Aus dem Institut für Med. Virologie der J.-W. Goethe Universität in Frankfurt am Main
Eingereicht über das Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Hepatitis C Virus Pseudotypen und deren Einsetzbarkeit in der virologischen Diagnostik

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kerstin Pfaff
Tierärztin
aus Bad Hersfeld

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3508

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	PD Dr. Kerstin Borchers
Zweiter Gutachter:	PD Dr. med. vet. Annemarie Berger
Dritter Gutachter:	Dr. Michael Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
Hepatitis C virus, virus neutralization, virus-like particles

Tag der Promotion: 23.04.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-206-9
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved
© Mensch und Buch Verlag 2012
Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de | www.menschundbuch.de

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1

1. Einleitung 6

2. Literaturübersicht 10

2.1. Das Hepatitis C Virus 10
2.1.1. Epidemiologie 12
2.1.2. Übertragungswege 14

2.2. Struktureller Aufbau von HCV 17
2.2.1. Veterinärmedizinisch relevante Vertreter in der Familie der Flaviviridae 23
2.2.2. Humanmedizinisch relevante Vertreter in der Familie der Flaviviridae 26
2.2.3. Die HCV-Genotypen 28
2.2.4. HCV-Quasispezies 29

2.3. Der Replikationszyklus von HCV 32

2.4. Der Infektionsverlauf 34
2.4.1. HCV assoziierte Krankheiten 36

2.5. Immunantwort auf eine HCV-Infektion 37
2.5.1. Neutralisierende Antikörperantwort auf eine HCV-Infektion 41

2.6. Die Therapie einer HCV-Infektion 44

2.7. Die Erforschung von Hepatitis C 48
2.7.1. Was sind Pseudotypen oder Pseudopartikel? 53

2.8. Der Nachweis/Labordiagnostik der Virushepatitis C 56

2.9. Zielsetzung der Arbeit 59

3. Material und Methoden 62

3.1. Material 62
3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial 62
3.1.2. Verwendete Kits 63
3.1.3. Verwendete Lösungen und Nährmedien zur Anzucht von Bakterien und in der Molekularbiologie 63
3.1.4. Bakterien 65
3.1.5. Plasmide und deren Herstellung 66
3.1.6. Filtersysteme 69
3.1.7. Zelllinien 70
3.1.8. In der Zellkultur verwendete Nährmedien, Lösungen, Zusätze und Puffer 71
3.1.9. Geräte 73
3.1.10. Patientenseren 74
3.1.10.1. Anti-HCV negative Kontrollseren 76
3.1.10.2. Patientenmaterial zur Untersuchung der Kreuzneutralisation der HCVpp 77
3.1.10.3. Untersuchung zur Kreuzneutralisation der HCVpp durch Seren von Patienten mit einer positiven Denguevirusserologie, mit zusätzlich bekanntem FSME Serostatus 78
3.1.10.4. Untersuchung der HCVpp-Neutralisation mit Patientenmaterial von LTNP (*Long Time Non Progressors*) HIV-Infizierten 78
3.1.10.5. Patientenmaterial mit schwach positiven Werten im anti-HCV Screening ELISA 79
3.1.10.6. Seren der Patientengruppen mit unterschiedlichem Therapieausgang: „*Responder, Non Responder* und *Relapse*“ 80

3.2. Methoden 82
3.2.1. Die Herstellung der Plasmide 82

3.2.2. Zellkulturmethoden 86
3.2.3. Transiente Ko-Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren 89
3.2.4. Transiente Ko-Transfektion zur Herstellung HCV-Env und VSV-G pseudotypisierter lentiviraler Vektoren 93
3.2.5. Transduktion von Zelllinien mit lentiviralen und retroviralen Überständen 95
3.2.6. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) 100
3.2.7. Neutralisationsversuche der HCV-pseudotypisierten Viren mit Patientenseren 102
3.2.8. Bestimmung der infektiösen Einheiten (IE) 105
3.2.9. Bestimmung der Infektiositäts-/Neutralisationswerte 105

4. Ergebnisteil 108

4.1. Grundlagen zur Etablierung und Optimierung des Neutralisationstests 109
4.1.1. Vergleich der onkoretroviralen mit den lentiviralen Vektoren bei der Produktion von infektiösen HCVpp 110
4.1.2. Die Wirkung von Polybrene auf die Transduktionseffizienz der Pseudotypen 111
4.1.3. Untersuchung zur Erhöhung der Transduktionseffizienz durch Konzentrierung des HCVpp-haltigen Zellkulturüberstandes 115
4.1.4. Der Einfluss des Zellkulturmediums x-Vivo, mit und ohne Zusatz von fötalem Kälberserum, auf die Ergebnisse der Transfektion mit HCVpp, angegeben in infektiösen Partikelzahlen 117

4.1.5. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse 119

4.2. Zelltropismusstudie mit HCVpp und verschiedenen B-Suspensionszelllinien 120

4.3. HCVpp-Neutralisationsstudien mit Patientenseren 124
4.3.1. Testung der HCVpp mit anti-HCV negativen Kontrollseren 125
4.3.2. Neutralisationsstudien mit HCVpp und Seren von Patienten die mit verschiedenen HCV-Genotypen infiziert sind 128
4.3.3. Neutralisationsversuche der HCVpp mit Patientenseren, die serologisch als „anti-HCV-schwach positiv“ eingestuft wurden 135
4.3.4. Neutralisationsversuche mit HCVpp und den Seren von Patienten, infiziert mit einem anderen Flavivirus (Dengue Virus) 140
4.3.5. Neutralisationstest mit HCVpp und Seren von HIV/HCV koinfizierten Patienten 143

4.4. HCVpp Neutralisationstest-Patientenstudien 146
4.4.1. Neutralisationstestung von Patientenseren im Therapieverlauf mit unterschiedlichem Ausgang der Therapie („*Responder, Non Responder* und *Relapse*“) 146

5. Diskussion 158

5.1. Die HCV-Infektion 158
5.1.2. Methoden zur Erforschung von HCV 159

5.1.3. Pseudopartikel 161

5.2. Etablierung und Herstellung der HCVpp 163

5.3. Zelltropismusstudien 166

5.4. Messung neutralisierender Antikörper gegen HCVpp mittels FACS Analyse 168

5.5. Klinische Neutralisationsstudie mit einem definierten Patientenkollektiv 178

5.5.1. Versuche mit den Patientengruppen „*Responder, Non Responder und Relapse*“ 179

5.6. Ausblick 182

6. Zusammenfassung 186
7. Summary 191
8. Literatur 196
9. Abkürzungen 211
10. Abbildungsverzeichnis 219
11. Tabellenverzeichnis 222
12. Publikationsliste 224
13. Danksagung 225
14. Selbstständigkeitserklärung 227

1. Einleitung

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) ist in der ganzen Welt eine der häufigsten Ursachen für chronische Lebererkrankungen. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge, hatten rund 2-3 % der Weltbevölkerung eine Infektion mit HCV. Davon gelten etwa 100-130 Millionen Menschen als chronisch infiziert (WHO; 1999).

Ende der achtziger Jahre wurde das Hepatitis C Virus erstmalig beschrieben. Damals jedoch noch unter dem Namen eines Agens, welches als Hauptursache der Transfusionshepatitis und der sporadischen Hepatitiden angesehen wurde, der Non-A Non-B Hepatitis (Häussinger *et al*.; 2001).

Die weltweit vorkommenden Hepatitis C Viren können in sechs Genotypen unterteilt werden. Einige Genotypen treten nur in bestimmten geografischen Regionen auf, wobei die HCV-Typen 1a und 1b die größte Verbreitung besitzen. Zusätzlich existiert HCV auch in einer Vielzahl von Varianten die innerhalb eines infizierten Patienten zirkulieren können. Eine solche Variabilität ist typisch für Viren mit einem RNA-Genom. Der Sequenzabschnitt, welcher eine besonders hohe Mutationsrate aufweist, wird als

hypervariable Region 1 (HVR1) bezeichnet. Die Konsequenz dieser genetischen Vielfalt ist, dass das Virus sich der Kontrolle durch das Immunsystem des Wirtes entzieht. Dies führt zu einer hohen Rate chronischer Infektionen, da kein wirksamer Immunschutz aufgebaut werden kann. In der Therapie der chronischen Hepatitis C wird PEG Interferon in Kombination mit dem Nukleosidanalogon Ribavirin eingesetzt.

Da Viren nur obligat intrazellulär existieren können, benötigt man für die Erforschung und auch in der virologischen Diagnostik ein System, in dem sie sowohl vermehrt, als auch untersucht werden können. Hierfür werden üblicherweise lebende Tiere oder empfängliche Wirtszellen in Zellkulturen genutzt.

Seit der Identifikation des Virus Ende der 1980iger Jahre mittels molekularbiologischer Techniken, wie der Polymerase-Ketten-Reaktion, wurde das HCV intensiv untersucht und erforscht; hierbei ergaben sich Schwierigkeiten, weil es nicht möglich war, das HCV in ausreichender Menge und stabil in der Zellkultur anzuzüchten.

In den letzten Jahren und auch während die vorliegende Arbeit erstellt wurde, wurden *in vitro* Modellsysteme entwickelt die das Studium der HCV

induzierten Immunantwort (Von Hahn *et al*.; 2007) und des HCV Zyklus (Bartenschlager e*t al*.; 2005) erlauben und auch bei der Entwicklung von antiviralen Therapiemöglichkeiten einsetzbar sind (Lindenbach *et al*.; 2005). Eines dieser *in vitro* Modelle sind HCV-Pseudopartikel (HCVpp) oder Pseudotypen, die unmodifizierte E1 und E2 HCV Hüllproteine auf retroviralen oder lentiviralen *Core*partikeln tragen und mit einem Markergen ausgestattet sind (Bartosch *et al*.; 2003). Sie erlauben eine gezielte und funktionelle Erforschung der aktiven Form von HCV. Ein Modellsystem wie diese Pseudopartikel können nicht nur als „Werkzeug“ für Versuche, Diagnostik und Therapieoptionen in der allgemeinen Virologie genutzt werden, sondern können auch als wichtiges Element zur Analyse von Virus-Wirt-Interaktionen eingesetzt werden und so z. B. für die Entwicklung von Impfstoffen auch in der Veterinärmedizin, Verwendung finden (Ackermann, 2001).

Diese Partikel wurden in vorliegender Arbeit durch transiente Ko-Transfektion adhärenter 293T Zellen hergestellt, und das Testsystem wurde durch weiterführende Versuche mit verschiedenen Zelllinien und zur Erhöhung der infektiösen Partikelzahlen optimiert. Durch die Verwendung definierter Seren

und Testungen zur Kreuzreaktivität konnte das Pseudopartikel-Modellsystem validiert und darauffolgend für den Neutralisationstest in einer Studie mit HCV-infizierten Patientenseren eingesetzt werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Das Hepatitis C Virus

Die Entwicklung diagnostischer Testsysteme in den 1970igern für das Hepatitis A und das Hepatitis B Virus ermöglichten erstmals die Beschreibung einer viralen Form der parenteral übertragenen Hepatitis, die keiner der bereits bekannten Hepatitis verursachenden Viren (Hepatitis A Virus; Hepatitis B Virus und Hepatitis Delta Virus) zugeordnet werden konnte. Diese Form wurde zunächst als non-A non-B Hepatitis (NANBH) bezeichnet (Clarke; 1997). Die Identifizierung des Agens erwies sich als sehr schwierig und wurde erst durch den technologischen Fortschritt mittels molekularbiologischer Methoden - wie der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) - ermöglicht. Durch rekombinante DNA Technologie konnte ein Teil des Genoms mithilfe von experimentell mit NANBH infizierten Schimpansen kloniert werden. 1989 wurde dadurch das Hepatitis C Virus als Erreger der sogenannten NANBH identifiziert (Choo *et al*.; 1989; Bartenschlager & Lohmann; 2000).

Durch das Wissen über die nun bekannte kurze HCV Genom Sequenz gelang auch die Etablierung eines ersten serologischen Tests zum Nachweis für HCV. Hierdurch konnten die meisten transfusionsassoziierten Hepatitiden auf eine HCV-Infektion zurückgeführt werden (Kuo *et al*.; 1989). Untersuchungen ergaben, dass nahezu alle Personen die regelmäßig Blut und Blutprodukte empfangen hatten und ebenso ein großer Teil der i. v. (intravenös) Drogenabhängigen mit HCV infiziert waren (Alter; 1993).

Die Fortschritte in der HCV-Diagnostik haben dazu geführt, dass heute die meisten infizierten Personen erkannt und von einer Blutspende ausgeschlossen werden können. Die Dauer des "Diagnostischen Fensters" beträgt zurzeit im Mittel 80 Tage. Anti-HCV-Tests für das Blutspendescreening müssen heute eine Sensitivität von mindestens 99,5 % aufweisen (Bundesgesundheitsblatt; 2003). Das Risiko einer unerkannten mit HCV infizierten Blutspende in Deutschland wird ohne HCV RNA-Testung mit 1 in 670.000 Fällen angegeben. Im Gegensatz hierzu wird das Risiko durch den HCV RNA Nachweis auf 1 in 4.400.000 Fällen gesenkt (Offergeld *et al*.; 2005).

2.1.1. Epidemiologie

In Deutschland wurden dem Robert Koch-Institut (RKI), mit einer sinkenden Tendenz, in den Jahren 2007 insgesamt 6.867 Fälle (Inzidenzrate 8,3), 2008 insgesamt 6.223 Fälle (Inzidenzrate 7,6) und 2009 insgesamt 5.412 Fälle (Inzidenzrate 6,6) erstdiagnostizierter Hepatitis C Erkrankungen gemeldet. In 2010 waren es, von Kalenderwoche 1–17, 1.671 Fälle (Epidemiolog. Bulletin; RKI; Nr. 20, 2010). Die Meldepflicht gilt für alle Erstdiagnosen einer HCV-Infektion (Ergänzung zum Epidemiolog. Bulletin; RKI; Nr. 50, 2007). Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass im Jahr 2009 die Prävalenz von HCV-Antikörpern in der deutschen Bevölkerung bei etwa 0,4 % lag; bei diesen HCV-Antikörper-Positiven waren wiederum 84 % in der HCV-PCR positiv (Epidemiolog. Bulletin; RKI; Nr. 20, 2010). Die Inzidenz erstdiagnostizierter Fälle, im Jahr 2009, mit 8,2 pro 100.000 Einwohner unter Jungen und Männern war deutlich höher als unter Mädchen und Frauen mit 5,0 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner (Epidemiolog. Bulletin; RKI; Nr. 20, 2010).

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge hatten rund 3 % der Weltbevölkerung

eine Infektion mit HCV. Davon können etwa 170 Millionen Menschen als chronisch infiziert gelten (WHO; 2002).

Die WHO Region mit der weltweit höchsten Infektionsrate liegt in Afrika (s. Abb. 1). Europa hingegen liegt mit einer durchschnittlichen Prävalenzrate von 1,03 % am niedrigsten.

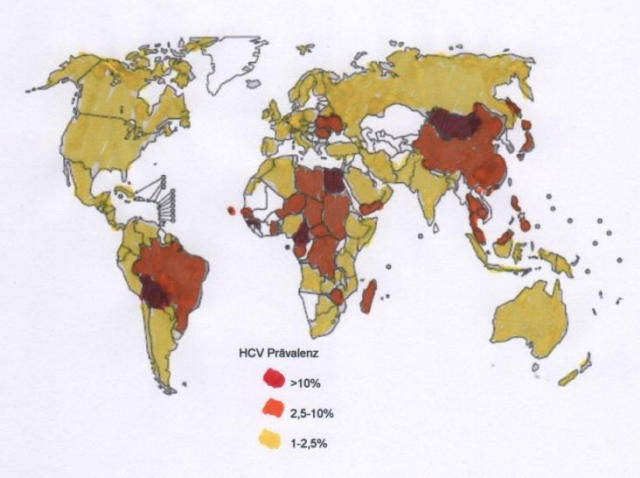


Abb. 1:
Angaben zur HCV-Prävalenz und Anzahl der HCV-Infizierten nach WHO Regionen
Angaben modifiziert aus: "Weekly Epidemiological Record No.6, 2002, 77, 41-48", der World Health Organisation.

2.1.2. Übertragungswege

Der klassische Übertragungsweg des Virus ist parenteral. Zu diesem zählen sowohl die Infektionen durch kontaminierte Blutkonserven und Plasmaprodukte, als auch die Infektion durch die Mehrfachverwendung von Einwegmaterial, wie z. B. Injektionskanülen. Gehäuft kann man das Auftreten einer HCV-Infektion ferner bei Hämodialysepatienten, tätowierten Personen und nach Nadelstichverletzungen (s. unten) beobachten. Die Prävalenz einer HCV-Infektion unter i. v.-Drogenabhängigen ist hoch; bis zu 60 %. Das sogenannte *„needle-sharing“* im Drogenmilieu gilt als wichtigste HCV-Infektionsquelle.

In den Ländern der so genannten „Dritten Welt“ führen Faktoren, wie die ineffektive Sterilisierung von medizinischen Geräten, das wiederholte Benutzen von Einmalartikeln, das Verwenden von Glasspritzen etc. zu einer weiterhin unverändert hohen Verbreitung von HCV (Maier; 2002).

<u>HCV-Übertragung durch Blut/ Blutprodukte</u>

Die Infektion durch Blut- und Blutprodukte kann als typische „Posttransfusionshepatitis“ beschrieben werden. Patienten, die wiederholt Blut- oder

Blutprodukte erhalten haben, werden als Risikogruppe eingestuft. Die Inzidenz an einer Posttransfusionshepatitis C zu erkranken steht in direkter Relation zu der Anzahl der erhaltenen Blutprodukte. Besonders Hämophile und Patienten mit Immunglobulinmangel sind gefährdet (Memon & Memon; 2002).

Durch die gesetzlich vorgeschriebene Testung sämtlicher Blutprodukte und Blutkonserven mit einem anti-HCV Test, gemäß den Richtlinien des Paul Ehrlich Institutes von 1999, konnte nahezu eine Elimination der Posttransfusionshepatitis C in Deutschland erreicht werden. Eine signifikante diagnostische Verbesserung, speziell im Blutspendewesen, beruht auf der hochempfindlichen Nukleinsäure-Amplifikations-Technologie (NAT). HCV-RNA kann durch dieses Verfahren, z. B. mittels PCR, mit sehr hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden (Bundesgesundheitsblatt; 2003). Vor dieser gesetzlich geforderten Testeinführung waren Blutprodukte häufig mit HCV kontaminiert.

Hitzebehandlung, Pasteurisation oder andere viruzide Behandlungen von Blutprodukten, wie chemische Inaktivierung, führen ebenfalls zu einer

Risikoherabsetzung (Maier; 2002; Memon & Memon; 2002).

HCV-Übertragung durch Nadelstichverletzungen

Besonders Personen die im medizinischen Bereich tätig sind, sind bezüglich einer HCV-Infektion gefährdet. Zwar ist das Risiko, nach einer einzigen, akzidentellen Nadelstichverletzung an einer HCV-Infektion zu erkranken gering; nur jeder Fünfzigste, der eine Nadelstichverletzung bei einem HCV-Träger erleidet, wird an einer klinisch bedeutsamen Hepatitis C Virusinfektion erkranken doch sind die Folgen für die Betroffenen, wegen der Gefahr eines chronischen Leberschadens, erheblich. Das Ausmaß der Gefährdung, durch eine Nadelstichverletzung infiziert zu werden, hängt vom Infektionsstatus des Patienten und von der übertragenen HC-Virusmenge ab; diese korreliert mit der Größe und Art der Kanüle und der Tiefe der Verletzung (Maier; 2002; Memon & Memon; 2002).

Nichtparenterale Übertragungswege

Die sexuelle Übertragung spielt bei der HCV-Infektion eine zunehmend wichtigere Rolle; dies gilt insbesondere für homosexuelle Sexualpraktiken. Dagegen ist die Transmission in monogamen,

heterosexuellen Beziehungen selten (Bundesgesundheitsblatt; 2003).

Die vertikale Übertragung einer HCV-Infektion, von einer infizierten Mutter auf ihr Kind, geschieht meist perinatal, d. h. während der Geburt durch direkten Kontakt des Neugeborenen mit infektiösem Blut der Mutter.

Etwa 4,7 % aller Kinder von HCV-positiven Müttern sind so von einer HCV-Infektion betroffen, wenn bei ihren Müttern HCV-RNA nachgewiesen werden kann (Mast *et al*.; 2005). Das Übertragungsrisiko steigt durch eine HIV-Koinfektion und durch eine hohe Viruslast der Mutter (IEASL; 1999).

Es gibt keine Hinweise auf Übertragungswege durch blutsaugende Gliederfüßler, Lebensmittel, Schmierinfektionen oder Aerosole bzw. Tröpfcheninfektionen (Bundesgesundheitsblatt; 2003).

2.2. Struktureller Aufbau von HCV

Die molekularbiologische Charakterisierung des HCV führte zur Einordnung des Virus als eigener Genus der Hepaciviren, in der Familie der Flaviviridae (Robertson *et al*.; 1998; Bartenschlager & Lohmann; 2000). Weitere Genera dieser Familie sind die

Flaviviren und die Pestiviren sowie die GB-Viren. Die Bezeichnung GB leitet sich von den Initialen des ersten Patienten ab bei dem 1996 eine Isolierung des Virus gelang. Damals wurde die Isolation beim Menschen fälschlicherweise mit einer Hepatitis in Verbindung gebracht, woher auch noch die alte Bezeichnung Hepatitis-G-Virus (HGV) stammt. Seit bei Affen sehr ähnliche Viren entdeckt wurden (GBV-A und GBV-B), wird die humane Variante als GB-Virus C (GBV-C) bezeichnet. Das GBV-B ist eng mit HCV verwandt und wird ebenfalls der Gattung Hepaciviren zugeordnet, grenzt sich aber noch deutlich als eigene Virusspezies ab (Bukh *et al*.; 2001).

Diese Genera umfassen einige wichtige Vertreter human- und tierpathogener Viren, von denen vor allem die Pestiviren von erheblicher veterinärmedizinischer Bedeutung sind.

Gemeinsame Merkmale aller Gattungen der Familie der Flaviviridae sind ein einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität, mit ca. 9.600 Basen (bei HCV), das von einem Nukleoprotein (*Core*) und einer Lipidhülle umgeben ist. In dieser Virushülle sind mindestens zwei glykosylierte Oberflächenproteine verankert, die bei den Genera Hepaciviren und

Pestiviren als E1 und E2 bezeichnet werden. Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu der Familie der Flaviviren und deren typischer Charakteristika wurden das BVD-Virus und andere Pestiviren auch als *in vitro* Modellviren für das HCV eingesetzt (Bartenschlager & Lohmann; 2000).

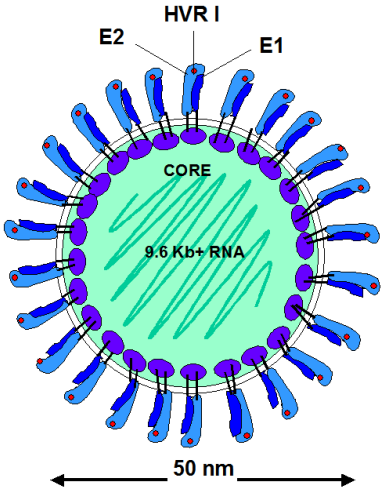


Abb. 2:
Hypothetisches Modell eines Hepatitis C Virus
Modifiziert aus Bundesgesundheitsblatt Gesundheits-forsch-Gesundheitsschutz 2003; 46: Seite 713.
***Core*:** Ein HCV-Strukturprotein es liefert Bestandteile des viralen Nukleokapsids.
E1 und E2: Transmembranproteine, sie sind Bestandteile der Virushülle.
HVR I: Hypervariable Region im Bereich des E2 Protein; variabelste Region im HCV-Genom; als HVR I bezeichnet.

Das Genom trägt einen einzigen offenen Leserahmen (O*pen Reading Frame,* ORF), der für ein Polyprotein mit einer Länge von 3.008-3.037 Aminosäuren codiert. Die Translation des HCV ORF wird durch eine etwa 340 Nukleotide lange, interne Ribosomeneintrittsstelle (*Internal Ribosomal Entry Site,* IRES) initiiert, die sich innerhalb der 5`terminalen nicht-codierenden Region (*Non Coding Region,* NCR) befindet und anstelle einer Cap-Struktur vorhanden ist (Bartenschlager & Lohmann; 2000).

Das entstandene Polyprotein wird ko- und post-translational von zellulären und viralen Autoproteasen in zehn verschiedene Produkte gespalten. Diese sind die Strukturproteine C, E1, E2 und p7, die am aminoterminalen Ende lokalisiert sind, sowie die Nichtstrukturproteine NS2 bis NS5B, die sich am carboxyterminalen Ende befinden und nur in infizierten Zellen vorkommen. Zu diesen zehn Spaltungsprodukten zählt auch das F Protein, über dessen biologische Funktion noch wenig bekannt ist (Xu *et al*.; 2001; Cristina *et al*.; 2005).

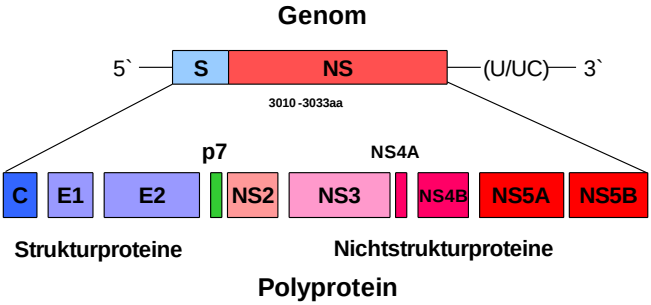


Abb. 3:
Die Genomorganisation des HCV
Modifiziert nach: Rispeter, K. und Roggendorf, M.; Seite 10; aus Hepatitis C; Häussinger, D und Niederau, C.; 2. Auflage; 2001; Blackwell Verlag.

Die schematische Darstellung des HCV Genoms zeigt die Position der Struktur **(S)**- und Nichtstrukturproteine **(NS)** innerhalb des Polyproteins.
aa: Aminosäuren
Zu den Strukturproteinen des HCV zählen: **C:** *Core*; **E1:** *Envelope* 1; **E2:** *Envelope* 2; **p7:** Polypeptid 7
Nichtstrukturproteine: **NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B**

Die HCV-Strukturproteine

Das *Core* Protein liefert die Bestandteile des viralen Nukleokapsids.

Es ist in seiner Sequenz hochkonserviert, was es zu einem wichtigen Bestandteil in der HCV-Diagnostik macht. Dem *Core* Protein wird eine erhebliche Rolle bei der Chronifizierung der HCV-Infektion zugesprochen; außerdem wird es aufgrund seiner

zelltransformierenden Eigenschaften für die Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms mitverantwortlich gemacht.

Die Proteine E1 und E2 sind hoch glykosylierte Typ 1 Transmembranproteine und sind Bestandteile der Virushülle. Durch die Faltung der Glykoproteine entstehen Heterodimere, welche die strukturellen Untereinheiten der Hülle bilden.

Das kleine hydrophobe Polypeptid p7 ist ein intrinsisches Membranprotein, das vermutlich zu der Familie der Viroporine gehört und wahrscheinlich eine erhebliche Rolle in der Freisetzung der viralen Partikel spielt (Penin *et al*.; 2004).

Die HCV-Nichtstrukturproteine

Das NS2 ist ein integrales Membranprotein und Bestandteil einer Autoprotease.

NS3 ist ein multifunktionelles Protein, das sowohl bei der Polyprotein-Prozessierung als auch bei der RNA-Replikation benötigt wird.

Das kleine Protein NS4A ist ein integrales Membranprotein, dem eine grundlegende Funktion im Replikationszyklus des HCV zugeschrieben wird.

NS4B ist ebenso ein integrales Membranprotein; cotranslational mit der ER (Endoplasmatisches

Reticulum) Membran assoziiert, induziert es eine spezifische Membranveränderung.
NS5A ist ein membran-assoziiertes Phosphoprotein, dessen genaue Struktur und Funktion noch nicht ausreichend bekannt sind.
Das NS5B-Protein codiert für die RNA-abhängige Polymerase des HCV (Häussinger & Niederau; 2001; Penin *et al*.; 2004).
Ein NS1 ist bei HCV, im Gegensatz zu anderen Flaviviren, nicht vorhanden.

2.2.1. Veterinärmedizinisch relevante Vertreter in der Familie der Flaviviridae

Als relevanter Vertreter ist ein Pestivirus, das BVD-Virus, als Verursacher der *Bovinen Virus Diarrhoe/ Mucosal Disease* (BVD/MD) der Paarhufer zu nennen. Als Hauptwirt dieser viralen Infektion wird das Rind angesehen; jedoch können andere Paarhufer ebenfalls infiziert werden. Der Befall mit dem Virus führt in der Regel zu einer zyklisch verlaufenden Allgemeininfektion.
Die BVD ist die wirtschaftlich bedeutendste virale Infektion der Rinder in Deutschland (Rolle & Mayr; 2002). Die dadurch bedingten Schäden entstehen,

insbesondere sowohl durch die verminderte Leistung, infolge der akuten Erkrankung, als auch durch Fruchtbarkeitsstörungen und die letal verlaufende Form, die *„Mucosal Disease“.*

Bei der Bekämpfung der BVD stehen das Auffinden und Entfernen von persistent infizierten (PI) Tieren und die Verhinderung des Viehverkehrs mit derart infizierten Tieren im Vordergrund. Die vollständige Eliminierung des BVDV aus der Rinderpopulation stellt den letzten Schritt in der Bekämpfungskette dar.

Persistent mit BVD-Virus infizierte Rinder entstehen ausschließlich durch eine intrauterine BVD-Virus Infektion. Sie scheiden lebenslang BVD-Virus aus und stellen somit die Hauptübertragungsquelle für diese Infektionskrankheit dar.

Für einen Rinder haltenden Betrieb ist das Erfassen der „Statussituation“, durch stichprobenartige, serologische Untersuchungen von Jungtieren auf Antikörper (Jungtierfenster), im Alter zwischen 6-18 Lebensmonaten, ein wichtiges Hilfsmittel im Management gegen BVD. Weisen Tiere in dieser Altersklasse bereits Antikörper gegen das BVD-Virus auf, so deutet das auf die Anwesenheit eines Dauerausscheiders im Bestand hin.

Das Jungtierfenster erlaubt somit eine grobe Einschätzung des Bestandsrisikos und stellt daher eine wichtige Entscheidungshilfe für das geeignete Vorgehen und die Durchführung von daraus resultierenden Impfmaßnahmen dar.

Da im Zusammenhang mit der BVD über 90 % der finanziellen Verluste durch Infektionen der Zuchttiere in den verschiedenen Phasen der Trächtigkeit entstehen, ist es von besonderer Wichtigkeit, Zuchttiere gezielt zu impften, um fetale Infektionen zu verhindern. Für moderne Bestandssanierungsverfahren als auch in den BVD-Bundesleitlinien wird daher von Impfstoffen der fetale Schutz verlangt (strategische Zuchttierimpfung) (Teich; 2001).

Zur Bekämpfung der BVD/MD auf freiwilliger Basis wurden am 01. Januar 2010 von den zuständigen Bundesministerien die "Leitlinien für den Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovines Virusdiarrhoe-Virus“ erlassen. Diese haben das Ziel, die Rinderbestände zu sanieren, PI-Tiere zu identifizieren, diese zu merzen und vor Neuinfektionen zu schützen.

Seit November 2004 besteht eine Anzeigepflicht für BVD (Bekanntmachung der Neufassung der

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen; BVDV-Verordnung (VO) 2011). Weitere Maßnahmen sind in der BVDV-VO (zuletzt geändert 17.12.2010) auf Bundesebene geregelt. Sie sieht die Untersuchungspflicht, ein Tötungsgebot für PI-Tiere, epidemiologische Nachforschungen und die Impfung von Antikörper-negativen Tieren mit dem Ziel der Verhinderung intrauteriner Infektionen vor.

Der Verursacher der Europäischen Schweinepest (ESP) ist ebenfalls ein Pestivirus. Die ESP zeigt sich bei typischem Verlauf unter dem Bild einer hämorrhagischen Septikämie und führt zu unterschiedlich hoher Letalität. Betroffene Bestände werden gekeult. Impfungen sind in allen Mitgliedsstaaten der EU untersagt. Die ESP wird somit zu einem großen wirtschaftlichen Faktor (Rolle & Mayr; 2002).

2.2.2. Humanmedizinisch relevante Vertreter in der Familie der Flaviviridae

Zu den humanmedizinisch relevanten Vertretern der Flaviviren zählen unter anderem die Dengue- und die FSME-Viren.

Eine Vielzahl der Flaviviren wird durch Arthropoden (z. B. Stechmücken oder Zecken), in denen sie auch aktiv replizieren, übertragen. Obwohl diese Viren weltweit verbreitet sind, sind individuelle Virusspezies typischerweise in bestimmten geographischen Regionen endemisch oder treten epidemisch auf. Für das Dengue-Virus trifft dies für tropische und subtropische Regionen zu, in denen die *Aedes* Stechmücke durch die das Virus übertragen wird, endemisch vorkommt. FSME, durch *Ixodes spp.* Zecken übertragen, tritt in großen Teilen Europas, der ehemaligen Sowjetunion und Asiens auf (Lindquist & Vapalahti; 2008). Nach aktuellen Schätzungen der WHO kommt es weltweit etwa zu 50 Millionen Dengue-Infektionen jährlich (WHO; 2009). Flaviviren verursachen unterschiedliche Erkrankungen, die sich durch Fieber, Gelenkschmerzen, Exanthem, Befall des Zentralnervensystems oder hämorrhagische Manifestation auszeichnen.

Sie sind lipidumhüllte Viren mit einem ikosaedrischen Kapsid, in das eine positiv orientierte Einzelstrang-RNA verpackt ist. Alle Flaviviren sind immunologisch miteinander verwandt und serologische Kreuzreaktivität kann im Hämagglutinationshemmtest und im Enzymimmunassay erfasst werden. Es

besteht jedoch keinerlei Kreuzneutralisation oder Kreuzprotektion zwischen Vertretern der einzelnen Serokomplexe. Doch werden beispielsweise durch eine Dengue-Virusinfektion Antikörper induziert, die in der immunologischen Diagnostik, z. B. in einem Enzymimmunassay, auch mit allen anderen Flaviviren kreuzreagieren und damit zu erheblichen Problemen führen (Doerr & Gerlich; 2002).

2.2.3. Die HCV-Genotypen

Von unterschiedlichen HCV-Genotypen wird ausgegangen, wenn die Homologie der Aminosäure-Sequenzen zweier Isolate, bezogen auf das Gesamtgenom, weniger als 72 % beträgt. Bei einer Sequenzhomologie zwischen 75 % und 86 % hingegen werden die isolierten Viren in unterschiedliche Subtypen des gleichen Genotyps eingeordnet. Besteht eine noch größere Homologie, so werden sie dem gleichen Subtyp zugeordnet (Simmonds; 2004).

Die weltweit vorkommenden Hepatitis C Viren können in sechs Genotypen unterteilt werden, wobei die Einordnung der HCV-Typen im Idealfall auf dem Vergleich der Sequenzen der Gesamtgenome beruht (Robertson *et al*.; 1998; Tokita *et al*.; 1998;

Simmonds; 2004). Die Zugehörigkeit zu einem bestimmten HCV-Typ kann aber auch anhand verschiedener, hochkonservierter Genomabschnitte bestimmt werden. Insbesondere die *Core*-Region, NS5 und die 5`-NCR sind hier von Wichtigkeit (Robertson *et al*.; 1998; Simmonds; 2004).

Einige Genotypen treten nur in bestimmten geografischen Regionen auf. Die HCV-Typen 1a und 1b besitzen die größte Verbreitung und sind überwiegend in Europa und Nordamerika anzutreffen. In Deutschland vorherrschend ist der Subtyp 1b; darauf folgend 1a und die Genotypen 3 und 2, die ebenfalls weltweit verbreitet sind. In Asien stark verbreitet ist der Subtyp 1b. Der Genotyp 4 spielt besonders in Nordafrika eine dominante Rolle. Genotyp 5 findet sich überwiegend in Südafrika und Genotyp 6 lässt sich in Hongkong und Vietnam häufig nachweisen (Häussinger & Niederau; 2001).

2.2.4. HCV-Quasispezies

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Genotypen und Subtypen existiert HCV auch in einer Vielzahl von Varianten, die innerhalb eines infizierten Patienten zirkulieren können. Eine solche Variabilität ist typisch

für Viren mit einem RNA-Genom und wird auf die Syntheseungenauigkeit der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase und auf fehlende Reparaturmechanismen zurückgeführt. Diese Ungenauigkeit führt dazu, dass es bei der Replikation des HCV zum Einbau nichtkomplementärer Nukleotide kommt. Eine auf diese Art und Weise entstandene komplexe Genompopulation wird als „Quasispezies“ bezeichnet (Martell *et al*.; 1992).

Man nimmt an, dass diese genetische Variabilität möglicherweise zur Persistenz der Virämie, zur Änderung des Zelltropismus und zur Resistenz gegen antivirale Substanzen führen kann. Eine entscheidende Bedeutung hierbei wird Mutationen der Hüllproteine zugesprochen, da auffallend ist, dass sich die Variabilität nicht homogen über das Gesamtgenom verteilt. Während einige Bereiche, wie z. B. die 5`-NCR und das *Core*–Protein, hoch konserviert sind zeigt das Hüllprotein E2 eine starke Variabilität (Ogata *et al*.; 1991; Smith & Simmonds; 1997; Rispeter *et al*.; 2000). Am aminoterminalen Ende des E2 befindet sich ein Sequenzabschnitt, der eine besonders hohe Mutationsrate aufweist und deshalb als hypervariable Region 1 (HVR1) bezeichnet wird. Es wird vermutet, dass diese Region

unter einem starken Selektionsdruck durch das Immunsystem steht und existierende Varianten durch dieses erkannt und eliminiert werden. Daraus resultiert eine positive Selektion neuer *„Immunescape-Mutanten*“, die sich der Elimination durch das Immunsystem des Wirtes entziehen. Eine Elimination von Virusvarianten ist durch neutralisierende Antikörper möglich von denen angenommen wird, dass sie insbesondere gegen die HVR1 des E2 gerichtet sind. Es wird postuliert, dass ein enger Zusammenhang zwischen Viruselimination und Chronifizierung der Infektion besteht (Weiner *et al*.; 1992; Kato *et al*.; 1993; Zibert *et al*.; 1995).

Ebenso wie HCV kann das Virus der ESP in einer Vielzahl von verschiedenen Varianten auftreten. Der Bereich des E2 weist hier die größte Variabilität auf (Lowings *et al*.; 1996).

2.3. Der Replikationszyklus von HCV

Die Nachweise von HCV Nichtstrukturproteinen und viraler RNA in der Leber lassen darauf schließen, dass die HCV-Replikation hier stattfindet. Außerdem geht man davon aus, dass HCV auch in peripheren mononuklearen Blutzellen repliziert (Sung *et al*.; 2003).

HCV zirkuliert im Plasma gebunden an Lipoproteine und wird wahrscheinlich in die Zellen, durch *Low-Density* Lipoprotein (LDL) Rezeptor-vermittelte-Endozytose, aufgenommen. Die Entwicklung von funktionellen HCV Modellsystemen, wie HCVpp oder HCVcc (*cell-culture-grown* Hepatitis C Virus), ermöglichte einen starken Wissenszuwachs in der Erforschung des HCV. Insbesondere konnten verschiedene Zelloberflächenproteine identifiziert werden die an der Aufnahme des Virus in die Wirtszelle beteiligt sind. Diese Aufnahme ist ein langsamer, komplexer Vorgang, an dem unterschiedliche Faktoren beteiligt sind. Dabei spielen CD81, ein ubiquitär vorkommendes tetraspanin Protein, das Protein Claudin-1 und der Scavenger Rezeptor B1 eine maßgebliche Rolle (Helle & Dubuisson; 2008). Kürzlich wurde ein Partner des

CD81 Rezeptors entdeckt; der EWI-2wint. Dieser kann die Interaktion zwischen dem Virus und dem CD81 Rezeptor unterbinden und einer potenziellen Infektion von Zellen, die diesen EWI-2wint Rezeptor tragen, vorbeugen (Guha *et al*.; 2005).

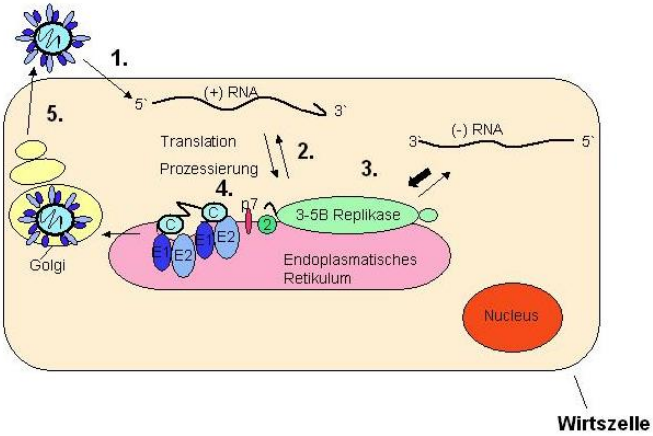


Abb. 4:
Hypothetisches Modell des HCV Replikationszyklus
Modifiziert nach: Bartenschlager, R. und Lohmann, V. (2000) Replication of hepatitis c virus. Journal of General Virology. 81: p.1633.

1. Penetration der Wirtszelle und Freisetzung der genomischen RNA aus dem Viruspartikel in das Zytoplasma der Zielzelle. Als Rezeptor für HCV kommt der CD81 Rezeptor infrage. Außerdem wird angenommen, dass der Scavenger Rezeptor, Klasse B, Typ 1 (SR-B1) an der rezeptorvermittelten Endozytose von HCV beteiligt ist (Bartosch *et al*.; 2003). **2.** Translation der eingebrachten RNA und Prozessierung des Polyproteins. Es formiert sich ein

Replikasekomplex, der mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) assoziiert. **3.** Verwendung der eingebrachten (+)-RNA zur Synthese eines (-)-RNA Zwischenproduktes durch die Replikase, die sich aus NS3-5B zusammensetzt. **4.** Die synthetisierte (-)-RNA fungiert als Vorlage für die weitere exzessive Produktion von (+)-RNA, welche wiederum für die Synthese von (-)-RNA genutzt werden kann. Außerdem fungiert sie zur Expression des Polyproteins oder kann in die Vorläufer-Virionen verpackt werden. Die Partikel erhalten ihre Hülle durch die Sprossung aus dem Lumen des ER. **5.** Die viralen Partikel werden durch den Golgi Komplex geschleust, bevor sie aus der Zelle freigesetzt werden (Bartenschlager *et al*.; 2000).

2.4. Der Infektionsverlauf

In den ersten Wochen nach der Infektion erscheinen im Plasma zunehmend Viruspartikel (bis zu 10^8 pro ml). Eine klinische Erkrankung liegt zunächst nicht vor und die Aktivität der Alaninaminotransferase (ALT) im Serum befindet sich im Normbereich.

Nach vier bis max. 12 Wochen kommt es zu einer relativ milden, anikterischen Hepatitis, jetzt einhergehend mit einer ALT-Erhöhung bis auf einige 100 IU/l. Diese Krankheitsphase bleibt jedoch, wegen des blanden Verlaufs, zumeist unbemerkt. Die relativ lange, symptomlose Inkubationszeit mit ausgeprägter Virämie deutet drauf hin, dass das Virus selbst keine hohe Zytopathogenität besitzt und die Symptomatik

der Infektion durch andere Faktoren ausgelöst wird. Sind die Symptome der akuten Phase aber deutlich ausgeprägt, dann heilt die Infektion häufiger (zu etwa 50 %) aus; im Gegensatz zur durchschnittlichen Ausheilungsrate von unter 20 %.

Der größte Teil der HCV-Infektionen geht jedoch in ein persistentes Stadium über, in dem das Manifestationsspektrum von fast völliger Gesundheit mit physiologischen Leberwerten und weitgehend normalem Organgewebe bis zur schweren, rasch progredienten chronischen Hepatitis reichen kann (Maier; 2002). Bei 10-30 % der chronisch infizierten Patienten kann bereits nach wenigen Jahren eine Leberzirrhose auftreten, mit der typischerweise erst 20-30 Jahre nach der Infektion zu rechnen ist. Die Zirrhose kann dann bei etwa 20 % der Patienten innerhalb weniger Jahre Leberversagen oder ein Leberkarzinom auslösen. Es ist anzunehmen, dass weltweit etwa 27 % aller Fälle von Leberzirrhose und 25 % aller Fälle von Leberkarzinomen auf Hepatitis C zurückzuführen sind (Epidemiolog. Bulletin; RKI; Nr. 20, 2010).

Die chronische Infektion durch HCV bewirkt eine dauerhafte Stimulation des Immunsystems. Daraus resultieren eine Entzündung der Leber und eine

Aktivierung insbesondere der B-Lymphozyten, was häufig zur erhöhten Immunglobulinproduktion, Kryoglobulinämie und Immunkomplexerkrankungen, wie Vaskulitis, Glomerulonephritis, Neuropathien und Hauterscheinungen führt (Bundesgesundheitsblatt; 2003).

2.4.1. HCV assoziierte Krankheiten

Das Hepatitis C Virus ist mehr noch als andere hepatotrope Viren nicht nur für akute und chronische Hepatitis verantwortlich, sondern auch für andere extrahepatische Erkrankungen.

Die am häufigsten dokumentierte extrahepatische Manifestation der HCV-Infektion ist die Kryoglobulinämie, die sich als eine Systemerkrankung darstellt und bei der es zu Ablagerungen von Immunkomplexen in den Blutgefäßen kommt (Cacoub *et al*.; 2000). Eine weitere Manifestation wird im Zusammenhang mit dem Lymphotropismus von HCV gesehen und so wird die Pathogenese der HCV assoziierten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome gedeutet (Zignego *et al*.; 1997).

Die membranoproliferative Glomerulonephritis bei einer HCV-Infektion ist zumeist Ausdruck der renalen

Beteiligung im Rahmen der Hepatitis-C-assoziierten gemischten Kryoglobulinämie (Johanson *et al*.; 1993).

2.5. Immunantwort auf eine HCV-Infektion

Eine HCV-Infektion zeichnet sich durch eine hohe Rate chronischer Infektionen aus. Nach akuter Infektion kann HCV in der Mehrzahl der Fälle nicht eliminiert werden (Häussinger & Niederau; 2001). Dies lässt darauf schließen, dass keine effektive Immunantwort initiiert wird oder aber, dass viral-vermittelte „*Immun-Escape* Strategien" wirken die zu einer Chronifizierung führen (Logvinoff *et al*.; 2004).
Studien, die die HCV-Genomsequenzen von chronologisch entnommenen Proben chronisch HCV-Infizierter verglichen, beschrieben die schnelle Veränderung des HCV-Genoms. Das HC Virus repliziert schnell mit einer geschätzten Menge von 10^{12} Virionen pro Tag. Bei einer angenommenen Fehlerrate der RNA-Polymerase von 1/10.000-1/100.000 Basenpaaren wird die Mutationsrate hoch, auf $1{,}44 \times 10^{-3}$ Nukleotid Veränderungen, pro Lokalisation, pro Jahr für das gesamte Genom, angegeben. In der NS5 und E1 Region wird diese sogar mit 4,1 und $7{,}1 \times 10^{-4}$ Veränderungen pro

Lokalisation, pro Jahr, angegeben (Simmonds; 2004). Die Konsequenz dieser genetischen Vielfalt ist, dass das Virus die Möglichkeit erhält, sich der Kontrolle durch das Immunsystem des Wirtes zu entziehen. Dies wiederum führt zu einer hohen Rate chronischer Infektionen (> 80 %), so kann kein wirksamer Immunschutz aufgebaut werden, der den Patienten vor einer neuen Infektion schützen könnte (Purcell; 1997).

Das Vorhandensein von Doppel- und Reinfektionen, bei bereits erfolgreich therapierten Patienten lässt ebenfalls darauf schließen, dass keine schützende Immunität gegen HCV aufgebaut werden kann (Wasielewski; 2004). Neuere Studien konnten zeigen, dass eine frühe nAK (neutralisierende Antikörper) Entwicklung in Zusammenhang mit der Elimination des HCV steht und dass ein spätes Auftreten nAK zur Chronifizierung der Infektion führt (Thimme *et al*.; 2008).

Durch weitere Studien an Schimpansen ist man zu der Erkenntnis gelangt, dass die *Clearance* einer HCV-Virämie während der sechsten bis achten Woche stattfindet; jedoch die Beseitigung von viral infizierten Hepatozyten nicht vor der 14. Woche nach der Infektion auftritt. Die so gewonnenen Daten

weisen auf ein biphasisches Geschehen hin, das zur viralen *Clearance* führt: einen direkten Interferon- (IFN) -abhängigen Mechanismus und einen eigenen und adaptiven immunantwort-vermittelten Mechanismus zur Beseitigung der infizierten Hepatozyten (Guha *et al*.; 2005).

Kaplan *et al.* (2007) konnten bestätigen, dass für die Viruselimination einer akuten HCV-Infektion eine hoch funktionelle, virusspezifische CD4 T-Zell und HCV-spezifische IFN-T-Zell Antwort verantwortlich ist und eine Infektion chronisch verläuft, wenn diese HCV-spezifische CD4 T-Zell Antwort nicht effektiv ist, auch wenn neutralisierende Antikörper und spezifische CD8 Zellen auftreten.

Die Untersuchungen und das Monitoring von Antikörpern und der intrahepatischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) Aktivität, bei akut mit HCV infizierten Schimpansen, erbrachte die Information, dass eine frühe und breite CTL-Antwort gegen verschiedene HCV Epitope besser mit einer viralen *Clearance* korrelierte als die neutralisierende Antikörperantwort (Cooper *et al.*, 1999; Guha *et al*.; 2005).

Multiple Mechanismen, die gemeinsam für das Versagen der Immunabwehr verantwortlich sind, sind

bereits bekannt. Das Virus ist in der Lage sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort zu manipulieren. Die zelluläre Abwehr wird geschwächt, indem: HCV-spezifische CD8-T-Zellen nur vermindert von dendritischen Zellen Informationen erhalten; CD8-T-Zellen Fehlfunktionen aufweisen, insbesondere eine verminderte Sekretion von Zytokinen und CD8-T-Zellen von anderen T-Zellen unterdrückt oder nicht ausreichend unterstützt werden (Thimme *et al.*; 2008).

Weitere Mechanismen, durch die das Virus sich der humoralen Immunantwort entziehen kann, sind: Interaktionen zwischen viralen Glykoproteinen, HDL (*High-density* Lipoprotein) und HCV Rezeptoren, die zu einer schnelleren Aufnahme des Virus in die Zielzelle führen und damit der Neutralisation durch Antikörper vorbeugen und Konformationsänderungen, die die Bindung von neutralisierenden Antikörpern nicht zulassen (Thimme *et al*.; 2008).

Ein Zusammenspiel der funktionellen zellulären und humoralen Immunabwehr ist bestimmend für den Verlauf einer HCV-Infektion. In diesem Zusammenhang ist es für die Entwicklung und die Angriffspunkte von Therapeutika wichtig, dass diese

beiden Abwehrwege gleichermaßen initiiert werden (Mancini *et al*.; 2009).

2.5.1. Neutralisierende Antikörperantwort auf eine HCV-Infektion

Die humorale Immunantwort und die Rolle von neutralisierenden Antikörpern während einer fortschreitenden HCV-Infektion sind bisher nicht ausreichend erforscht.

Das *in vivo* Tiermodell des Schimpansen bietet die Möglichkeit, die Ereignisse, die auf eine frische HCV-Infektion folgen, zu untersuchen. Informationen über diese frühe Phase der Infektion beim Menschen sind nur unzureichend vorhanden, da zumeist der genaue Infektionszeitpunkt unbekannt ist. Es vergeht gewöhnlich einige Zeit, im günstigsten Fall vier bis sechs Wochen, bis die Infektion des Patienten bemerkt und darauffolgend diagnostiziert wird. Eine Serokonversion findet im Durchschnitt mit etwa sechs Wochen statt (Netski *et al*.; 2005). Von Hahn *et al*. (2007) bestätigt, in einer neueren Studie mit Serumproben (entnommen über einen Zeitraum von 26 Jahren von einem bekannten und intensiv untersuchten HCV-Patienten – „Patient H“) und unter

Einsatz des HCVpp Neutralisationstests, dass sich eine stammspezifische nAK-Antwort etwa acht Wochen nach der Infektion entwickelt. Eine breitangelegte, anti-HCV kreuzneutralisierende nAK-Antwort entsteht erst spät; etwa 33 Wochen nach der Infektion. Diese neueren Studien waren zum Zeitpunkt der Entstehung der vorliegenden Dissertation noch unbekannt.

Versuche an Schimpansen zeigen, dass nachdem HCV-infiziertes Patienten Serum inokuliert wurde, neutralisierende Antikörper gebildet werden, die spezifisch gegen die inokulierte HCV-Variante gerichtet sind (Farci *et al.*, 1994; Guha *et al*.; 2005).

Als Angriffspunkte für neutralisierende Antikörper werden insbesondere die HVR 1 des E2, aber auch andere konservierte Bereiche des E2 Hüllglykoproteins angenommen. Die schnelle Mutation der Zielstruktur neutralisierender Antikörper lässt einen Mechanismus vermuten, der sensible Sequenzen aus der Quasispeziespopulation entfernt. Dadurch kann sich das Virus dem Selektionsdruck durch die humorale Immunabwehr entziehen (Logvinoff *et al*.; 2004; Von Hahn *et al*.; 2007; Mancini *et al*.; 2009).

Bis heute ist die routinemäßige Messung von anti-HCV Antikörpern, z. B. mittels ELISA, in Patientenblut nur ein Mittel, um eine HCV-Infektion zu diagnostizieren. Erst die Entwicklung von autologen und heterologen HCV-Glykoprotein tragenden-Pseudopartikeln schuf die Möglichkeit, die Rolle der Antikörper während einer HCV-Infektion genauer zu untersuchen (Hsu *at al*.; 2003; Bartosch *et al*.; 2003). Das intensive Studium der humoralen Immunantwort bei chronischen HCV Patienten und Verlaufskontrollen während der Therapie, können neue und wertvolle Erkenntnisse liefern, die es ermöglichen, rechtzeitig individuelle Behandlungen zu modifizieren und auf die Bedürfnisse des Patienten abzustimmen.

Ein *in vitro*-System zur Messung der neutralisierenden Antikörperantwort, wie in vorliegender Arbeit, ist ein neuer und nützlicher Ansatz in der Erforschung des HCV-Infektionsverlaufs und bietet zusätzliche Einsatzmöglichkeiten in der klinischen Diagnostik (Berger *et al*.; 2009).

2.6. Die Therapie einer HCV-Infektion

Grundsätzlich sind alle Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Kandidaten für eine antivirale Therapie. Primäres Ziel bei der antiviralen Therapie der chronischen Hepatitis C ist die Induktion einer anhaltenden Remission, definiert durch den fehlenden Nachweis von HCV-RNA im Serum 24 Wochen nach Therapieende mittels sensitiver Testverfahren (Berg; 2004).

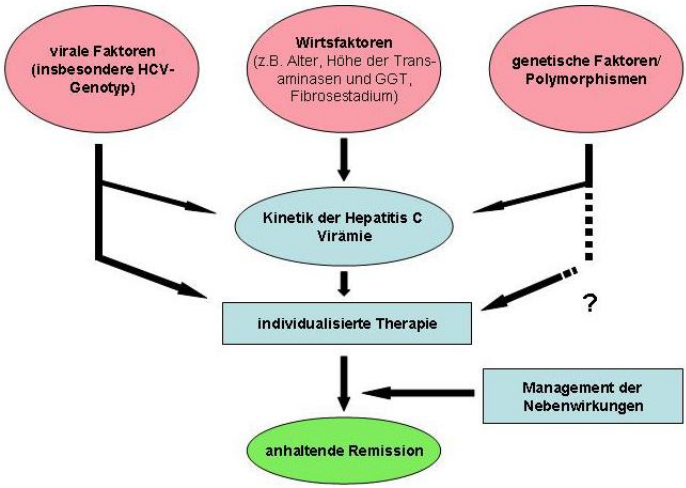


Abb. 5:
Einflussfaktoren für das dauerhafte Therapieansprechen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C.

Modifiziert nach: Berg, T., (2004); Therapie der chronischen Hepatitis C. Med Welt: 7-8. Seite 225.

Die bekannten wirts- und virusspezifischen prädiktiven Parameter beeinflussen die HCV-Kinetik unter Therapie. Die individuelle Vorhersage des Therapieerfolgs ist daher am besten anhand der individuellen Viruskinetik zu treffen.

In der Therapie der chronischen Hepatitis C wird seit 1986 IFN alpha eingesetzt. Es bildet die Grundlage der antiviralen Therapie und ist seit 1991 auch für diese zugelassen.

Die Kombination mit dem Nukleosidanalogon Ribavirin brachte schließlich stark verbesserte Erfolge. Bei einer Therapiedauer von einem Jahr mit 3 MU IFN 3-mal wöchentlich und 1.000 bis 1.200 mg Ribavirin täglich lässt sich bei Genotyp 1 zu 33 %, bei anderen Genotypen zu 80 % eine bleibende Viruselimination erzielen (Manns *et al*.; 2001). Eine weitere Verbesserung, insbesondere bei Genotyp 1, bewirkt die Verwendung von Interferon, das mit Polyethylenglykol (PEG) konjugiert ist (Fried *et al*.; 2002). PEGInterferon besitzt eine längere Halbwertszeit, welches eine effizientere Wirkung hervorruft. Das Ansprechen auf die Therapie konnte durch PEGInterferon deutlich erhöht werden.

Eine 24-wöchige, anstelle einer 48-wöchigen, Therapie genügt bei Genotyp 2 oder 3 oder auch bei einer niedrigen HCV-RNA-Anfangskonzentration des Genotyps 1 unter 2.000.000 Kopien/ml. Insgesamt ist jedoch nur in 50 % der Fälle von einer erfolgreichen Therapie auszugehen (Bretner; 2005). Andere Autoren berichten bei der aktuellen Standardtherapie von anhaltenden Remissionsraten von ca. 55 bis 60 % (Berg, 2004). Als günstige Faktoren für ein Ansprechen der Therapie gelten neben den Genotypen 2 und 3 und einer niedrigen Viruslast, jüngeres Alter, weibliches Geschlecht und ein geringer Grad der Fibrose (Maier; 2002).

Der Therapieverlauf einer HCV-Infektion kann in drei Gruppen eingeteilt werden: *Responder* ("andauerndes Ansprechen auf die Therapie"), *Non Responder* ("Kein Ansprechen auf die Therapie") und *Relapse* ("Rezidiv nach initialem Response"). Diese Einteilung erfolgt durch die Messung der HCV RNA im Patientenserum bzw. –plasma. Die Messungen werden zur Kontrolle des Therapieerfolgs vor Therapiebeginn und 12 Wochen nach Start durchgeführt. Sie stellen eine adäquate Methode dar, um den Therapieverlauf eines Patienten zu überprüfen, gegebenenfalls zu modifizieren oder

auch, um die Therapie bei ausbleibendem Erfolg abzubrechen. Die Therapie kann bis auf 48 Wochen verlängert werden, wenn die HCV RNA Menge nach 12 Wochen um 2-Log Stufen gefallen ist. Wenn jedoch kein Abfall zu verzeichnen ist, ist mit einem „Nicht-Ansprechen“ (*Non Responder*) auf die Therapie zu rechnen. Sie kann in diesem Fall beendet oder fortgeführt werden, um das Voranschreiten der Lebererkrankung zu verhindern; jedoch voraussichtlich ohne Elimination des Virus. Kann am Ende der Behandlung die Anwesenheit von HCV RNA wieder nachgewiesen werden, spricht dies mit großer Sicherheit für ein Rezidiv (*Relapse*). Ein erfolgreiches Ansprechen auf die Therapie (*Sustained Response*) wird charakterisiert durch ein negatives HCV RNA Detektionsergebnis im Blut mit einer sensitiven Nachweismethode 24 Wochen nach Therapieende (Pawlotsky; 2002).

Genannte Medikamente wirken, indem sie die HCV-Replikation hemmen oder eine Stimulation des Immunsystems anregen, jedoch rufen sie auch eine Vielzahl an Nebenwirkungen hervor. Diese Nebenwirkungen, die insbesondere auf das Interferon zurückzuführen sind, umfassen grippeähnliche Symptome wie Müdigkeit, Myalgien, Fieber, einen

Abfall der Leukozyten, der neutrophilen Granulozyten und der Thrombozyten. Andere Nebenwirkungen sind psychische Veränderungen wie Depressionen, die zum Suizid des Patienten führen können.
Die beobachteten Nebenwirkungen von Ribavirin sind eine Abnahme der Hämoglobinkonzentration, Übelkeit, Anorexie, Schlaflosigkeit, Hautveränderungen und Schilddrüsenfunktionsstörungen. Eine weitere Nebenwirkung des Ribavirin ist seine Teratogenität, welche bei einer geplanten oder bestehenden Schwangerschaft berücksichtigt werden muss. Weiterhin kommt hinzu, dass diese aktuelle, einjährige Standardtherapie mit nicht unerheblichen Kosten verbunden ist, die sich derzeit auf etwa 28.000 Euro belaufen (Wedemeyer & Trautwein; 2004).

2.7. Die Erforschung von Hepatitis C

Die Anfänge der HCV-Forschung waren nach der Entdeckung des Agens, welches die Non-A, Non-B Hepatitis hervorrief, das klassische virologische Tierversuchsmodell. Durch Infektionsversuche mit

Schimpansen im Jahre 1978 wurde der Nachweis eines übertragbaren Agens erbracht (Purcell; 1997).

Da Viren nur obligat intrazellulär existieren können, benötigt man für die Erforschung ein System, in dem sie sowohl vermehrt, als auch untersucht werden können. Hierfür werden üblicherweise lebende Tiere oder empfängliche Wirtszellen genutzt in denen sich die Viren effektiv anzüchten lassen.

Solche Wirtszellsysteme bestehen, im einfachsten Falle, aus permanenten Zelllinien, die kommerziell erworben und einfach im Labor kultiviert werden können. Bisher wurden schon zahlreiche Versuche unternommen HCV in einer solchen Zellkultur zu vermehren, doch ist dies aus noch unbekannten Gründen bis heute nicht zufriedenstellend, beziehungsweise nur unter großen Schwierigkeiten, gelungen.

Die meisten Infektionsversuche wurden mit primären Zellkulturen oder primären Zellen, isoliert aus persistent mit HCV infizierten Patienten, unternommen. Diese Methoden sind jedoch schlecht reproduzierbar. HCV wird in nur so geringen Mengen repliziert, dass höchst sensitive Detektionsverfahren notwendig sind (Bartenschlager & Lohmann; 2000).

Bisher ist weiterhin nur der Schimpanse als etabliertes *in vivo* Tiermodel für die Erforschung für HCV geeignet. Das einzige kleine Säugetier, welches jedoch auch nur nach Immunsuppression, mit HCV infiziert werden kann, sind *Tupaia spec*.. Die Produktion von HCV transgenen oder immundefizienten Mäusen, die nach Transplantation humaner Hepatozyten eine HCV-Infektion entwickelten oder virale Gene exprimierten, ist möglich (Bartenschlager & Lohmann; 2000).

Außerdem wurden in den letzten Jahren weitere *in vitro* Modellsysteme entwickelt, die das Studium des HCV Zyklus erlauben und bei der Entwicklung von antiviralen Therapiemöglichkeiten einsetzbar sind. Durch das Replicon System konnte erstmals *in vitro* die ursprüngliche HCV-RNA Replikation untersucht werden (Bartenschlager & Lohmann; 2001). Diese Methode war jedoch nicht ausreichend um die frühen und fortschreitenden Infektionsschritte zu untersuchen und wurde daher weiterentwickelt. Aus dem Serum eines, an einer fulminanten Hepatitis C erkrankten Patienten, wurde ein Genotyp 2a Replicon (JFH-1) etabliert. Dieses System repliziert sich sehr effizient in verschiedenen Zelltypen und produziert infektiöse virale Partikel, die sogar in einer *in vitro*

Zellkultur passagiert werden können und für Schimpansen und Mäuse, denen humane Hepatozyten transplantiert wurden, infektiös sind (Helle & Debuisson; 2008). Die Partikel werden als HCVcc bezeichnet (Wakita *et al*.; 2005; Lohmann; 2008).

Als weiteres *in vitro* Modell wurden infektiöse, genetisch markierte HCVpp entwickelt, die unmodifizierte E1 und E2 Hüllproteine auf retroviralen oder lentiviralen *Core*partikeln tragen. Diese Partikel sind hoch infektiös aber nicht voll replikationsfähig und erlauben eine gezielte, funktionelle Erforschung der aktiven Form von HCV E1 und E2 Glykoproteinen. Durch diese Pseudopartikel besteht die Möglichkeit der gezielteren Erforschung der HCV-Hüllproteine (Bartosch *et al*.; 2003; Brass *et al*.; 2007). HCVpp haben einen bevorzugten Tropismus für Hepatozyten (Helle & Dubuisson; 2008).

Eine andere Methode zur Erforschung von HCV sind HCV virusartige Partikel, die auf verschiedene Arten hergestellt wurden: in Insektenzellen oder durch Pseudotypisieren mit Vesiculoviren oder mit Influenzaviren und modifizierten HCV E1 und E2 Glykoproteinen. Jedoch waren diese Partikel nur gering oder gar nicht infektiös und widersprüchliche

Ergebnisse machten ein funktionelles Arbeiten nicht realisierbar (Baumert *et al*.; 1998; Buonocore *et al*.; 2002; Flint, *et al*.; 1999; Lagging *et al*.; 1998).

Tab. 1:

Modelle zur Erforschung von HCV

Zellkultur Modelle:

- Pseudopartikel, die funktionale HCV Glykoproteine tragen (HCVpp) (Bartosch *et al*.; 2003)
- Infektion von primären Hepatozyten und etablierten Zelllinien (Bartenschlager *et al*.; 2004)
- Stabile Transfektion von Zelllinien (Bartenschlager & Pietschmann; 2005)
- Replicons (Bartenschlager & Lohmann; 2001)
- Als surrogates Model: Tamarin (*Saguinus*) Hepatozyten für GBV-B (Grakoui *et al*.; 2001)
- HCVcc (Lindenbach *et al*.; 2005)
- Rekombinant infizierte Zellkultursysteme (Bartenschlager & Pietschmann; 2005)
- Virus-Chimären (z. B. Poliovirus-HCV) (Baumert *et al*.; 1998)

***In vivo* Modelle:**

- Schimpansen (*Pan troglodytes*) (Grakoui *et al*.; 2001)
- Tupaia spec. (Brass *et al*.; 2007)
- Immundefiziente Mäuse oder immuntolerante Ratten/Mäuse transplantiert mit humanen Hepatozyten (Grakoui *et al*.; 2001)
- Transgene Mäuse (Brass *et al*.; 2007)
- Als surrogates Modell: Tamarine (*Saguinus*) für GBV-B (Grakoui *et al*.; 2001)

2.7.1 Was sind Pseudotypen oder Pseudopartikel?

Die ursprüngliche Bedeutung des „Pseudotypisieren“ ist, dass ein oder mehrere strukturelle Proteine eines Viruspartikels nicht durch die Nukleinsäure des Virus codiert werden. Dies ist jedoch eine weit gefasste Definition und die derzeit gebräuchliche Bedeutung besagt, dass ein pseudotypisiertes Virus eines ist, dessen Außenhülle (die Hüllglykoproteine eines behüllten Virus oder die Kapsidproteine eines unbehüllten Virus) von einem Virus stammt, welches eine andere Genomherkunft und eine herkünftlich andere Genom-Replikationsmaschinerie besitzt. Pseudotypisierte Viren können vielseitig genutzt werden: um bestimmte Gene in Zellen einzubringen (z. B. in der Gentherapie), um den Eintrittsprozess des Virus (von dem die Außenhülle des rekombinanten Virus stammt) in die Zelle zu untersuchen oder auch für Neutralisations-, Tropismus- und Rezeptorstudien. Außerdem können sie experimentell leicht manipuliert werden (z. B. Genmutationen) und Untersuchungen der Hüllproteine sind, auch bei Viren für die kein

adäquates Zellkultursystem vorhanden ist, möglich (Sanders; 2002; Lavillette *et al*.; 2005).

Die Technik der Pseudopartikel wird bereits seit längerer Zeit zum Studium anderer Viren genutzt und ist in den letzten Jahren auch intensiv in der HCV-Forschung zum Einsatz gekommen (Von Hahn *et al*.; 2007; Mancini *et al*.; 2009).

Pseudopartikel werden insbesondere zur Erforschung von Viren, die aus verschiedenen Gründen problematisch sind, eingesetzt. Als Beispiele können genannt werden: hohes Sicherheitsniveau oder keine vorhandenen geeigneten Zellkultursysteme, wie es beispielsweise für das SARS-Coronavirus (SARS-CoV) oder auf Viren des Genus Hantavirus zutrifft.

Studien über die natürliche Infektion von diesen Viren und die neutralisierende Antikörperantwort sind nur unter Schwierigkeiten, auf hohem Sicherheitsniveau (S3 oder höher) möglich. Zur Entwicklung eines Impfstoffes sind diese Studien jedoch unerlässlich. Durch den Einsatz der Pseudotypen konnten Neutralisationsversuche mit Patientenseren und retroviralen SARS-CoV Pseudopartikeln in einer geringeren Sicherheitsstufe durchgeführt werden, da dieses System nicht mit ursprünglichen Viren arbeitet.

Hierdurch kann diese Methode eine weite Anwendung in der Routinediagnostik erfahren und in präklinischen Studien eingesetzt werden (Temperton *et al*.; 2005).

In anderen Studien wurden SARS-CoV Pseudopartikel als probates Instrument für Rezeptor- oder auch Tropismusstudien angewandt (Giroglou *et al*.; 2004). Zur Erforschung und für den späteren Einsatz in der Gentherapie wurden erfolgreich Lymphozyten Choriomeningitis Virus (LCMV) Pseudotypen eingesetzt. Ihre hohe Stabilität, geringe Toxizität und deren großes Wirtsspektrum stellen ein attraktives Versuchssystem dar (Beyer *et al*.; 2002).

Zur Bestimmung von Hantavirus Serotypen und neutralisierenden Antikörpertitern kann der Focus oder „Plaque Reduktion Neutralisationstest“ eingesetzt werden. Generell ist aber von Nachteil, dass ein bis zwei Wochen vergehen, bevor ein Ergebnis abgelesen werden kann; außerdem ist hierbei ein hohes biologisches Sicherheitsniveau notwendig. Durch den Einsatz von VSV (Vesicular Stomatitis Virus) Pseudotypen, die Hüllproteine eines Hantavirus tragen, konnte ein einfacher, sicherer und schneller Neutralisationstest entwickelt werden (Ogino *et al*.; 2003).

Diese Arbeiten zeigen, dass Pseudotypen als ein geeignetes und einfaches Werkzeug eingesetzt werden können und insbesondere bei der Erforschung und Diagnostik von Viren dienlich sind. Dies ist deshalb von besonderer Relevanz, da ihre Erforschung, aus den verschiedensten Gründen bis vor Kurzem noch nicht, oder nur unter großen Schwierigkeiten möglich war.

2.8. Der Nachweis/Labordiagnostik der Virushepatitis C

Die Labordiagnostik bietet die Möglichkeit direkter oder indirekter Nachweismethoden einer HCV-Infektion.

Die direkten Nachweismethoden umfassen HCV-Antigentests, HCV-RNA Nachweise und auch die HCV-Genotypisierung. Der quantitative HCV-Antigentest ist erst seit wenigen Jahren kommerziell erhältlich. Er weist das HCV-*Core*-Protein nach und besitzt eine relativ hohe Sensitivität (Berger; 2005). Der HCV-RNA Nachweis beruht auf einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (Polymerasekettenreaktion oder *Transcriptions-mediated Amplification*), die die HCV-RNA

Zielsequenz durch Vermehrung auch in geringen Mengen nachweisen kann. Der sensitive qualitative HCV-RNA-Nachweis findet besonders im Blutspendedienst, bei der Verwendung von Blutprodukten und bei der Abklärung unklarer serologischer Befunde Verwendung. Als wichtiger Marker hinsichtlich der HCV-Therapie besitzt die quantitative Viruslastbestimmung große Bedeutung. Zur Quantifizierung der viralen RNA steht unter anderem die Technik der Signalamplifikation (bDNA), die PCR und seit kurzer Zeit auch *Real-Time* PCR (zum Teil voll automatisiert) zur Verfügung.

Das Ergebnis der HCV-Genotypisierung ist ein wichtiger prognostischer Marker für eine bevorstehende HCV-Therapie. Die Genotypisierung kann durch die direkte Sequenzierung der NS5B- oder der E1-Region mit darauf folgendem Sequenzvergleich und einer phylogenetischen Analyse erfolgen. Sie wird zudem häufig mittels eines kommerziellen Verfahrens vorgenommen das auf einer reversen Hybridisierung des 5`-NTR und *Core* Bereiches beruht (Line Probe Assay von der Firma Siemens, Leverkusen).

Eine indirekte Nachweismethode, der Nachweis von spezifischen anti-HCV-Antikörpern im

Patientenplasma oder –serum, erfolgt mittels Enzym-Immunoassays (EIA). Dieser Test wird zum Patientenscreening und im Blutspendedienst verwendet. Er weist eine humorale Immunantwort gegen Teile des Genoms von HCV, der Nichtstrukturproteine NS3, NS4 und des *Core*-Proteins nach. Der Test der zweiten Generation konnte das diagnostische Fenster von durchschnittlich 16 Wochen auf durchschnittlich 10 Wochen verringern (Gretch; 1997). Eine deutliche Verbesserung durch das Hinzunehmen eines weiteren Nichtstrukturproteins, dem NS5, in den Tests der dritten Generation konnte nicht erzielt werden. Jedoch wurden andere Verbesserungen vorgenommen und das diagnostische Fenster wiederum um zwei bis drei Wochen verkürzt. Ein eindeutig positiver HCV-Antikörpertest bedeutet jedoch nicht zwingend, dass der Patient eine aktive Infektion hat, denn es können auch noch Jahre nach der Ausheilung spezifische Antikörper vorhanden und nachweisbar sein.

Die Messung der zellulären Immunität bei einer HCV-Infektion durch durchflusszytometrische Bestimmungsverfahren ist bisher nur zu Forschungszwecken etabliert. Die Verfahren befinden

sich noch in der Entwicklung; jedoch schreitet diese schnell voran.

Ein HCV-Neutralisationstest, der anderen etablierten Zellkulturmodellen gleicht, existiert in dieser Form noch nicht.

Die Entwicklung und Nutzung der HCV-Pseudopartikel, die HCV-Hüllglykoproteine tragen, bietet hier neue Möglichkeiten. Inwieweit diese für die Routinediagnostik nutzbar sind, ist noch abzuwarten (Berger; 2005).

2.9. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung infektiöser HCVpp, die die frühen Infektionsschritte von HCV nachahmen und die es ermöglichen, Serumproben von chronisch HCV-infizierten Patienten auf ihre Neutralisationsfähigkeit zu untersuchen. Die HCVpp enthalten unmodifizierte und funktionale HCV E1 und E2 Hüllglykoproteine und sind mit einem grün-fluoreszierenden Markergen ausgestattet, welches die positiv transduzierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zum Leuchten bringt.

Diese Arbeit untersucht und befasst sich im Einzelnen mit:

1. Herstellung von lentiviral- und onkoretroviral-basierten HCVpp durch transiente Ko-Transfektion adhärenter 293T Zellen und unter Einsatz von Polybrene, Vergleich der daraus gewonnenen Ergebnisse zur Optimierung des entstehenden Testsystems für die Neutralisationsversuche;
2. Studien zum Zelltropismus der HCVpp mit verschiedenen B-Suspensionszelllinien durch Nutzung der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse);
3. Validierung des Neutralisationstestsystems mithilfe von Neutralisationsstudien der HCVpp durch Hinzugabe von definierten Seren und Etablierung dieses Systems als diagnostischer und prognostischer Marker der HCV-Infektion unter Auswertung der in den Neutralisationsstudien erzielten Ergebnisse;
4. Neutralisationsversuche mit HCVpp und Patientenseren, in denen Antikörper gegen andere Flaviviren wie Dengue und FSME nachweisbar sind, mit dem Ziel, eine mögliche vorhandene Kreuzreaktivität festzustellen;

5. Neutralisationsstudien der HCVpp durch Hinzugabe von ausgewählten Seren HCV infizierter Patienten mit unterschiedlichem Therapieausgang, um zu untersuchen, ob dieser in Zusammenhang mit der Höhe der neutralisierenden Antikörperantwort stehen könnte.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, die für die Versuche genutzt wurden, wurden soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Takara (Shiga, Japan) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) gefertigt.
Plastikwaren und Filtersysteme wurden von BD (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Costar (Bodenheim), Sarstedt (Nürnbrecht), Beckman (München), Vivascience (Hannover), Codan (Lensahn), Nalge (New York, USA) und Millipore (Eschborn) bezogen. Die Medien, Antibiotika und Zusätze für die Zellkultur verwendete ich von den Firmen Bio Whittaker/Cambrex (Verviers, Belgien), Difco (Augsburg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Gibco BRL (Eggenstein).

3.1.2. Verwendete Kits

Tab. 2:
Verwendete Kits in der Zellkultur und Molekularbiologie

Kit	Firma
Calcium phosphate transfection kit	Sigma, Deisenhofen
Nucleo Bond PC 500 Maxi Kit (s. Macherey-Nagel, User manual)	Macherey-Nagel, Düren
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (Vaughan et al.; 2003)	Genomed, Bad Oeynhausen

3.1.3. Verwendete Lösungen und Nährmedien zur Anzucht von Bakterien und in der Molekularbiologie

Das Nährmedium wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt und für 20 Minuten bei 121°C und zwei bar sterilisiert.

Tab. 3:

Lösungen, Nährmedium und Puffer

Name	Zusammensetzung
Kanamycin	60 mg/ml in sterilem Wasser
LB-Medium	10 g Trypton / Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml *aqua dest.* und autoklaviert
50 xTAE	Tris-Base 0,8 mM, Essigsäure 0,8 mM, EDTA 0,04 mM/ 50 ml *aqua dest*. (=0,5 M), Einstellen des pH auf 8,3
Zell-Suspensions-Puffer P1 aus dem JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	50 mM tris (hydroxymethyl) Aminomethanhydrochlorid in *aqua dest.*, 10 mM EDTA und 100 µg/ml Ribonuklease
Zell-Lysis-Puffer P2 aus dem JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	200 mM Natriumhydroxid in *aqua dest.*, 1% SDS (Natriumdodecylsulfat)
Neutralisations-Puffer P3 aus dem JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	enthält Guanidinhydrochlorid

3.1.4. Bakterien

Es wurde der *Escherichia coli*-Stamm TOP10 von Invitrogen (Karlsruhe) als Wirtsstamm zur Herstellung der Plasmid-DNA verwendet.

Tab. 4:

Genotyp des verwendeten Bakterienstammes

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP10	F⁻*mcr*A Δ(*mmr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.5. Plasmide und deren Herstellung

Als Kontrollen wurden in den Versuchen VSVpp eingesetzt, die auch in der Arbeit von Giroglou *et al*.; 2004 verwendet wurden. VSV-G Hüllglykoproteine werden effizient in retroviralen Pseudotypen verwendet (Giroglou *et al.*; 2004; Ogino *et al*.; 2003) und sind daher sehr gebräuchlich (Beyer *et al*.; 2002), insbesondere als positive Kontrolle in Studien mit HCVpp (Bartosch *et al*.; 2003). Diese VSVpp werden im Institut regelmäßig als Kontrollviruspartikel bei Infektions- und Neutralisationsstudien verwendet.

Die verwendeten Plasmide und Vektoren (M3, M56a, M57, M334 und M420) wurden mir von Frau Prof. Dr. D. van Laer/Georg-Speyer Haus (Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt.

Tab. 5:

Verwendete Plasmide und Vektoren

Name	Gen / Verwendungszweck	Referenz
M3	Hilfsvektor mit dem Glykoprotein G des "vesicular stomatitis virus" (VSV-G), für die Bildung der Hüllproteine nach einer Transfektion unter Kontrolle des CMV-Promotors.	VSV-G aus M1; Gallione & Rose, 1983; in M3.
M56a	Retroviraler Vektor; als Insert das Markergen GFP (grün fluoreszierendes Protein).	Schambach *et al.*, 2000
M57	Helferplasmid zur Expression von Gag/Pol für die Replikation und reverse Transkription onkoretroviraler Vektoren nach einer Transfektion.	Beyer *et al*., 2002
M334	Expressionplasmid der HIV-Proteine Gag-pro-Pol für die Replikation und reverse Transkription zur lentiviralen Verpackung, unter Kontrolle des CMV-Promotors.	Naldini *et al*., 1996
M420	Lentiviraler transfer Vektor mit GFP. Original Name SEWnew.	Demaison *et al.*, 2002
M480	Expressionsplasmid der HCV 1a E1 und E2 Hüllglykoproteine.	Bartosch *et al*., 2003

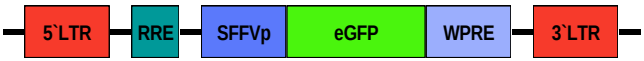
A. (M3)

B. (M56a)

C. (M57)

D. (M334)

E. (M420)



F. (M480)

Abb. 6:
Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren

Ψ(psi) charakterisiert die Signalsequenz für die Verpackung onkoretroviraler bzw. lentiviraler RNA in

Viruspartikel. LTR-Sequenzen (L*ong Terminal Repeats*) flankieren die bestimmten Verpackungs- bzw. Reporter-Gene. An drei Konstrukte grenzt ein CMV (humane Cytomegalie Virus) -Promotor und zwei Konstrukte werden von einer Poly (A)-Signalsequenz begrenzt. Zur Förderung des Levels der Genexpression enthält der Vektor M429 SFFVp (*Spleen Focus Forming Virus*) und WPRE (*Woodchuck-hepatitis-virus Posttranscriptional Regulatory Element*). Den Sequenzen zur Expression der Hüllproteine in M480 ist eine IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) vorgeschaltet. **A:** M3, dies ist der Hilfsvektor zur Herstellung von VSV-G (G = Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus). **B:** M56a, enthält das Markergen GFP. **C:** M57, dient als Hilfsvektor für die Herstellung von Gag und Pol, bei der onkoretroviralen (auf MLV = Murines Leukämievirus basierend) Verpackung. **D:** M334, dient als Hilfsvektor für die Herstellung von Gag, pro und ol bei der lentiviralen Verpackung. **E:** M420, enthält als Insert das Markergen GFP; eGFP HIV SIN LTR (SIN= *Self-Inactivating Transfer*). **F:** M480, ist der Expressionsvektor zur Herstellung der HCV E1 und E2 Hüllproteine.

3.1.6. Filtersysteme

Tab. 6:

Verwendete Filtersysteme

Filter	Hersteller
Millex-HA MCE 0,45 µm-Filter	Millipore (Eschborn)
Millex-GV 0,22 µm Filter	Millipore (Eschborn)

3.1.7. Zelllinien

Tab. 7:

Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz u./o. ATCC-/DSMZ-Nummer	Medium
293T	Humane embryonale Nieren-epithelzellen mit dem inserierten T Antigen von SV40	Numa *et al.*, 1995; ATCC-CRL 11268	DMEM-Standard
Huh-7	Humane Leberkarzinomzellen	Nakabayashi *et al.*, 1982	DMEM-Standard
SEM	humane Leukämie-Pre-B Zelle	DSMZ-ACC 546vc	RPMI-Standard
RAJI	humane Burkitt-Lymphom Zellen	ATCC-CCL 86	RPMI-Standard
Namalwa	humane Burkitt-Lymphom Zellen	ATCC-CRL 1432	RPMI-Standard
Nalm6	humane Leukämie-Pre-B Zelle aus peripherem Blut	DSMZ-ACC 128	RPMI-Standard
BV173	humane Leukämie-Pre-B Zelle aus peripherem Blut	Pegoraro *et al.*, 1983; DSMZ-ACC 20	RPMI-Standard

3.1.8. In der Zellkultur verwendete Nährmedien, Lösungen, Zusätze und Puffer

Tab. 8:

Verwendete Nährmedien, Lösungen, Zusätze und Puffer in der Zellkultur

Name	Hersteller
DMEM-Standard (*Dulbecco`s Modified Eagle Medium*)	BioWhittaker/Cambrex; Verviers, Belgien (BW12-614F)
RPMI-Standard 1640 Medium (*Roswell Park Memorial Institute*)	BioWhittaker/Cambrex; Verviers, Belgien (BW12-167F)
BioWhittaker x-Vivo-Standard Medium	Lonza Walkersville (04-743Q)
Dulbeccos`s PBS (Phosphat gepuffertes Kochsalz, DPBS)	Sigma-Aldrich; Deisenhofen (D5652)
Hank`s Balanced Salt Solution	Sigma-Aldrich; Deisenhofen (H9394)
Fötales Kälberserum (FKS)	PAN BioTech GmbH; Aidenbach
Retronectin	Takara, Japan (T100A)
HEPES-Puffer	Bestandteil des *Calcium phosphate transfection kit* von Sigma-Aldrich; Deisenhofen

Polybrene

Unter diesem Namen ist Hexadimethrinbromid (Sigma Prod. Nr. H9268) ebenfalls bekannt. Es handelt sich um ein Polykation, welches hauptsächlich bei der Transfektion von Säugetierzellen eingesetzt wird, da es die Transfektionseffizienz signifikant erhöht (Sigma Material Safety Data Sheet).

Die pulvrige Substanz wurde zuerst in 9 % NaCl, in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst, steril filtriert und dann für den weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert.

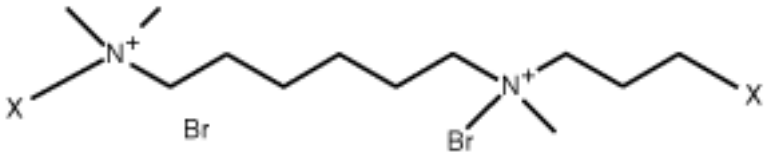


Abb. 7:

Chemische Strukturformel von "Polybrene"

aus Sigma-Aldrich/Produktinformation

3.1.9. Geräte

Tab. 9:

Verwendete Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Brutschrank Cytoperm für die Zellkultur	Heraeus, Hanau
Casy-Cellcounter	Schärfe-System, Reutlingen
Durchflusszytometer: FACSCalibur & Software CellQuestPro	BD, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Hycor Biomedicals, Kassel
DNA-Elektrophoreseapparatur	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Heizblock	Techne England
Kühlzentrifuge Beckman Avanti J20	Beckman, München
Zentrifugenrotor Beckman JA 25.50 Rotor	Beckman, München
Mikroskop	Leica, Bensheim
Rührer RCT Basic	IKA, Staufen
Schüttler TH25	Edmund Bühler, Tübingen
Tischzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge Beckman L8-80M	Beckman, München
Ultrazentrifugenrotoren SW 28 und Sw 32 Ti	Beckman, München

UV-Transilluminator GelDoc 2000	BioRad, München
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel

3.1.10. Patientenseren

Die Angaben über die Viruslast, die Antikörpertiter und den HCV-Genotyp wurden durch das Institut für Medizinische Virologie der Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinik (Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Sie wurden im Rahmen der Therapieüberwachung der Patienten in der virologischen Routinediagnostik, gemäß Herstellerangaben, im Labor ermittelt.

Patientenseren werden üblicherweise in der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Virologie der Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinik, (Frankfurt am Main) mittels ELISA auf anti-HCV Antikörper getestet, um eine bislang nicht bekannte HCV-Infektion nachzuweisen. Ein Immunoblot wird in der Regel nur durchgeführt um das Ergebnis zu bestätigen. Aus diesem Grund gibt es von den meisten der verwendeten Seren auch keine weiteren (oder Verlaufs-) HCV Antikörper-Untersuchungen. Eine aktive Infektion wird durch den

HCV-RNA Nachweis mittels PCR bestätigt. Die qualitativen Antikörperuntersuchungen wurden teilweise, da sie über einen großen Zeitraum entnommen wurden, mit verschiedenen Tests (s. unten) durchgeführt und daher sind die aufgeführten Werte nicht miteinander vergleichbar. Sie haben keine quantitative Aussagekraft und können nur als Richtwerte fungieren. Im Verlauf der Therapie wird routinemäßig nur die Viruslast im Plasma oder Serum bestimmt, vor Therapiebeginn zusätzlich noch der HCV-Genotyp.

Die Bestimmung der anti-HCV Antikörper (Ismail *et al*.; 2004) erfolgte mit dem Vitros anti-HCV ELISA Test (Ortho Clinical Diagnostics, Amersham, Bucks, UK), dem AxSYM anti-HCV 3.0 (Abbott, Delkenheim) und dem Line Immunoassay (Immunoblot) (Maertens *et al*.; 1998), INNO-LIATA HCV Score (Innogenetics, Gent, Belgien), der Nachweis der HCV RNA (Berger *et al*.; 2009) erfolgte mit dem Cobas HCV Monitor Test (Roche Diagnostics, Basel). Die HCV-Genotypisierung (Stuyver *et al*.; 1993) wurde mit den PCR Amplifikaten des Cobas Monitor, mit dem Versant HCV Genotypisierungs Test (Inno-LIPA, damals Bayer, Leverkusen) durchgeführt.

Die Dengue Antikörper Daten wurden mit dem DENV IgM Test von Focus Diagnostics (Cypress, CA, USA) ermittelt. Bei dem FSME Test handelt es sich um den Enzygnost anti-FSME IgG von Dade Behring (jetzt Siemens Healthcare, Eschborn).

Diese Untersuchungen erfolgten im Rahmen der Routinediagnostik im Institut für Medizinische Virologie der Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinik (Frankfurt am Main).

Als Negativkontrolle wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit kommerziell erhältliches humanes, HCV negatives AB-Serum (LOT.: 01100424; Bio Whittaker, Maryland) verwendet. Dieses war steril filtriert.

Zur Virusinaktivierung wurden alle verwendeten Patientenseren bei 56°C für eine halbe Stunde hitzeinaktiviert.

3.1.10.1. Anti-HCV negative Kontrollseren

Untersucht wurde die Neutralisation von HCVpp durch zehn anti-HCV negativ getesteten Patientenseren. Sie wurden als zusätzliche Kontrollen zu dem AB-Serum eingesetzt, um den Neutralisationstest zu optimieren und mögliche

Fehlerquellen auszuschließen. Diese anti-HCV negativ getesteten Patientenseren stammen aus der Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Virologie. Die dort durchgeführten Ergebnisse des Vitros anti-HCV ELISA Tests (s. 3.1.10.) sind unter einem Wert von 1,0 S/CO (*sample/cut-off*) als negativ einzustufen.

3.1.10.2. Patientenmaterial zur Untersuchung der Kreuzneutralisation der HCVpp

Zur Untersuchung der Kreuzneutralisation der HCVpp, die dem HCV-Genotyp 1a entsprechen, wurden anti-HCV positive Patientenseren von insgesamt acht Patienten verwendet. Diese sind mit einem nicht HCV-Genotyp 1a entsprechenden HCV-Genotyp infiziert. Fünf dieser Patientenseren enthalten HCV-Genotyp 3a, zwei HCV-Genotyp 4 und eines HCV-Genotyp 2a/c.

3.1.10.3. Untersuchung zur Kreuzneutralisation der HCVpp durch Seren von Patienten mit einer positiven Denguevirusserologie, mit zusätzlich bekanntem FSME Serostatus

In diesen Neutralisationsversuchen wurden 16 Patientenseren, in denen Antikörper gegen andere Flaviviren (Dengue Viren und FSME Viren) nachweisbar sind, eingesetzt.

3.1.10.4. Untersuchung der HCVpp-Neutralisation mit Patientenmaterial von LTNP (Long Time Non Progressors) HIV-Infizierten

Das Material für die HCVpp-Neutralisation stammt von acht Patienten die eine HCV/HIV (humane immundefizienz Virus) Koinfektion haben. Aufgrund ihrer immunologischen Situation im Verlauf der Infektion und im Rahmen der Therapieüberwachung wurde sie, bezüglich der HIV-Infektion, als LTNP eingestuft.

Geschätzte 2-10 % der HIV-positiven Patienten werden als LTNP angesehen (Vento *et al*.; 2004).

Laut Definition bleiben bei diesen Patienten Parameter des Immunsystems (CD4+ T-Helferzellen > 500 Zellen/µl in einem Zeitraum der länger als zehn Jahre andauert) auch ohne antiretrovirale Therapie stabil. Das Fortschreiten der Erkrankung findet bei den LTNP nicht oder nur sehr langsam statt (Vento *et al*.; 2004).

Diese Patientenseren und die dazu gehörigen Informationen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Ursula Dietrich/Georg-Speyer-Haus (Chemotherapeutisches Forschungsinstitut/Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt.

3.1.10.5. Patientenmaterial mit schwach positiven Werten im anti-HCV Screening ELISA

Es wurden zehn Patientenseren, mit zumeist relativ schwach reaktiven HCV Screening ELISA Resultaten (s. 3.1.10.), für diesen Versuch verwendet. Diese Ergebnisse ließen sich im zusätzlich durchgeführten rekombinanten Immunoblot (INNO-LIA^{TA} HCV Score) als „nicht eindeutig“ bestätigen (nur eine deutlich reaktive Proteinbande statt der geforderten mindestens zwei). In dem INNO-LIA^{TA} HCV Score

Test werden rekombinante HCV-Proteine (*Core*, E2, NS3, NS4 und NS5), die auf einer Nylon-Membran fixiert sind, als Antigene eingesetzt. Die ebenfalls durchgeführte PCR (s. 3.1.10, der Cobas HCV Monitor Test) zum Nachweis der HCV RNA ergab, bis auf das Serum des Patienten 4s, ein negatives Ergebnis.

3.1.10.6. Seren der Patientengruppen mit unterschiedlichem Therapieausgang: „Responder, Non Responder und Relapse“

Es handelte sich um archivierte Serumproben von Patienten des Zentrums der Inneren Medizin, Medizinische Klinik II der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Frankfurt am Main) aus den Jahren 2001-2004, die bei –20°C gelagert wurden. Sie wurden vom Institut für Medizinische Virologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Die Proben einer klinischen Studie stammten von Patienten die sich einer HCV-Therapie unterzogen haben und mit unterschiedlichen HCV-Genotypen infiziert waren. Sie wurden zu bekannten, definierten Zeitpunkten entnommen. Entsprechende Daten wurden mir von PD Dr. med. Gerlinde Teuber,

Zentrum der Inneren Medizin II, Gastroenterologie, überlassen.

Die Fragestellung war, ob die gewonnenen Daten als prognostischer Marker über den Erfolg der HCV-Therapie eingesetzt werden könnten.

Die Proben wurden so ausgewählt, dass das Patientenkollektiv aus drei Gruppen therapierter, chronisch mit HCV infizierten Patienten bestand und untersucht werden konnte, ob der unterschiedliche Therapieausgang im Zusammenhang mit der gemessenen neutralisierenden Antikörperantwort zu sehen ist. Diese Gruppen wurden eingeteilt in: „*Responder*“ ("andauerndes Ansprechen auf die Therapie"), „*Non Responder*“ ("Kein Ansprechen auf die Therapie") und „*Relapse*“ ("Rezidiv nach initialem Ansprechen auf die Therapie"). In der Gruppe „*Responder*“ wurden Seren von vier Patienten untersucht, in der Gruppe „*Non Responder*“ Seren von zwei und in der Gruppe „*Relapse*“ Seren von drei Patienten. Der genaue Zeitpunkt der HCV-Infektion ist unbekannt.

3.2. Methoden

3.2.1. Die Herstellung der Plasmide

Plasmid-Minipräparation

Diese Methode diente der schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die daraus gewonnene Plasmid-DNA wurde dann zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

Die Bakterien wurden von einer Agarplatte in 2 ml LB-Medium überimpft und für 12-16 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert (OD_{600} von etwa 0,6). Die Sedimentation erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Heraeus-Tischzentrifuge (5 min, 12.000 U/min). Das so gewonnene Pellet wurde anschließend in 250 µl kaltem Zell-Suspensions-Puffer P1 (s. Tab. 3) resuspendiert. Die Bakterienzellen lysierten durch Zugabe von 250 µl SDS (*sodium dodecyl sulfate)*-haltigem Zell-Lysis-Puffer P2 (s. Tabl. 3) für 5 min bei RT (Raumtemperatur). Zur Neutralisation wurde die lysierte Kultur mit 250 µl Neutralisations-Puffer P3 (s. Tabl. 3) versetzt, wobei Proteine und überschüssiges SDS als Kaliumdodecylsulfat ausfielen. Das Lysat

wurde durch eine anschließende Zentrifugation (10 min, 12.000 U/min) in einer Tischzentrifuge (Megafuge 1.0R; Heraeus, Hanau) abzentrifugiert. Der Überstand konnte so in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,1 Vol.% Natriumacetat und 0,7 Vol.% Isopropanol 30 min bei 12.000 rpm und RT ausgefällt werden. Das erhaltene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und anschließend in 30 µl sterilem *aqua bidest.* resuspendiert.

Das verwendete JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit von Genomed ergab zumeist eine DNA Konzentration von je 10-20 µg pro Mini-Präparation (d. h. aus 1 ml Bakterienkultur wurden etwa 7 µg Plasmid-DNA hergestellt).

Restriktionsenzymanalyse (REA)

Um die erfolgte Klonierung nachzuweisen und ob der gewünschte DNA-Bereich hergestellt werden konnte, wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonucleasen gespalten. Mithilfe dieser Enzyme lassen sich die Plasmide in Fragmente trennen. Sie erkennen spezifische Basensequenzen innerhalb des Plasmids und schneiden dort die

doppelsträngige DNA. Es gibt Restriktionsendonucleasen, die glatte Enden (*blunt ends*) produzieren und andere, die überhängende Enden (*sticky ends*) hinterlassen. Für analytische Restriktionen wurde 1 µg Plasmid-DNA mit der entsprechenden Enzymmenge für ein bis zwei Stunden bei der für das jeweilige Enzym (*Bam*H1) optimalen Temperatur inkubiert. Die Arbeit und Auswahl des geeigneten Puffers wurde nach den Empfehlungen und dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Plasmid-Maxipräparation

Die DNA-Präparation der lysierten Bakteriensuspension zur Gewinnung der Plasmide wurde mit dem Nucleo Bond PC 500 Maxi Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei lagen die DNA-Ausbeuten bei 500-1.000 µg.

Agarosegelelektrophorese

Die Auswertung der DNA-Präparation geschah mittels Gelelektrophorese. Dies ist eine analytische Methode zur DNA Trennung die unter Einfluss eines elektrischen Feldes vorgenommen wird. Hierbei

wandert die Mischung der zu trennenden Plasmid-DNA durch ein Agarose-Gel (1 %), welches sich in einer ionischen TAE Gebrauchspufferlösung (s. Tab. 3) befindet. Zur Kontrolle werden die Plasmid-DNA Fragmente mit einem Farbstoff (Ethidiumbromid) angefärbt und dann unter UV-Licht bewertet.

Die Gelelektrophorese wurde in horizontalen 1 % Agarose-Gelen, mit TAE (s. Tab. 3) als Laufpuffer, durchgeführt. Es wurde 1/1.000 Volumen Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und die Flüssigkeit in die Gelkammer gegossen. Nach Erstarrung des Agarose-Gels konnte der Geltaschenformer entfernt und das Gel in eine, mit TAE gefüllte, Elektrophoresekammer gelegt werden. Den Proben wurde 6X DNA-Ladepuffer hinzugefügt und diese dann in die Geltaschen pipettiert. Jede Geltasche erhielt 30 µl DNA-Lösung. Als Größenmarker kamen 0.5 µg 100-Basenpaarmarker oder 1-kb-Marker (New England Biolabs, Schwalbach) zum Einsatz. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 Volt für 15 Minuten. Die DNA-Fragmente konnten mit UV-Licht unter Verwendung eines Transilluminators sichtbar gemacht, fotografiert, dokumentiert und bewertet werden.

Lagerung der Plasmid-DNA-Lösungen

Die Plasmid-DNA-Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Verwendung fand das Puffersystem der Firma New England Biolabs, das auf den Angaben von Sambrook *et al*. (1989) basiert.

3.2.2. Zellkulturmethoden

Kultivierung und Kryo-Konservierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator mit 7 % CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Zum Einsatz als Standardmedium für adhärente Zellen kam DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium), dem 10 % fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin hinzugefügt wurden. In einem Versuch wurde das DMEM durch x-Vivo Nährmedium, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin und 5-8 % A/B Serum ersetzt. Die Suspensionszelllinien wuchsen in RPMI Standard Medium (Roswell Park Memorial Institute, RPMI 1640), 10 % fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin.

Die adhärenten Zellen wurden in DMEM

Standardmedium kultiviert und in regelmäßigen Zeitabständen, in Korrelation zur Wachstumsdichte, in einem Verhältnis von 1:6 (Huh-7 Zellen) und 1:10 (293T Zellen) gezüchtet. Dazu musste das Medium entfernt und der Zellrasen einmal mit PBS (Phosphat gepuffertes Kochsalz; Zusammensetzung siehe DPBS Sigma-Aldrich Produktinformation) gewaschen werden. Danach wurden die Zellen solange mit Trypsin/EDTA (0,25 % Trypsin/1 mM EDTA) behandelt, bis sie sich von der Kulturschale lösten. Anschließend konnten die Zellen resuspendiert und ein Teil in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt werden.

Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte nach Kryokonservierung in FKS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Zellen geschah in einem Wasserbad bei 37°C. Nachfolgend wurden sie in 5-10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium aufgenommen und zentrifugiert, um das für Zellen toxische DMSO zu entfernen. Die adhärenten Zellen konnten anschließend in eine neue Kulturflasche überführt werden.

Vitalfärbung mit Trypan-Blau und Zellzählung

Für die Bestimmung der Zellzahl der Huh-7 Zellen wurden diese mit 0,004 % Trypan-Blau (Invitrogen, Karlsruhe; 4x verdünnt in PBS) gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer (Hycor Biomedicals, Kassel) ausgezählt.

Dafür wurde von den adhärenten Zellen das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und dann Tprypsin/EDTA hinzugegeben, bis die Zellen sich ablösten (s. Kultivierung von Zelllinien). Die Zellen wurden mit Hilfe von 100 µl DMEM abgespült und es wurden 50 µl Trypan-Blau in jede Vertiefung gegeben. Dies wurde für zwei Minuten inkubiert, bevor die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurden.

Mittels der Färbemethode „Vitalfärbung“ mit Trypan-Blau wurden die Zellen auf ihre Lebensfähigkeit getestet. Der Farbstoff kann nicht durch die intakte Zellmembran dringen und wird daher nur von toten Zellen aufgenommen, die sich dadurch anfärben und im Lichtmikroskop deutlich sichtbar werden. So ist eine Kontrolle über den Zustand und die Bestimmung der Anzahl der kultivierten Zellen möglich.

Zur Messung der 293T Zellzahl fand der automatische Zellzähler Casy-Cellcounter

Verwendung; es wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

3.2.3. Transiente Ko-Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren

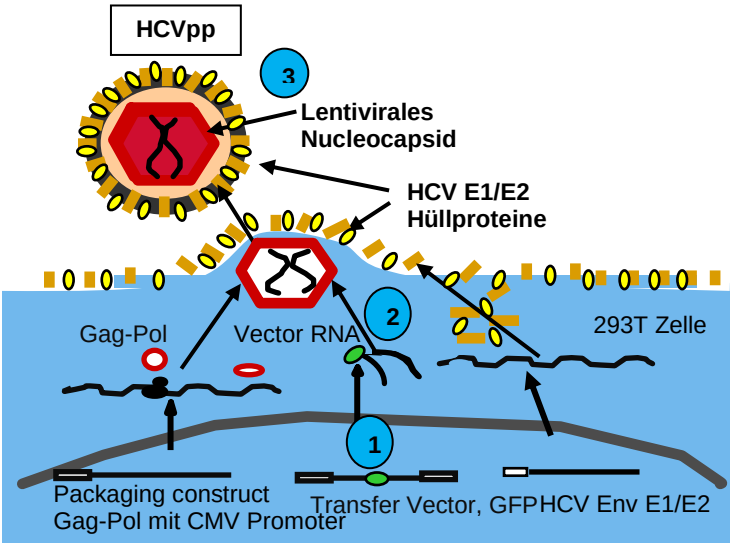


Abb. 8:
Schematische Darstellung der Verpackung eines HCVpp
Modifiziert nach Voisset *et al*.; 2004

1. In die 293T Produktionszelle werden drei Vektor RNA Segmente, mittels transienter Ko-Transfektion, verbracht. **2.** Die Vektor RNA Segmente (eine Verpackungskomponente, die die Gag-Pol Gene enthält und das retrovirale *Core*-Strukturprotein und Replikationsenzyme codiert; einen Transfer Vektor mit GFP-Markergen, welcher die viralen LTRs enthält

und über die Signale zur Transkription und Integration des viralen Genoms verfügt und einen HCV-Hüllglykoprotein codierenden Expressionsvektor) werden mithilfe der Verpackungszellmaschinerie, welche virale Struktur- und enzymatische Proteine herstellt, zu fertigen Partikeln zusammengefügt. **3.** Fertige HCVpp werden von der 293T Zelle freigesetzt und können mit dem Zellkulturüberstand geerntet werden.

Infektiöse HCVpp wurden mithilfe von einem lentiviralen/onkoretroviralen Vektor, einem Markergen und HCV 1a E1 und E2 Hüllproteinen durch transiente Ko-Transfektion mit Calciumphosphat in 293T Produktionszellen hergestellt.

Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine hohe Transfizierbarkeit und durch ihre besondere Produktivität hoher Partikelzahlen infektöser Retroviren aus (siehe ATCC Katalog CRL-11268). Bei der Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen wird mit der Methode durch Calciumphosphat-Kopräzipitation die Vektor-DNA über Salzkomplexe an die Zellmembran gebunden und vermutlich durch Endocytose aufgenommen (Graham & van der Eb; 1973). Der Vektor M57 dient als Helferplasmid zur Expression von Gag-Pol Proteinen und für die reverse Transkription der Vektoren nach der Transfektion. Dieser Vektor stellt die Verpackungskomponente. Der Transfervektor M56a enthält als Insert das Markergen

GFP und der Expressionsvektor M480 codiert für die Hüllproteine des HCV, welche für den Zelltropismus und das Eindringen des Partikels in die Wirtszelle verantwortlich sind. Fertige HCVpp werden von der 293T-Verpackungszelle freigesetzt (s. Abb. 8).

Einen Tag vor der Transfektion wurden $6x10^6$ 293T-Zellen in einer 10 cm-Zellkulturschale ausplattiert und in Standard-DMEM-Medium unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Am darauf folgenden Tag, unmittelbar vor der Transfektion, wurde das Medium durch 2 mM Glutamin/50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin/DMEM, ohne FKS ersetzt. Unter Verwendung des Calciumphosphat Transfektions Kits (Sigma, Deisenhofen) wurden 7,5 µg Transfer-Vektor mit dem Markergen für GFP (M 56a), 12,5 µg des Gag-Pol-Expressionsplasmids (M 57, onkoretroviraler Vektor) sowie 2 µg des HCV-Env Plasmids (M480) oder des VSV-G Hilfsvektors (M3) in ein Eppendorfgefäß überführt und mit Wasser (Bestandteil des Kits) auf 450 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 µl $CaCl_2$-Lösung (2.5 M) wurde die Mischung, unter ständigem Vortexen, tröpfchenweise dem 500 µl HEPES-Puffer (in *aqua dest*. 10 g/l HEPES; 16 g/l NaCl; 0,74 g/l KCl; 0,27 g/l $Na_2HPO_4.2H_2O$; 2,0 g/l Dextrose) hinzugegeben. Das

Gemisch inkubierte für 20 Minuten bei Raumtemperatur und wurde anschließend tropfenweise auf die 293T-Zellen gegeben. Die Zellen wurden für sechs bis acht Stunden mit der DNA-Mischung inkubiert und anschließend konnte das Medium durch 10 ml frisches DMEM ersetzt werden. Die HCVpp- oder VSVpp (enthalten VSV-G Glykoprotein)-haltigen Zellkulturüberstände wurden, nach positiver Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop, nach 24, 36 und 48 Stunden abgenommen und gegen 6 ml frisches Medium ausgetauscht. Zur Reinigung wurden die gesammelten Überstände, unter Zuhilfenahme einer sterilen Einmalspritze (5 ml, 10 ml und 20 ml) der Firma Codan, durch einen 0.45 μm-Filter steril filtriert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Aufbereitung durch Ultrazentrifugation fand am folgenden Tag statt.

Konzentrierung der Überstände durch Ultrazentrifugation

Hierzu wurde 6x32 ml des Zellkulturüberstandes, der nach Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop den positiv-transfizierten, produktiven 293T Zellen abgenommen wurde, in ein steriles Beckman

Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml 20 % Sucrose unterschichtet. Der Vorgang wurde mit einem SW 28 oder SW 32 Ti Rotor (Beckman) in einer Beckman L8-80M Ultrazentrifuge, bei 25.000 U/min und 4°C für zwei ½ Stunden durchgeführt. Das zurückgebliebene Pellet wurde, nach dem vorsichtigen Abnehmen des Überstandes, mit 100 µl PBS, über Nacht auf einer Wippe bei 4°C gelöst. Das Konzentrat wurde in Eppendorfgefäße alliquotiert und bei –80°C gelagert bis es für die Versuche zum Einsatz kam.

3.2.4. Transiente Ko-Transfektion zur Herstellung HCV-Env und VSV-G pseudotypisierter lentiviraler Vektoren

Zur Herstellung von rekombinanten HCV-Env pseudotypisierten, lentiviralen Vektoren wurden einen Tag vor der Transfektion $6x10^6$ 293T-Zellen in einer 10 cm-Zellkulturschale ausplattiert und unter Standardbedingungen kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurde kurz vor der Transfektion das Medium entfernt und 10 ml 2 mM Glutamin/DMEM ohne FKS hinzugefügt. Die Transfektion erfolgte mithilfe des Calciumphosphat Transfektions Kits (Sigma, Deisenhofen). 12,5 µg des Verpackungskonstruktes

für die Herstellung von Gag, pro und Pol für die lentivirale Verpackung (M334), 7,5 µg des lentiviralen Transfervektors (M420) sowie 2 µg des HCV-Hüllprotein Expressionsplasmids (M480) oder des VSV-G Hilfsvektors (M3) wurden vermischt und mit Wasser auf 450 µl aufgefüllt. Zur Präzipitation wurde das DNA-Gemisch, nach Zugabe von 50 µl 2,5 M $CaCl_2$-Lösung, tropfenweise in 2X HEPES-Puffer, unter Schütteln, hineingegeben. Nach 20-minütiger Inkubation der DNA-Präzipitationsmischung wurde die DNA tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 6-8 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 10 ml FKS-haltiges DMEM ersetzt. Nach 24, 36 und 48 Stunden konnten die Zellkulturüberstände mithilfe von sterilen Einmalspritzen (Codan) entnommen, steril filtriert, vereinigt und bis zur weiteren Verwendung am folgenden Tag bei 4°C aufbewahrt werden. Dann wurden sie durch Ultrazentrifugation, ebenso wie die retroviral transfizierten Zellkulturüberstände, weiter aufbereitet. Das gewonnene Konzentrat konnte nun in Eppendorfgefäße alliquotiert und bei –80°C bis zur weiteren Nutzung gelagert werden.

3.2.5. Transduktion von Zelllinien mit lentiviralen und retroviralen Überständen

Mithilfe der Transduktion wird gezielt fremdes, genetisches Material durch Vektoren (als „Genfähren“) in Zielzellen eingeschleust.

Adhärente Zellen

Auf eine 48 Lochplatte wurden in je eine Vertiefung $2x10^4$ Huh-7 Zellen in 1 ml DMEM gegeben und über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium kurz vor der Transduktion entfernt um daraufhin durch 2 µl konzentrierten, aufgetauten HCV- oder VSV-pseudopartikelhaltigen Zellkulturüberstand, 1 µl Polybrene (8 mg/ml) der Firma Sigma und 247 µl DMEM, ersetzt zu werden. Daraufhin wurde die Platte für eine Stunde bei 2.000 U/min und 31°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der HCV-pseudopartikelhaltige Überstand aus den Vertiefungen vorsichtig abgenommen und durch 1 ml DMEM ausgetauscht. Die Zellkulturplatte wurde anschließend für weitere 2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Erfolg der Transduktion konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Nach der Kultivierung wurden die Zellen schließlich in FACS-Röhrchen überführt. Dafür

musste das Medium aus jeder einzelnen Vertiefung vorsichtig abgenommen werden und etwas PBS - zum Waschen der Zellen - hinzugefügt werden. Dieses wurde daraufhin gleich wieder entfernt und der Zellrasen wurde mit einem Tropfen Trypsin/EDTA (0,25 % Trypsin/1 mM EDTA) behandelt. Nach kurzer Einwirkzeit konnten die Zellen durch leichtes Klopfen auf den Plattenboden von der Unterfläche abgelöst werden. Diese wurden dann in 300 µl FACS-Puffer (PBS mit 3 % fötalem Kälberserum) aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Im FACS-Gerät wurde dann das Markergen GFP detektiert und der Prozentsatz infizierter Zellen bestimmt.

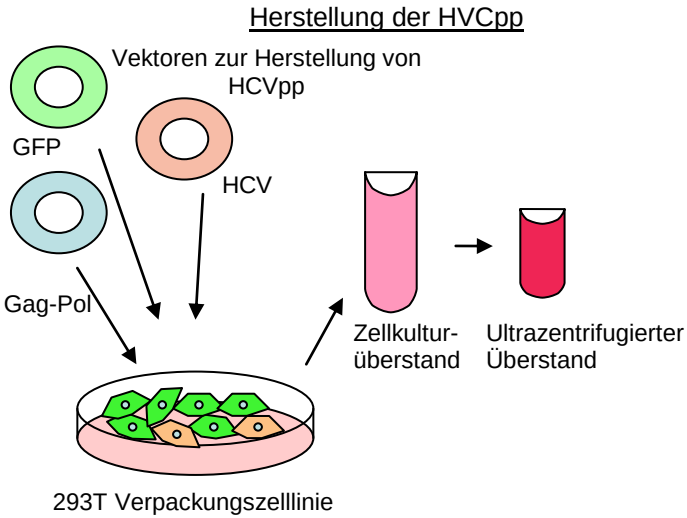


Abb. 9:
Schematische Darstellung der Herstellung von HCV-Pseudopartikeln

Suspensions Zellen

Bei den Suspensionszellen handelt es sich um die gängigen Zelllinien BV173, Nalm-6, Namalwa, RAJI und SEM.

Für die Transduktion der Suspensionszellen konnten Kulturplatten mit 24-Vertiefungen genutzt werden. Einen Tag vor dem Versuch wurden diese mit Retronectin (Takara, Japan) behandelt und beschichtet. Retronectin ist ein rekombinantes Fibronektinfragment CH-296, das durch

Kolokalisierung von Zellen und Viruspartikeln den Gentransfer verstärkt (Hanenberg *et al*.; 1996).
Hierzu war es nötig, gefriergetrocknetes Retronectin Pulver in 1 ml Zellkulturwasser zu lösen und dann durch einen 0,22 µm Millex-GV Filter (Millipore) zu filtrieren. Dieses Filtrat wurde im nächsten Schritt mit 9 ml filtriertem Zellkulturwasser verdünnt, 400 µl dieser Lösung nun in je eine Vertiefung gegeben und die Kulturplatten bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Retronectin-Lösung aus den Vertiefungen genommen und die Reaktion mit 400 µl sterilem PBS und 2 % BSA pro Vertiefung für 30 Minuten bei Raumtemperatur gestoppt. Die PBS/BSA Lösung musste dann aus den Vertiefungen entfernt und diese mit 400 µl *Hank`s Balanced Salt Solution* (HBSS; Sigma) gewaschen werden. Nach der Entfernung der Lösung war die Kulturplatte fertig mit Retronectin beschichtet und konnte für den weiteren Versuch verwendet werden.

Erste Transduktion:

Der HCV-Pseudotypen-Überstand musste in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und dann 200 µl davon in jede Vertiefung gegeben werden. Hierbei wurde HCVpp- und VSVpp-haltiger Überstand verwendet;

letzterer wurde als positive Kontrolle mitgeführt. Die Kulturplatten wurden nun 45 Minuten bei 4°C und mit 2.400 U/min zentrifugiert, anschließend der Überstand wieder entfernt und die beiden letzten Schritte noch dreimal wiederholt. Somit waren nach Abschluss der Transduktion insgesamt 1 ml Pseudotypen-Überstand in jede Vertiefung gegeben worden. Nun wurden die Suspensionszellen aus den Kulturflaschen abgenommen und mit dem Casy-Cellcounter gezählt. Dazu musste eine Menge von $5x10^5$ Zellen in Kulturmedium aufgenommen werden. Anschließend wurde 1 ml dieses Zellgemisches in je eine Vertiefung der vorher mit Retronectin preparierten Kulturplatten gegeben. Die so behandelten Kulturplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Zweite Transduktion:

Eine zweite, mit Retronectin beschichtete, Kulturplatte wurde mit HCV (VSV) Pseudotypen-Überstand beladen; hierfür musste 200 µl Überstand und 1,5 µl Polybrene (8 mg/ml) in je eine Vertiefung gegeben und die Platte 45 Minuten, bei 4°C und mit 2.400 U/min, zentrifugiert werden. Diese Arbeitsschritte wurden insgesamt viermal wiederholt. Der nächste

Arbeitsschritt bestand aus der vorsichtigen Überführung der vorher transduzierten Suspensionszellen in die neu beschichtete Kulturplatte. Die Vertiefungen der alten Kulturplatte wurden mit 500 µl frischem Medium und IL-2 (200 U/ml) gewaschen und diese Lösung in die Vertiefungen der neuen Kulturplatte gefügt, um dann zwei Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert zu werden. So konnte die Lösung mit dem FACS-Gerät ausgewertet werden. Für die Auswertung mussten die Zellen mit dem Medium resuspendiert und für acht Minuten bei 37°C und 1500 U/min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und anschließend in FACS-Röhrchen überführt. Im FACS-Gerät wurden dann die infizierten Zellen über das Markergen GFP detektiert und so der Prozentsatz der positiv transduzierten Zellen bestimmt.

3.2.6. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der gleichzeitigen Messung verschiedener natürlicher Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel durch Fluoreszenz- oder Lumineszenzerscheinungen. Die

Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander angeordnet und einzeln, mittels eines Laserstrahls, auf ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften untersucht. Aufgrund ihrer Streulichteigenschaften können simultan Zellgröße und Granularität für mehrere tausend einzelne Zellen bestimmt werden. Durch Expression eines z. B. GFP können die Zellen mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Stärke der Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur Anzahl der vorhandenen Moleküle des fluoreszierenden Proteins. Fluoreszierende und somit positiv transduzierte Zellen und nicht fluoreszierende Zellen lassen sich so charakterisieren und zählen.

FACS-Analyse der Ziel-Zellen (Huh-7 und Suspensionszellen)

Für jede Probe mussten die Zellen aus der 48-Loch Zellkulturplatte in ein FACS-Röhrchen überführt werden. Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal vorsichtig mit PBS abgespült und mit Trypsin/EDTA behandelt. Dadurch lösten sie sich vom Untergrund der Zellkulturplatte und konnten nun in 300 µl sterilen FACS-Puffer (PBS mit 3 % fötalem Kälberserum) aufgenommen und in das FACS-

Röhrchen gegeben werden. Anschließend wurde die Untersuchung an dem FACS-Gerät durchgeführt. Gemessen wurde die Fluoreszenz von GFP in 10.000 Zellen. Die FACS-Messung und -Analyse erfolgte am Durchflusszytometer (FACS-Calibur, BD, Heidelberg) mit der Software CellQuestPro (BD, Heidelberg).

3.2.7. Neutralisationsversuche der HCV-pseudotypisierten Viren mit Patientenseren

In diesen Neutralisationsversuchen kamen verschiedene Patientenseren zum Einsatz. Es wurde die Neutralisationsfähigkeit der Seren von HCV-negativ getesteten, HCV-infizierten, HCV/HIV-koinfizierten, Dengue- und FSME-infizierten Patienten untersucht. Die hohe Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Flaviviren ist ein bekanntes Phänomen, welches in der Antikörperdiagnostik häufig zu Problemen führt (Doerr & Gerlich; 2002).
Als Negativkontrolle wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit kommerziell erhältliches humanes, HCV negatives AB-Serum mitgeführt. Als positive Kontrolle fungierte das Serum des Pat. 54. Kontrollzellen (ohne Zugabe von Serum) zur

Errechnung der infektösen Partikelzahlen wurden bei jedem Versuch mitgeführt.

Für die Neutralisationsversuche mussten insgesamt $2x10^4$ adhärente (Huh-7) Zellen in 48-Loch Zellkulturplatten ausgesät werden. Sie wurden einen Tag im Brutschrank bei 37°C kultiviert, bevor die weitere Behandlung durchgeführt werden konnte. Eine Mischung aus den Patientenseren in unterschiedlichen Verdünnungsstufen von 1:50; 1:500 und 1:5.000, aus Polybrene (8 mg/ml; 1:1.000 Verdünnung) und 2 µl der konzentrierten HCV-pseudotypisierten Viren wurde angesetzt. (Aufgrund der Vorversuche kann bei dem Einsatz dieser Volumina von infektiösen Partikelwerten von $3x10^3$ bis $3x10^4$ IE/ml ausgegangen werden). Diese Mischung wurde auf 250 µl mit Standardmedium aufgefüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie auf die Zellen gegeben werden konnte. Anschließend mussten die Platten mit den Zellen und der Serum-/HCV-Pseudotypenmischung für eine Stunde bei 31°C und 2.000 U/min zentrifugiert werden. Die Serum-/HCV-Pseudotypenmischung wurde gleich darauf abgenommen und durch frisches Standardmedium DMEM ersetzt. Die behandelten Zellen wurden zwei Tage im Brutschrank bei 37°C

kultiviert, um dann mit dem FACS Gerät ausgewertet werden zu können.

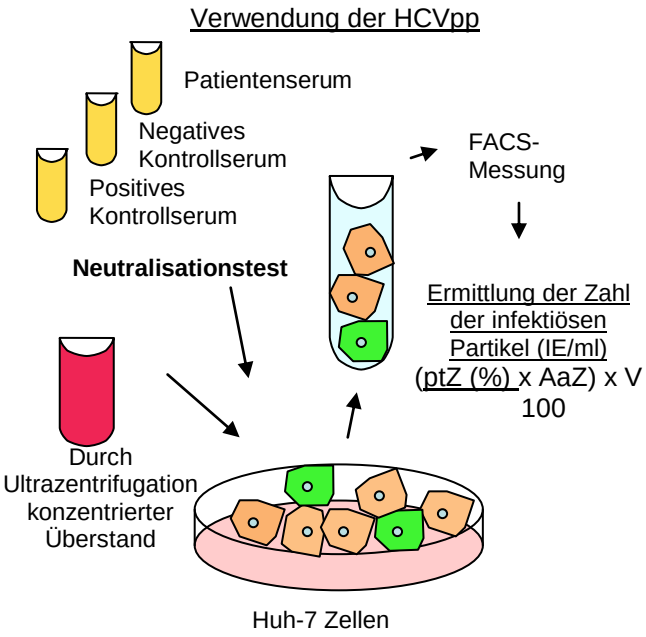


Abb. 10:
Schematische Darstellung der Verwendung von Patientenseren im HCVpp Neutralisationstest

3.2.8. Bestimmung der infektiösen Einheiten (IE)

Für die Errechnung der infektiösen Einheiten (infektiöse Partikel/ml) wurden die durch die FACS-Analyse positiv gemessenen Zellen herangezogen.

$$IE = \frac{(ptZ\ (\%) \times AaZ) \times V}{100}$$

Infektiöse Einheiten (IE = infektiöse Partikel/ml) = (positiv transduzierte Zellen [%]/100) x Anzahl der ausgesäten Zellen x Verdünnungsfaktor

3.2.9. Bestimmung der Infektiositäts-/Neutralisationswerte

Zur Ermittlung der Daten aus den Infektions- und Neutralisationsversuchen wurde zuerst das arithmetische Mittel (in %) der positiv HCVpp-infizierten Kontrollzellen ohne Serumzugabe berechnet. Dieser errechnete Wert wurde als 100 % Infektiosität festgelegt. Mithilfe dieses arithmetischen Mittels, das den weiteren Berechnungen zugrunde gelegt wurde, konnte dann die Infektiosität/Neutralisation (in %) der untersuchten

Proben ermittelt werden. Für jede Probe wurde die durch das FACS-Gerät gemessene Zahl (in %) positiv transduzierter Zellen eingesetzt. Jeder Versuch wurde jeweils immer in drei Parallelansätzen durchgeführt. Der daraus errechnete Mittelwert diente dann als Grundlage für die oben beschriebenen Berechnungen, um die Tendenz der ermittelten Daten möglichst gut zu repräsentieren. Um die Streuung der Werte darzustellen zeigen die Graphen im Ergebnisteil zudem auch die Standardabweichung dieser Parallelansätze.

Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurde ein Bewertungsschema für die Neutralisationsintensität entworfen, das sich an den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Bartosch *et al*.; 2003; Lavillette *et al*., 2005) orientiert und die Darstellung der Ergebnisse vereinfacht. Zu diesem Zweck wurde die Stärke der errechneten Neutralisation in drei Stufen eingeteilt: + = mäßige Neutralisation, diese liegt in einem Bereich von 20-40 %; ++ = gute Neutralisation, diese liegt in einem Bereich von 40-70 %; +++ = sehr gute Neutralisation, diese liegt in einem Bereich von 70-100 %. Werte, die unter einer Neutralisation von 20 % lagen, wurden als negativ gewertet. Die Neutralisationsstärke wurde anhand der mitgeführten

negativen Kontrollseren ermittelt, denn hier wurde keine Neutralisation beobachtet.

4. Ergebnisteil

Die Arbeiten wurden mit dem Ziel durchgeführt, infektiöse Pseudopartikel herzustellen, die die frühen Infektionsschritte von HCV nachahmen. Die generierten HCVpp wurden anschließend zur Etablierung eines HCV Neutralisationstests sowie zur Untersuchung des Zelltropismus der HCVpp verwendet.

Im Rahmen der Neutralisationsstudien wurden Seren von Patienten unter Therapie untersucht und die Resultate mit dem Therapieverlauf verglichen. Außerdem wurden Serumproben von HIV/HCV koinfizierten Patienten untersucht. Zur Überprüfung der Spezifität des in dieser Arbeit etablierten HCVpp Neutralisationstests wurden neben anti-HCV negativen Patientenproben auch potenziell kreuzreaktive Patientenseren und Serumproben von, mit verschiedenen HCV-Genotypen, infizierten Patienten eingesetzt. Flaviviren sind bekannt dafür, dass Seren von infizierten Patienten kreuzneutralisierende Aktivität mit anderen Flaviviren zeigen. Daher wurden auch Untersuchungen mit Seren von Patienten, die mit dem Dengue-Virus infiziert waren, vorgenommen.

Es wurden bei allen Versuchen mindestens Doppelansätze durchgeführt und Kontrollen zur Überprüfung der Ergebnisse mitgeführt. Die angegebenen Werte sind arithmetische

Mittelwerte und als Balkendiagramm mit Fehlerindikatoren, die die Standardfehler zeigen, dargestellt.

4.1. Grundlagen zur Etablierung und Optimierung des Neutralisationstests

In der Arbeit wurden infektiöse HCVpp, mithilfe eines lentiviralen/onkoretroviralen Vektors, eines Markergens und HCV 1a E1 und E2 Hüllproteinen durch transiente Ko-Transfektion von 293T Produktionszellen hergestellt. Der HCVpp-haltige Zellkulturüberstand wurde gesammelt und für die Versuche aufbereitet; wie in Abb. 9 und Abb. 10 zu sehen. Die HCVpp sollten weiterhin zur Untersuchung von Serumproben chronisch HCV-infizierter Patienten eingesetzt und auf ihre Neutralisationsfähigkeit getestet werden.

Zur Etablierung der Methodik und der HCVpp im Labor wurden zu Beginn solange Versuche durchgeführt bis eine messbare infektiöse Partikelzahl in der Höhe von 10^3 IE/ml bis 10^4 IE/ml (s. Abb. 11) vorlag. Diese Partikelmenge wurde anfänglich nicht erreicht, ist jedoch notwendig für die weitergehenden Versuche und Neutralisationsstudien, um aussagekräftige und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Im Folgenden wurde der Einfluss des verwendeten Vektors (onkoretroviraler oder lentiviraler Herkunft) sowie die Zugabe von Polybrene auf die Ausbeute ermittelt und die Anreicherung mittels Ultrazentrifugation untersucht.

4.1.1. Vergleich der onkoretroviralen mit den lentiviralen Vektoren bei der Produktion von infektiösen HCVpp

Die infektiösen Partikelzahlen nach Einsatz von onkoretroviralen (MLV) und lentiviralen (Lenti) Vektoren als Grundlage für die HCVpp, wurden verglichen, um festzustellen welcher dieser Vektoren effizientere Transduktionsergebnisse liefert. Dieser Vektor wurde dann in den Neutralisationstests verwendet.

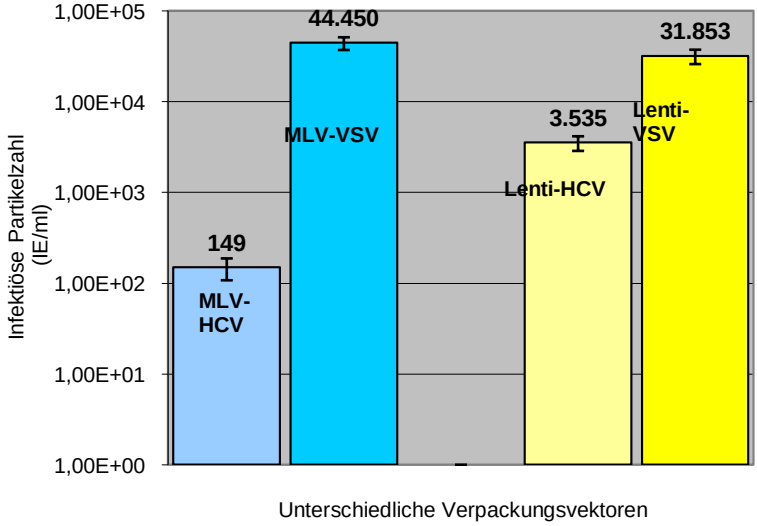


Abb. 11:
Vergleich der Transuktionseffizienz onkoretroviraler und lentiviraler Vektoren

Die Abb. 11 stellt die infektiösen Partikelanzahlen, angegeben in IE/ml (s. Kapitel 3.2.9.), unter Verwendung unterschiedlicher

Verpackungsvektoren dar, die bei einer Transduktion auf Huh-7 Zielzellen erreicht wurden. Als positive Kontrolle wurde bei den Versuchen eine Verpackung mit VSV mitgeführt; deren Ergebnis erwartungsgemäß ausfiel.

Die blau eingefärbten Balken zeigen die infektiöse Partikelanzahl der mit dem MLV Vektor verpackten Pseudotypen. Die gelben Balken zeigen die IE/ml unter Verwendung der lentiviralen Verpackungskomponente. Die Standardabweichung ist jeweils unterhalb der Werte dargestellt. Die Verpackung mit dem lentiviralen Vektor führte zu höheren Werten (3.535 IE/ml) als die mit dem onkoretroviralen (MLV) Vektor (149 IE/ml). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den Neutralisationsstudien die lentivirale Verpackungskomponente eingesetzt.

4.1.2. Die Wirkung von Polybrene auf die Transduktionseffizienz der Pseudotypen

Bei Polybrene (PB) handelt es sich um ein Polykation, welches hauptsächlich bei der Transfektion von Säugetierzellen eingesetzt wird, da es die Transfektionseffizienz signifikant erhöht (Sigma Material Safety Data Sheet).

In diesem Versuch (siehe Abb. 12) wurde 1 ml unkonzentrierter und aufgereinigter Zellkulturüberstand, der die HCVpp enthielt, eingesetzt. Für die Transduktion wurden

8 µg/ml PB (Sigma-Aldrich) gemeinsam mit dem HCVpp-haltigen Überstand auf die Huh-7 Zellen gegeben.

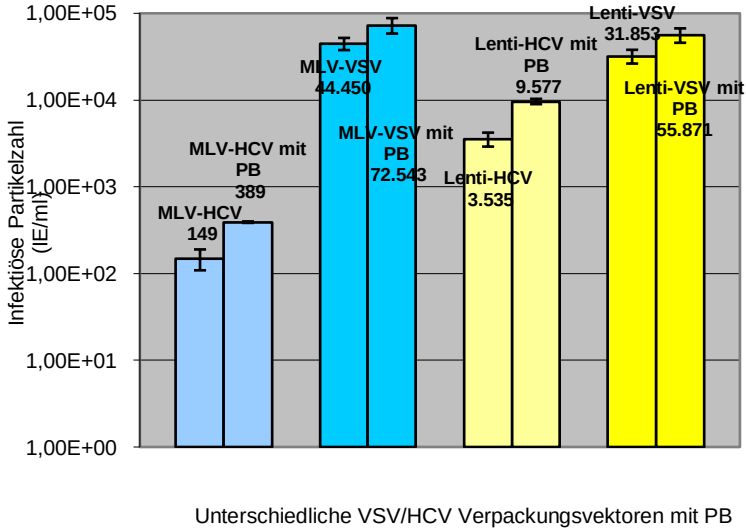


Abb. 12:
Der Einfluss von PB auf die Transduktionseffizienz verschiedener VSVpp/HCVpp in Huh-7 Zellen

Die Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen, dass durch die Verwendung von PB bei der Transduktion der Zielzellen die infektiösen Partikelzahlen der HCVpp und der VSVpp erhöht werden können. Die Werte der MLV-basierten-HCVpp konnten von 149 IE/ml auf 389 IE/ml und die der lentiviralen HCVpp Verpackung konnten von 3.535 IE/ml auf 9.577 IE/ml erhöht werden. Durch den Einsatz von PB können bei der MLV- und

lentiviralen Verpackungskomponente die infektiösen Partikelzahlen erhöht werden.

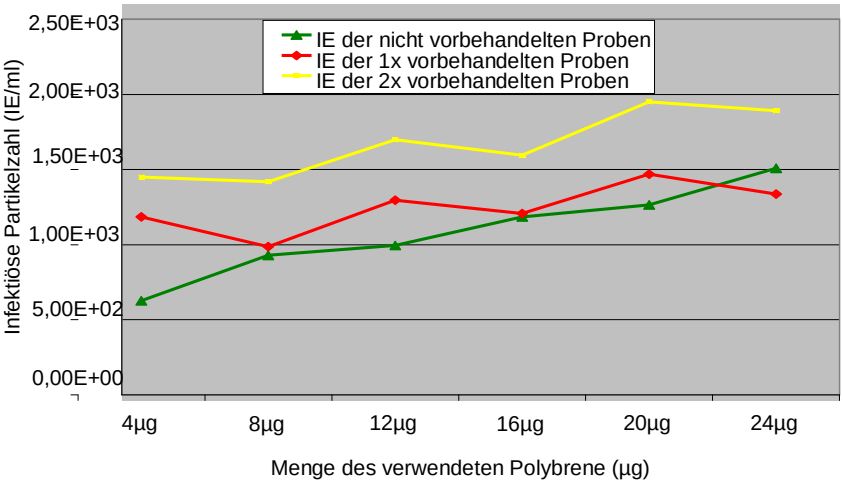


Abb. 13:
Einfluss von PB-Vorbehandlung auf die Bildung von HCVpp bei der Transduktion von Huh-7 Zellen mit HCVpp auf lentiviraler Basis

In diesem Versuchsansatz, den Abb. 13 wiedergibt, wurden die Huh-7 Zellen mit PB vorbehandelt. Bei einmaliger Vorbehandlung (roter Graph) wurde den Zellen direkt nach der Aussaat 8 µg/ml PB zugefügt. In einem weiteren Ansatz (gelber Graph) wurde eine zweite PB Behandlung, eine Stunde vor der Transduktion, mit 8 µg/ml PB durchgeführt. Bei der Transduktion wurden in die einzelnen Vertiefungen jeweils 4 µg/ml; 8 µg/ml; 12 µg/ml; 16 µg/ml; 20 µg/ml und 24 µg/ml

PB auf die Huh-7 Zellen gegeben. Es wurde eine Menge von je 1 ml HCVpp Überstand eingesetzt. Die grafische Darstellung der erlangten Ergebnisse lässt erkennen, dass der wiederholte Einsatz von PB zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz führt. Besonders lässt sich die Erhöhung der infektiösen Partikelzahlen bei dem zweimal vorbehandelten Ansatz darstellen; jedoch scheint ab einer gewissen Menge eine Sättigung erreicht zu sein. Diese Menge liegt bei den vorbehandelten Ansätzen bei 20 µg/ml PB, denn hier ist wiederum ein Abfall der ermittelten Partikelanzahl zu beobachten. Mikroskopische Hinweise auf eine mögliche Zellschädigung konnten nicht erkannt werden. Die einmalige Vorbehandlung mit PB verbessert die Transduktionseffizienz der HCVpp; die zweimalige Vorbehandlung führt nochmals zu höheren infektiösen Partikelzahlen bei der Transduktion der Zielzellen.

Daher wurde in den Neutralisationsstudien eine PB-Vorbehandlung zur Verbesserung der Transduktionseffizienz eingesetzt.

4.1.3. Untersuchung zur Erhöhung der Transduktionseffizienz durch Konzentrierung des HCVpp-haltigen Zellkulturüberstandes

Die Konzentrierung der im Zellkulturüberstand enthaltenen HCVpp wurde mit der Absicht durchgeführt eine höhere infektiöse Partikelzahl bei der Transduktion der Zielzellen zu erreichen.

Zur Konzentration, der in Abb. 14 gezeigten Ergebnisse, wurde der gewonnene Zellkulturüberstand (32 ml) mit einem 20 % Sucrosekissen unterschichtet und anschließend mit einer Ultrazentrifuge (bei 25.000 U/min und 4°C, für zwei ½ Stunden) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl PBS über Nacht gelöst. Für diesen Versuch wurden jeweils gleiche ansteigende Volumina (von 1-20 µl) des ultrazentrifugierten und somit konzentrierten Zellkulturüberstandes (UZ) und unkonzentrierter (NK) Zellkulturüberstand auf Huh-7 Zielzellen gegeben und, wie in Kapitel 3.2.5. beschrieben, weiter behandelt.

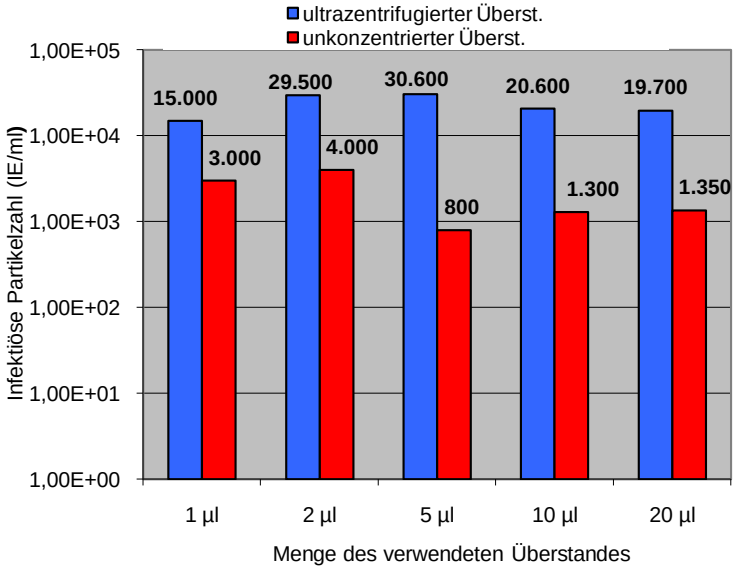


Abb. 14:
Infektiöse HCVpp Mengen nach Ultrazentrifugation des Überstandes, im Vergleich zu unkonzentriertem Überstand, bei unterschiedlichen Ausgangsmengen

In Abb. 14 ist das Ergebnis der Studie zur Konzentration der HCVpp dargestellt. Die Resultate zeigen, dass der Einsatz von ultrazentrifugiertem Überstand zu einer höheren Ausbeute führt als der NK (unkonzentrierte) Überstand. Mit dieser Verbesserung erreichen die infektiösen Partikelwerte eine Höhe von 30.600 IE/ml. Außerdem ist ein Anstieg (etwa eine Log_{10} -Stufe) der IE/ml durch größere Volumina des eingesetzten UZ Überstandes zu erkennen. Dies jedoch nur bis zu einer Menge von 5 µl; danach scheint eine Sättigung erreicht zu sein, denn die Werte steigen nicht weiter an

sondern fallen sogar ab. Sie fallen von 30.500 IE/ml auf 20.600 IE/ml beim Einsatz von 10 µl UZ Überstand und beim Einsatz von 20 µl bis auf 19.700 IE/ml ab. Im Falle des NK Überstandes kann dieses ebenso beobachtet werden; hier fallen die Werte von 4.000 IE/ml beim Einsatz von 2 µl auf 800 IE/ml bei 5 µl NK Überstand und bleiben dann im Bereich von 1.300-1.350 IE/ml bei 10 und 20 µl NK Überstand. Mikroskopische Hinweise auf eine mögliche Zellschädigung konnten auch hier nicht erkannt werden. Grundsätzlich werden jedoch höhere infektöse Partikelzahlen durch eine Konzentrierung des HCVpp Zellkulturüberstandes mit der Ultrazentrifuge erreicht. Dies wurde in den Patientenstudien berücksichtigt und der verwendete HCVpp Zellkulturüberstand wurde mittels Ultrazentrifugation konzentriert.

4.1.4. Der Einfluss des Zellkulturmediums x-Vivo, mit und ohne Zusatz von fötalem Kälberserum, auf die Ergebnisse der Transfektion mit HCVpp, angegeben in infektiösen Partikelzahlen

In folgendem Versuch (s. Abb. 15) wurde der Einfluss der Verwendung eines anderen Zellkulturmediums als DMEM bei der Transfektion auf die HCVpp untersucht. Angegeben sind die infektiösen Partikelzahlen der erzeugten HCVpp Zellkulturüberstände auf Huh-7 Zielzellen. Das bisherige Zellkulturstandardmedium DMEM (mit FKS) wurde mit dem kostenintensiveren x-Vivo Medium, mit und ohne FKS,

verglichen. Für diesen Versuch wurde unkonzentrierter HCVpp Überstand in unterschiedlichen, aufsteigenden Mengen (50 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl, 500 µl und 1 ml) eingesetzt und auf die Huh-7 Zielzellen gegeben.

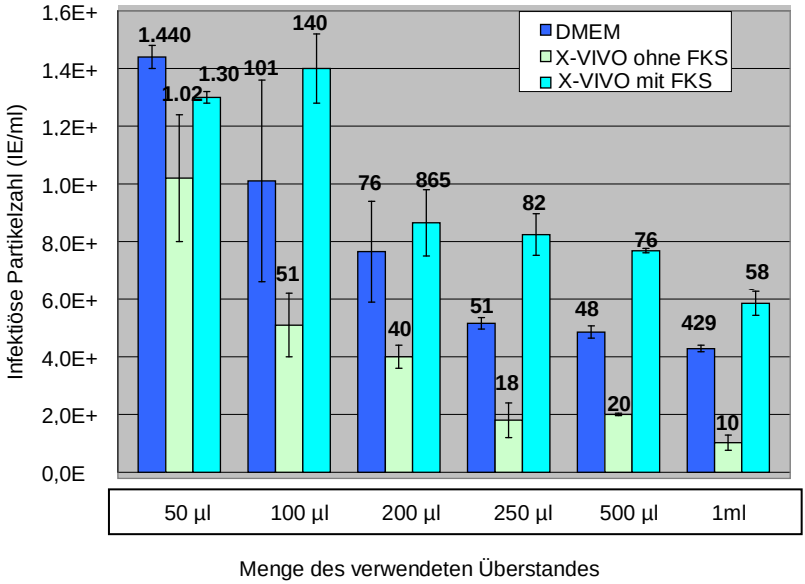


Abb. 15:
Vergleich der infektiösen Partikelzahlen, nach Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien und mit/ohne Zusatz von fötalem Kälberserum (FKS)

Die höchsten infektiösen Partikelzahlen (1.440 und 1.400 IE/ml) konnten beim Einsatz von 50 µl HCVpp/DMEM und 100 µl HCVpp/x-Vivo mit FKS erzielt werden. Die Anzahl der infektiösen Partikel fällt bei allen Ansätzen mit steigenden

Einsatzvolumina der HCVpp ab und ist besonders gering bei den HCVpp/x-Vivo ohne FKS. Die infektiösen Partikelzahlen die durch die HCVpp/x-Vivo mit FKS gemessen werden konnten fallen weniger stark ab als die zu Vergleichenden und liegen auch in den Ansätzen von 250 µl und 500 µl noch in einem höheren Bereich. Erkennbar ist besonders, dass der Einsatz des FKS-haltigen Nährmediums zu höheren infektiösen Partikelzahlen der HCVpp bei der Transduktion auf die Zielzellen führt. Mikroskopisch konnte bei den Ansätzen ohne FKS ein langsameres Zellwachstum festgestellt werden.
In den folgenden Versuchen und Patientenstudien wurde DMEM mit dem Zusatz von FKS verwendet.

4.1.5. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse:

- Die Verwendung lentiviraler Vektoren führt zu höheren infektiösen Partikelzahlen als der Einsatz onkoretroviraler Vektoren.
- Durch eine PB-Vorbehandlung steigen die infektiösen Partikelzahlen an.
- Die Konzentrierung des Zellkulturüberstandes durch Ultrazentrifugation führt zu höheren infektiösen Partikelzahlen.
- Der Zusatz von FKS zu dem Zellkulturmedium x-Vivo führt zu höheren infektiösen Partikelzahlen als ohne FKS. Bei dem Einsatz von 50 µl HCVpp Überstand,

unter Verwendung des Zellkulturmediums DMEM, wurden die höchsten infektiösen Partikelzahlen erzielt.

4.2. Zelltropismusstudie mit HCVpp und verschiedenen B-Suspensionszelllinien

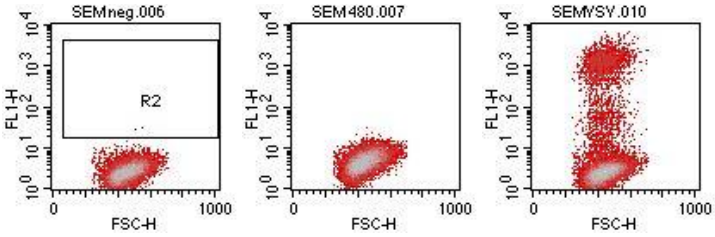
Für diese Testreihe wurden verschiedene B-Zelllinien auf ihre Empfänglichkeit für eine Infektion mit HCVpp getestet. Es sollten gängige Zelllinien getestet werden deren Ursprung ein anderer als Lebergewebe ist.

Diese B-Zelllinien tragen die Namen: SEM, Raji (humane Burkitt Lymphoma Zelllinie), Namalwa (humane Burkitt Lymphoma Zelllinie), Nalm6 und BV173. Es handelt sich um Suspensionszellen menschlicher Herkunft. Das Vorgehen für diese Zelltropismusstudie wurde in Material und Methoden, Kapitel 3.2.5. und 3.2.6., beschrieben.

Die folgenden Darstellungen zeigen die FACS Ergebnisse dieser Versuche - hier vorgestellt als *Dot-Blot* (Punktwolkentest). Die erste Abbildung in den Reihen stellt jeweils die negative Kontrolle dar. Dieser Ansatz enthält nur die Zellen ohne Zusatz der HCVpp. Die mittlere Abbildung in den Testreihen stellt die Ergebnisse der Ansätze dar, die mit den HCVpp transduziert wurden. Als positive Kontrolle wurden die Zellen mit VSVpp transduziert; die Resultate sind in den jeweils letzten Bildern der Testreihen dargestellt. Aufgrund der Vorversuche kann bei den eingesetzten Volumina der HCV-

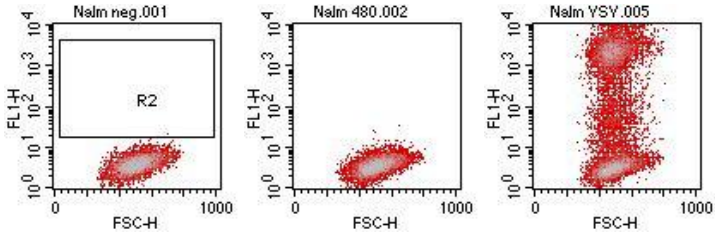
und VSVpp von infektiösen Partikelwerten von $3x10^3$ bis $3x10^5$ IE/ml ausgegangen werden (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.5. Transduktion von Zelllinien mit lentiviralen und retroviralen Überständen).

SEM Zellen



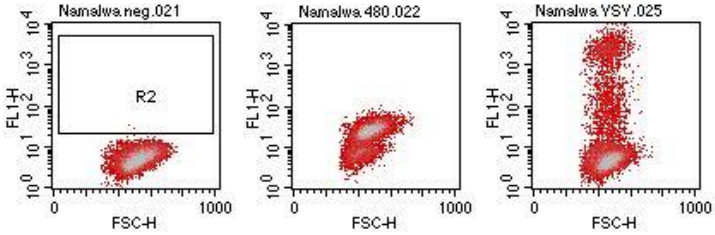
Negativ Kontrolle HCVpp Positiv Kontrolle

Nalm Zellen



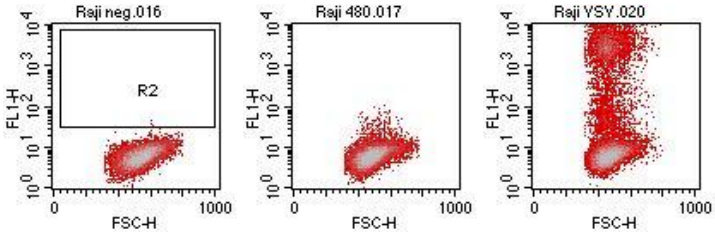
Negativ Kontrolle HCVpp Positiv Kontrolle

Namalwa Zellen



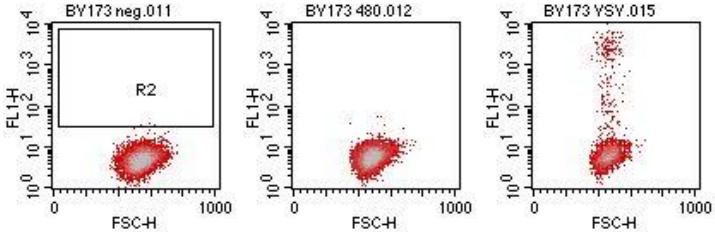
Negativ Kontrolle HCVpp Positiv Kontrolle

Raji Zellen



Negativ Kontrolle HCVpp Positiv Kontrolle

BV173 Zellen



Negativ Kontrolle HCVpp Positiv Kontrolle

Abb. 16:
Zelltropismusstudie mit HCVpp und verschiedenen Suspensionszelllinien

Diese Zelllinien wurden auf ihre mögliche Infizierbarkeit mit HCVpp untersucht. Es wurde überprüft, ob diese Suspensionszellen möglicherweise im Neutralisationstest eingesetzt hätten werden können.

Die jeweils ersten Abbildungen (s. Abb. 16) zeigen die Negativkontrollen, auf der die lebenden Zellpopulationen als rotes, rundes Gebilde zu sehen sind. Diese setzen sich aus vielen roten Punkten zusammen, wobei jeder einzelne Punkt eine Zelle darstellt. Oberhalb der Gesamtpopulation ist eine Markierung gesetzt, in welcher die durch Fluoreszenz gekennzeichneten, positiv transduzierten Zellen zu erwarten wären. Das jeweils folgende Bild zeigt den Infektionsversuch mit den HCVpp. Es ist in jeder Versuchsreihe zu erkennen, dass die Zellen nicht durch die HCVpp infiziert wurden und somit keine positiv markierten Zellen oberhalb der Zellpopulation, in dem Bereich der zu erwartenden, gesetzten Markierung, zu finden sind.

In den Positivkontrollen hingegen, welche die jeweiligen Abbildungen am rechten Bildrand darstellen, zeigt sich, dass eine Vielzahl der Zellen mit den VSVpp transduziert und als Punktwolke oberhalb der Zellpopulation zu erkennen sind. Dieses Ergebnis war erwartungsgemäß. Einzig die BV173 Zellen zeigen keine so gute Infizierbarkeit mit den VSVpp.

Diese Suspensionszelllinien (SEM, Raji, Namalwa, Nalm6 und BV173) konnten unter den beschriebenen Bedingungen nicht mit den HCVpp infiziert werden.

4.3. HCVpp-Neutralisationsstudien mit Patientenseren

Für die Neutralisationsversuche wurden Huh-7 Zellen in Zellkulturplatten ausgesät und danach einen Tag im Brutschrank kultiviert. Im nächsten Arbeitsschritt konnte eine Mischung aus den Patientenseren in unterschiedlichen Verdünnungsstufen, aus Polybrene und den konzentrierten HCVpp Überständen auf die Zellen gegeben werden. Die Zellkulturplatten mit den Zellen und der Serum-/HCV-Pseudotypenmischung wurden zentrifugiert und gleich darauf die Serum-/HCV-Pseudotypenmischung wieder abgenommen, um durch frisches Standardmedium ersetzt zu werden. Darauffolgend wurden die behandelten Zellen 2 Tage im Brutschrank kultiviert, um dann mittels FACS-Analyse ausgewertet werden zu können (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.6.).

Um die Neutralisationsintensität bewerten und vorhandene Störfaktoren dadurch minimieren zu können wurde ein Schema entworfen, das die Darstellung der Ergebnisse vereinfacht (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.9.). Zu diesem Zweck wurde die Stärke der errechneten Neutralisation in drei Stufen eingeteilt: + = mäßige

Neutralisation, diese liegt in einem Bereich von 20-40 %; ++ = gute Neutralisation, diese liegt in einem Bereich von 40-70 %; +++ = sehr gute Neutralisation, diese liegt in einem Bereich von 70-100 %. Werte, die unter einer Neutralisation von 20 % lagen, wurden als negativ gewertet.

4.3.1. Testung der HCVpp mit anti-HCV negativen Kontrollseren

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um das Testsystem zu optimieren und mögliche Fehlerquellen (z. B. falsch positive Ergebnisse) zu prüfen.

Abb. 17 und Tab. 10 stellen die Infektiosität der HCVpp in Anwesenheit von zehn anti-HCV negativ getesteten Patientenseren in drei unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:50; 1:500 und 1:5.000) dar. Diese Patienten hatten im HCV Screening ELISA, durchgeführt im Rahmen der Routinediagnostik (s. Material und Methoden, Kapitel 3.1.10.1.) des Institutes für Medizinische Virologie der Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinik (Frankfurt am Main), keine nachweisbaren HCV-Antikörper im Serum. Als Kontrollen wurden hier ein anti-HCV negativ getestetes AB-Serum (Cambrex/Bio Whittaker; roter Balken) und das HCV-positive Serum des Pat. 54 (gelber Balken) mitgeführt.

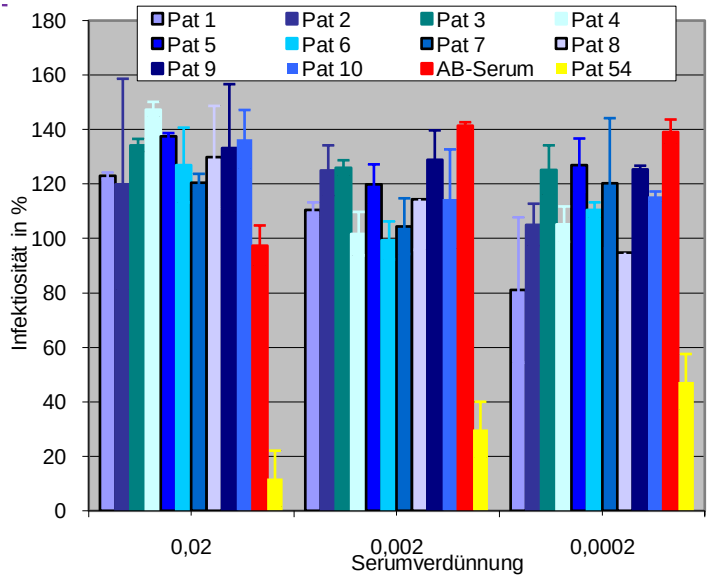


Abb. 17:
Verbleibende Infektiosität von HCVpp in Anwesenheit von anti-HCV negativ getesteten Patientenseren unterschiedlicher Konzentration

Zur besseren Darstellung der Resultate wurde in Abb. 17 die verbleibende Infektiosität der HCVpp dargestellt. Sie lässt erkennen, dass keine wesentliche Inhibition der Infektiosität der HCVpp durch diese Seren erfolgt. Die Infektiosität liegt zumeist bei einem Wert über 100 %. Auch durch das AB-Serum werden die HCVpp ebenfalls nicht neutralisiert und die Infektiosität liegt durchschnittlich über 100 %. Jedoch zeigt die Positivkontrolle erwartungsgemäß eine Inhibition der Infektiosität der HCVpp.

Die Zugabe von HCV-Antikörper negativen Patientenseren zeigt somit keinen hemmenden Einfluss auf die Infektiosität; zum Teil liegt diese sogar über dem Durchschnitt. Lediglich die 1:5.000 Verdünnung einer Probe zeigt eine leicht verminderte Infektiosität, die sich ergebende Neutralisation des Serums von Pat. 1n lag aber noch unter dem definierten Grenzbereich.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt somit keine falsch positive Neutralisation der HCVpp durch die anti-HCV negativen Kontrollseren.

Tab. 10:

Anti-HCV negative Kontrollseren

Nr.	Geschlecht	Alter	Anti-HCV-AK (ELISA) S/CO Werte
Pat 1n	w	29	negativ
Pat 2n	w	22	negativ
Pat 3n	m	62	negativ
Pat 4n	m	22	negativ
Pat 5n	m	44	negativ
Pat 6n	w	42	negativ
Pat 7n	m	74	negativ
Pat 8n	m	46	negativ
Pat 9n	w	59	negativ
Pat 10n	w	45	negativ
AB-Serum	-	-	-
Pat 54	w	60	4,9 (Vitros anti-HCV ELISA Test)

- = nicht bekannt; S/CO Werte = *sample/cut-off*

4.3.2. Neutralisationsstudien mit HCVpp und Seren von Patienten die mit verschiedenen HCV-Genotypen infiziert sind

In folgender Studie (s. Abb. 18) wurde untersucht inwiefern die Anwesenheit von anti-HCV positiven Patientenseren (Genotyp 1a und 1b, s. Tab. 11) Einfluss auf die Infektiosität der HCVpp hat und ob die in den Seren enthaltenen Antikörper unterschiedliche Neutralisationsintensitäten aufweisen, je nachdem gegen welchen HCV-Subtyp (1a oder 1b) sie gerichtet sind. Der verwendete HCVpp entspricht dem Genotyp 1a. Als Kontrollen wurden das anti-HCV negative AB-Serum (rot) und das Serum des Pat. 54 (gelb) mitgeführt.

Um die am besten geeignete Serumverdünnung für die folgenden Neutralisationsversuche zu ermitteln, wurden die verwendeten HCV-positiven Patientenseren in 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000 und 1:2.000 Verdünnungen eingesetzt.

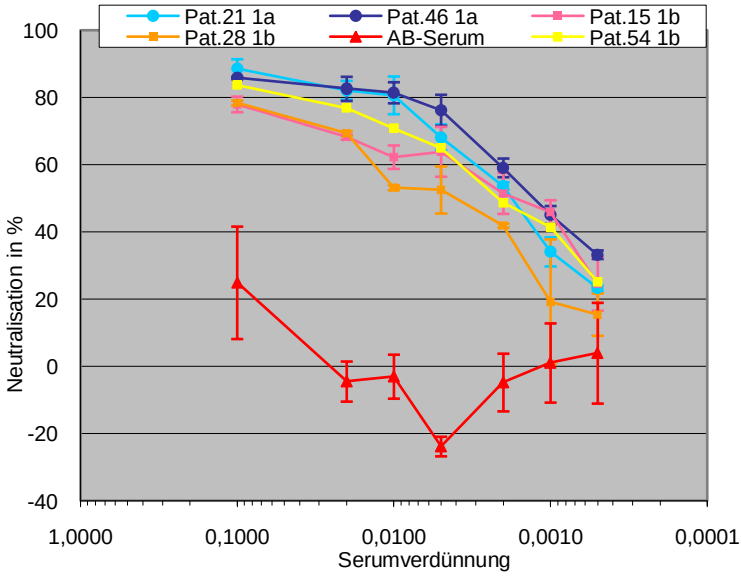


Abb. 18:
Vergleich der Neutralisation der HCVpp mit Seren von Patienten mit einer HCV-Subtyp1a bzw.1b Infektion

In der Grafik (Abb. 18) ist zu erkennen, dass das negative Kontrollserum (rot) erwartungsgemäß keine nennenswerte Neutralisation auf die HCVpp ausübt. Alle Patientenproben jedoch haben Einfluss auf die Infektiosität der HCVpp; insbesondere in der niedrigsten Serumverdünnungsstufe. Hier werden die HCVpp in den Proben der HCV-Genotyp 1a infizierten Patienten bis zu über 80 % (+++) neutralisiert. Die Neutralisationsfähigkeit der Seren der mit HCV 1b infizierten Patienten liegt etwas unterhalb von 80 % (+++). In der gesamten Titrationskurve ist zu beobachten, dass die Neutralisation der Subtyp 1a Patientenseren stetig oberhalb

der Werte der 1b Patientenseren liegt. Zu erkennen ist, dass bei größerer Verdünnung der Seren die Neutralisation erwartungsgemäß abnimmt und die gemessenen Werte einander annähern, jedoch immer noch eine mäßige Neutralisation (+, bei 1:2.000) zeigen.

Die Neutralisation der HCVpp mit Seren von Patienten mit einer HCV-Subtyp 1a Infektion, der Subtyp, der auch in den HCVpp verwendet wurde ist etwas stärker, als die des HCV-Subtyps 1b.

Tab. 11:

Seren von Patienten mit einer HCV-Subtyp1a bzw.1b Infektion

Nr.	Geschl.	Alter	HCV-Genotyp	Anti-HCV-AK (ELISA) * S/CO Werte
Pat 15	w	60	1b	5,2
Pat 21	m	39	1	4,9
Pat 28	w	42	1b	5,7
Pat 46	w	39	1a	5,3
AB-Serum	-	-	-	-
Pat 54	w	60	1b	4,9

* Vitros anti-HCV ELISA Test (Ortho Clinical Diagnostics, Amersham, Bucks, UK);

Cut-Off = 1 S/CO, die Werte entsprechen einer hoch-positiven Reaktion, eine Überprüfung im Immunoblot ist daher nicht durchgeführt worden. - = nicht bekannt

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurde eine Kreuzneutralisationsstudie mit verschiedenen HCV-Genotypen in den Verdünnungstufen 1:50, 1:500 und 1:5.000 (Patientenseren s. Tab. 12) durchgeführt. Deren Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 19 dargestellt. Die verwendeten Seren stammen von chronisch infizierten Patienten, infiziert mit HCV-Genotyp 2a/c, 3a oder 4. Als Kontrollen wurden wiederum das anti-HCV negative AB-Serum (als rote Linie) und das Serum von Pat. 54 (als gelbe Linie) mitgeführt. In dem HCV-negativen AB-Serum sind keine neutralisierenden anti-HCV Antikörper zu erwarten, weshalb die gemessenen Neutralisationswerte im Bereich um 0 % liegen.

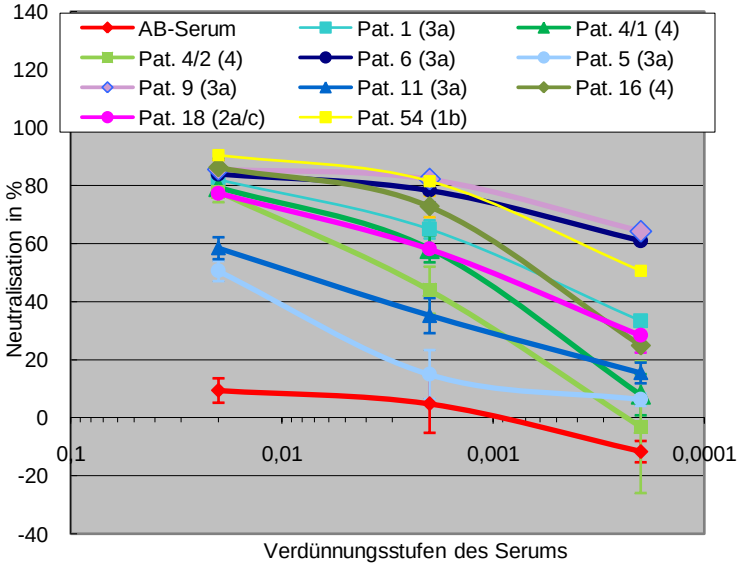


Abb. 19:
HCVpp Neutralisation mit Seren von Patienten mit HCV-Genotyp 2, 3 und 4 Infektionen

Die in Abb. 19 dargestellte x-Achse zeigt die Ansätze in den drei gewählten Verdünnungsstufen; die y-Achse beschreibt die gemessene Neutralisation der HCVpp (Genotyp 1a). Die Werte der Serumproben von mit Genotyp 3a infizierten Patienten werden in blauen Farbtönen wiedergegeben, die mit Genotyp 4 in grünen Tönen und mit Genotyp 2a/c in Pink.

Zu erkennen ist, dass die Neutralisationstest-Werte (NT-Werte) erwartungsgemäß alle oberhalb des roten Kontrollgraphen der AB-Serumprobe liegen und somit eine eindeutige Neutralisation zeigen. In der ersten

Verdünnungsstufe (1:50), also bei geringerer Serumverdünnung liegt die Neutralisation nicht unter 50 % (++ bis +++); zumeist sogar in einem Bereich um 80 % (+++).

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den erzielten Daten der Genotyp 1a/b Seren – auch an dem gelben Graphen, des als positive Kontrolle mitgeführten Pat. 54, zu erkennen. Diese Daten zeigen, dass eine Neutralisation der HCVpp durch alle verwendeten Seren unabhängig vom HCV-Genotyp, insbesondere in der niedrigsten Verdünnungsstufe, möglich ist.

Tab. 12:
Patientenseren der HCV-Genotyp-Kreuzneutralisationsstudie

Nr.	Geschl.	Alter	Viruslast im Patientenserum in IE/ml #	HCV Genotyp	NT-Werte der 1. Verdünnung in %
Pat 1	m	57	16.000	3a	Ca. 85 % (+++)
Pat 4	unbekannt	65	92.000	4	Ca. 80 % (+++)
Pat 5	w	43	43.000	3a	Ca. 50 % (++)
Pat 6	m	32	500.000	3a	Ca. 85 % (+++)
Pat 9	m	40	500.000	3a	Ca. 55 % (++)
Pat 11	m	29	202.000	3a	Ca. 85 % (+++)
Pat 16	w	49	484.000	4	Ca. 85 % (+++)
Pat 18	w	36	219.000	2a/c	Ca. 80 % (+++)
AB-Serum	-	-	-	-	Ca. 0 %
Pat 54	w	60	500.000	1b	Ca. 90 % (+++)

Cobas HCV Monitor Test (Roche Diagnostics, Basel); - = nicht bekannt

Interessanterweise konnte in keinem der Versuche eine 100%-ige Neutralisation erzielt werden. Dennoch war auch in

sehr hohen Verdünnungsstufen vieler Proben noch eine eindeutige Neutralisationsfähigkeit nachweisbar.
Aufgrund der Vorversuche in denen geeignete Verdünnungsstufen gewählt wurden, um in den Seren vorhandene Störfaktoren zu reduzieren, wurden die Neutralisationsversuche in den Verdünnungen 1:50, 1:500 und 1:5000 durchgeführt.

4.3.3. Neutralisationsversuche der HCVpp mit Patientenseren, die serologisch als „anti-HCV schwach positiv“ eingestuft wurden

Dieser Versuch wurde mit dem Ziel durchgeführt den HCVpp Neutralisationstest zu optimieren und festzustellen, wie sensitiv er auf im anti-HCV ELISA grenzwertige Proben reagiert.

Die in Tab. 13 dargestellten zehn Patientenseren wiesen in der virologischen Antikörper-Diagnostik (s. Material und Methoden, Kapitel 3.1.10.5.) uneindeutige Ergebnisse auf. (Dies bedeutet relativ schwach positive Resultate im anti-HCV Screening ELISA, die sich im zusätzlich durchgeführten rekombinanten Immunoblot als nicht eindeutig bestätigen ließen, d. h., es konnte nur gegenüber einem der rekombinanten HCV Proteine - i.d.R. gegenüber dem HCV

Nicht-Struktur-Protein NS-3 - eine eindeutige Immunantwort gemessen werden. Die in Klammern zusätzlich angegebenen HCV Proteine - i. d. R. das HCV Nicht Struktur-Protein NS-4 - waren nur sehr schwach unterhalb des Cut-Offs nachweisbar.) Alle Patientenseren, außer Pat. 4s haben im direkten Virus-RNA Nachweis, der zur Überprüfung der Ergebnisse in der Routinediagnostik durchgeführt wurde, ein negatives Resultat erzielt. Die Nachweisgrenze der verwendeten Polymerasekettenreaktion lag bei < 50 IE/ml. Als Kontrollen wurden in diesem Versuch das anti-HCV negative AB-Serum und das Serum eines bereits getesteten anti-HCV positiven Patienten (Pat 54) mitgeführt.

Tab. 13:

Verbleibende Infektiosität der HCVpp nach Inkubation mit Patientenseren die serologisch als „anti-HCV schwach positiv" bzw. als „nicht eindeutig bewertbar“ eingestuft wurden

Nr.	Geschl.	Alter	Mittelwerte der Verbleibenden Infektiosität der HCVpp; 1:500 Verdünnung in %	HCV-IgG Immunoblot/ pos. Banden	PCR	Anti-HCV-AK (ELISA) *[1] S/CO Werte	Weitere Informationen
Pat 1s	w	50	**82,44 %**	NS3	-	2,3	frühere HBV Inf.
Pat 2s	w	50	**84,16 %**	C2	-	14,3	akute EBV Inf.
Pat 3s	m	76	**80,15 %**	NS3, (NS4)	-	10,9	
Pat 4s	m	44	**43,70 %**	NS3, (C2)	+	2,2	HIV Inf.
Pat 5s	w	60	**78,44 %**	NS3, (NS4)	-	2,1	
Pat 6s	m	52	**85,50 %**	NS3	-	1	
Pat 7s	w	47	**87,22 %**	NS3	-	1	
Pat 8s	w	28	**77,67 %**	NS3	-	5,9	erhöhte Leberwerte (Transaminasen)
Pat 9s	w	45	**89,31 %**	NS3	-	5,4	

Pat 10s	w	35	**93,71 %**	NS3	-	1,3	anamnestisch HCV/HBV Inf. früher abgelaufen
AB-Serum	**-**	**-**	**95,23 %**	**-**	-	**-**	
Pat 54	w	60	**26,72 %**	**-**	+	4,9 *2	

- = es konnten keine HCV-spezifischen Genomsequenzen nachgewiesen werden; + = es ließen sich HCV-spezifische Nukleinsäureamplifikate nachweisen; die Nachweisgrenze der PCR liegt bei < 50 IE/ml. *1 AxSYM anti-HCV 3.0 (Abbott, Delkenheim); Der anti-HCV ELISA Test wird in der Diagnostik ab einem Wert von 1,0 S/CO als positiv eingestuft. Die Erfahrungswerte des Labors zeigen jedoch, dass Proben mit Werten < 15 S/CO oft unspezifisch reaktiv sind und daher in einem zusätzlichen HCV-Immunoblot überprüft werden. *2 Vitros anti-HCV ELISA Test (Ortho Clinical Diagnostics, Amersham, Bucks, UK);
- = nicht bekannt

Als Darstellung wurde die verbleibende Infektiosität der HCVpp in Anwesenheit der Patientenseren gewählt, da keine Neutralisation zu erwarten war.

Die Versuche wurden in den Verdünnungen 1:50, 1:500 und 1: 5.000 durchgeführt.

In obiger Tabelle 13 sind die Ergebnisse der 1:500 Verdünnung aufgetragen. Diese wurden gewählt, da Vorversuche gezeigt haben, dass vorhandene Störfaktoren minimiert werden und in diesen Verdünnungsstufen verwertbare Ergebnisse erzeugt werden konnten.

Die gewonnenen Daten in Tab. 13 zeigen, dass neun der untersuchten Seren keine besondere Neutralisationsfähigkeit auf die HCVpp ausüben und die verbleibende Infektiosität zumeist in einem Bereich um 70-80 % liegt. Das negative Kontrollserum zeigt erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Infektiosität der HCVpp. Hervorzuheben ist das Serum des einen Patienten (Pat 4), welches zu einer deutlichen Inhibition (43,70 % verbleibende Infektiosität) der HCVpp Infektiosität führt. Einzig im Serum dieses Patienten, der gleichzeitig mit HIV koinfiziert war, konnte eine HCV-Infektion in der virologischen Routinediagnostik mittels PCR bestätigt werden.

Die Ergebnisse des durchgeführten HCVpp Neutralisationstests zeigen, dass die einzige gesichert HCV positive Probe aus den als „anti-HCV schwach positiv“ eingestuften Seren mittels HCVpp Neutralisationstest erkannt wurde.

4.3.4. Neutralisationsversuche mit HCVpp und den Seren von Patienten, infiziert mit einem anderen Flavivirus (Dengue Virus)

In unten gezeigtem Versuch (s. Abb. 20) wurde die Infektiosität der HCVpp, nach Inkubation mit 16 Seren (s. Tab. 14) von mit Dengue-Virus infizierten Patienten, geprüft. Einige dieser Patienten weisen zusätzlich FSME-IgG Antikörper im Serum auf. Flaviviren sind bekannt dafür, dass Seren von infizierten Patienten in Antikörpertests anderer Flaviviren Kreuzreaktionen zeigen können (Doerr & Gerlich; 2002). Um diese Problematik, im Zusammenhang mit der Spezifität des HCVpp Neutralisationstests, zu untersuchen, wurde folgender Versuch durchgeführt.

Die Versuchsansätze erfolgten in drei Verdünnungsstufen (1:50; 1:500 und 1:5.000). Als Kontrollen wurden wiederum das anti-HCV negative AB-Serum, als roter Balken, und das des Pat. 54, als gelber Balken, mitgeführt.

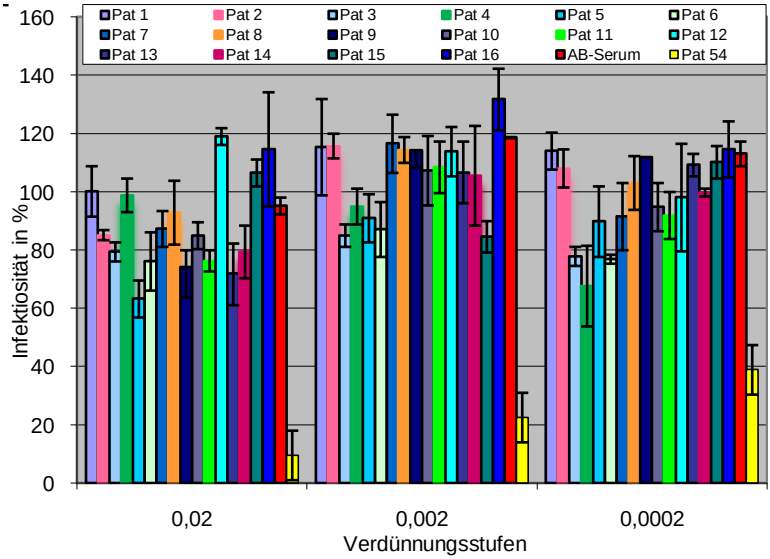


Abb. 20:
Messung der Kreuzneutralisation der HCVpp mit Seren von mit Dengue-Virus infizierten Patienten, von denen einige zusätzlich FSME-IgG enthielten

Die Darstellung der Ergebnisse in Abb. 20 zeigt, dass sich die untersuchten Proben, im Vergleich zum negativen Kontrollserum, ähnlich verhalten und die Infektiosität der HCVpp nicht herabsetzen; also keinerlei Neutralisation auf die HCVpp ausüben. Die Daten der positiven Kontrolle sind erwartungsgemäß niedrig.

Es ist keine Kreuzneutralisation der mit anderen Flaviviren infizierten Patientenseren und den HCVpp zu erkennen.

Tab. 14:

Untersuchte Seren der Patienten: Dengue-Virus positiv und in der klinischen Diagnostik außerdem auf das FSME Virus getestet

Nr.	Geschl.	Alter	Dengue-AK ELISA (S/CO) *1	FSME-IgG U/ml *2	Durchschnittl. Infektiosität der HCVpp in % der 1:500 Verdünnungsstufe
Pat 1f	w	27	2,7	negativ	115,39 %
Pat 2f	w	57	1,6	62	115,77 %
Pat 3f	m	28	1,2	0	85 %
Pat 4f	m	42	7,5	20	95 %
Pat 5f	w	32	5,5	29	90,96 %
Pat 6f	w	33	1,1	0	87,12 %
Pat 7f	w	49	5,2	22	116,54 %
Pat 8f	w	36	4,4	0	114,43 %
Pat 9f	w	58	2,9	220	114,23 %
Pat 10f	w	86	2,0	0	107,31 %
Pat 11f	m	51	1,2	58	108,46 %
Pat 12f	w	44		0	113,45 %
Pat 13f	m	56	1,3	53	106,54 %
Pat 14f	w	46	3,1	270	105,58 %

Pat 15f	w	24	1,5	22	84,62 %
Pat 16f	w	34	1,2	-	131,71 %
AB-Serum	-	-	-	-	118,66 %
Pat 54	w	60	-	-	22,56 %

[*1] DENV IgM Test von Focus Diagnostics (Cypress, CA, USA), die Werte sind ab einem S/CO Wert von 1,0 als positiv zu bewerten. [*2] Enzygnost anti-FSME IgG von Dade Behring (jetzt Siemens Healthcare, Eschborn) bei den Werten handelt es sich um Units/ml.
- = nicht durchgeführt; - = nicht bekannt

4.3.5. Neutralisationstest mit HCVpp und Seren von HIV/HCV koinfizierten Patienten

In dem Versuchsansatz (s. Abb. 21) wurden Serumproben (s. Tab. 15) von LTNP-HIV Patienten, die zusätzlich mit HCV koinfiziert sind, auf ihre Reaktivität mit den HCVpp untersucht (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.1.10.4.). Es sollte festgestellt werden ob die HIV-Koinfektion dieser Patientenproben im HCVpp-Neutralisationstest eine abweichende Reaktion verursacht.
Als Kontrollen wurden in diesem Versuchsansatz das anti-HCV negative AB-Serum (Negativkontrolle, rot) und das

Serum eines HCV 1b (Pat 54 als Positivkontrolle, gelb) infizierten Patienten mitgeführt. Die Ergebnisse der Kontrollen fielen erwartungsgemäß aus.

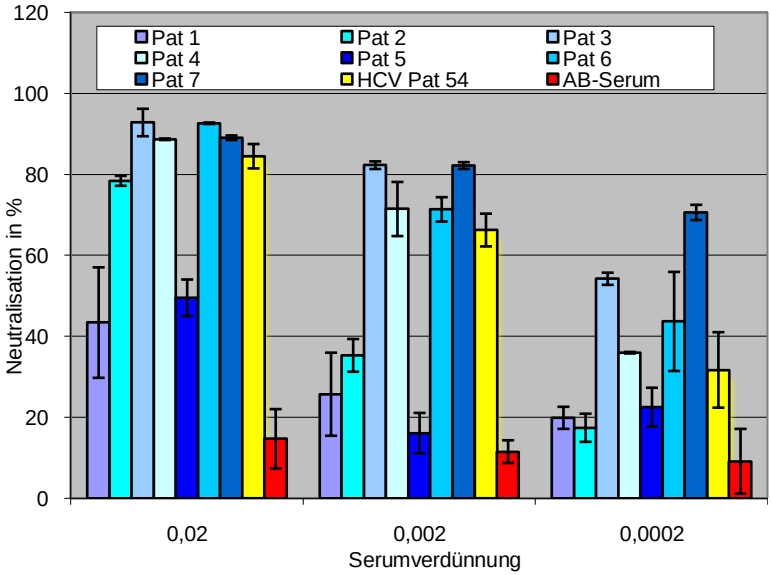


Abb. 21:
Neutralisation der HCVpp nach Inkubation mit Seren von LTNP HIV/HCV koinfizierten Patienten

Zu erkennen ist, dass die Seren der koinfizierten Patienten mit dem HCV-Genotyp 1a/b alle eine sehr gute Neutralisation der HCVpp aufweisen und in der höchsten Verdünnungsstufe noch deutlich besser neutralisieren als das Serum des positiven Kontrollpatienten (der grüne Balken, s. Abb. 21). Nur in der höchsten Verdünnungsstufe kann bei den meisten

Seren ein Abfall der Neutralisationseffizienz beobachtet werden; vor allem bei den Seren anderer (als HCV-Genotyp 1a/b) oder unbekannter Genotypen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die meisten Seren der HIV/HCV-koinfizierten Patienten eine bessere Neutralisation verursachen als die Probe des HCV positiven Kontrollpatienten.

Tab. 15:

HCVpp Neutralisation mit Seren der HIV LTNP–Patienten

Nr.	HCV-Genotyp	Durchschnittl. Neutralisation in % der 1:500 Verdünnungsstufe
Pat 1h	-	25,71 % (+)
Pat 2h	4c/4d	35,31 % (+)
Pat 3h	1a/1b	82,30 % (+++)
Pat 4h	1a/1b	71,47 % (+++)
Pat 5h	-	16,10 %
Pat 6h	3a	71,38 % (+++)
Pat 7h	1a/1b	82,21 % (+++)
HCV Pat 54	1b	66,28 % (++)
AB-Serum	negativ	11,53 %

- = nicht bekannt

4.4. HCVpp Neutralisationstest-Patientenstudien

4.4.1. Neutralisationstestung von Patientenseren im Therapieverlauf mit unterschiedlichem Ausgang der Therapie („Responder, Non Responder und Relapse“)

Ziel dieser Untersuchung war der Vergleich zwischen der Neutralisationseffizienz (humoralen Immunantwort) der untersuchten Seren im zeitlichen Verlauf, dem klinisch bekannten Ausgang der antiviralen Therapie und ob zwischen diesen Parametern ein Zusammenhang beobachtet werden kann. Im Hinblick auf die Einsetzbarkeit dieses Testsystems in der virologischen Diagnostik und der sich daraus ergebenden Möglichkeit über einen prognostischen Marker zu verfügen, wurden diese Neutralisationsversuche durchgeführt.

Die Therapie wurde, wie in Kapitel 2.6. beschrieben, mit Ribavirin und PEGInterferon durchgeführt.

Im Folgenden sind die erzielten Resultate der einzelnen Studien in Grafiken, die in Balkendiagrammen die arithmetischen Mittelwerte mit Fehlerindikatoren zeigen, dargestellt. Diese präsentieren die gemessene Neutralisation der HCVpp nach Zugabe der Patientenseren. Die Versuchsansätze erfolgten immer im doppelten Ansatz und in der Serum-Verdünnungsstufe 1:500, da sich diese Verdünnung nach den Vorversuchen als am meisten geeignet erwies.

In jedem Versuch wurden anti-HCV positive und anti-HCV negative Patientenseren als Kontrollen mitgeführt; anhand derer wurden die gewonnenen Daten ausgewertet. Als negatives Kontrollserum fungierte das anti-HCV negative AB-Serum.

Die Viruslast der Patientenseren wurde im Rahmen der Routinediagnostik mittels Cobas HCV Monitor Test (Roche Diagnostics, Basel) ermittelt.

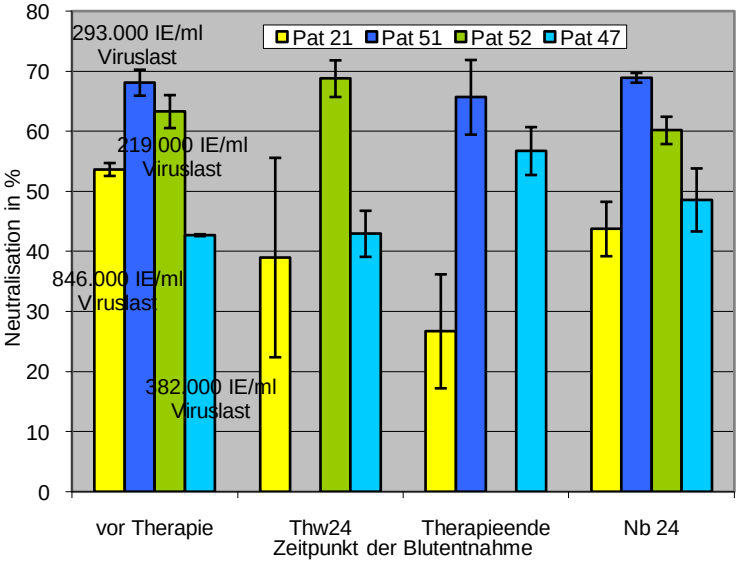


Abb. 22:
Darstellung der Neutralisation der HCVpp nach Inkubation mit Seren von Patienten der „*Responder*“-Gruppe

Für diesen Versuch, in Abb. 22 dargestellt, wurden vier Patienten (s. Tab.16) mit dem Therapiestatus "*Responder*" ausgewählt. Die Patienten dieses Kollektivs haben auf die Therapie angesprochen und waren in der Lage das Virus zu eliminieren. Bis auf die Probe „vor Therapie", in der bei allen Patienten mittels PCR virale HCV-RNA nachgewiesen werden konnten, wiesen alle Folgeproben dieser Patienten negative Ergebnisse in der HCV-PCR auf.

Zur Überwachung der Therapie wurden von diesen Patienten zu definierten Zeitpunkten Blutproben entnommen. In den Versuchen wurden diese Serumproben in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Die Termine zur Blutentnahme waren: vor Beginn der Therapie, in Therapiewoche 24, am Therapieende und 24 Wochen nach Therapieende (Nb 24).

Diese Abbildung zeigt eine Inhibition der HCVpp Infektiosität mit einer Neutralisationseffizienz von 68 % (++) bis zu 26 % (+); jedoch mit keiner eindeutig erkennbaren Tendenz. Einzig bei Pat. 21 kann in den Resultaten der Neutralisation der Serumproben während der Therapie (Serumproben Thw24 und Therapieende) eine Abnahme der Neutralisationsfähigkeit beobachtet werden. Ein Anstieg der Neutralisation der HCVpp erfolgte bei diesem Patienten in der Serumprobe „Nb24" nach der Therapie.

Die Ergebnisse dieses Neutralisationstests mit den Patientenseren der Gruppe „*Responder*" zeigen keine

eindeutigen Tendenzen der Neutralisationseffizienz im zeitlichen Ablauf der Therapie.

Tab. 16:
Untersuchte Patientenseren der Gruppe „*Responder*“ in der Verdünnungsstufe 1:500

Pat. 21, männlich, 39 Jahre, Genotyp 1a	**Viruslast im Patientenserum in IE/ml #**	**Durchschnittl. Neutralisation in %**	**Anti-HCV-AK (ELISA) * S/CO Werte**
Vor Therapie	846.000	53,66 % (++)	4,9
Therapiewoche 24	0	39,00 % (+)	-
Therapieende	0	26,72 % (+)	-
24 Wochen nach Therapieende	0	43,75 % (++)	-
Pat. 51, männlich, 62 Jahre, Genotyp 1b			-
Vor Therapie	293.000	68,11 % (++)	5,0
Therapieende	0	65,67 % (++)	-
24 Wochen nach Therapieende	0	68,92 % (++)	-
Pat. 52, weiblich, 66 Jahre, Genotyp 1b			-

Vor Therapie	219.000	63,30 % (++)	5,6
Therapiewoche 24	0	68,78 % (++)	-
24 Wochen nach Therapieende	0	60,07 % (++)	-
Pat. 47, weiblich, 43 Jahre, Genotyp 1b			-
Vor Therapie	382.000	42,72 % (++)	5,2
Therapiewoche 24	0	42,95 % (++)	-
Therapieende	0	56,73 % (++)	-
24 Wochen nach Therapieende	0	48,59 % (++)	-

* Vitros anti-HCV ELISA Test (Ortho Clinical Diagnostics, Amersham, Bucks, UK); # Cobas HCV Monitor Test (Roche Diagnostics, Basel); - = nicht bekannt

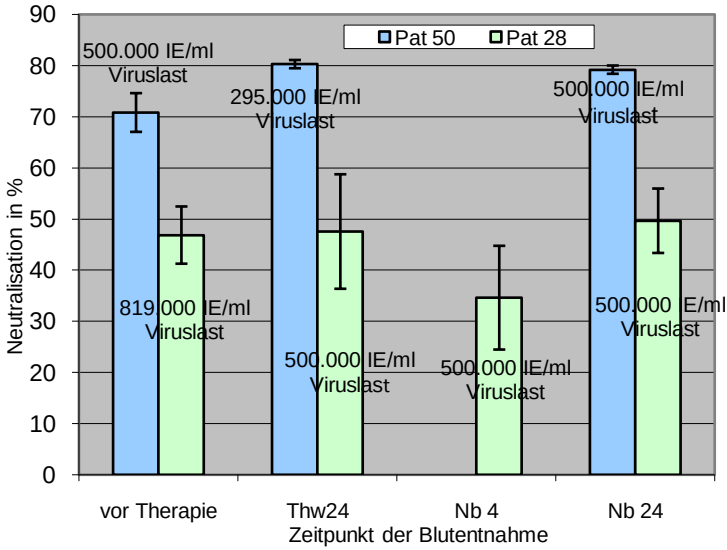


Abb. 23:
Darstellung der Neutralisation der HCVpp nach Inkubation mit Patientenseren der „*Non Responder*“-Gruppe

Die Abb. 23 zeigt die Ergebnisse der Versuche mit der Patientengruppe „*Non Responder*“. Diese Patienten waren nicht in der Lage mithilfe der Therapie das HC-Virus aus ihrem Körper zu eliminieren. Hier wurden ebenfalls Verlaufsblutproben, in einer Serumverdünnung von 1:500, dieser Patienten (s. Tab. 17) untersucht. Keine Untersuchung fand jedoch zum Therapieende statt; dafür erfolgte aber eine Probenentnahme vier Wochen nach der Behandlung. Die Neutralisationseffizienz des Serums von Pat. 50 liegt während des gesamten Probenentnahmezeitraums zwischen 70,81 %

und 80,27 % (+++) und die des Pat. 28 zwischen 34,62 % und 49,65 % (+ bis ++).

Beide Verlaufsproben der Patientengruppe „*Non-Responder*“ zeigen keine besonderen Abweichungen oder Schwankungen in ihrer Neutralisationseffizienz während oder nach der antiviralen Therapie.

Tab. 17:

Untersuchte Patientenseren der Gruppe „*Non Responder*“ in der Verdünnungsstufe 1:500

Pat. 28, weiblich, 42 Jahre, Genotyp 1b	**Viruslast im Patientenserum in IE/ml #**	**Durchschnittl. Neutralisation in %**	**Anti-HCV-AK (ELISA) * S/CO Werte**
Vor Therapie	819.000	46,85 % (++)	5,7
Therapiewoche 24	500.000	47,55 % (++)	-
4 Wochen nach Therapieende	500.000	34,62 % (+)	-
24 Wochen nach Therapieende	500.000	49,65 % (++)	-
Pat. 50, männlich, 41 Jahre, Genotyp 1b			-
Vor Therapie	500.000	70,81 % (+++)	4,8
Therapiewoche 24	295.000	80,27 % (+++)	-
24 Wochen nach Therapieende	500.000	79,19 % (+++)	-

* Vitros anti-HCV ELISA Test (Ortho Clinical Diagnostics, Amersham, Bucks, UK); # Cobas HCV Monitor Test (Roche Diagnostics, Basel); - = nicht bekannt

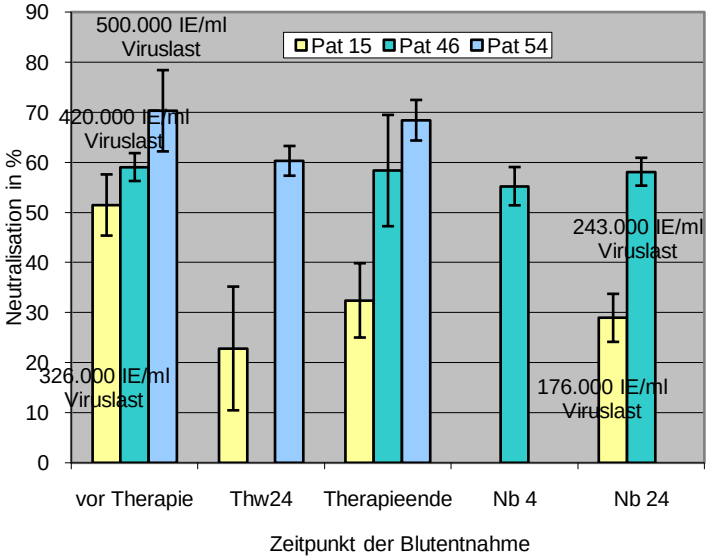


Abb. 24:
Darstellung der Neutralisation der HCVpp nach Inkubation mit Patientenseren der „*Relapse*“-Gruppe

Obige Abb. 24 zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Patientenkollektiv „*Relapse*“. Diese HCV-Patienten (s. Tab. 18) haben zu Beginn auf die antivirale Behandlung angesprochen. Sie konnten das Virus jedoch nicht vollständig eliminieren und es konnte wieder HCV-RNA, mittels PCR, im Plasma detektiert werden. Aus dieser Gruppe wurden Verlaufsproben (Verdünnungsstufe 1:500) von drei Patienten

untersucht, die zur Kontrolle der antiviralen Therapie entnommen wurden. Hervorzuheben sind die Ergebnisse der Neutralisation der Serum-Verlaufsproben von Pat. 15. Insbesondere nach Beginn der Therapie unterscheiden sie sich von den anderen Serumproben dieser Gruppe in ihrer Neutralisationsfähigkeit, da diese geringer ist als die der übrigen Patienten.

Die gewonnenen Daten der Serumverlaufsproben in der Gruppe „*Relapse*“ zeigen eine breite Streuung, zwischen 22 % (+) und 70 % (+++), der HCVpp Neutralisation.

Tab. 18:

Untersuchte Patientenseren der Gruppe „*Relapse*“ in der Verdünnungsstufe 1:500

Pat. 15, weiblich, 60 Jahre, Genotyp 1b	**Viruslast im Patientenserum in IE/ml #**	**Durchschnittl. Neutralisation in %**	**Anti-HCV-AK (ELISA) * S/CO Werte**
Vor Therapie	326.000	51,45 % (++)	5,2
Therapiewoche 24	0	22,82 % (+)	-
Therapieende	0	32,41 % (+)	-
24 Wochen nach Therapieende	176.000	28,92 % (+)	-
Pat. 54, weiblich, 60 Jahre,			-

Genotyp 1b			
Vor Therapie	500.000	70,27 % (+++)	4,9
Therapiewoche 24	0	60,27 % (++)	-
Therapieende	0	68,38 % (++)	-
Pat. 46, weiblich, 39 Jahre, Genotyp 1a			-
Vor Therapie	420.000	59,03 % (++)	5,3
Therapieende	0	58,33 % (++)	-
4 Wochen nach Therapieende	0	55,21 % (++)	-
24 Wochen nach Therapieende	243.000	58,10 % (++)	-

* Vitros anti-HCV ELISA Test (Ortho Clinical Diagnostics, Amersham, Bucks, UK); # Cobas HCV Monitor Test (Roche Diagnostics, Basel); - = nicht bekannt

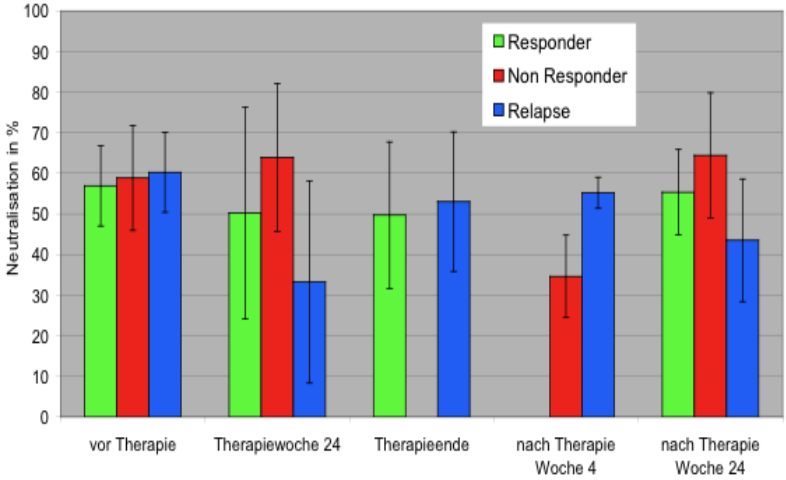


Abb. 25:
Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Neutralisationsversuche mit den unterschiedlichen Patientengruppen

Ziel dieser Neutralisationsstudien mit den Patientengruppen war der Vergleich der Neutralisationseffizienz der untersuchten Patientenseren im zeitlichen Verlauf der Therapiekontrollen und dem klinisch bekannten Ausgang der HCV-Therapie. Die Fragestellung war, ob sich hier ein Zusammenhang herstellen ließe.

Die Abb. 25 zeigt eine Zusammenfassung der oberhalb dargestellten Patientengruppen (s. Tab. 16, 17 und 18) mit den Therapiegruppen: „*Responder*, *Non Responder* und *Relapse*“. Hervorzuheben ist, dass die Werte für die Neutralisation der HCVpp der einzelnen Gruppen vor

Therapiebeginn ähnlich nah beieinanderliegen und dann, im Verlauf der Therapie, zu divergieren beginnen. So kann nach der Behandlung in Woche vier und 24 ein Unterschied von ca. 20 % zwischen der Therapiegruppe „*Non Responder*“ und „*Relapse*“ festgestellt werden. Die „*Non Responder*“-Gruppe zeigt einen durchschnittlichen Anstieg der Neutralisationsfähigkeit und die „Relapse“-Gruppe im Durchschnitt einen Abfall der Neutralisationsfähigkeit. Die Gruppe der „Responder“ zeigt keine so deutlichen Schwankungen und die Werte der gemessenen Neutralisation bewegen sich stets zwischen 57 % und 50 % (++).

Die Ergebnisse der HCVpp Neutralisationsstudien im Vergleich lassen insgesamt keine eindeutige Tendenz der Neutralisationseffizienz, im Bezug auf den Therapiestatus oder den zeitlichen Therapieverlauf eines Patienten, erkennen. Insbesondere ist hier auch die starke Streuung der individuellen Werte erkennbar.

Es lässt sich kein Zusammenhang zwischen der Neutralisationseffizienz, dem zeitlichen Therapieverlauf und dem Ausgang der antiviralen Therapie (Therapiestatus) herstellen.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von HCVpp und ihre Verwendung zur Messung von HCVpp-neutralisierenden Antikörpern im Serum HCV-infizierter Patienten.
Hierzu wurden zunächst entsprechende HCVpp hergestellt und das System hinsichtlich der Ausbeute des Herstellungsprozesses optimiert. Zusätzlich wurde die Infektiosiät dieser so gewonnenen HCVpp in verschiedenen Suspensionszelllinien überprüft. Im nächsten Schritt wurde ein Testsystem zur Messung HCV-neutralisierender Antikörper mit diesen HCVpp etabliert und hinsichtlich seiner Spezifität anhand ausgewählter Patientenseren überprüft. Im letzten Teil wurden ausgewählte Patientenproben, von denen zu definierten Zeitpunkten ihrer Therapie Proben vorlagen, in den Neutralisationstests eingesetzt.

5.1. Die HCV-Infektion

Hepatitis B und C gehören zu den bedeutendsten chronischen Viruserkrankungen des Menschen.
Seit der Entdeckung des Hepatitis C Virus sind nun mehr als zwanzig Jahre vergangen; jedoch sind neue Erkenntnisse bezüglich des Infektionsverlaufs und der Therapie weiterhin dringend erforderlich, denn von der Virushepatitis C sind

weltweit ca. 170 Millionen Menschen betroffen; das sind etwa 3 % der Weltbevölkerung (WHO; 1999).

In der HCV-Therapie wird seit 1986 Interferon alpha eingesetzt, welches jedoch nur in 20 % der Fälle zu einer Heilung führte (Manns *et al*.; 2001). Insbesondere bei Infektionen mit dem HCV-Genotyp 1 waren die Erfolgsaussichten ungünstig. Dieser Sachverhalt konnte durch den Einsatz des Nukleosidanalogons Ribavirin, in einer Kombinationstherapie mit Interferon alpha, deutlich verbessert werden. Außerdem wurde durch die Verwendung von PEGInterferon eine bessere Wirkung erzielt. Trotzdem ist diese Therapie in nur 50 % der Fälle erfolgreich (Manns *et al*.; 2001; Fried *et al*.; 2002).

5.1.2. Methoden zur Erforschung von HCV

Die Erforschung von HCV wurde in der Vergangenheit insbesondere durch den Umstand erschwert, dass das Virus sich nur ungenügend in der Anzucht auf Zellkulturen vermehrt und somit kein einfaches und geeignetes Versuchssystem, wie bei vielen anderen Viren, zur Verfügung stand. Eine weitere Möglichkeit zur *in vivo* Viruserforschung bieten Tiermodelle, wobei insbesondere Kleintiermodelle (Ratten und Mäuse) von großem Vorteil sind. Das Tier, welches jedoch für die Infektionsversuche mit HCV am besten geeignet ist, ist der

Schimpanse. Ethische Gründe und die Tatsache, dass das Arbeiten mit solchen großen Tieren schwierig und teuer ist, machen dieses *in vivo* Tiermodell nur begrenzt nutzbar.

Eine kleine Halbaffenart, die *Tupaia spec*., sind neben dem Schimpansen eine weitere Tierart, welche mit HCV infiziert werden kann. Diese Baumspitzhörnchen sind keine Nagetiere, sondern phylogenetisch eng mit den Affen verwandt. HCV ist imstande primäre *Tupaia* Hepatozyten zu infizieren, jedoch haben die wilde Natur dieser Tiere und ein schlechtes Reproduktionsverhalten in der Laboratoriumsgefangenschaft dazu geführt, dass sie keine Verbreitung erfahren haben (Brass *et al.*; 2007).

Einige Zellkultur-Infektions-Versuche wurden unternommen, die hauptsächlich darauf beruhten, primäre Zellkulturen oder primäre Zellen von chronisch infizierten Patienten zu infizieren und/oder anzuzüchten. Die Ergebnisse waren jedoch unbefriedigend, da sich diese Systeme als schwer reproduzierbar erwiesen und außerdem nur eine geringe Virusreplikation nachgewiesen werden konnte (Bartenschlager & Lohmann*;* 2000).

Vor einiger Zeit wurden neue Wege gefunden die eine intensivere Erforschung von HCV voranbringen. Eine Möglichkeit bieten HCV Replicons. Diese sind subgenomische, selbst-replizierende HCV RNAs die ein detailliertes Studium - insbesondere der molekularen

Virusreplikation in der Zellkultur - erlauben, da sie mit einem Markergen ausgestattet sind. Replicons kodieren für alle bekannten viralen Enzyme, die als Ziel einer antiviralen Therapie infrage kommen und sie können in stabilen Zelllinien für Jahre vermehrt werden (Bartenschlager & Lohmann; 2001). Einer Arbeitsgruppe ist es gelungen, das gesamte Genom eines Hepatitis C Virus, Genotyp 2a, zur Replikation und Produktion viraler Partikel in einer empfänglichen Zelllinie zu bringen. Die Entwicklung dieser sogenannten HCVcc ermöglicht erstmals *in vitro* Studien über den viralen Lebenszyklus von HCV und die Erforschung und Entwicklung antiviraler Medikamente (Lindenbach *et al*.; 2005, Lohmann; 2008).

5.1.3. Pseudopartikel

HCVpp sind infektiöse, aber replikations-inkompetente, genetisch markierte HCV-Pseudopartikel, die unmodifizierte E1 und E2 Hüllproteine auf retroviralen oder lentiviralen *Core*partikeln tragen. Sie sind für Zellkulturen hochinfektiös und erlauben eine funktionelle Erforschung der HCV E1 und E2 Glykoproteine und deren biologischen Funktionen; wie zum Beispiel des "*viral entry*".

Diese Pseudopartikel bieten die Möglichkeit gezielt Forschung mit HCV zu betreiben. Insbesondere mit der Arbeit der Gruppe

um Bartosch *et al*. (2003) sind in den letzten Jahren große Fortschritte, auch im Bereich des HCV-Neutralisationstests (Von Hahn *et al*.; 2007) gemacht worden. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren diese noch nicht bekannt oder abzusehen. Vorteile sind: die einfache Produktion in großen Mengen mit vergleichbar hohen infektiösen Partikelzahlen; eindeutige Detektion durch eine standardisierte Methode, wie z. B. FACS und Arbeiten in einer günstigen Sicherheitseinstufung durch replikations-inkompetente Partikel (Berger *et al*.; 2009; Bartosch *et al*.; 2003; Sandrin *et al*.; 2005).

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass dieses etablierte System eine geeignete, verlässliche und standardisierbare Methode zur Messung der humoralen Immunantwort HCV infizierter Patienten ist. Von Hahn *et al*. (2007) setzte HCVpp ein und beschreibt sie als ideales Werkzeug, um die nAK-Antwort auf eine HCV-Infektion zu untersuchen. Sie können so hergestellt und modifiziert werden, dass sie verwandte, unterschiedliche Glykoproteinsequenzen aufweisen und einen direkten Neutralisationsvergleich (autolog oder auch heterolog) zwischen den einzelnen Varianten ermöglichen. HCVpp bieten weitere vielfältige Einsatzbereiche in der HCV-Forschung. In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass HCVpp eine starke humorale und zelluläre Immunantwort hervorrufen.

Mit Baboon Affen wurden HCVpp Immunisierungsversuche durchgeführt. Nach vier Immunisierungen, während einer Periode von acht Monaten, entwickelten alle Tiere eine spezifische humorale und zelluläre Immunantwort. Diese Versuche zeigten, dass HCVpp ein potentes Immunogen darstellen und für die zukünftige HCV-Forschung ein wichtiges Werkzeug darstellen können (Jeong *et al*.; 2004).
Desweiteren wurden die in vorliegender Arbeit produzierten HCVpp ebenfalls in einer parallelen Pilotstudie des Institutes für medizinische Virologie der Johann Wolgang Goethe Universitätsklinik, mit chronisch HCV-infizierten Patientenproben für die Untersuchung der zellulären Immunantwort eingesetzt. Hierzu wurden die HCVpp als Antigene zur zytotoxischen T-Zellen-Stimulation erfolgreich verwendet. Es konnten dadurch wichtige Erkenntnisse zur spezifischen CD4+ und CD8+-T-Zell Immunantwort gewonnen werden. Diese Ergebnisse wurden, gemeinsam mit Teilen aus vorliegender Arbeit, in Berger *et al*. (2009) veröffentlicht.

5.2. Etablierung und Herstellung der HCVpp

Die Versuche der vorliegenden Arbeit bestätigten, dass Retroviren und insbesondere Lentiviren, als Grundlage zur Herstellung von Hepatitis C viralen Pseudopartikeln gut geeignet sind (s. Kapitel 4.1.1.). Sie besitzen die Eigenschaft

virale Glykoproteine in ihr *Core* zu inkorporieren und die Möglichkeit genetische Marker in die DNA infizierter Zellen zu integrieren (Sandrin *et al*.; 2002; Sung *et al*.; 2003; Negre & Cosset; 2002). Bei Basisversuchen stellte sich heraus, dass HCVpp, die auf der Grundlage von lentiviralen Vektoren hergestellt wurden, eine höhere Infektiosität besitzen, als HCVpp die auf der Grundlage von MLV-retroviralen Vektoren generiert wurden. Die HCVpp auf lentiviraler Grundlage erreichten infektiöse Partikelzahlen, die etwas mehr als eine Log_{10}-Stufe höher lagen als die HCVpp auf MLV-retroviraler Basis. Es wird vermutet, dass der Grund für diesen Sachverhalt im Zusammenfügen der Hüllproteine mit dem Nukleokapsid liegt; doch sind hierfür verantwortliche Mechanismen noch unzureichend bekannt (Sandrin *et al*.; 2002).

Eine weitere Erhöhung der infektiösen Partikelzahlen konnte durch die Zugabe des Polykations Polybrene erreicht werden (s. Abb. 12 und 13). Dieses wird bei HCVpp Infektionsversuchen den Zellkulturmedien häufig in einer Konzentration von 4 µg/ml zugesetzt (Flint *et al*.; 2004; Von Hahn *et al*.; 2007). Elektrostatische Kräfte spielen eine wichtige Rolle an der Zelloberfläche; besonders während der Interaktion des Partikels mit der Zelle in der Phase der „Anheftung“ und des „Eintritts“. Die verbesserte Infektiosität

und die Erhöhung der Partikelzahlen durch Polybrene lassen vermuten, dass diese Kräfte in Gegenwart des Polykations positiv beeinflusst werden. Jedoch scheint nach einer gewissen Menge (ab 20 µg/ml Polybrene) eine Sättigung erreicht zu sein; mikroskopische Hinweise auf eine mögliche Zytotoxizität konnten nicht erkannt werden. Es kann dann keine Steigerung mehr beobachtet werden. Auch konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung der zu transfizierenden Zellen mit Polybrene einen Anstieg der infektiösen Partikelzahlen hervorruft. Somit konnte diese Studie zu einer Optimierung des Testsystems beitragen.

Eine Steigerung der infektiösen HCVpp Zahlen konnte erwartungsgemäß auch durch Aufbereitung des HCVpp-haltigen Zellkulturüberstandes durch die zwei ½ Stunden Ultrazentrifugation erwirkt werden (Bartosch *et al*.; 2003). Hierzu wurden Infektionsversuche (s. Abb. 14) mit unterschiedlichen Volumina des konzentrierten Überstandes durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die infektiösen Partikelzahlen zumeist in einem Bereich befanden, der mehr als eine Log_{10}-Stufe höher lag, als in den unkonzentrierten Überständen. Die besten Werte wurden mit 5 µl ultrazentrifugiertem Überstand erzielt. Größere Volumina des konzentrierten und gereinigten Überstandes konnten keine Verbesserung der infektiösen Partikelzahl bewirken.

Eine Steigerung der Infektiosität durch diese Methode ist auf ein Maximum limitiert.
Durch weitere Versuche (s. Kapitel 4.1.4. und Abb. 15) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Verwendung von hochwertigen Zellkulturnährmedien und der Zusatz von FKS, welches essenzielle Wachstumsfaktoren enthält, einen positiven Einfluss auf die Kondition der Empfängerzellen und damit auf die Infektiosität der HCVpp haben.

5.3. Zelltropismusstudien

In vivo ist beschrieben dass neben Hepatozyten auch andere Zellen mit HCV infizierbar sind (Zignego *et al*.; 1997). Daher wurden verschiedene B-Zelllinien, Suspensionszellen menschlicher Herkunft, auf ihre Empfänglichkeit für eine Infektion mit HCVpp und damit der mögliche Einsatz im Neutralisationstest, untersucht (s. Kapitel 4.2. und Abb. 16). Die Verwendung von Suspensionszellen hätte die notwendigen Arbeitsschritte verkürzt, da das Ablösen der Zellen mittels Trypsin entfallen wäre.
HCV wird für extrahepatische Krankheitsmanifestationen verantwortlich gemacht, und es wird ein Zusammenhang mit einem HCV-Lymphotropismus gesehen. HCV RNA konnte bereits in mononukleären Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen werden und wird bei HCV Patienten für die

Pathogenese des B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms mitverantwortlich gemacht (Zignego *et al*.; 1997).

Die in dieser Arbeit verwendeten B-Zelllinien konnten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht effektiv mit HCVpp infiziert werden. Dies steht im Kontrast zu einer Infektion mit dem Wildvirus, da hier virale RNA in mononukleären Zellen nachgewiesen werden konnte (Zignego *et al*.; 1997). Die Positivkontrollen mit anderen Pseudopartikeln (VSVpp) zeigen jedoch, dass die Infektion hier erfolgreich verlaufen kann.

Ein anderes HCVpp Model (VSV/HCVpp), welches transmembrane und zytoplasmatische Domänen von VSV G Glykoproteinen enthält und keine retro- oder lentiviralen Komponenten, zeigt ebenfalls einen deutlichen Tropismus humane Leberzelllinien zu infizieren. Diese VSV/HCVpp sind aber außerdem in der Lage eine umfassende Auswahl von Säugetierzelllinien, auch solche, die nicht von Lebergewebe stammen, zu infizieren (Zeisel *et al*.; 2007).

Dies demonstriert, dass die verwendeten B-Zellen, im Gegensatz zu den Huh-7 Leberzellen, für die Infektion mit diesen HCVpp unter den bezeichneten Bedingungen nicht geeignet sind und daher nicht im Neutralisationstest eingesetzt werden können. Gründe hierfür könnten, außer die Auswahl der für die Pseudotypen verwendeten Vektoren, ein spezieller Tropismus verschiedener mononukleärer Zellen

oder verschiedener Genotypen sein (Zignego *et al*.; 2007); oder auch die Abwesenheit notwendiger aktivierender Substanzen die für den Infektionsschritt notwendig sein könnten (Maurice *et al*.; 2002).

5.4. Messung neutralisierender Antikörper gegen HCVpp mittels FACS Analyse

Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurde ein Bewertungsschema für die Neutralisationsintensität entworfen (s. Ergebnisteil, Kapitel 4.3.), das sich an der Arbeit anderer Arbeitsgruppen (Bartosch *et al*.; 2003; Lavillette *et al*.; 2005) orientiert und die Darstellung der Versuchsergebnisse vereinfacht. Hierfür wurde die Stärke der errechneten Neutralisation in drei Stufen eingeteilt: + = mäßige Neutralisation, diese liegt in einem Bereich von 20-40 %; ++ = gute Neutralisation, diese liegt in einem Bereich von 40-70 %; +++ = sehr gute Neutralisation, diese liegt in einem Bereich von 70-100 %. Werte, die unter einer Neutralisation von 20 % lagen, wurden als negativ gewertet. Die Neutralisationsstärke wurde anhand der mitgeführten negativen Kontrollseren ermittelt, denn hier wurde keine Neutralisation beobachtet.
Das in vorliegender Arbeit angewandte Bewertungsschema veranschaulicht die erzielten Ergebnisse in einer geeigneten und vereinfachten Weise; hierfür wurden die Ansätze und

Schemata der im Folgenden benannten Arbeitsgruppen verwendet.

Bartosch *et al.* (2003), die ebenfalls nach der in dieser Arbeit beschrieben und so vergleichbaren Methodik und Detektion mittels FACS arbeiteten, haben mit HCVpp und Patientenseren Neutralisationsstudien durchgeführt. Sie gaben ihre Ergebnisse als Durchschnitt der Inhibitionstiter in Prozent an; wobei diese anhand von Kontrollseren gesunder Individuen ermittelt wurden. Diese beschrieben das Ergebnis einer Reaktion als gut, wenn die Hälfte der den Proben zugegebenen HCVpp inhibiert wurde. Sie stellten erst eine Inhibition fest, wenn mehr als 20 % der enthaltenen HCVpp neutralisiert wurden.

Lavillette *et al*. (2005) ermittelten ihre Daten, indem sie HCVpp in Abwesenheit von humanem Serum auf Zellkulturen inkubierten und die positiv infizierten Zellen als 100 % infektiös bezeichneten. Die Methodik der Neutralisationsversuche richtete sich nach den Angaben von Bartosch *et al*. (2003); sie wurden jedoch durchgeführt, um die frühen Infektionsschritte von HCV zu untersuchen.

Diese unterschiedlichen Auswertungsansätze führen dazu, dass ein genauer Vergleich der Ergebnisse und Daten schwierig ist. Es ist jedoch möglich eindeutige Ergebnisse übereinstimmend zu erfassen und zu vergleichen, wie z. B. eine starke oder gar keine Neutralisation. Um die gewonnenen

Ergebnisse mit den Daten anderer Autoren vergleichen zu können müsste ein einheitliches Bewertungsschema entwickelt werden, welches die unterschiedlichen Ansätze berücksichtigt.

Im Folgenden beschriebene Schwierigkeiten, die im Zusammenhang mit der Auswertung des Neutralisationstests entstanden, konnten mithilfe des Bewertungsschemas minimiert werden.

In den Neutralisationsversuchen mit HCV infizierten Patientenseren konnte keine 100 %ige Neutralisation erreicht werden; diesen Umstand haben Bartosch *et al*. (2003) und Lavillette *et al*. (2005) ebenfalls beobachtet. Sie führen dies unter anderem auf die zirkulierende Population von HCV-Quasispezies und auf posttranslationale Modifikationen der HCV E1 und E2 Strukturproteine *in vivo* zurück.

Außerdem war eine eindeutige Ausverdünnung der Seren mit steigenden Verdünnungsstufen nicht möglich. Teilweise zeigten HCV-negative Seren (AB-Serum) in der geringsten Verdünnungsstufe eine leichte Inhibition der HCVpp-Infektiosität. Es ist davon auszugehen, dass im Serum Störfaktoren enthalten sind die Einfluss auf die HCVpp Infektiosität ausüben und diese negativ beeinflussen.

Um diese Begebenheiten zu berücksichtigen, wurden Vorversuche mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen durchgeführt und so eine geeignete und repräsentative

Verdünnung für die klinischen Patientenstudien gewählt, die 1:500 Verdünnung.
Zur Etablierung des Testsystems, bei dem neutralisierende Antikörper aus Patientenseren die funktionalen HCV-Glykoproteine auf den HCVpp als Zielstrukturen erkennen (Op De Beeck *et al*.; 2004) und neutralisieren sollen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

Hierbei wurde geprüft, ob die Infektiosität der HCVpp in Anwesenheit von zehn anti-HCV negativ getesteten Patientenseren (s. Tab. 10 und Abb. 17) beeinflusst wird. Wie zu erwarten konnte keinerlei Neutralisation der HCVpp durch die Patientenseren festgestellt werden. Im Gegenteil war die Infektiosität der HCVpp mit Patientenserum z. T. höher als im Vergleich zu der Kontrolle ohne Serum, die zur Berechnungsgrundlage diente.
Im Hinblick auf die Einsetzbarkeit der HCVpp in der klinischen Diagnostik ist dies eine wichtige Erkenntnis, denn sie zeigt, wie in Berger *et al*. (2009) veröffentlicht, dass dieses Testsystem zuverlässig auf eventuell im Serum enthaltene Antikörper reagiert und kein falsch positives Ergebnis zu erwarten ist.
Ebenso wurde untersucht (s. Abb. 18), ob die Seren von Patienten die mit den Genotypen 1a und 1b (s. Tab. 12) infiziert sind eine unterschiedliche Neutralisation der HCVpp

(Genotyp 1a) bewirken. Alle Patientenproben hatten Einfluss auf die Infektiosität der HCVpp. Die Neutralisationsfähigkeit der mit HCV 1b infizierten Patientenseren lag etwas unterhalb derer der 1a Patientenseren, jedoch konnte eine eindeutige Kreuzneutralisation nachgewiesen werden, welche für die routinemäßige Einsetzbarkeit in der Diagnostik eine wichtige Voraussetzung darstellt.

Untersucht wurde ebenfalls die Neutralisationsfähigkeit gegenüber anderen Genotypen (s. Abb. 19). Für diese Neutralisationsversuche von Antikörpern gegen HCV-Genotypen, die nicht dem Genotyp 1a der HCVpp entsprachen, wurden Serumproben von neun HCV-infizierten Patienten (s. Tab. 13) in den Verdünnungsstufen 1:50; 1:500 und 1:5.000 untersucht. Diese Patienten sind mit den HCV-Genotypen 2a/c, 3a und 4 infiziert. Vier dieser Patienten zeigten in der höchsten Verdünnungsstufe keine Neutralisation mehr (< 20 %). Acht Proben der Patienten zeigten in der 1:500 Verdünnungsstufe eine geringe bis deutliche Neutralisation der HCVpp. In der niedrigsten Verdünnungsstufe konnte mit allen Proben eine gute bis sehr gute Neutralisation (> 50 %) festgestellt werden. Es konnte also insbesondere in der 1:50 Verdünnung eine eindeutige Kreuzneutralisation, der in den Serumproben enthaltenen nAK mit dem 1a HCVpp, festgestellt werden. Dieses Ergebnis, dass Serumproben unterschiedlicher HCV-Genotyp infizierter

Patienten, HCVpp auf Genotyp 1a basierend, neutralisieren, wurde bereits durch Bartosch *et al*. (2003) beobachtet. In dieser Arbeit konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Neutralisation eines bestimmten HCV-Genotyps bessere Ergebnisse zeigte als ein anderer. Jedoch besteht die erwartungsgemäße Tendenz, dass die Neutralisation der beiden Genotyp 1a Seren etwas bessere Neutralisationsergebnisse (s. Abb. 18) erzielte, als die der beiden Genotyp 1b Seren, da bei der Herstellung der HCVpp Hüllproteine von HCV-Genotyp 1a verwendet wurden. Bartosch *et al.* (2003) konnten ebenfalls feststellen, dass die nAK-Antwort des gleichen HCV-Genotyps stärker ausgeprägt war, als die gegenüber dem heterologen HCV-Genotyp der verwendeten HCVpp. Trotz dieser Begebenheit zeigen diese Versuche, dass eine ausreichende Kreuzneutralisation der HCVpp erzielt werden kann, sodass im Patientenserum enthaltene HCV Antikörper unabhängig vom infizierenden HCV-Genotyp nachweisbar sind.

Untersucht wurden weiterhin Serumproben von Patienten (s. Tab.13), deren serologisches anti-HCV-Screening Resultat im Immunoblot (s. Kapitel 3.1.10. und 3.1.10.5.) nicht eindeutig bestätigt werden konnte und die somit serologisch als “nicht eindeutig“ eingestuft wurden. Um die Diagnose weiter abzusichern, wurde daher eine PCR zum direkten Nachweis von HCV-RNA durchgeführt. In allen Patientenseren, außer in

dem des Patienten 4s, war mittels HCV-PCR keine HCV RNA nachweisbar. Im Serum des Patienten 4s dagegen war HCV RNA als Zeichen einer aktiven Infektion nachweisbar.

Mögliche Ursachen für die uneindeutige Reaktion dieser Patientenseren im HCV-Screening ELISA bzw. Immunoblot der Routinediagnostik können sein: 1. eine unspezifische Reaktion 2. eine frische Serokonversion d. h. es sind noch nicht genügend Antikörper gebildet (jedoch nicht bei negativer PCR) 3. eine verzögerte Serokonversion bei starker Immunsuppression (dies ist vermutlich bei Patient 4s der Fall) 4. eine späte Rekonvaleszenz und daher der Verlust der Antikörper (Serumnarbe) nach Ausheilung der Infektion (Patient 10s).

Die Versuche (s. Kapitel 4.3.3. und Tab. 13), mit dem Ziel durchgeführt, festzustellen, ob der HCVpp Neutralisationstest diese anti-HCV-Screening Reslutate bestätigen würde, ergaben, dass neun der untersuchten Seren die HCVpp nicht neutralisierten; was mit den auch nur grenzwertigen Resultaten in den zusätzlich durchgeführten Immunoblots korrelliert und für eine unspezifische Reaktion in den anti-HCV-Screening Tests spricht. Dieses Ergebnis war erwartungsgemäß. Hervorzuheben ist das Serum des einen Patienten (Pat 4s), welches zu einer deutlichen Inhibition der HCVpp Infektiosität führte. Einzig bei diesem Patienten, der gleichzeitig mit HIV koinfiziert war, konnte eine HCV-Infektion,

auch mittels PCR, bestätigt werden. Vermutlich kommt die verhältnismäßig schwache Reaktion im anti-HCV-Screening Test durch eine HIV-bedingte Immunsuppression zustande; jedoch konnten die HCVpp eindeutig, durch im Serum enthaltenen AK, neutralisiert werden. Das Resultat dieser Versuche beweist, dass HCVpp geeignet sind HCV Antikörper in Patientenseren nachzuweisen und wurde in Berger *et al*.; (2009) veröffentlicht. Ein Einsatz dieses Testsystems in der Diagnostik, zum Beispiel um unklare serologische Befunde zu klären, wäre möglich.

Um das HCVpp-Neutralisationstestsystem weiterhin zu optimieren wurde es weiteren Versuchen unterzogen.

Flaviviren sind bekannt dafür, dass Seren von infizierten Patienten in Antikörpertests für andere Flaviviren kreuzreagieren können. Dieser Umstand kann zu Problemen in der virologischen Diagnostik führen, da durch zunehmenden Reiseverkehr auch Patientenseren auf Erreger, die normalerweise nicht in Deutschland vorkommen, z. B. Dengue-Viren, untersucht werden (Doerr & Gerlich; 2002). Deshalb wurde das in der vorgelegten Arbeit eingesetzte Versuchssystem der HCVpp unter diesem Aspekt untersucht und Versuche zur Infektiosität der HCVpp, nach Inkubation mit 16 Seren (s. Tab. 14) von mit Dengue Virus infizierten Patienten, unternommen. Einige dieser Patienten wiesen zusätzlich Antikörper gegen das FSME Virus auf.

Es konnte keinerlei Kreuzneutralisation der HCVpp, mit den gegen andere Flaviviren gerichteten Antikörpern der untersuchten Patientenseren, beobachtet werden (s. Abb. 20). Dieses wiederum stellt ein positives Kriterium zur Einsetzbarkeit der HCVpp in der virologischen Diagnostik dar. Eine deutliche Kreuzneutralisation mit Seren von HCV Patienten, die mit HCV-Genotypen bzw. Subtypen infiziert sind, die nicht dem Genotyp 1a des verwendeten HCVpp entsprechen, konnte jedoch bestätigt werden.

In einem weiteren Versuchsansatz (s. Kapitel 4.3.5.) wurden Serumproben von LTNP-HIV Patienten, die ebenfalls mit HCV koinfiziert sind, auf ihre Reaktivität mit HCVpp untersucht (s. Tab. 15).

Die Seren der HCV 1a bzw. 1b und HIV koinfizierten Patienten wiesen alle eine sehr gute Neutralisation (s. Abb. 21) in der geringsten Verdünnungsstufe auf. Die Neutralisation war sogar in der höchsten Verdünnungsstufe bei einigen Patienten deutlich besser, als bei dem positiven Kontrollserum.

LTNP Patienten verfügen über bestimmte Faktoren die dazu beitragen, dass gewisse Parameter des Immunsystems stabil bleiben und das Fortschreiten der HIV-Erkrankung nur sehr langsam stattfindet (Vento *et al*.; 2004). Genetische Komponenten, die eine stärkere Resistenz oder eine wirkungsvollere Kontrolle des Immunsystems erwirken, werden als Ursache angenommen; hier kommen

insbesondere Rezeptor Mutationen und die gezielte Produktion von Antikörpern gegen hochkonservierte HIV-Regionen infrage (O`Connell *et al*.; 2009). Es scheint, dass diese Faktoren auch Einfluss auf die neutralisierende Antikörperantwort gegen HCV nehmen. Die Ergebnisse lassen auf eine starke neutralisierende Antikörperantwort gegen HCV schließen.

Durch diese Vorversuche konnte gezeigt werden, dass HCVpp ein geeignetes *in vitro* Testsystem darstellen mit denen gezielt und zuverlässig HCV Antikörper in Patientenseren erfasst werden können. Die Ergebnisse bestätigen, dass Seren mit einem positiven HCV-Infektionsnachweis die HCVpp (kreuz-) neutralisieren. Dagegen konnte keine Kreuzneutralisation mit Proben von Patienten, die positive Antikörpernachweise für andere Flaviviren aufwiesen, beobachtet werden. Alle untersuchten Seren von HCV-negativen Patienten wiesen keine signifikante Neutralisation auf. Daher könnte dieses System auch als Unterstützung zu den bestehenden Verfahren in der routinemäßigen virologischen Diagnostik zum Einsatz kommen und Informationen über die in den Patientenseren enthaltenen Antikörper liefern.

5.5. Klinische Neutralisationsstudie mit einem definierten Patientenkollektiv

Dieses Patientenkollektiv wurde ausgewählt, da die untersuchten HCV Patienten an einer klinischen Studie teilnahmen und Serumproben, die zu definierten Zeitpunkten entnommen wurden, vorhanden waren. Im Zusammenhang mit dem Therapiestatus der Patienten dieses Kollektivs sollte nach einem prognostischen Marker im Therapiemonitoring mithilfe des HCV-Neutralisationstests gesucht werden. Zum Beispiel, ob die Stärke der Neutralisation im Zusammenhang mit einem Ansprechen/ Versagen der Theapie gesehen werden könne.

Die immunmodulatorische Wirkung von IFN und Ribavirin wird im Zusammenhang mit der Stimulation des Immunsystems und dadurch der Bildung nAK diskutiert.

Die Möglichkeit jene Patienten zu erkennen, welche erfolgreich auf die Therapie ansprechen würden, war das Ziel dieser Versuche. Somit hätte ein Therapieversagen früher erkannt und die Therapie frühzeitig abgebrochen werden können, um Nebenwirkungen und hohe Kosten zu reduzieren.

5.5.1. Versuche mit den Patientengruppen „Responder, Non Responder und Relapse“

Die Untersuchung von Verlaufsproben HCV-Genotyp 1 infizierter Patienten (s. Kapitel 3.1.10.6. und 4.4.), im Rahmen einer einjährigen IFN-Ribavirin Therapie, zeigte keine signifikant unterschiedliche HCVpp-Neutralisation; weder im Verlauf der Therapie noch in Relation zum Therapieerfolg („*Response, Non-Response, Relapse*“) oder zur vorhandenen Viruslast (s. Abb. 22, 23 und 24).

Ein Vergleich der verschiedenen Patientengruppen (s. Abb.25) zeigte lediglich einen leichten Trend hin zu einer höheren Neutralisation der HCVpp vor und nach der Therapie, im Vergleich zu den Proben, die während der Therapie entnommen wurden. Die Probenentnahmen fanden zeitlich versetzt so statt (vor Therapiebeginn; während der einjährigen Behandlung und etwa ein halbes Jahr nach Abschluss der Therapie), dass eine signifikante Reaktion der Immunabwehr mit Bildung von neutralisierenden Antikörpern hier hätte detektiert werden können, da eine Serokonversion bei einer HCV-Infektion durchschnittlich mit ca. sechs Wochen (Netski *et al*.; 2005) und das Auftreten nAK mit etwa acht Wochen nach einer HCV-Infektion zu erwarten ist (Von Hahn *et al*.; 2007).

Bedauerlicherweise konnten bei diesem kleinen Patientenkollektiv keine kausalen Zusammenhänge zwischen der Höhe der neutralisierenden Antikörperantwort und dem Ausgang der Therapie hergestellt werden.

Jedoch besteht offenbar ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer frühen und breit angelegten neutralisierenden Antikörperantwort und dem Eliminieren des Virus (Zeisel *et al*.; 2007). Auch die Kontrolle der HCV-Infektion wird durch das Immunsystem beeinflusst; so wird das schnelle Voranschreiten der Krankheit mit einer mangelhaften Immunabwehr in Verbindung gebracht (Zeisel *et al.*; 2007). Ähnliches ist bei einer HIV-Infektion bekannt; hier werden nAK-Titer mit dem „nicht-Voranschreiten“ der Krankheit in Verbindung gebracht (Logvinoff *et al*.; 2004). Ein eindeutiges Ergebnis wäre hier wünschenswert gewesen und hätte als prädiktiver Marker ein wertvolles Hilfsmittel in der HCV-Therapie sein können.

Neuere Studien haben genau diesen Aspekt bestätigt. Sie wurden mit einem größeren Patientenkollektiv durchgeführt und zeigten einen Zusammenhang von höheren nAK-Titern und einem schnellen und anhaltenden Ansprechen auf die HCV-Therapie (Sasayama *et al*.; 2010).

In vorliegender Arbeit konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der gemessenen Viruslast und der Neutralisationsstärke ermittelt werden. Dies wurde ebenfalls

von Logvinoff *et al*. (2004) in Versuchen mit Schimpansen, die mit kloniertem HCV infiziert und mit deren Seren und autologen HCVpp Neutralisationsstudien durchgeführt wurden, beobachtet.

Um die genannten und weitere Punkte, wie den zeitlichen Zusammenhang des Anstiegs oder des Abfalls der nAK während der Therapie abzuklären, sind mehr Informationen nötig. Diese Informationen über die Kinetik einer HCV-Infektion könnte man in weiteren Studien, vor allem mit einem größeren Patientenkollektiv erhalten, denn diese sind wichtige Komponenten zur optimalen Therapieeinstellung (Forns *et al*.; 2005).

HCVpp haben sich als probates Medium gezeigt; beispielsweise um den Nachweis nAK in Patientenseren zu erbringen und eine Infektion, im uneindeutigen Falle zusätzlich zur PCR, sicher nachzuweisen.

Auffällig ist, dass es nie möglich war eine 100 %ige Neutralisation der HCVpp mit Patientenseren zu erzielen. Es ist zu vermuten, dass Modifikationen der Zielstrukturen (HCV E1 und E2 Glykoproteine) der nAK keine 100 %ige Neutralisation zulassen und das mögliche Vorhandensein einer Vielzahl von HCV-Quasispezies zu einer großen Varianz der im Serum enthaltenen AK geführt hat. Dennoch lassen sie eine deutliche Kreuzneutralisation erkennen. Bartosch *et al*. (2003) führten Versuche mit Patientenseren und mit

monoklonalen AK durch die eine spezifische Reaktion gegen HCV 1a Glykoproteine aufwiesen, welche entwickelt und selektiert wurden, um intrazelluläre E1 und E2 Komplexe zu neutralisieren. Es wurde eine > 70 % Reduzierung der Infektiosität gemessen. Die Infektiosität der HCVpp, so vermuten diese Autoren, wird über die E1 und E2 Hüllglykoproteine gesteuert. Auch konnten sie zeigen, dass die HCV 1a spezifischen monoklonalen AK nicht in der Lage waren HCV 1b pp zu neutralisieren (Bartosch *et al*.; 2003).
Den verwendeten HCVpp liegt der Genotyp 1a zugrunde; jedoch kann auch mit Patientenseren des gleichen Genotyps keine deutlich bessere Neutralisation, im Vergleich zu anderen Genotypen, beobachtet werden.

5.6. Ausblick

Die Entwicklung der HCVpp hat für die Hepatitis Forschung neue Möglichkeiten eröffnet. Durch diese Methode konnten dringend benötigte Versuche zur Grundlagenforschung des HCV generiert werden. Die HCV-Forschung, die durch das lange Fehlen eines geeigneten Infektions- und Zellkultursystems stark beeinträchtigt war, erfährt hierdurch in den letzten Jahren einen großen Wissenszuwachs. Über die Details des viralen Vermehrungszyklus des HCV ist immer noch zu wenig bekannt. Einige Kenntnisse gehen auf

Versuche mit einem adäquaten HCV-Modellvirus, dem Pestivirus BVD, zurück.

Die in dieser Arbeit erzeugten HCVpp stellen ein Surrogat-System dar, um in Patientenseren neutralisierende Antikörper zu messen. Dies konnte ebenfalls durch folgende Autoren bestätigt werden: Bartosch *et al*. (2003) und Berger *et al*. (2009). Die Produktion der HCVpp ist nicht sonderlich aufwendig. Sie kann innerhalb weniger Tage durchgeführt werden und ist nicht sehr kostenintensiv. Anschaffungskosten entstehen hauptsächlich in Form von Zellkulturbedarf und der verwendeten Kits. Voraussetzung ist jedoch, dass Geräte wie das FACS-Gerät und Zentrifugen vorhanden sind. Außerdem kann die Produktion in einer annehmbaren Sicherheitseinstufung (S2) durchgeführt werden, die in vielen Laboratorien bereits vorhanden ist. Die Durchführung des Neutralisationstests ist ebenfalls technisch leicht durchzuführen, verlangt jedoch zeitlichen Aufwand durch die vorgeschriebene Inkubationszeit von zwei Tagen, die aber bei biologischen Vorgängen als verhältnismäßig einzustufen ist. Die Auswertung des Tests, durch die Detektion des Markergens mittels FACS, ist nicht schwierig. Sie lässt sich jedoch nicht automatisieren und erfordert ebenfalls einen gewissen zeitlichen Aufwand von mehreren Stunden. Dieser dürfte auch sicher bei vielen Proben, wie sie in der klinischen Diagnostik anfallen, durch qualifiziertes Personal zu

bewältigen sein. Im Hinblick auf den Einsatz dieses Verfahrens in der Routinediagnostik eines Klinikums kann jedoch gesagt werden, dass es nicht als Standardmethode geeignet ist, wohl aber als besondere, zusätzliche Leistung in spezialisierten Institutionen angeboten werden könnte.

Wenn dieses System in einem Labor erst einmal etabliert ist und repräsentative und reproduzierbare Ergebnisse vorzuweisen sind, dann bietet es eine Vielzahl von Möglichkeiten in der HCV-Forschung; insbesondere in der Untersuchung der Immunantwort einer HCV-Infektion z. B. die Glykoproteine als Zielstrukturen für nAK und zur Erforschung der frühen HCV-Infektionsschritte z. B. in Form von Rezeptorstudien. Diese gewonnenen Ergebnisse können möglicherweise wichtige Informationen zur Verbesserung der Therapie oder zur Herstellung eines Therapeutikums liefern. Vorteil der Pseudopartikel ist, dass sie nach der jeweiligen Aufgabenstellung modifizierbar sind. Beispielsweise können aus dem Serum eines HCV-infizierten Patienten autologe Glykoproteine gewonnen, in dem Verpackungs-Vektor verwendet und in Studien eingesetzt werden.

Denkbar wäre ein potenzieller Einsatz der etablierten Methode zur Untersuchung von Immunglobulinpräparaten im Blutspendewesen oder unterstützend zur Klärung unspezifischer ELISA Resultate im Antikörper Screening. In der Wissenschaft, insbesondere bei der Erforschung der

molekularen Mechanismen der Antikörper vermittelten neutralisierenden Immunantwort einer HCV-Infektion, für die Entwicklung von Therapeutika und einer möglichen Vakzine sind die HCVpp eine Option, die lange Zeit nicht zur Verfügung stand und durch die die HCV-Forschung einen großen Wissenszuwachs erfahren hat.

6. Zusammenfassung

Hepatitisviren B und C stellen weltweit ein erhebliches medizinisches Problem und eine Bedrohung der Weltgesundheit dar. Insbesondere die Infektion mit HCV ist in der ganzen Welt eine der häufigsten Ursachen für chronische Lebererkrankungen. Der Erfolg der zumeist einjährigen Therapie mit PEG IFN und dem Nukleosidanalogon Ribavirin hängt von verschiedenen bisher noch unzureichend erforschten Faktoren (z. B. von dem infizierenden HCV-Genotyp) ab.

Die Erforschung des HCV war erschwert durch den Fakt, dass es lange Zeit nicht möglich war HCV in ausreichender Menge und stabil in der Zellkultur anzuzüchten. Um die dadurch bedingten Schwierigkeiten zu umgehen, wurden HCV pseudotypisierte Viren (HCVpp) entwickelt. Sie bieten die Möglichkeit, die funktionelle und infektiöse Form von HCV zu untersuchen, da sie diese imitieren und für bestimmte Zielzellen infektiös sind. Mithilfe dieser HCVpp wurde in vorliegender Arbeit ein Neutralisationstest etabliert. Es wurden definierte Kontrollseren und Seren von Patienten, die an einer

Therapiestudie teilgenommen hatten, auf ihre Neutralisationsfähigkeit untersucht.

Die HCVpp, die für die Versuche verwendet wurden, tragen E1 und E2 HCV Genotyp 1a Hüllproteine auf retroviralen oder lentiviralen *Core*partikeln und sind mit einem GFP-Markergen ausgestattet, welches leicht mittels durchflusszytometrischer Technik (FACS) detektierbar ist.

In vorliegender Arbeit wurden diese HCVpp, mit HCV 1a Hüllglykoproteinen, als Basis für den Neutralisationstest eingesetzt.

Zu Beginn musste das Testsystem etabliert und optimiert werden, um festzustellen, ob HCVpp überhaupt als verlässliches Neutralisationstest-Medium eingesetzt werden können. Hierzu wurden Versuche mit unterschiedlichen Vektoren, Zellkulturmedien und Polybrene, als Transfektionsverstärker, durchgeführt. Es zeigte sich, dass HCVpp mit lentiviralen *Core*partikeln als Vektor und mit hochwertigen Nährmedien hergestellt, die besten Ergebnisse in der Höhe der infektiösen Partikelzahlen ergaben. Außerdem konnten diese durch den Zusatz von PB ebenfalls verbessert werden.

Zusätzlich wurden Zelltropismusstudien mit verschiedenen B-Suspensionszelllinien und HCVpp ausgeführt, jedoch war keine der untersuchten Zelllinien für eine Infektion mit HCVpp empfänglich und daher nicht für den Neutralisationstest einzusetzen.

Nach der Optimierung der HCVpp wurden Neutralisationsversuche mit verschiedenen Patientenseren durchgeführt. Diese stammten von nicht HCV-infizierten Patienten, von Patienten, deren HCV-Screening Ergebnisse uneindeutig waren, von Patienten, mit unterschiedlichen HCV-Genotypen infiziert, von HIV/HCV-koinfizierten Patienten und von Patienten, die mit anderen Flaviviren (Dengue- und FSME-Virus) infiziert waren. Die Erprobung des Testsystems ergab, dass HCVpp zuverlässig durch die in den Serumproben enthaltenen nAk neutralisiert wurden und negative Proben verlässlich als solche erkannt wurden. Es konnte eine eindeutige Kreuzneutralisation mit anderen Genotypen beobachtet werden und eine Neutralisation durch Seren die AK gegen andere Flaviviren aufweisen ausgeschlossen werden.

Obwohl die Messung von anti-HCV Antikörpern als diagnostisches Mittel in der klinischen

Routinediagnostik eingesetzt wird, kann sie jedoch keine relevanten Informationen über den Krankheitsverlauf oder den möglichen Erfolg einer Therapie liefern. Ein Modellsystem zur Messung von neutralisierenden Antikörpern, wie in vorliegender Arbeit, könnten Erkenntnisse liefern, die es ermöglichen, rechtzeitig individuelle Behandlungen zu modifizieren und auf die Bedürfnisse des Patienten abzustimmen.

Aus diesem Grund wurden, mit dem oben beschriebenen System, Folgeseren von chronisch HCV-infizierten Patienten untersucht, die sich einer Therapie unterzogen haben und bei denen ein unterschiedlicher Ausgang der Therapie („andauerndes Ansprechen auf die Therapie“, „Rezidiv nach initialem Ansprechen auf die Therapie“ und „kein Ansprechen auf die Therapie“) beobachtet werden konnte. Obwohl neuere Literaturquellen mit einem größeren Patientenkollektiv einen Zusammenhang zwischen der Höhe nAK und dem Verlauf einer HCV-Therapie bestätigen, konnten die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse des HCVpp-Neutralisationstests keinen Hinweis als prognostischer Marker auf einen Zusammenhang des

Therapieverlaufs und der neutralisierenden Antikörperantwort geben.

Jedoch konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit erzeugten HCVpp ein Surrogat-System darstellen, um in Patientenseren nAK zu messen. Ein Einsatz dieses, auf HCVpp basierenden Neutralisationstests in der klinischen Routinediagnostik wäre eine Möglichkeit, um künftig größere Patientenkollektive zu untersuchen und größere Datenmengen erheben zu können. Dadurch könnten die HCV-Therapiemöglichkeiten erheblich verbessert und individueller angepasst werden. Denkbar wäre auch der Einsatz im Blutspendewesen, um in im Screening auffällige Proben zuverlässig auf eine HCV-Infektion zu untersuchen. Außerdem ist die Möglichkeit der Anwendung dieses Neutralisationstests zu HCV Forschungszwecken eine Option, die lange Zeit nicht zur Verfügung stand und weiterhin wichtige Erkenntnisse über eine HCV-Infektion liefern kann.

7. Summary

Hepatitis C virus pseudo-particles and their suitability in virological diagnostics

Hepatitis B and C viral infections are worldwide a formidable medical problem and a threat to global health. In particular the infection with HCV is universally one of the leading causes of chronic liver diseases.

The success of HCV infection therapy, which usually lasts one year with PEG IFN and the nucleoside analog Ribavirin depends on different, up until now insufficiently researched criteria (e. g. the infecting HCV-genotype).

The HCV research was hindered for a long time due to the fact that it was not possible to cultivate stable HCV in sufficient amounts in cell culture. To circumvent these difficulties surrogate models -HCVpp- have recently been developed. HCVpp gives the opportunity to study the functional and infectious active form of HCV, as they mimic HCV and are infectious for certain host cells.

In this research these HCVpp were used to establish a neutralization test. Defined control sera and sera from patients who had taken part in a study (because

of their different outcome of therapy) have been analyzed in their ability to neutralize the HCVpp.

The HCVpp used for these experiments have E1 and E2 HCV, genotype 1a, envelope glycoproteins on retroviral or lentiviral core particles and have GFP as a detection marker gene, which is easily detectable using flow cytometry technique (FACS). In this research these HCVpp, with HCV 1a envelope glycoproteins were used as the basis for the neutralization test.

At first the test system had to be established and opitimised to ascertain whether HCVpp could even be used as a reliable neutralization medium. Tests with various vectors, cell culture media and PB, as transfection enhancer, were carried out. It appeared that HCVpp with lentiviral core particles as the vector, produced in high quality cell culture media yielded the best infectious particles results. Furthermore the results were improved with the addition of PB.

Also the cell tropism with different B-cells and HCVpp was studied, however none of the examined cell lines were susceptible to the infection with HCVpp and could therefore not be used for the neutralization test.

After the optimization of the HCVpp neutralization experiments were carried out with various patient

sera. These were from non HCV infected patients, from patients with borderline results in the HCV Immunoblot, from patients infected with different HCV genotypes, from HIV/HCV coinfected patients and from patients who were infected with other Flaviviruses (Dengue- and Tick-Borne Encephalitis Virus). The trials of the HCVpp based test system had shown, that HCVpp were steadily neutralized by the neutralizing antibodies contained in the patient`s sera and that negative samples were found to be reliable. A distinct crossneutralization with other HCV genotypes was observed and a neutralization from antibodies, contained in sera infected with other Flaviviruses could be excluded.

Even though the detection of anti-HCV antibodies is used as a diagnostic tool in the clinical routine investigation, it could not provide relevant information about the course of the disease or the potential success of a therapy.

A system to measure neutralizing antibodies, as in this research, could lead to scientific findings, that would open new possibilities to modify individual treatments early enough and adjust to the patient`s needs. For this reason, follow up sera from chronically HCV infected patients, that underwent a therapy, with

different outcome (“responder”, “non responder” and “relapse”), were examined.,

Although other authors in newer studies with a greater pool of patients found a correlation between the level of neutralizing antibodies and the outcome of a HCV therapy, the results of the HCVpp based neutralization test in this research could not be used as a prognostic marker and did not show any correlation between the course of the therapy and the neutralizing immune response.

It could be demonstrated, that the HCVpp produced in this research represents a valuable surrogate system for the detection of neutralizing antibodies in patients sera. The application of this HCVpp based neutralization test used for clinical routine investigation of patients material, would be a possibility to study a larger pool of patients and to collect more data in the future. By this means the HCV therapy options could be significantly improved and individualized. The use of the HCVpp based neutralization test for the safe screening of blood for transfusion among blood donors or for the examination of conspicuous patients material for a HCV infection would be conceivable. To use this HCVpp based neutralization test for research is an

option which was not available for a long time and which could lead furthermore to important scientific findings.

8. Literatur

Ackermann, M. (2001). Visions on the future of veterinary virology. *Vet. Sci. Tomorrow* **1:** 1-10.

Alter, M. J. (1993). The detection, transmission, and outcome of hepatitis C virus infection. *Infect Agents Dis.* **3:** 155-166.

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

Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2001). Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res.* **52:** 1-17.

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

Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2005). Efficient hepatitis C virus cell culture system: What a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci USA* **102 (28):** 9739-9740.

Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. (2003). Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med.* **197:** 633-642.

Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. & Cosset, F.-L. (2003). Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *J Biol Chem.* **278:** 41624-41630.

Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T. & Liang, T. J. (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol.* **72:** 3827 - 3836.

Berg, T. (2004). Therapie der chronischen Hepatitis C. *Medizinische Welt* **7-8:** 220-227.

Berger, A. (2005). Virologische Labordiagnostik der Hepatitis C. *LaboratoriumsMedizin.* **29:** 28-32.

Berger, A., Giroglou, T., Leutz, A., Ogbomo, H., Pfaff, K., Teuber, G., Cinatl, J., van Laer, D. & Doerr, H. W. (2009). Measurements of HCV neutralizing antibodies and of HCV-specific CD4+ and CD8+ cells using hepatitis C virus pseudo-particles. *J Clinl Virol.* **46 (1):** 55-60.

Beyer, W., Westphal, M., Ostertag, W. & van Laer, D. (2002). Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol*. **76**: 1488-1495**.**

Brass, V., Moradpour, D. & Blum, H. E. (2007). Hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro models. *J Viral Hepat.* **14:** (Suppl. 1), 64-67.

Bretner, M. (2005). Existing and future therapeutic options for hepatitis C virus infection. *Acta Biochim Pol.* **52:** 57-70.

Bukh, J., Apgar, C. L., Gouindarajan, S. & Purcell, R. H. (2001). Host range studies of GB virus-B hepatitis agent, the closest relative of hepatitis C virus, in New World monkeys and chimpanzees. *J Med Virol.* **65 (4):** 694-697.

Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz (2003). Hepatitis-C-Virus (HCV) Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit **46:** 712-722.

Buonocore, L., Blight, K. J., Rice, C. M. & Rose, J. K. (2002). Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol.* **76:** 6865-6872.

Cacoub, P., Hausfater, P., Musset, L. & Piette, J. C. (2000). Mixed cryoglobulinemia in hepatitis C patients. *Ann Med Interne* **151:** 20-29.

Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244:** 359-362.

Clarke, B. (1997). Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* **78:** 2397-2410.

Cooper, S. Erickson, A., Adams, E., Kansopon, J., Weiner, A., Chien, D., Houghton, M., Parham, P. & Walker, C. (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* **10 (4):** 439-449.

Cristina, J., Lopez, F., Moratorio, G., Lopez, L., Vasquez, S., Garcia-Aguirre, L. & Chunga, A. (2005). Hepatitis C virus protein sequence reveals a lack of functional constraints an a variable pattern of amino acid substitution. *J Gen Virol.* **86:** 115-120.

Demaison, C., Parsley, K., Brouns, G., Scherr, M., Battmer, K., Kinnon, C., Grez, M., & Thrasher, A. J. (2002). High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency (correction of imunodeficiency) virus type 1-bases lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promotor. *Hum Gene Ther.* **13:** 803-813.

Doerr, H. W. & Gerlich, W. H. (2002). Medizinische Virologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder. *Thieme Verlag.* ISBN 3-13-113961-7: 226-227.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. & Naldini, L. (1998). A Third-Gerenation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *J Virol.* **72:** 8463-8471.

Epidemiologisches Bulletin Nr. 28; Robert Koch Institut; (2000). S. 227.

Epidemiologisches Bulletin Nr. 24; Robert Koch Institut; (2002). S. 198.

Ergänzungen zum Epidemiologischen Bulletin Nr. 50; Robert Koch Institut; (2007).

Epidemiologisches Bulletin Nr. 16; Robert Koch Institut; (2008). S. 127-130.

Epidemiologisches Bulletin Nr. 1; Robert Koch Institut; (2010). S. 10.

Epidemiologisches Bulletin Nr. 20; Robert Koch Institut; (2010). S. 177-190.

Farci, P., Alter, H., Wong, D., Miller, R., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M. & Purcell, R. (1994). Prevention of hepatits C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91 (16):** 7792-7796.
Flint, M., Thomas, J. M., Maidens, C. M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. S. & McKeating, J. A. (1999). Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol.* **73:** 6782-6790.

Flint, M., Logvinoff, C., Rice, C. M., & McKeating, J. A. (2004). Characterization of Infectious Retroviral Pseudotype Particles Bearing Hepatitis C Virus Glycoproteins. *J Virol.* **78:** 6875-6882.

Forns, X., Martínez-Bauer, E., Feliu, A., García-Retortillo, M., Martín, M., Gay, E., Navasa, M., Sánchez-Tapias, J., Bruguera, M. & Rodés, J. (2005). Nosocomial transmission of HCV in the liver unit of a tertiary care center. *Hepatology*. **41(1):** 115-122.

Fried, M. W., Shiffman, M., Rajender Reddy, K., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F., Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J. & Yu, J. (2002). Peginterferon Alfa-2a Plus Ribavirin For Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med.* **347:** 975-982.

Gallione, C. & Rose, J. K. (1983). Nucleotide Sequence of a cDNA Clone Encoding the Entire Glycoprotein from the New Jersey Serotype of Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol.* **46:** 162-169.

Giroglou, T., Cinatl, J., Rabenau, H., Drosten, C., Schwalbe, H., Doerr, H. W. & von Laer, D. (2004). Retroviral vector Pseudotyped with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus S Protein. *J Virol.* **78:** 9007-9015.

Graham, F. L. & van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52:** 456-467.

Grakoui, A., Hanson, H. & Rice, C. (2001). Bad Time for Bonzo? Experimental Models of Hepatitis C Virus Infection, Replication, and Pathogenesis. *Hepatology* **33(3):** 489-495.

Gretch, D. R. (1997). Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* **26:** 43-47.

Guha, C., Lee, S.-W., Chowdhury, N. & Chowdhury, J. (2005). Cell Culture Models and Animal Models of Viral Hepatitis. Part II: Hepatitis C. *Lab Anim (NY)* **34:** 39-47.

Haas, J., Park, E.-C. & Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol.* **6**: 315-324.

Häussinger, D & Niederau, C. (2001). Hepatitis C. 2. Auflage. *Blackwell Verlag*. ISBN 3-89412-484-9.

Hanenberg, H., Xiao, X., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I. & Williams, D. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med.* **2 (8):** 876-882.

Helle, F. & Dubuisson, J. (2008). Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci.* **65:** 100-112.

Hsu, M., Zang, J., Flint, M., Logninoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. & McKeating, J. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **100(12):** 7271-7276.

IEASL International Consensus Conference on Hepatitis C. (1999). *J. Hepatology* **30:** 95-96.

Inubushi, R., Shimano, R., Oshima, Y. & Adachi, A. (1998). The potential of various HIV-1 mutants to inhibit the replication of wild-type virus. *Biochem Biophys Res Commun.* **247:** 349-352.

Ismail, N., Fish, G. & Smith, M. (2004). Laboratory Evaluation of a Fully Automated Chemiluminescence Immunoassay for Rapid Detection of HBsAg, Antibodies to HBsAg, and Antibodies to Hepatitis C Virus. *J Clin Microbiol.* **42 (2):** 610-617.

Jeong, S., Qiao, M., Nascimbeni, M., Hu, Z., Rehermann, B., Murthy, K. & Liang, T. (2004). Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates. *J Virol.***78 (13):** 6995-7003.

Johanson, R. J., Gretch, D., Yamabe, H., Hart, J., Bacchi, C. E., Hartwell, P., Couser, W. G., Corey, L., Wener, M., Alpers, C. E. & Willson, R. (1993). Membranoproliferative Glomerulonephritis Associated with Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med.* **328:** 465-470.

Kaplan, D., Sugimoto, K., Newton, K., Valiga, M., Ikeda, F., Aytaman, A., Nunes, F., Lucey, M., Vance, B., Vonderheide, R., Reddy, K., Mckeating, L. & Chang, K. (2007). Basic-Liver, Pancreas, And Biliary Tract. Discordant Role of CD4 T-Cell Response Relative to Neutralizing Antibody and CD8 T-Cell Responses in Acute Hepatitis C. *Gastroenterology* **132:** 654-666.

Kato, N., Sekiya, H., Ootsuyama, Y., Nakazawa, T., Hijikata, M., Ohkoshi, S. & Shimotohno, K. (1993). Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope

glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol.* **67 (7):** 3923-3930.

Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., Dimassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M. R., Nowak, M. A., Shaw, G. M. & Saag, M. S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med.* **4:** 1302-1307.

Kuo, G., Choo, Q. L.; Alter, H. J.; Gitnick, G. L., Redeker, A. G.; Purcell, R. H.; Miyamura, T.; Dienstag, J. L.; Alter, M. J. & Stevens, C. E. (1989). An assay for circulating antbodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **244 (4902):** 362-364.

Lagging, L. M., Meyer, K., Owens, R. J. & Ray, R. (1998). Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J Virol.* **72:** 3539-3546.

Lavillette, D., Morice, Y., Germanidid, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J.-M. & Cosset, F.-L. (2005). Human Serum Facilitates Hepatitis C Virus Infection, and Neutralizing Response Inversely Correlate with Viral Replication Kinetics at the Acute Phase of Hepatitis C Virus Infection. *J Virol.* **79:** 6023-6034.

Lindenbach, B., Evans, M., Syder, A., Wölk, B., Tellinghuisen, T., Liu, C., Maruyama, T., Hynes, R., Burton, D., McKeating, J. & Rice, C. (2005). Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* **309 (5734):** 623-626.

Lindquist, L. & Vapalahti, O. (2008). Tick-borne encephalistis. *Lancet* **371 (9627):** 1861-1871.

Logvinoff, C., Major, M., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S., Alter, H., Rice, C. & McKeating, J. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**

(27): 10149-10154.

Lohmann, V. (2008). Hepatitis C: Methods and Protocols. Springer Verlag **510:** 145-163.

Lowings, D., Ibata, G., Neddham, J. & Paton, D. (1996). Classical swine fever virus diversity and evolution, *J Gen Virol.* **77:** 1311-1321.

Maertens, G., Dekeyser, F., Van Geel, A., Sablon, E., Bosmans, F., Zrein, M. & Pollet, D. (1998). Confirmation of HCV antibodies by the Line Immunoassay INNO-LIA™ HCV Ab III update; Methods im Molecular Medicine: Hepatitis C Protocols. *NJ: Howana Press. 1988.* **11-26**.

Maier, K. P. (2002). Akute und chronische Hepatitis C. 2. Auflage, *Thieme Verlag,* ISBN: 13-9783131161727, 8-21.

Mancini, N., Diotti, R., Perotti, M., Sautto, G., Clementi, N., Nitti, G., Patel, A., Ball, J., Clementi, M. & Burioni, R. (2009). Hepatitis C Virus (HCV) Infection May Elicit Neutralizing Antibodies Targeting Epitopes Conserved in All Viral Genotypes. *PLoS One.* **4(12):** 8254.

Manns, M. P., McHutchinson, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M.-H., Albrecht, J. K. & the International Hepatitis Interventional Therapy Group (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358:** 958-965.

Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J. & Gomez, J. (1992). Hepatitis C Virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genom distribution. *J Virol.* **66:** 3225-3229.

Mast, E. E., Hwang, L-Y., Seto, D., Nolte, F. S., Nainan, O. N, Wurtzel, H & Alter, M. J. (2005). Risk Factors of Perinatal

Transmission of Hepatitis C Virus (HCV) and the natural History of HCV Infection Aquired in Infancy. *J Infect Dis.* **192:** 1880-1889.

Maurice, M., Verhoeyen, E., Salmon, P., Trono, D., Russell S. J. & Cosset, F. L. (2002). Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood* **99(7):** 2342-2350.

Memon, M. I. & Memon, M. A. (2002). Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat.* **9:** 84-100.

Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J. (1982). Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Res*. **42:** 3858-3863.

Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. & Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-267.

Negre, D. & Cosset, F. (2002). Vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV). *Biochimie*. **84 (11):** 1161-71.

Netski, D., Mosbruger, T., Depla, E., Maertens, G., Ray, S., Hamilton, R., Roundtree, S., Thomas, D., McKeating, J. & Cox, A. (2005). Humoral Immune Response in Acute Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis.* **41:** 667-675.

Numa, F., Hirabayashi, K., Tsunaga, N., Kato, H., O'Rourke, K., Shao, H., Stechmann-Lebakken, C., Varani, J., Rapraeger, A. & Dixit, V.M. (1995). Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res.* **55:** 4676-4680.

O`Connell, K. A., Bailey, J. R., & Blankson, J. N. (2009). Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol Sci.* **30 (12):** 631-637.

Offergeld, R., Faensen, D., Ritter, S & Hamouda, O. (2005). Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis C And Hepatitis B Infections Among Blood Donors in germany 2000-2002: Risk Of Virus Transmission And The Impact Of Nucleic Acid Ampilfication Testing. *Euro Surveill.* **10 (2):** 8-11.

Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H. & Purcell, R. H. (1991). Nucloetide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **88:** 3392-3396.

Ogino, M., Ebihara, H., Lee, B-H., Araki, K., Lundkvist, A., Kawaoka, Y., Yoshimatsu, K. & Arikawa, J. (2003). Use of Vesicular Stomatitis virus Pseudotype Bearing Hantaan or Seoul Virus Envelope Proteins in a Rapid and Safe Neutralization Test. *Clin Diagn Lab Immunol.* **10:** 154-160.

Op De Beeck, A., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., Foung, S., Cosset, F.-L. & Dubuisson, J. (2004). Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *J Virol.* **78 (6):** 2994-3002.

Pawlotsky, J.-M. (2002). Use and Interpretation of Virological Tests for Hepatitis C. *Hepatology* **36:** 65-73.

Pegoraro, L., Matera, L., Ritz, J., Levis, A., Palumbo, M. & Biagini, G. (1983). Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *J Natl Cancer Inst.***70 (3):** 447-453.

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D. & Pawlotsky, J.-M. (2004). Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology* **39:** 5-19.

Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, G., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. & Bartenschlager, R. (2002). Persistent and transient replication of full-lenght hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol.* **76:** 4008-4021.

Purcell, R. (1997).The Hepatitis C Virus: Overview. *Hepatology* **26:** 11-14.

Rispeter, K., Lu, M., Behrens, S. E., Yoshida, C. F. T. & Roggendorf, M. (2000). Hepatitis C Virus Variability: Sequence Analysis of an Isolate after 10 Years of Chronic Infection. *Virus Genes.* **21:** 179-188.

Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shin-I, T., Simmonds, P., Smith, D., Stuyver, L., & Weiner, A. (1998). Classification, nomenclature, and databae development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *Arch Virol.* **143:** 2493-2503.

Rolle, M. & Mayr, A. (2002). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage, *Enke Verlag*, ISBN: 3830410603. 251-266.

Sambrook, J. & Gething, M. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* **342 (6247):** 224-225.

Sanders, D. A. (2002). No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr Opin Biotechnol.* **13:** 437-442.

Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Nègre, D., Le Grand, R., Trono, D. & Cosset, F.-L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100:** 823-832.

Sandrin, V., Boulanger, P., Penin, F., Granier, C., Cosset, F-L. & Bartosch, B. (2005). Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *J Gen Virol.* **86:** 3189-3199.

Sasayama, M., Deng, L., Ryang Kim, S., Ide, Y.-H., Shoji, I. & Hotta, H. (2010). Analysis of Neutralizing Antibodies against Hepatitis C Virus in Patients who were treated with Pegylated-Interferon plus Ribavirin. *Kobe J Med Sci.* **56:** 60-66.

Schambach, A., Wodrich, H., Hildinger, M., Bohne, J., Kraeusslich, H. G. & Baum, C. (2000). Context-dependence of different modules for post-transcriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther.***2:** 435-445.

Schreiber, G. B., Busch, M. P., Kleinmann, S. H. & Korelitz, J. J. (1996). The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med.* **334 (26):** 1685-1690.

Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus–15 years on. *J Gen Virol.* **85:** 3173-3188.

Smith, D. B. & Simmonds, P. (1997). Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: contains on sequence change in coding regions as both ends of the genome. *J Mol Evol.* **45:** 238-246.

Stuyver, L., Rossau, R., Wyseur, A., Duhamel, M., Vanderborght, B., Van Heuverswyn, H. & Maertens, G. (1993). Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol.* **74:** 1093-1102.

Sung, V., Shimodaira, S., Doughty, A., Piccio, G., Can, H., Yen, T. S., Lindsay, K., Levine, A. & Lai, M. (2003). Establishment of B-Cell Lymphoma Cell Lines Persistently Infected with Hepatitis c Virus In Vivo and In Vitro: the Apoptotic Effects of Virus Infection. *J Virol.* **77:** 2134-2146.

Teich, K. (2001). BVD. Sonderdruck aus *Milchpraxis.* **1:** 1-3.

Temperton, N., Chan, P., Simmons, G., Zambon, M., Tedder, R., Takeuchi, Y. & Weiss, R. (2005). Longitudinally profiling neutralizing antibody response to SARS coronavirus with pseudotypes. *Emerg Infect Dis.* **11 (3):** 411-506.

Thimme, R., Neumann-Haefelin, C., Boettler, T. & Blum, H. (2008). Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine. *Biol Chem.* **389:** 457-467.

Tokita, H., Okamoto, H., Iizuka, H., Kishimoto, J., Tsuda, F., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1998). The entire nucleotide sequences of three heopatitis c virus isolates in genetic groups 7-9 and comparison with those in other eight genetic groups. *J Gen Virol.* **79 (Pt 8):** 1847-1857.

Vaughan, A., Eijsink, V. & van Sinderen, D. (2003). Functional Characterization of a Composite Bacteriocin Locus fro Malt Isolate Lactobacillus sakei 5. *Appl Environ Microbiol.* **69 (12):** 7194-7203.

Vento, S., Lanzafame, M., Malena, M., Cainelli, F., Concia, E. & Masiero, G. (2004). Can we really identify HIV-1 long-term nonprogressors? *J Acquir Immune Defic Syndr.* **37:** 1218.

Voisset. C. &, Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell.* **96:** 413–420.

Von Hahn, T., Chun-Yoon, J., Alter, H., Rice, C., Rehermann, B., Balfe, P. & McKeating, J. (2007). Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* **132:** 667–678.

Wakita, T., Pietschmann, T. & Kato, T. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from cloned viral genome. *Nat Med.* **11:** 791-796.

Wasielewski, S. (2004). Übertragungswege und Problempatienten. *Medizinische Welt* **7-8:** 55.

Wedemeyer, H.& Trautwein, C. (2004). Neue Therapiestrategien bei viralen Hepatitiden. *Medizinische Welt* **7-8:** 228-234.

Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C., Crawford, K., Brunetto, M., Barr, P., Miyamura, T., McHutchinson, J. & Houghton, M. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope

glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* **89:** 3468-3472.

WHO: Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board. (1999). *J Viral Hepatol.* **6 (1):** 35-47.

WHO. (1999). *Weekly Epidemiological Record.* 74th Year. **49:** 425-427.

WHO. (2002). Hepatitis C. http://www.who.int/cst/disease/hepatitis/Hepc.pdf

WHO. (2002). *Weekly Epidemiological Record.* 77th Year. **6:** 41-48.

WHO. (2009). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Fact sheet* **N° 117**.

Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindadajan, S., Chien, D., Selby, M. & Ou, J.-h. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* **20:** 3840-3848.

Zeisel, M., Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Barth, H., Stoll-Keller, F., Doffoel, M. & Baumert, T. (2007). Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* **13 (36):** 4824-4830.

Zibert, A., Schreier, E. & Roggendorf, M. (1995). Antibodies in human sera specific to hypervirable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* **208:** 653-661.

Zignego, A. L., Ferri, C., Giannini, C., La Civita, L., Careccia, G., Longombardo, G., Bellesi, G., Caracciolo, F., Thiers, V. & Gentilini, P. (1997). Hepatitis C virus infection in mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin`s lymphoma: evidence for a pathogenetic role. *Arch Virol.* **142:** 545-555.

Zignego, A. L., Giannini, C., Monti, M. & Gragnani, L. (2007). Hepatitis C virus lymphotropism: lesson from a decade of studies. *Dig Liver Dis.* Suppl 1 **39:** 38-45.

9. Abkürzungen

>	größer
<	kleiner
°	Grad
%	Prozent
A	Adenosin
aa	Aminosäuren (*amino acids)*
AaZ	Anzahl der ausgesäten Zellen
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALT	Alaninaminotransferase
Amp	Ampicillin
aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATCC	"*American Type Culture Collection"*
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bDNA	Technik der Signalamplifikation
BSA	Bovines Serumalbumin
BVDV	Bovines Virus Diarrhoe-Virus
BVD/MD	*Bovine Virus Diarrhoe/Muccosal Disease*
BVD-VO	Bovine Virus Diarrhoe-Verordnung
C	HCV *Core* (Kern), hochkonserviertes Nukleoprotein

C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CD	"C*luster of Differentiation"*
ca.	circa
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CD81	ubiquitär vorkommendes tetraspanin Protein, HCV Rezeptor
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
d. h.	das heißt
DMEM	"*Dulbeccos Modified Eagles Medium"*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E1 und E2	sind hoch glykosylierte Typ 1 Transmembranproteine
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	"*Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay"*
Env	Hüllprotein (*Envelope*)

ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESP	Europäische Schweinepest
et al.	und andere (*et alii)*
etc.	und das Übrige (*et cetera)*
ETOH	Ethanol
EU	Europäische Union
e.V.	eingetragener Verein
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (F*luorescence Activated Cell Sorting*)
FKS	fötales Kälberserum
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
G	Guanosin
g	Gravitationskonstante
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GALV	"*Gibbon Ape Leukemia Virus"*
GB-Viren	Bezeichnung leitet sich von den Initialen des ersten Patienten ab.
Geschl.	Geschlecht
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
gr.	groß
HBSS	"*Hank`s Balanced Salt Solution"*
HC	Hepatitis C
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	"*cell-culture-grown Hepatitis C Virus"*

HCVpp	Hepatitis C Virus Pseudopartikel
HDL	"*High-density Lipoprotein"*
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozyten Antigen
H_2O	Wasser
HVR1	hypervariable Region 1
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IE	infektöse Einheiten (infektiöse Partikel/ml)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle *(Internal Ribosomal Entry Site)*
IU/l	Internationale Einheiten/Liter
i.v.	intravenös
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kl.	klein
LB	Luria Bertani
LCMV	Lymphozyten Choriomeningitis Virus
LDL	"*Low-Density Lipoprotein"*
Lenti	lentiviraler Ursprungsvektor
LNGFR	"*Low affinity Nerval Growth Factor Receptor"*
Log_{10}	Logarithmus

LTNP	"*Long Time Non Progressors"*
LTR	lange terminale Wiederholungssequenz (*Long Terminal Repeat*)
M	molar
m	männlich
mM	Millimol
max.	maximal
min	Minute
Mio	Million
MHC	"*Major Histocompatibility Complex"*
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MLV	Maus-Leukämievirus
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	„*messenger RNA"*
MU	Millionen Einheiten *(Million Units)*
n.a.	nicht aufgeführt
nAK	neutralisierende Antikörper
NAT	Nukleinsäure-Amplifikations-Technologie
NANBH	non-A non-B Hepatitis
Nb	nach Therapieende
NCR	nicht-codierende Region (*Non Coding Region*)

ng	Nanogramm
NK	nicht konzentriert
Nr.	Nummer
NS	Nicht-Strukturprotein
NTR	nicht-translatierte Region
o.g.	oben genannte
ORF	offener Leserahmen (O*pen Reading Frame)*
p7	Polypeptid p7 ist ein intrinsisches Membranprotein des HCV.
Pat.	Patient
PB	Polybrene
PBMC	periphere mononukleare Zellen der Blutbahn
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (P*hosphate Buffered Saline)*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PI	persistent infiziert
pol	Polymerase
ptZ	positiv transduzierte Zellen
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute (*rounds per minute)*

RPMI	"*Rosewell Park Memorial Institute Medium"*
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S3	Sicherheitsniveau 3
SARS-CoV	"S*evere Acute Respiratory Syndrome Corona Virus"*
S/CO	"*Sample/Cut-Off*"
SDS	*Sodium (*Natrium*) Dodecyl Sulfate*
SFFV	*Spleen Focus Forming Virus*
spec.	Spezies
SIN	"S*elf-Inactivating transfer"*
siRNA	"*small interfering RNA"*
SR-B1	Scavenger Rezeptor, Klasse B
St.	Stunde
T	Thymidin
t ½	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
TAT	"*Transactivator of Transcription"*
TAS	temperaturarretiertes Stadium
TBE	Tris-Borat-EDTA
Thw	Therapiewoche
TNF	Tumor Nekrose Faktor

Tris	Trishydroxyaminomethan
TU	*Transducing Units*
U	Enzymeinheit *(Units)*
U	Uracil
Überst	Überstand
U/min	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge
UV	ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein G
VSVpp	Vesicular Stomatitis Virus Pseudopartikel mit Glykoprotein G
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen (*volume per volume)*
w	weiblich
WHO	"*World Health Organization"*
WPRE	"*Woodchuckhepatitis-virus Posttranscriptional Regulatory Element"*
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen (*weight per volume)*
z. B.	zum Beispiel

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Angaben zur HCV Prävalenz und Anzahl der HCV-Infizierten nach WHO Regionen 13
Abb. 2: Hypothetisches Modell eines Hepatitis C Virus 19
Abb. 3: Die Genomorganisation des HCV 21
Abb. 4: Hypothetisches Modell des HCV Replikationszyklus 33
Abb. 5: Einflussfaktoren für das dauerhafte Therapieansprechen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C 44
Abb. 6: Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren 68
Abb. 7: Chemische Strukturformel von "Polybrene" 72
Abb. 8: Schematische Darstellung der Verpackung eines HCVpp 89
Abb. 9: Schematische Darstellung der Herstellung von HCV-Pseudopartikeln 97
Abb. 10: Schematische Darstellung der Verwendung von Patientenseren im HCVpp Neutralisationstest 104
Abb. 11: Vergleich der Transduktionseffizienz onkoretroviraler und lentiviraler

Vektoren 110

Abb. 12: Der Einfluss von PB auf die Transduktionseffizienz verschiedener VSVpp/HCVpp in Huh-7 Zellen 112

Abb. 13: Einfluss von PB-Vorbehandlung auf die Bildung von HCVpp bei der Transduktion von Huh-7 Zellen mit HCVpp auf lentiviraler Basis 113

Abb. 14: Infektiöse HCVpp Mengen nach Ultrazentrifugation des Überstandes, im Vergleich zu unkonzentriertem Überstand, bei unterschiedlichen Ausgangsmengen 116

Abb. 15: Vergleich der infektiösen Partikelzahlen nach Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien und mit/ohne Zusatz von fötalem Kälberserum (FKS) 118

Abb. 16: Zelltropismusstudie mit HCVpp und verschiedenen Suspensionszelllinien 121-122

Abb. 17: Verbleibende Infektiosität von HCVpp in Anwesenheit von anti-HCV negativ getesteten Patientenseren unterschiedlicher Konzentration 126

Abb. 18: Vergleich der Neutralisation der HCVpp mit Seren von Patienten mit einer HCV-Subtyp 1a bzw.1b Infektion 129

Abb. 19: HCVpp Neutralisation mit Seren von Patienten mit HCV-Genotyp 2, 3 und 4 Infektionen 132

Abb. 20: Messung der Kreuzneutralisation der HCVpp mit Seren von mit Dengue-Virus infizierten Patienten, von denen einige zusätzlich FSME-IgG enthielten 141

Abb. 21: Neutralisation der HCVpp nach Inkubation mit Seren von LTNP HIV/HCV koinfizierten Patienten 144

Abb. 22: Darstellung der Neutralisation der HCVpp nach Inkubation mit Seren von Patienten der „*Responder*"-Gruppe 147

Abb. 23: Darstellung der Neutralisation der HCVpp nach Inkubation mit Patientenseren der „*Non Responder*"-Gruppe 151

Abb. 24: Darstellung der Neutralisation der HCVpp nach Inkubation mit Patientenseren der „*Relapse*"-Gruppe 153

Abb. 25: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Neutralisationsversuche mit den unterschiedlichen Patientengruppen 156

11. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Modelle zur Erforschung von HCV 52
Tab. 2: Verwendete Kits in der Zellkultur und Molekularbiologie 63
Tab. 3: Lösungen, Nährmedium und Puffer 64
Tab. 4: Genotyp des verwendeten Bakterienstammes 65
Tab. 5: Verwendete Plasmide und Vektoren 67
Tab. 6: Verwendete Filtersysteme 69
Tab. 7: Verwendete Zelllinien 70
Tab. 8: Verwendete Nährmedien, Lösungen, Zusätze und Puffer in der Zellkultur 71
Tab. 9: Verwendete Laborgeräte 73-74
Tab. 10: Anti-HCV negative Kontrollseren 127
Tab. 11: Seren von Patienten mit einer HCV-Subtyp1a bzw.1b Infektion 130
Tab. 12: Patientenseren der HCV-Genotyp-Kreuzneutralisationsstudie 134
Tab. 13: Verbleibende Infektiosität der HCVpp nach Inkubation mit Patientenseren die serologisch als „anti-HCV-schwach positiv" bzw. als „nicht eindeutig bewertbar“ eingestuft wurden 137-138
Tab. 14: Untersuchte Seren der Patienten:

Dengue-Virus positiv und in der klinischen Diagnostik außerdem auf das FSME Virus Getestet 142-143

Tab. 15: HCVpp Neutralisation mit Seren der HIV LTNP–Patienten 145

Tab. 16: Untersuchte Patientenseren der Gruppe „*Responder*“ in der Verdünnungsstufe 1:500 149-150

Tab. 17: Untersuchte Patientenseren der Gruppe „*Non Responder*“ in der Verdünnungsstufe 1:500 152

Tab. 18: Untersuchte Patientenseren der Gruppe „*Relapse*“ in der Verdünnungsstufe 1:500 154-155

12. Publikationsliste

Wissenschaftliche Publikationen

- Berger, A., Giroglou, T., Leutz, A., Ogbomo, H., Pfaff, K., Teuber, G., Cinatl, J., van Laer, D. & Doerr, H. W. (2009). Measurements of HCV neutralizing antibodies and of HCV-specific CD4+ and CD8+ cells using hepatitis C virus pseudo-particles. *J Clin Virol.* **46 (1):** 55-60.

Poster

- Pfaff, K., Giroglou, T., van Laer, D., Teuber, G., Doerr, H. W. & Berger, A. (2005). Follow up measurement of HCV neutralizing antibodies in patients under antiviral treatment. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Hannover. 16.-19.03.2005.

13. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Medizinische Virologie der Johann-Wolfgang Goethe Universitätsklinik und in Kooperation mit dem Georg-Speyer Haus, in Frankfurt am Main erstellt.

Herrn Professor Dr. med. H. W. Doerr, möchte ich für die Überlassung des Themas und die fachliche Betreuung meiner Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. med. vet. Dr. med. habil. A. Berger für die Möglichkeit, unter ihrer hilfreichen Anleitung meine Dissertation anfertigen zu können. An positivem Zuspruch und Motivation hat es nie gefehlt.

Ebenso möchte ich mich bei Frau P.D. Dr. K. Borchers der FU Berlin für die Geduld, die sie mir und meiner Arbeit entgegengebracht hat, danken. Ihre Betreuung und konstruktive Kritik haben mir sehr geholfen.

Frau Prof. Dr. D. van Laer danke ich vielmals für die Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit, mit der diese Arbeit entstanden ist.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Tsanan Giroglou für die große Unterstützung. Sie gab mir stets Hilfestellungen in allen wissenschaftlichen und technischen Belangen und war eine große Hilfe.

Danken möchte ich auch ganz herzlich weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe des Georg Speyer Hauses von Frau Prof. Dr. D. van Laer; insbesondere Herrn Tefik Merovci.

Frau Dr. med. G. Teuber danke ich für die Bereitstellung der Patientenproben.

Auch möchte ich meinen ganz besonderen Dank Frau Prof. Dr. E. Helm, die mir in familiärer Tradition mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, danken.

Schließlich möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinem Lebensgefährten bedanken. Durch den Ansporn meiner Mutter ist diese Arbeit nun fertiggestellt worden; sie war immer für mich da, wenn ich Hilfe benötigt habe. Dies gilt auch für meine Schwester, Naomi, Neil und Tümsal. In einer schweren Zeit konnte ich immer auf Euch zählen.

14. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur eigenständig erstellt habe.

Frankfurt, den 16.05.2011

Kerstin Pfaff