engl: direct-acting antiviral)
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	fetales Kälberserum (engl: fetal calf serum)
H V 500	(Fluoreszenzfarbstoff)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
IFN	Interferon
IONO	Ionomycon
ISG	Interferon-stimulierte-Gene
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl: phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
PE-Cy7	(Fluoreszenzfarbstoff)
PerCP	Peridiniumchlorophyll-Protein (Fluoreszenzfarbstoff)
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RPMI	Zellkulturmedium (engl: Roswell Park Memorial Institute)
SFC	Spot-forming Cells
TCR	T Zellrezeptor
Th-Zelle	T Helferzelle, CD4 <sup>+</sup> T Lymphozyt
T <sub>reg</sub>	regulatorische T Zelle

## VII Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Murphy, K.M. & Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), pp.787–93.
- Aberle, J.H. et al., 2007. CD4+ T cell responses in patients with chronic hepatitis C undergoing peginterferon/ribavirin therapy correlate with faster, but not sustained, viral clearance. *The Journal of infectious diseases*, 195(9), pp.1315–9.
- Adams, G. et al., 1997. Natural recovery from acute hepatitis C virus infection by agammaglobulinemic twin children. *The Pediatric infectious disease journal*, 16(5), pp.533–4.
- Antunes, D.A. et al., 2011. Structural in silico analysis of cross-genotype-reactivity among naturally occurring HCV NS3-1073-variants in the context of HLA-A\*02:01 allele. *Molecular immunology*, 48(12-13), pp.1461–7.
- Arends, J.E. et al., 2010. T-cell responses at baseline and during therapy with peginterferon-alpha and ribavirin are not associated with outcome in chronic hepatitis C infected patients. *Antiviral research*, 87(3), pp.353–60.
- Armstrong, G.L. et al., 2006. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Annals of internal medicine*, 144(10), pp.705–14.
- Barnes, E. et al., 2009. Cellular immune responses during high-dose interferon-alpha induction therapy for hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases*, 199(6), pp.819–28.
- Barnes, E. et al., 2012. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Science translational medicine*, 4(115), p.115ra1.
- Barnes, E. et al., 2002. The dynamics of T-lymphocyte responses during combination therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(3), pp.743–54.
- Bes, M. et al., 2012. IL28B genetic variation and hepatitis C virus-specific CD4(+) T-cell responses in anti-HCV-positive blood donors. *Journal of viral hepatitis*, 19(12), pp.867–71.
- Bolacchi, F. et al., 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), pp.188–96.
- Bukh, J. et al., 2008. Previously infected chimpanzees are not consistently protected against reinfection or persistent infection after reexposure to the identical hepatitis C virus strain. *Journal of virology*, 82(16), pp.8183–95.
- Burton, J.R. et al., 2008. Prospective analysis of effector and regulatory CD4+ T cells in chronic HCV patients undergoing combination antiviral therapy. *Journal of hepatology*, 49(3), pp.329–38.
- Cabrera, R. et al., 2004. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(5), pp.1062–71.
- Capone, S. et al., 2006. A novel adenovirus type 6 (Ad6)-based hepatitis C virus vector that overcomes preexisting anti-ad5 immunity and induces potent and broad cellular immune responses in rhesus macaques. *Journal of virology*, 80(4), pp.1688–99.
- Casey, L.C. & Lee, W.M., 2013. Hepatitis C virus therapy update 2013. *Current opinion in gastroenterology*, 29(3), pp.243–9.

- Chang, K.M. et al., 2001. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(1), pp.267–76.
- Choo, Q.L. et al., 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), pp.359–62.
- Cox, A.L. et al., 2005. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 42(1), pp.104–12.
- Cusick, M.F., Schiller, J.J., et al., 2011. Hepatitis C virus induces regulatory T cells by naturally occurring viral variants to suppress T cell responses. *Clinical & developmental immunology*, 2011, p.806061.
- Cusick, M.F., Yang, M., et al., 2011. Naturally occurring CD4+ T-cell epitope variants act as altered peptide ligands leading to impaired helper T-cell responses in hepatitis C virus infection. *Human immunology*, 72(5), pp.379–85.
- Day, C.L. et al., 2002. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 76(24), pp.12584–95.
- Day, C.L. et al., 2003. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *The Journal of clinical investigation*, 112(6), pp.831–42.
- Diepolder, H.M. et al., 1997. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 71(8), pp.6011–9.
- Diepolder, H.M. et al., 1995. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet*, 346(8981), pp.1006–7.
- Duggal, P. et al., 2013. Genome-wide association study of spontaneous resolution of hepatitis C virus infection: data from multiple cohorts. *Annals of internal medicine*, 158(4), pp.235–45.
- Farci, P. et al., 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5079), pp.135–40.
- Farci, P. et al., 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), pp.15394–9.
- Farnik, H. et al., 2010. Meta-analysis shows extended therapy improves response of patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 8(10), pp.884–90.
- Feinstone, S.M. et al., 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England journal of medicine*, 292(15), pp.767–70.
- Fleming, V.M. et al., 2010. Virological footprint of CD4+ T-cell responses during chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of general virology*, 91(Pt 6), pp.1396–406.
- Folgori, a et al., 2006. Early impairment of hepatitis C virus specific T cell proliferation during acute infection leads to failure of viral clearance. *Gut*, 55(7), pp.1012–9.
- Folgori, A. et al., 2006. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nature medicine*, 12(2), pp.190–7.
- Fuller, M.J. et al., 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 (Baltimore, Md.)*, 51(2), pp.378–87.

- Fytily, P. et al., 2008. Cross-genotype-reactivity of the immunodominant HCV CD8 T-cell epitope NS3-1073. *Vaccine*, 26(31), pp.3818–26.
- Ge, D. et al., 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461(7262), pp.399–401.
- Gerlach, J.T. et al., 2005. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *Journal of virology*, 79(19), pp.12425–33.
- Gerlach, J.T. et al., 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, 117(4), pp.933–41.
- Giugliano, S. et al., 2009. Degree of cross-genotype reactivity of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells directed against NS3. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(3), pp.707–16.
- Golden-Mason, L. et al., 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), pp.9122–30.
- Gower, E. et al., 2014. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus. *Journal of hepatology*.
- Grakoui, A. et al., 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5645), pp.659–62.
- Grüner, N.H. et al., 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *The Journal of infectious diseases*, 181(5), pp.1528–36.
- Harcourt, G.C. et al., 2003. Evidence for lack of cross-genotype protection of CD4+ T cell responses during chronic hepatitis C virus infection. *Clinical and experimental immunology*, 131(1), pp.122–9.
- Hüppe, D. et al., 2008. [Epidemiology of chronic hepatitis C in Germany--an analysis of 10,326 patients in hepatitis centres and outpatient units]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 46(1), pp.34–44.
- Idrees, S. & Ashfaq, U.A., 2013. Structural analysis and epitope prediction of HCV E1 protein isolated in Pakistan: an in-silico approach. *Virology journal*, 10, p.113.
- Itose, I. et al., 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), pp.844–52.
- Jacobson, I.M. et al., 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*, 364(25), pp.2405–16.
- Jo, J. et al., 2009. Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology*, 136(4), pp.1391–401.
- 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), pp.2199–204.
- Kamal, S.M. et al., 2002. Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4+ T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 123(4), pp.1070–1083.
- Kamili, S. et al., 2012. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55 Suppl 1, pp.S43–8.

- Kaplan, D.E. et al., 2005. T-cell response relative to genotype and ethnicity during antiviral therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(6), pp.1365–75.
- Karosiene, E. et al., 2013. NetMHCIIpan-3.0, a common pan-specific MHC class II prediction method including all three human MHC class II isotypes, HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ. *Immunogenetics*, 65(10), pp.711–24.
- Kasproicz, V. et al., 2008. Defining the directionality and quality of influenza virus-specific CD8+ T cell cross-reactivity in individuals infected with hepatitis C virus. *The Journal of clinical investigation*, 118(3), pp.1143–53.
- Kelly, C. et al., 2014. Cross-reactivity of hepatitis C virus specific vaccine-induced T cells at immunodominant epitopes. *European journal of immunology*.
- Kennedy, P.T.F. et al., 2006. The influence of T cell cross-reactivity on HCV-peptide specific human T cell response. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(3), pp.602–11.
- King A M Q, Adams M J, Carstens E B, Lefkowitz E J (2012) Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. Seiten 1003-1020.
- Kobayashi, M. et al., 1999. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect hepatitis C virus serological groups 1 to 6. *Journal of gastroenterology*, 34(4), pp.505–9.
- Kuo, G. et al., 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), pp.362–4.
- Lamonaca, V. et al., 1999. Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4(+) T cells: implications for vaccine development. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 30(4), pp.1088–98.
- Lanford, R.E. et al., 2004. Cross-genotype immunity to hepatitis C virus. *Journal of virology*, 78(3), pp.1575–81.
- Langhans, B. et al., 2012. Ribavirin exerts differential effects on functions of Cd4+ Th1, Th2, and regulatory T cell clones in hepatitis C. *PloS one*, 7(7), p.e42094.
- Lauer, G.M. et al., 2002. Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *Journal of virology*, 76(12), pp.6104–13.
- Lauer, G.M. & Walker, B.D., 2001. Hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*, 345(1), pp.41–52.
- Lechner, F. et al., 2000. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *European journal of immunology*, 30(9), pp.2479–87.
- Lee, S. et al., 2010. Could a loss of memory T cells limit responses to hepatitis C virus (HCV) antigens in blood leucocytes from patients chronically infected with HCV before and during pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy? *Clinical and experimental immunology*, 161(1), pp.118–26.
- Lindenbach, B.D. & Rice, C.M., 2013. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature reviews. Microbiology*, 11(10), pp.688–700.
- Lohmann, V., 2013. Hepatitis C virus RNA replication. *Current topics in microbiology and immunology*, 369, pp.167–98.
- Lozano, R. et al., 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), pp.2095–128.

- De Luca, A., Bianco, C. & Rossetti, B., 2014. Treatment of HCV infection with the novel NS3/4A protease inhibitors. *Current opinion in pharmacology*, 18C, pp.9–17.
- Lucas, M. et al., 2007. Tracking virus-specific CD4+ T cells during and after acute hepatitis C virus infection. *PloS one*, 2(7), p.e649.
- Luckheeram, R.V. et al., 2012. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*, 2012, p.925135.
- Di Martino, V. et al., 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 (Baltimore, Md.)*, 54(3), pp.789–800.
- McFarland, A.P. et al., 2014. The favorable IFNL3 genotype escapes mRNA decay mediated by AU-rich elements and hepatitis C virus-induced microRNAs. *Nature immunology*, 15(1), pp.72–9.
- Mehta, S.H. et al., 2002. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet*, 359(9316), pp.1478–83.
- Missale, G. et al., 1996. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *The Journal of clinical investigation*, 98(3), pp.706–14.
- Mohd Hanafiah, K. et al., 2013. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(4), pp.1333–42.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C.M., 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews. Microbiology*, 5(6), pp.453–63.
- Morikawa, K. et al., 2011. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *Journal of viral hepatitis*, 18(5), pp.305–15.
- Mueller, M. et al., 2010. Virus-specific CD4+ T cell responses in chronic HCV infection in blood and liver identified by antigen-specific upregulation of CD154. *Journal of hepatology*, 52(6), pp.800–11.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008a) The front line of host defense. In: Janeway's Immunobiology, Seventh Edition. Garland Science, New York. Seiten 40-53.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008b) The generation of T-cell receptor ligands. In: Janeway's Immunobiology, Seventh Edition. Garland Science, New York. Seiten 182-195.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008c) The effector mechanisms of adaptive immunity. In: Janeway's Immunobiology, Seventh Edition. Garland Science, New York. Seiten 27-37.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008d) B-cell activation and antibody production. In: Janeway's Immunobiology, Seventh Edition. Garland Science, New York. Seiten 381-400.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008e) T cell-mediated cytotoxicity. In: Janeway's Immunobiology, Seventh Edition. Garland Science, New York. Seiten 364-368.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008f) The course of the immune response to infection. In: Janeway's Immunobiology, Seventh Edition. Garland Science, New York. Seiten 426-427.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008g) The major histocompatibility complex and its functions. In: Janeway's Immunobiology, Seventh Edition. Garland Science, New York. Seiten 196-212.

- Naggie, S. et al., 2012. Dysregulation of innate immunity in hepatitis C virus genotype 1 IL28B-unfavorable genotype patients: impaired viral kinetics and therapeutic response. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 56(2), pp.444–54.
- Neumann, A.U. et al., 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5386), pp.103–7.
- Neumann-Haefelin, C. & Thimme, R., 2013. Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection. *Current topics in microbiology and immunology*, 369, pp.243–62.
- Neumann-Haefelin, C. & Thimme, R., 2007. Impact of the genetic restriction of virus-specific T-cell responses in hepatitis C virus infection. *Genes and immunity*, 8(3), pp.181–92.
- Offergeld, R. et al., 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. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 10(2), pp.8–11.
- Pawlotsky, J.-M., 2003. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clinics in liver disease*, 7(1), pp.45–66.
- Pearlman, B.L. & Traub, N., 2011. Sustained virologic response to antiviral therapy for chronic hepatitis C virus infection: a cure and so much more. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(7), pp.889–900.
- Pestka, J.M. et al., 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14), pp.6025–30.
- Poethko-Müller, C. et al., 2013. [Epidemiology of hepatitis A, B, and C among adults in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 56(5-6), pp.707–15.
- Poordad, F. et al., 2011. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine*, 364(13), pp.1195–206.
- Prabdial-Sing, N., Puren, A.J. & Bowyer, S.M., 2012. Sequence-based in silico analysis of well studied hepatitis C virus epitopes and their variants in other genotypes (particularly genotype 5a) against South African human leukocyte antigen backgrounds. *BMC immunology*, 13, p.67.
- Raglow, Z. et al., 2013. IL28B genotype and the expression of ISGs in normal liver. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 33(7), pp.991–8.
- Rahman, F. et al., 2004. Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(1), pp.87–97.
- Ruys, T. a et al., 2008. HCV-specific T-cell responses in injecting drug users: evidence for previous exposure to HCV and a role for CD4+ T cells focussing on nonstructural proteins in viral clearance. *Journal of viral hepatitis*, 15(6), pp.409–20.
- Sabo, M.C. et al., 2011. Neutralizing monoclonal antibodies against hepatitis C virus E2 protein bind discontinuous epitopes and inhibit infection at a postattachment step. *Journal of virology*, 85(14), pp.7005–19.
- Schoggins, J.W. & Rice, C.M., 2013. Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy R. Bartenschlager, ed. , 369, pp.219–242.

- Schulze zur Wiesch, J. et al., 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), pp.3603–13.
- Schulze Zur Wiesch, J. et al., 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), pp.61–75.
- Schulze Zur Wiesch, J. et al., 2007. Immunologic evidence for lack of heterologous protection following resolution of HCV in patients with non-genotype 1 infection. *Blood*, 110(5), pp.1559–69.
- Seeff, L.B., 2002. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(5 Suppl 1), pp.S35–46.
- Semmo, N. et al., 2005. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(5), pp.1019–28.
- Semmo, N. & Klenerman, P., 2007. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology : WJG*, 13(36), pp.4831–8.
- Shoukry, N.H. et al., 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *The Journal of experimental medicine*, 197(12), pp.1645–55.
- Simmonds, P. et al., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 42(4), pp.962–73.
- Sloan-Lancaster, J. & Allen, P.M., 1996. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annual review of immunology*, 14, pp.1–27.
- Smith, D.B. et al., 2014. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59(1), pp.318–27.
- Smyk-Pearson, S. et al., 2008. Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases*, 197(1), pp.46–57.
- Sugimoto, K. et al., 2005. Strain-specific T-cell suppression and protective immunity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 79(11), pp.6976–83.
- Swadling, L. et al., 2014. A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Science Translational Medicine*, 6(261), pp.261ra153–261ra153.
- Takaki, A. et al., 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nature medicine*, 6(5), pp.578–82.
- Thomas, D.L. et al., 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 461(7265), pp.798–801.
- Thompson, A.J., 2012. Genetic factors and hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 142(6), pp.1335–9.
- Timm, J. et al., 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *The Journal of experimental medicine*, 200(12), pp.1593–604.
- Torresi, J., Johnson, D. & Wedemeyer, H., 2011. Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *Journal of hepatology*, 54(6), pp.1273–85.

- Tsai, S.L. et al., 1997. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 25(2), pp.449–58.
- Urban, T.J. et al., 2010. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(6), pp.1888–96.
- Urbani, S. et al., 2005. Heterologous T cell immunity in severe hepatitis C virus infection. *The Journal of experimental medicine*, 201(5), pp.675–80.
- Vali, B. et al., 2011. Characterization of cross-reactive CD8+ T-cell recognition of HLA-A2-restricted HIV-Gag (SLYNTVATL) and HCV-NS5b (ALYDVVSKL) epitopes in individuals infected with human immunodeficiency and hepatitis C viruses. *Journal of virology*, 85(1), pp.254–63.
- Wedemeyer, H. et al., 2001. Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *Journal of virology*, 75(23), pp.11392–400.
- Wehmeyer, M.H. et al., 2014. Safety and efficacy of protease inhibitor based combination therapy in a single-center “real-life” cohort of 110 patients with chronic hepatitis C genotype 1 infection. *BMC gastroenterology*, 14, p.87.
- Wertheimer, A.M. et al., 2003. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 37(3), pp.577–89.
- Zignego, A.L. et al., 2012. The hepatitis C virus infection as a systemic disease. *Internal and emergency medicine*, 7 Suppl 3, pp.S201–8.

## VIII Anhang

**Tabelle VIII.1:** GenBank-Nummern der verwendeten HCV-Stränge**GT1a**

M62321;

**GT1b**

AB016785, AB049087, AB049088, AB049089, AB049090, AB049091, AB049092, AB049093, AB049094, AB049095, AB049096, AB049097, AB049098, AB049099, AB049100, AB049101, AB080299, AB154177, AB154178, AB154179, AB154180, AB154181, AB154182, AB154183, AB154184, AB154185, AB154186, AB154187, AB154188, AB154189, AB154190, AB154191, AB154192, AB154193, AB154194, AB154195, AB154196, AB154197, AB154198, AB154199, AB154200, AB154201, AB154202, AB154203, AB154204, AB154205, AB154206, AB191333, AB249644, AB426117, AB429050, AB435162, AB442219, AB442220, AB442221, AB442222, AF054247, AF054248, AF054249, AF054250, AF054252, AF054253, AF054254, AF054255, AF054257, AF054258, AF054259, AF139594, AF165045, AF165046, AF165047, AF165048, AF165049, AF165050, AF165051, AF165052, AF165053, AF165054, AF165055, AF165056, AF165057, AF165058, AF165059, AF165060, AF165061, AF165062, AF165063, AF165064, AF176573, AF207752, AF207753, AF207754, AF207755, AF207756, AF207757, AF207758, AF207759, AF207760, AF207761, AF207762, AF207763, AF207764, AF207765, AF207766, AF207767, AF207768, AF207769, AF207770, AF207771, AF207772, AF207773, AF207774, AF208024, AF313916, AF333324, AF356827, AF483269, AJ000009, AJ132996, AJ132997, AJ238799, AJ238800, AJ851228, AY045702, AY460204, AY587016, AY587844, D10750, D10934, D11168, D11355, D13558, D14484, D30613, D45172, D50480, D50481, D50482, D50483, D50484, D50485, D63857, D85516, D89815, D89872, D90208, DD418408, DQ071885, EF032891, EF032892, EF032893, EF032894, EF032895, EF407458, EF407459, EF407460, EF407461, EF407462, EF407463, EF407464, EF407465, EF407466, EF407467, EF407468, EF407469, EF407470, EF407471, EF407472, EF407473, EF407474, EF407475, EF407476, EF407477, EF407478, EF407479, EF407480, EF407481, EF407482, EF407483, EF407484, EF407485, EF407486, EF407487, EF407488, EF407489, EF407490, EF407491, EF407492, EF407493, EF407494, EF407495, EF407496, EF407497, EF407498, EF407499, EF407500, EF407501, EF407502, EF407503, EF407504, EF638081, EU155217, EU155218, EU155219, EU155220, EU155221, EU155222, EU155223, EU155224, EU155225, EU155226, EU155227, EU155228, EU155229, EU155230, EU155231, EU155232, EU155234, EU155235, EU155253, EU155254, EU155255, EU155256, EU155257, EU155258, EU155259, EU155260, EU155261, EU155262, EU155263, EU155264, EU155279, EU155280, EU155281, EU155300, EU155301, EU155302, EU155303, EU155304, EU155305, EU155306, EU155307, EU155308, EU155315, EU155316, EU155317, EU155318, EU155324, EU155325, EU155326, EU155327, EU155328, EU155329, EU155330, EU155331, EU155332, EU155333, EU155334, EU155335, EU155336, EU155337, EU155356, EU155357, EU155358, EU155359, EU155360, EU155361, EU155362, EU155363, EU155364, EU155365, EU155366, EU155367, EU155368, EU155369, EU155370, EU155371, EU155372, EU155373, EU155374, EU155375, EU155376, EU155377, EU155381, EU155382, EU234061, EU234062, EU239714, EU255960, EU255962, EU256000, EU256001, EU256045, EU256054, EU256059, EU256061, EU256062, EU256064, EU256065, EU256066, EU256075, EU256076, EU256077, EU256078, EU256079, EU256081, EU256082, EU256083, EU256084, EU256085, EU256088, EU256089, EU256090, EU256091, EU256092, EU256098, EU256099, EU256100, EU256101, EU256102, EU256103, EU482833, EU482839, EU482849, EU482859, EU482860, EU482874, EU482875, EU482877, EU482879, EU482880, EU482881, EU482883, EU482885, EU482886, EU482888, EU529682, EU660386, EU660388, FJ024086, FJ024277, FJ024279, FJ390396, FJ390397, FJ390398, FJ478453, L02836, M58335, M84754, M96362, S62220, U01214, U16362, U45476, X61596;

**GT2a**

AB047639, AB047640, AB047641, AB047642, AB047643, AB047644, AB047645, AF169002, AF169003, AF169004, AF169005, AF177036, AF238481, AF238482, AF238483, AF238484, AF238485, AY746460, D00944;

**GT2b**

AB030907, AF238486, AY232730, AY232731, AY232732, AY232733, AY232734, AY232735, AY232736, AY232737, AY232738, AY232739, AY232740, AY232741, AY232742, AY232743, AY232744, AY232745, AY232746, AY232747, AY232748, AY232749, D10988, DQ430815, DQ430817;

**GT3a**

AF046866, AY956467, D17763, D28917, DQ430819, DQ430820, DQ437509, X76918;

**GT4a**

DQ418782, DQ418783, DQ418784, DQ418785, DQ418787, DQ418788, DQ418789, DQ516084, DQ988073, DQ988074, DQ988075, DQ988076, DQ988077, DQ988078, DQ988079, GU814265.

## Tabellen VIII.2: Genotyp-spezifische Aminosäuresequenzen der 24 Peptide

## p094

GT1a	L G A L T G T Y V Y N H L T P L R D W A	
GT1b	. A . . . . . D . . . . .	
GT2a	. . R W . . . . I . D . . . . M S . . .	14/19
	. . R W . . . . I . D . . . . S . M S . . .	3/19
	F . R W . . . . I . D . . . . A . M S . . .	1/19
	. . R W S . . . . I . D . . . . M S . . .	1/19
GT2b	I . R W . . . . I . D . . . . S . . S T . .	12/25
	M . R W . . . . I . D . . . . S . . S T . .	7/25
	V . R W . . . . I . D . . . . S . . S T . .	4/25
	. . R W . . . . I . D . . . . S . . S T . .	2/25
GT3a	I . R W F N . . L . D . . . . A . M Q H . .	4/8
	V . R W F N . . L . D . . . . A . M Q H . .	2/8
	. A D G S N . . L . D . . . . A . M Q H . .	1/8
	I . R W F N . . L . D . . . . A . M Q Y . .	1/8
GT4a	V . . . . . I . D . . . . S . . . .	6/16
	M . . . . . I . D . . . . S . . . .	3/16
	M . . . . . I . D . . . . S G . . .	1/16
	M . . . . . I . D . . . . M S . . .	1/16
	M . . . . . * . . . . . S . . .	1/16
	S R G . . . . . I . D . . . . M S . . . P	1/16
	I . . . . . I . D . . . . S . . . .	1/16
	A . . . . . I . D . . . . S . . . .	1/16
	V . . M . . . . I . D . . . . S . . . .	1/16

## p120

GT1a	L E T T M R S P V F T D N S S P P V V P	
GT1b	M . . . . . . . . . . . . . . . A . . .	
GT2a	. D I V T . . . . T . S . . . . T . . A . .	14/19
	. D V V T . . . . T . S . . . . T . . A . .	2/19
	. D I A T . . . . T . S . . . . T . . A . .	1/19
	. D I V S . . . . T . S . . . . T . . A . .	1/19
	. A I V T . . . . T . S . . . . T . . A . .	1/19
GT2b	. D I A T . . . . S . S . . . . T . . A . .	4/25
	. D I A A . T . S . S . . . . T . . A . .	4/25
	. N I A T . T . S . S . . . . T . . A . .	3/25
	. D I A R . T . S . S . . . . T . . A . .	3/25
	. A I A T . T . S . S . . . . A . . A . .	2/25
	. D I A A . . . S . S . . . . T . . A . .	2/25
	. N I A A . . . S . S . . . . T . . A . .	2/25
	. D I A T . T . S . S . . . . T . . A . .	2/25
	I D I A T . T . S . S . . . . T . . A . .	2/25
	. D V A T . T . S . S . . . . T . . A . .	1/25
GT3a	. S . Q A . . . . S . S . . . . T . . A . .	6/8
	. S . Q T . . . . S . S . . . . T . . A . .	2/8
GT4a	. . . . . . . . . . . T . . A . .	13/16
	. . . . . . . . . . . S . . T . . A . .	1/16
	. . . S . . . . . . . . . . T . . A . .	1/16
	. A . . . . . . . . . . . T . . A . .	1/16

## p132

GT1a	T D A T S I L G I G T V L D Q A E T A G	
GT1b	. . S . T . . . . . . . . . . . . . . .	
GT2a	V . . . T . . . . . . . . . . . . . . .	10/19
	V . S . T . . . . . . . . . . . . . . .	4/19
	V . . . . . . . . . . . . . . . . . . .	1/19
	V G S . T N . . . . . . . . . . . . . . .	1/19
	. . S . T . . . . . . . . . . . . . . .	1/19
	M . . . T . . . . . . . . . . . . . . .	1/19
	V . . . T . . . . V . . . . . . . . . . .	1/19
GT2b	V . . . T . . . . . . . . . . . . . . .	23/25
	V . S . T . . . . . . . . . . . . . . .	2/25
GT3a	Q . . . . . . . . . . . . . . . . . . .	8/8
GT4a	. . S . T . . . . . . . . . . . . . . .	16/16

## p117

GT1a	C P A G H A V G I F R A A V C T R G V A	
GT1b	. . S . . . . . . . . . . . . . . . . . .	
GT2a	. . R . . . . . . . . . . . . . . . S . . . .	16/19
	. . R . . . . . . . . . . . . . . . S . . . .	2/19
	. . R . . . . V . . L . . . . . . . . . S . . . .	1/19
GT2b	. . R . . . . . . . . L . . . . . . . . A . . . .	11/25
	. S R . . . . . . . . L . . . . . . . . . . . . .	4/25
	. S R . . . . V . . L . . . . . . . . A . . . .	2/25
	. S R . . . . . . . . L . . . . . . . . A . . . .	2/25
	. . R . . . . . . . . L . . . . . . . . . . . . .	2/25
	. . R . . . . . . . . L . . . . . . . . . . . . .	2/25
	. . M . . . . . . . . L . . . . . . . . S . . . .	1/25
	. * M . . . . . . . . L . . . . . . . . S . . . .	1/25
GT3a	. . S . . . V A . . . . . . . . . . . . . . .	8/8
GT4a	. . M . . . A . L . . . . . . . . . . . . . . .	6/16
	. . M . . . A . . . . . . . . . . . . . . .	6/16
	. . M . . . A . * . . . . . . . . . . . . . . .	1/16
	. . M . . . V A . L . . . . . . . . . . . . . . .	1/16
	. . M . . . A . . . . . . . . L . . . . . . . . .	1/16
	. . M . . . R A . . . . . . . . . . . . . . .	1/16

## p124

GT1a	P A A Y A A Q G Y K V L V L N P S V A A	
GT1b	. .	
GT2a	. V . . . . . . . . . . . . . . . . . . .	15/19
	. V . . . . S . . . . . . . . . . . . . . .	3/19
	. V . . . . . . . . . . . I . . . . . G . . . .	1/19
GT2b	. . . . . S . . . . . . . . . . . . . . .	22/25
	. . . . . T S . . . . . . . . . . . . . . .	1/25
	. . . . . S . . . . . . . . . . . G . . . . .	2/25
GT3a	. . . . V . . . . N . . . . . . . . . . .	6/8
	. . . . V . . . . T . . . . . . . . . . .	1/8
	. . . . V . . . . D . . . . . . . . . . .	1/8
GT4a	. .	13/16
	. . . . . G . . . . . . . . . . . . . . .	1/16
	. . . . . S . . . . . . . . . . . . . . .	1/16
	. . . . H . . . . . . . . . . . . . . .	1/16

## p141

GT1a	G I N A V A Y Y R G L D V S V I P T S G	
GT1b	. L . . . . . . . . . . . . . . . . . . .	
GT2a	. L . . . . . . . . . . . . . . . I . . . Q . .	8/19
	. L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . Q . .	6/19
	. L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . I . . A Q .	2/19
	. L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . T . . . Q .	1/19
	. L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . A . . A Q .	1/19
	. L . S . . . . . . . . . . . . . . . . . . . Q . .	1/19
GT2b	. V . . . . . . . . . . . . . . . . . . . Q . .	22/25
	. V . . . . . . . . . . . . . . . . . . . A Q . .	2/25
	. V . . . . . F . . . . . . . . . . . . . . . Q . .	1/25
GT3a	. L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . T . .	6/8
	. L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . A . .	1/8
	. L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . L . . T . .	1/8
GT4a	. L .	14/16
	. L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . A . . A . .	1/16
	. L . . . . . ? . . . . . . . . . . . . . . . . .	1/16

**p149**

GT1a	T G R G K P G I Y R F V A P G E R P S G	
GT1b	. . . . R R . . . . T . . . . .	
GT2a	. . . . R L . . . . Y . S T . . . . A . . .	14/19
	. . . . R L . T . . . . Y . S T . . . . A . . .	4/19
	. . . . R Q . T . . . . Y . S T . . . . A . . .	1/19
GT2b	. . . . R L . . . . Y . S S . . . . .	16/25
	. . . . R L . T . . . . Y . S S . . . . .	8/25
	. . . . R L . V . . . . Y . S S . . . . .	1/25
GT3a	. . . . R L . T . . . . Y . . . . . .	5/8
	. . . . R L . T . . . . Y . T . . . . . .	2/8
	. . . . R L . T . . . . Y . . S . . . . .	1/8
GT4a	. . . . R L . . . . Y . T . . . . . .	13/16
	. . . . R L . T . . . . Y . T . . . . . .	3/16

**p153**

GT1a	T P A E T T V R L R A Y M N T P G L P V	
GT1b	. . . . . S . . . . . L . . . . .	
GT2a	. . . . . F . . . . .	10/19
	. . S . . . . . F . . . . .	4/19
	. . V . . . . . F . . . . .	2/19
	. . V . . . . . G . . F . . . . .	1/19
	. . G . . . . . F . . . . .	1/19
	S . V . . . . . F . . . . .	1/19
GT2b	. . . . . F . . . . .	24/25
	. . S . . . . . F . . . . .	1/25
GT3a	Q . . . . . L S . . . . .	7/8
	Q . . . . . * L S . . . . .	1/8
GT4a	. . . . . T . . . . . F . . . . .	13/16
	. . . . . T . . . . . L . . . . .	1/16
	. . . . . T . . K . . F D . . . . .	1/16
	. . S . . . . I . . . . . L . . . . .	1/16

**p158**

GT1a	E N L P Y L V A Y Q A T V C A R A Q A P	
GT1b	D . F . . . . .	
GT2a	. . F A . . . . . K . . . . .	13/19
	. . F A . . T . . . . . K . . . . .	2/19
	D . F A . . T . . . . . K . . . . .	2/19
	D . F A . . . . . K . . . . .	1/19
	. S F . . . . . K . . . . .	1/19
GT2b	D . F A . . T . . . . . K . . . . .	12/25
	. . F A . . T . . . . . K . . . . .	9/25
	D . F A . . . . . K . . . . .	2/25
	D . . A . . T . . . . . K . . . . .	1/25
	D . F A . . ? . . . . . K . . . . .	1/25
GT3a	L . F S . . T . . . . .	5/8
	L . F S . . A . . . . .	2/8
	L . F . . . T . . . . .	1/8
GT4a	. . . . . L . . . . .	12/16
	. . F . . . . . K . L . . . . .	2/16
	. . F . ? . . . . . * L . * . . . .	1/16
	. . F . . . . . S . K V W L A . . . . .	1/16

**p162**

GT1a	P T P L L Y R L G A V Q N E I T L T H P	
GT1b	. . . . . V . . . . .	
GT2a	. . . . . S . T . . V . . . . .	9/19
	. . . . . P . T . . V . . . . .	3/19
	. . . . . S . T . . . . .	2/19
	. . . . . S . T . . V . F . . . . .	1/19
	. K . . . . . S . T . . V . . . . .	1/19
	. . . . . S . A . . . . .	1/19
	. . . . . T . T . . . . .	1/19
	. . . . . P I T . . V . . . . .	1/19
GT2b	. . . . . T . . V . . . . .	22/25
	. . . . . T . . . . .	3/25
GT3a	. . . . . P . . . . . C . . . . .	5/8
	. . . . . P . . . . . C . S . . . . .	1/8
	. . . . . P . . . . . T C . . . . .	2/8
GT4a	. . . . . S . . . . . V . . . . .	13/16
	. . . . . ? . . . . . S . . . . . V . . . . .	1/16
	. . . . . S . . . . . V V . . . . .	1/16
	. . . . . ? . . . . . V . . . . .	1/16

**p177**

GT1a	G I Q Y L A G L S T L P G N P A I A S L	
GT1b	. . . . .	
GT2a	. . . . . V . . M . . . . .	17/19
	. . P . . . R . . Q . . . . V . . M . . . . .	1/19
	. . . . . R . . . . . V . . M . . . . .	1/19
GT2b	. . . . . V . . M . . . . .	25/25
GT3a	. . . . . V . . . . .	7/8
	. . . . . P . . . . . V . . . . .	1/8
GT4a	. . . . .	14/16
	. V . . . . .	2/16

**p180**

GT1a	L T T S Q T L L F N I L G G W V A A Q L	
GT1b	. . . Q H . . . . .	
GT2a	. S . . T . I . L . . . . . L . S . I . . . . .	17/19
	. S . . T . I . L . . . . . M . . . . . L . S . I . . . . .	1/19
	. S . . T . I . L . . . . . R . L . S . I . . . . .	1/19
GT2b	. P . . T . I . L . . . . . M . . . . . L . S . I . . . . .	22/25
	. S . . T . I . L . . . . . M . . . . . L . S . I . . . . .	3/25
GT3a	. . . N . . M F . . . . . T H . . . . .	6/8
	. . . N . . V F . . . . . T H . . . . .	2/8
GT4a	. . . Q . . . . . S . I . . . . .	16/16



**p252**

GT1a	F G Y G A K D V R C H A R K A V T H I N	
GT1b	. . . . . N L S S . . . . . N . . . R	
GT2a	Y . F . . . . E . . . S L S G R . . . N . . K	14/19
	Y . F . . . . E . . . S L S . R . . . N . . K	2/19
	Y . F . . . . E . . . G L . G R . . . N . . K	1/19
	Y . . . . . E . . . S L S G R . . . N . . K	1/19
	Y . F . . . . E . . . S L S G R . A N . A K	1/19
GT2b	Y . F . . . . E . . . S L S . R . . . N . . R	22/52
	Y . F . . . . E . . . S L S . G . . . N . . R	1/25
	Y . F . . . . E . . . S L S . R . . . N . . Q	2/25
GT3a	. . . S . . . . . S L S S R . I N Q . R	3/8
	. . . S . . . . . S L S S . . I N Q . R	3/8
	. . . S . . . . . S L S S R . I D Q . R	2/8
GT4a	. . . . . S . S . . . I N . . .	12/16
	. . . . . S . S . . . I N . . S	1/16
	. . . . K . . . . S . S . . . I N . . S	1/16
	. . . . . S . S . R . I N . . .	1/16
	. . . . . S . S . . . N . . .	1/16

**p266**

GT1a	Q C C D L D P Q A R V A I K S L T E R L	
GT1b	. . . . . A . E . . . Q . . R . . . . .	
GT2a	. A . S . P E E . . T . . H . . . . .	8/19
	R A . S . P E E . H T . . H . . . . .	6/19
	L A . S . P E E . . T . . H . . . . .	1/19
	. A . S . Q E E . . T . . R . . . . .	1/19
	. A . S . P E E . H T . . H . . . . .	1/19
	R P . S . P E E . H T . . H . . . . .	1/19
	R A . S . ? E E . H T . . H . . . . .	1/19
GT2b	. A . S . P Q E . . T V . H . . . . .	18/25
	. A . S . P Q E . K T V . H . . . . .	4/25
	. A . S . P Q E . . . . H . . . . .	1/25
	L A . S . P Q E . K T . H . . . . .	1/25
	. A . S . P Q E . . T V . H . I . . . .	1/25
GT3a	. . . N . E . E . . K V . S . . . . .	5/8
	. . . . . E . E . . K V . S . . . . .	2/8
	. . . N . E . E P G Q . . S . . . . .	1/8
GT4a	. . . . . E . E . . K V . A A . . . . .	6/16
	. . . . . E . E . . K V . T A . . . . .	5/16
	. . . . . E . E . . K . . T A . . . . .	3/16
	. . . . . E . E . . K V . T A . . D . .	1/16
	. . . . . E . E . . K . . A A . . . . .	1/16

**p280**

GT1a	V Y Y L T R D P T T P L A R A A W E T A	
GT1b	. . . . . . . . . . . . . . . . . . . .	
GT2a	R . . . . . . . . . . I . . . . . V	13/19
	R . . . . . . . . . . . . . . . . V	1/19
	R . . . . . . . . . . * . . . . . V	1/19
	R . . . . . . . . . . . S . . . . . V	1/19
	R . . . . . . . . . . A . . . . . R . V	1/19
	R . . . . . . . . . . S I . . . . . V	1/19
	K . . . . . . . . . . I . . . . . V	1/19
GT2b	R . F . . . . . . . . . I T . . . . . V	18/25
	R . . . . . . . . . . I S . . . . . V	6/25
	R . . . . . . . . . . I T . . . . . V	1/25
GT3a	Y . . . . . . . . . . A . . . . .	6/8
	Y . . . . . . . . . . A . . . . . V	2/8
GT4a	. . . . . . . . . . E . . . . . V	12/16
	. . . * . . . . . E . . . . . V	1/16
	. . . . . . . . . . E . . . . . V	1/16
	. . . . . . . . . . E . . . . . V	1/16
	. . . . . . . . . . E . . . . . S	1/16

**p257**

GT1a	K G G R K P A R L I V F P D L G V R V C	
GT1b	. . . . . . . . . . . . . . . . . . . .	
GT2a	. . . . K . A . . . . . Y . . . . .	14/19
	. . . . K . . . . . Y . . . . .	3/19
	. . . . K . A . . . . . Y . . . S . . . .	2/19
GT2b	. . . . K . . . . . Y . . . . .	20/25
	. . . . K . A . . . . . Y . . . . .	5/25
GT3a	. . . . . . . . . . . Y . . . . .	6/8
	. . . . . A . . . . . Y . . . . .	1/8
	R . . . . . R . . . . . Y . . . . .	1/8
GT4a	. . . . . . . . . . . Y . . . . .	10/16
	. . . . . . . . . . . . . . . . . . . .	1/16
	. . . . . . . . . . . Y . . . * . . . . .	1/16
	. . . . . . . . . . . Y . . . . S . . . .	1/16
	. . . . . . . . . . . Y . . . . G P G F	1/16
	. . . . . S . . . . . Y . . . . .	1/16
	. . . . . A . . . . . Y . . . . .	1/16

**p267**

GT1a	V A I K S L T E R L Y V G G P L T N S R	
GT1b	Q . . R . . . . . I . . . . . K	
GT2a	T . . H . . . . . . . . . . M F . . K	14/19
	T . . H . . . . . . . . . . M L . . K	4/19
	T . . R . . . . . . . . . . M F . . K	1/19
GT2b	T V . H . . . . . . . . . . M . . . K	20/25
	T V . H . . . . . . . . . . M I . . K	2/25
	T . . H . . . . . . . . . . M . . . K	1/25
	. . . H . . . . . . . . . . M . . . K	1/25
	T V . H . I . . . . . . . . . . M . . . K	1/25
GT3a	K V . S . . . . . . . . . . C . . M F . . K	7/8
	Q . . S . . . . . . . . . . C . . M N . . K	1/8
GT4a	K V . A A . . . . . . . . . . M H . . K	6/16
	K V . T A . . . . . . . . . . M H . . K	4/16
	K V . T A . . . D . . . . . M H . . K	1/16
	K . . A A . . . . . . . . . . M H . . K	1/16
	K . . T A . . . . . . . . . . M H . . K	1/16
	K . . T A . . . . . . . . . . M H . . A	1/16
	K . . T A . . . . . . . . . . M Y . . K	1/16
	K V . T A . . . . . . . . . . M H . . .	1/16

**p294**

GT1a	C G K Y L F N W A V R T K L K L T P I A	
GT1b	. P	
GT2a	. . R . . . . . . . . . . K . . . . . L P	18/19
	. . R . . . . . . . . . . . . . . . L P	1/19
GT2b	. . R . . . . . . . . . . K . . . . . L P	21/23
	. . R . . . . . . . . . . . . . . . L P	2/23
GT3a	. . L . . . . . . . . . . T . . . . . L P	3/5
	. . L . . . . . . . . . . T N . . . L P	2/5
GT4a	. . I . . . . . . . . . . K . . . . . L P	8/9
	. . V . . . . . . . . . . K . . . . . I . L P	1/9

## **IX Danksagung**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist die Danksagung in der veröffentlichten Version der Doktorarbeit nicht enthalten.

## **X Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf in der veröffentlichten Version der Doktorarbeit nicht enthalten.

## **XI Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

---

Christoph Scheurich