

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und
Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus
Virchow Klinikum

DISSERTATION

Analyse der CD4 T-Zell Immunantwort gegen HCV-Proteine bei
Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonas Florian Möller

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. E. Schott
 2. Prof. Dr. med. R. Somasundaram
 3. Priv. Doz. Dr. med. C. Schramm

Datum der Promotion: 09.09.2011

Diese Arbeit widme ich meinem Vater.

Inhaltsverzeichnis

Widmung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	11
1.1.0 Das Hepatitis C Virus und die Hepatitis C Virusinfektion	11
1.1.1 Entdeckung und Struktur des Hepatitis C Virus	11
1.1.1.1 Strukturproteine und ihre Funktionen	11
1.1.1.2 Nichtstrukturproteine und ihre Funktionen	12
1.1.2 HCV-Genotypen	13
1.1.3 Epidemiologie und Übertragung des Hepatitis C Virus	14
1.1.4 Diagnostik der Hepatitis C Virusinfektion	15
1.1.5 Klinik der Hepatitis C Virusinfektion	15
1.1.6 Therapie der chronischen Hepatitis C Virusinfektion	16
1.1.7 Nebenwirkungen der antiviralen Therapie der chronischen HCV-Infektion	17
1.1.8 Kosten der Hepatitis C Virustherapie	17
1.2 T-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems	18
1.2.1 Das adaptive Immunsystem	18
1.2.2 Aktivierung von CD4 T-Zellen	18
1.2.3 Effektor-T-Zellen	20
1.2.4 Terminierung der Immunreaktion	21
1.2.5 T-Gedächtniszellen	21
1.2.6 Immunantwort bei Virusinfektionen	22
1.3 Immunantwort bei der Hepatitis C Virusinfektion	25
1.3.1 Humorale Immunantwort	25
1.3.2 T-Zell-Immunantwort bei HCV-Infektion	26
1.3.2.1 CD4 T-Zell-Immunantwort bei HCV-Infektion	26
1.3.2.2 CD8 T-Zell-Immunantwort bei HCV-Infektion	28
2 Herleitung der Fragestellung	31
3 Materialien und Methoden	33
3.1 Materialien	33
3.1.1 Auflistung verwendeter Materialien	33
3.1.2 Patientenproben	35

3.1.3 Lösungen	35
3.1.3.1 PBS	35
3.1.3.2 PBS/BSA-Lösung	35
3.1.3.3 Paraformaldehyd (PFA)	36
3.1.3.4 Saponin	36
3.1.3.5 Erythrozyten Lyse-Puffer	36
3.1.3.6 Brefeldin A (BFA)	36
3.1.3.7 Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)	36
3.1.4 Hepatitis C Virusproteine	37
3.1.5 Antikörper	38
3.2 Methoden	40
3.2.1 Patientenkollektiv	40
3.2.1.1 Kohorte 1	40
3.2.1.2 Kohorte 2	40
3.2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien	41
3.2.2 Praktische Durchführung der Versuche	42
3.2.2.1 Ansetzen der Blutproben mit HCV-Proteinen	42
3.2.2.1.1 Versuchsaufbau	42
3.2.2.1.2 Inkubation und Exozytosehemmung	43
3.2.2.2 Vorbereitung der Laborproben für die Durchflusszytometrie	45
3.2.2.2.1 Isolierung der Leukozyten	45
3.2.2.2.2 Die extrazelluläre (Oberflächen-) Färbung der Leukozyten (CD4, CD69)	45
3.2.2.2.3 Fixierung mit PFA	46
3.2.2.2.4 Permeabilisierung mit Saponin	46
3.2.2.2.5 Die intrazelluläre Färbung der Leukozyten (CD154, IFN- γ , TNF- α)	46
3.2.2.3 Die durchflusszytometrische Messung	47
4 Ergebnisse	49
4.1 Darstellung der Ergebnisse	49
4.2 Auswertung der Ergebnisse	50
4.3 Subgruppenanalysen	51
4.4 Statistik	51
4.5 Auswertung der Ergebnisse von Kohorte 1	52
4.5.1 Beschreibung der Kohorte	52

4.5.2 Einfluss etablierter Faktoren auf das Therapieansprechen	53
4.5.3 Prozentuale Häufigkeit positiver Reaktionen auf einzelne HCV-Proteine in Abhängigkeit des Therapieansprechens	54
4.5.4 Auswertung der Daten hinsichtlich der Anzahl von HCV-Proteinen, auf die eine positive Reaktion eintrat	57
4.5.4.1 Subgruppenanalyse: CD154-gefärbte Patienten	61
4.5.4.2 Subgruppenanalyse: HCV-Genotyp 1 Patienten	62
4.5.5 Auswertung des maximalen Aktivierungsniveaus von CD4-Zellen nach T-Zellrezeptor unspezifischer Stimulation mit SEB	66
4.5.5.1 Subgruppenanalyse: CD154-gefärbte Patienten nach SEB-Stimulation	66
4.5.5.2 Subgruppenanalyse: HCV-Genotyp 1 Patienten nach SEB-Stimulation	67
4.6 Auswertung der Ergebnisse von Kohorte 2	70
4.6.1 Beschreibung der Kohorte	70
4.6.2 Häufigkeit positiver Reaktionen auf die einzelnen HCV-Proteine in Abhängigkeit des Therapieansprechens und bei therapienaiven Patienten	71
4.6.3 Auswertung der Daten hinsichtlich der Anzahl von HCV-Proteinen, auf die positiv reagiert wurde	73
4.6.3.1 Vergleich zwischen therapieerfahrenen und therapienaiven Patienten	73
4.6.3.1.1 Subgruppenanalyse: CD154-gefärbte Patienten	73
4.6.3.1.2 Subgruppenanalyse: Genotyp 1 Patienten	78
4.6.3.2 Vergleich der Daten von Respondern (SR), Nonrespondern (NR) und Relapsern (RL) nach HCV-Proteinstimulation	78
4.6.4 Auswertung des maximalen Aktivierungsniveaus von CD4 T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit SEB	81
4.6.4.1 Subgruppenanalyse: CD154-gefärbte Patienten nach SEB-Stimulation	85
4.6.4.2 Subgruppenanalyse: Genotyp 1 Patienten nach SEB-Stimulation	85
5 Diskussion	86
5.1 Methodik	86
5.2 Einfluss bekannter Faktoren, die eine Auswirkung auf das Therapieergebnis haben	88
5.3 Maximale Antigen-unspezifische Reaktion von CD4 T-Zellen	88
5.4 Stimulation durch rekombinante HCV-Proteine	91
5.5 Zytokinproduktion der CD4 T-Zellen und T-Zellerschöpfung	93
5.6 Hemmender Einfluss des HCV auf das Immunsystem	97

5.7 Bedeutung unterschiedlicher Aktivierungsmarker	99
5.8 Einfluss des HCV-Genotyps	99
5.9 Antigen-spezifität der CD4 T-Zellen	100
5.10 Bewertung der eigenen Studie	102
6 Zusammenfassung	104
7 Literaturverzeichnis	106
8 Anhang	112
8.1 Lebenslauf	112
8.2 Publikationsliste	113
8.3 Selbständigkeitserklärung	114
8.4 Danksagung	115

Abkürzungsverzeichnis

Akt+	Aktivierungsmarkerpositiv
APZ	antigenpräsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin (FACS-Fluoreszenz)
Aqua dest.	Aqua destillata
BE	Blutentnahme
BFA	Brefeldin A
BSA	bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Celsius
Ca	Kalzium
CD	cluster of differentiation
FCS	fetal calf serum = Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (FACS- Fluoreszenz)
FSC	Forward Scatter
γ -GT	Gamma-Glutamyltranspeptidase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
GT 1	Hepatitis C Virusgenotyp 1
HCV	Hepatitis C Virus bzw. Hepatitis C Virusinfektion
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HVR	hypervariable Region
ICAM	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Log	Logarithmus
m	Männlich
max.	Maximum
Mg	Magnesium
MHC	major histocompatibility complex
min.	Minimum
Naive	therapienaive Patienten
NK	Natürliche Killerzellen
NR	nonresponse bzw. Nonresponder
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin (FACS-Fluoreszenz)
PE-Cy7	Phycoerythrin – Cyanin 7 (FACS-Fluoreszenz)
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
RL	relapse bzw. Relapser
RNA	Ribonukleinsäure
upm	Umdrehungen pro Minute
SA	Standardabweichung
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SR	sustained response bzw. sustained Responder
SSC	Sidescatter

TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tx	Therapie
w	weiblich
Zyt+	zytokinpositiv
Zyt+/-	zytokinpositiv oder zytokinnegativ

1 Einleitung

1.1.0 Das Hepatitis C Virus und die Hepatitis C Virusinfektion

1.1.1 Entdeckung und Struktur des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus wurde erstmals mit molekularbiologischen Techniken im Jahr 1989 nachgewiesen [1]. Zuvor waren nur die Hepatitisviren A und B bekannt, die jedoch einen großen Teil der gehäuft nach Bluttransfusionen auftretenden chronischen Hepatitiden nicht erklären konnten [2-4]. Diese Fälle wurden daher als Non-A-non-B Hepatitiden bezeichnet. Nach der Entdeckung des Hepatitis C Virus war es möglich ca. 80% der Non-A-non-B Hepatitiden ätiologisch dem Hepatitis C Virus zuzuordnen.

Das Hepatitis C Virus gehört zur Familie der Flaviviridae in der Spezies Hepacivirus. Es ist ein Einzel(+)-Strang-RNA-Virus mit einer Länge von ca. 9600 Nukleotiden und einer elektronenmikroskopischen Größe von ca. 45-65nm. Das HCV-Genom befindet sich in einem Nukleokapsid, welches von einer Hülle umgeben wird. Die HCV-RNA kodiert für ein Vorläuferprotein aus ca. 3010-3033 Aminosäuren, aus dem durch Proteasen die Strukturproteine Core, E1 und E2 und durch Virusproteasen die Nichtstrukturproteine P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B abgespalten werden [5-7].

Siehe hierzu auch Abbildung 1.

1.1.1.1 Strukturproteine und ihre Funktionen

Das Core-Protein ist am Aufbau des Nukleokapsids beteiligt. Daneben interagiert es mit mehreren Zellproteinen und beeinflusst u.a. intrazelluläre Signalwege, Transkription und Apoptose der Wirtszelle [5, 6]. Möglicherweise ist das Core-Protein durch Ras ähnliche Eigenschaften über den Ras/Raf/Map-Kinase Mechanismus an der HCC Entstehung beteiligt [5, 6].

Die Glykoproteine E1 und E2 bilden Heterodimere und sind in der Hüllschicht des Nukleokapsids zu finden [5, 8]. Sie sind für die Struktur der HCV-Virionen von besonderer Bedeutung. Auf dem Glykoprotein E2 sind zwei hypervariable Regionen (HVR) zu finden, HVR1 und HVR2. Die Heterogenität von HVR1 steht in Zusammenhang mit der Antwort auf eine Interferon(IFN)- α Therapie [6].

Eine wichtige Funktion des E2-Proteins ist die Interaktion mit CD81. Diese Interaktion spielt bei der Aufnahme des Virus in Hepatozyten eine Rolle. Daneben gibt es experimentelle Hinweise auf die Beeinflussung der Aktivierung von natürlichen Killerzellen sowie der Zytokinproduktion mit unterschiedlicher immunmodulatorischer Bedeutung [6].

1.1.1.2 Nichtstrukturproteine und ihre Funktionen

Über die Funktion des p7-Proteins ist wenig bekannt. Möglicherweise hat es die Funktion eines Ionen- [5] oder Membrankanals [9].

NS2 bildet zusammen mit einem Teil von NS3 eine Autoprotease, die das Polyprotein zwischen NS2 und NS3 spaltet [5].

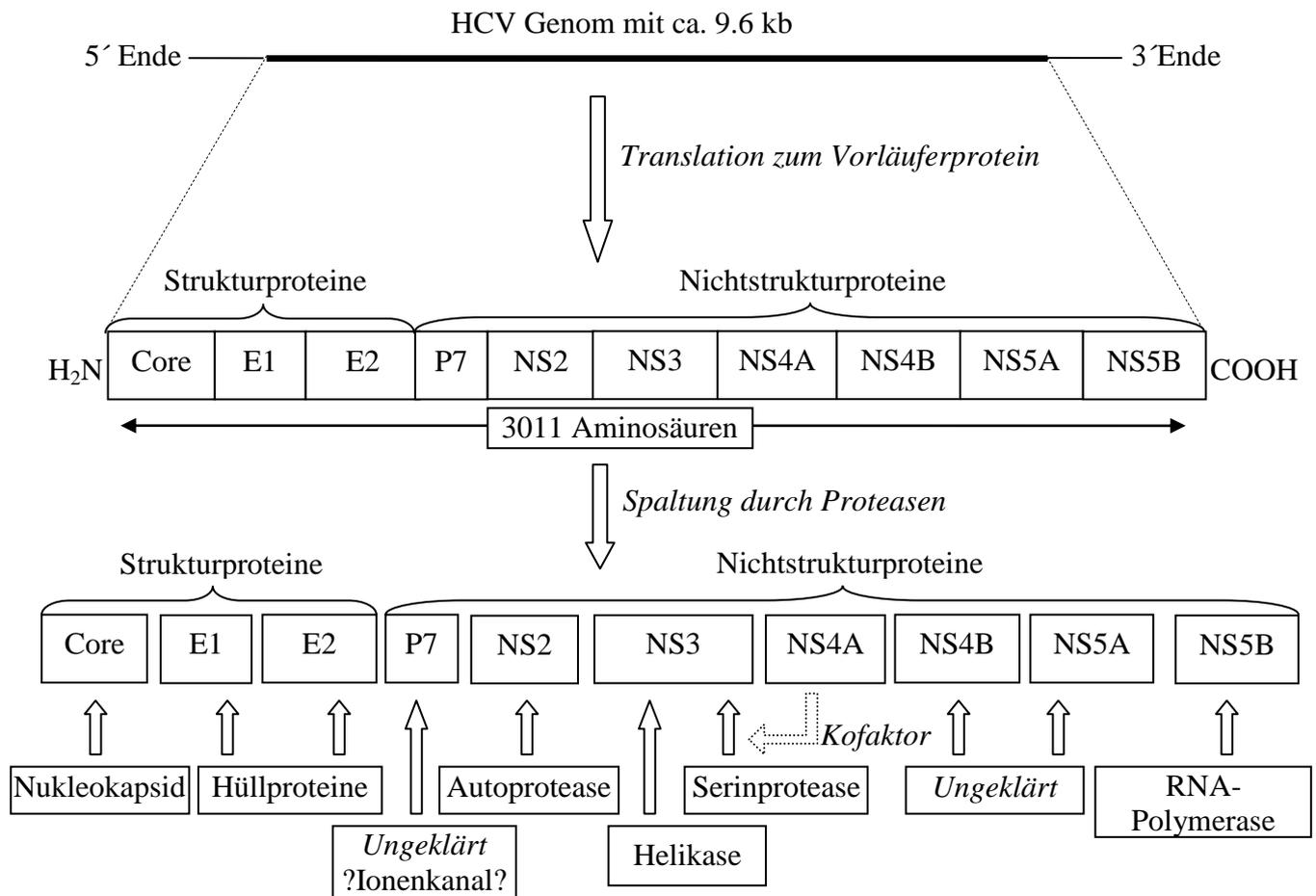
Es sind diverse Funktionen des NS3-Proteins bekannt. Mit NS4A als Kofaktor bildet es eine Serin-Protease, die das HCV-Vorläuferprotein an verschiedenen Stellen spaltet [5]. Zusätzlich hemmt die Serin-Protease angeborene Zellabwehrmechanismen [5]. Mit seiner Helikase-Aktivität spielt es wiederum in Zusammenarbeit mit NS5B eine wichtige Rolle für die virale Replikation [6].

Neben der oben genannten Funktion von NS4A als Kofaktor für die NS3/NS4A Serin-Protease interagiert NS4A mit anderen HCV-Proteinen und fungiert möglicherweise als Ankerprotein am endoplasmatischen Retikulum [6].

Die Funktionen der HCV-Proteine NS4B und NS5A sind noch weitgehend ungeklärt. Insbesondere bei NS5A gibt es Hinweise auf Interaktionen mit zahlreichen Proteinen und intrazellulären Signalproteinen. Somit beeinflusst NS5A womöglich indirekt die Transkription [6] und die virale Replikation [5]. Experimentelle Hinweise auf eine Beeinflussung der Interferonantwort durch NS5A konnten bisher nicht endgültig bestätigt werden [5].

NS5B ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase [10], deren niedrige Genauigkeit bei der Transkription der RNA eine hohe Variabilität des HCV-Genoms zur Folge hat. NS5B spielt eine zentrale immunmodulatorische Rolle bei der antiviralen Therapie der Hepatitis C Virusinfektion [5].

Zusammengefasst haben die Nichtstrukturproteine vor allem Aufgaben als Proteasen (NS2, NS3/NS4A) sowie im Bereich der RNA-Replikation (NS3, NS5A und NS5B) [6].



Modifiziert nach Borowski und Blum

Abbildung 1: Schemadarstellung des Hepatitis C Virusaufbaus. Ganz oben die Darstellung des Hepatitis C Virusgenoms. Zwischen den nicht translatierten Regionen am 5'- und 3'Ende liegt der Genombereich, aus dem durch Translation das HCV-Vorläuferprotein entsteht, welches in der Mitte dargestellt ist. Das aus 3011 Aminosäuren bestehende Vorläuferprotein wird durch verschiedene Proteasen in die Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten. In den unteren Kästchen ist die jeweilige Hauptfunktion der HCV-Proteine angegeben.

1.1.2 HCV-Genotypen

Innerhalb des HCV-Genoms konnte eine große genetische Heterogenität nachgewiesen werden [11]. Es werden sechs Genotypen des HCV mit mehreren Subtypen unterschieden. Die Einteilung der HCV-Genotypen erfolgt nach Simmonds in arabischen Zahlen für die Genotypen 1-6 sowie Kleinbuchstaben für die jeweiligen Subtypen. Die Nukleotidsequenzen im Genom der verschiedenen Genotypen variieren dabei zwischen 31% und 33%, die der Subtypen zwischen 20% und 25%, mindestens jedoch mit 15% [12].

Epidemiologische Studien weisen regionale Unterschiede im Vorkommen der verschiedenen Genotypen nach. In Deutschland kommt am häufigsten der Genotyp 1b mit ca. 50% der Fälle vor, gefolgt von den Genotypen 1a und 3a mit einem Anteil von jeweils ca. 20% [13]. In Nordamerika trifft man dagegen überwiegend den HCV-Genotyp 1a an und in Ägypten, dem Land der weltweit höchsten HCV-Prävalenz, ist der Genotyp 4 mit einem Anteil von ca. 80% vorherrschend [14-16].

1.1.3 Epidemiologie und Übertragung des Hepatitis C Virus

Die weltweite Prävalenz der chronischen Hepatitis C Virusinfektion wird auf ca. 170Mio. Menschen oder ca. 3% der Weltbevölkerung geschätzt, dabei bestehen starke regionale Unterschiede. Während in Ägypten eine Antikörperprävalenz von ca. 25% gefunden wird, wurde 2007 für Deutschland eine Anti-HCV-Prävalenz von 0.4-0.7% entsprechend 400.000-500.000 Personen beschrieben [16].

Der Hauptübertragungsweg des HCV ist parenteral. Insbesondere der intravenöse Drogenkonsum stellt ein wesentliches Infektionsrisiko dar. Die Übertragung des HCV durch Blutprodukte, Hämodialyse oder chirurgische Eingriffe ist in den Industrienationen durch die Entwicklung effizienter Screeningmethoden in der heutigen Zeit kaum noch von Bedeutung, kommt aber in Entwicklungsländern häufig vor. Die Wahrscheinlichkeit einer HCV-Infektion durch Erhalt kontaminierter Blutprodukte in Deutschland ist sehr gering. Das Risiko beträgt geschätzt für Deutschland seit 1999 annähernd 1:5.000.000 [16]. Auch Nadelstichverletzungen sowie Piercings und Tätowierungen mit kontaminierten Nadeln zählen zu den bekannten Übertragungswegen [17]. Ein weiterer Infektionsweg ist die Infektion durch sexuellen Kontakt [18], obwohl die Infektionsgefahr auf sexuellem Weg als gering angesehen wird. Nach der Jahresstatistik 2007 des Robert Koch Instituts für Deutschland wird diese Form der Übertragung von ca. 23% der Infizierten als mögliche Infektionsquelle genannt, ohne dass dieser Übertragungsweg tatsächlich gesichert ist [16].

Die vertikale Übertragung des Hepatitis C Virus von der Mutter auf das Kind zeigt eine Abhängigkeit von der Viruslast und kommt insgesamt eher selten vor. Ein erhöhtes Übertragungsrisiko haben Mütter mit hohen HCV-Titern oder einer HCV/HIV Koinfektion [19, 20].

In ca. 40% aller HCV-Infektionen bleibt der Übertragungsweg ungeklärt [13].

1.1.4 Diagnostik der Hepatitis C Virusinfektion

Die Expositions- bzw. Risikofaktorenanamnese liefern Anhaltspunkte für eine Hepatitis C Virusinfektion. Klinische Symptome wie Müdigkeit, Oberbauchbeschwerden und Völlegefühl sind unspezifisch. Wegweisende Zeichen wie Hepatomegalie mit Leberkapselschmerzen, Haut- und Sklerenikterus treten typischerweise nur in der Akutphase auf. Serologische Auffälligkeiten mit erhöhten Serumtransaminasen (GOT, GPT) sind häufig das Ergebnis von zufälligen Routineuntersuchungen.

Für die Diagnosesicherung erforderliche HCV-spezifische Labortests stehen in Form des indirekten serologischen HCV-Antikörpernachweises oder des direkten Nachweises von HCV-RNA ggf. mit Quantifizierung zur Verfügung.

Die heute verwendeten Enzymimmunoassays (EIA) für den Nachweis von HCV-Antikörpern können schon sieben bis acht Wochen nach der Virusinfektion positiv ausfallen. Aktuelle Tests weisen HCV-Antikörper gegen verschiedene HCV-Epitope in Core-, NS3-, NS4- und NS5-Proteinen nach. Entsprechende Antikörper sind bei 50-70% der Patienten zu Beginn der klinischen Symptome nachweisbar, später bei allen Patienten. Die Tests haben eine Spezifität und Sensitivität von ca. 99% [21].

Bei Verdacht auf eine akute Infektion sollte zusätzlich zur Bestimmung von HCV-Antikörpern immer ein direkter molekularbiologischer Nachweis von Hepatitis C Virus-RNA durchgeführt werden, um eine Infektion im serologischen Fenster nicht zu übersehen oder eine spontane Ausheilung der Hepatitis C Virusinfektion nachzuweisen. Die HCV-RNA ist im Serum erstmals ca. ein bis zwei Wochen nach Infektion und im chronischen Stadium dauerhaft nachweisbar [21]. Direkte Nachweisverfahren von HCV-RNA nutzen die reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Früher wurden ein qualitativer Nachweis mit einer unteren Nachweisgrenze zwischen 10-50 Virusäquivalenten/ml sowie ein quantitativer Nachweis mit geringerer Sensitivität eingesetzt. Neuere quantitative Tests haben jedoch sehr niedrige Nachweisgrenzen um 5-10 IE/ml. Die quantitative HCV-RNA-Bestimmung wird unter anderem zur Darstellung des Verlaufs der Viruslast nach Therapiebeginn verwendet [21, 22].

1.1.5 Klinik der Hepatitis C Virusinfektion

Die akute Hepatitis C Infektion verläuft in mehr als 80% der Fälle asymptomatisch oder mit nur milden, unspezifischen Symptomen und wird deshalb häufig nicht im Akutstadium diagnostiziert. Innerhalb der Inkubationszeit von 2 bis 26 Wochen kann es in einigen Fällen zu Ikterus, Abgeschlagenheit und Übelkeit kommen. Vier bis zwölf Wochen nach der Infektion

kommt es zu einem meist moderaten Anstieg der Transaminasen. Bei ca. 20-50% der Infizierten kommt es zu einer spontanen, dauerhaften Eliminierung des Virus.

Ein fulminanter Verlauf der akuten Hepatitis C Virusinfektion ist ausgesprochen selten zu beobachten (<1%) [23, 24]. Dagegen kommt es in ca. 50-80% zu einer Viruspersistenz von mehr als 6 Monaten, das heißt, es entwickelt sich eine chronische Hepatitis C Virusinfektion [16, 25].

Die chronische Hepatitis C Virusinfektion ist häufig durch einen über lange Zeiträume asymptomatischen bzw. oligosymptomatischen Verlauf mit Müdigkeit, Leistungsminderung, Oberbauchschmerzen, einer eventuellen Hepatomegalie [26] und in ca. 60% erhöhten Aminotransferasewerten im Serum gekennzeichnet. Bei Verläufen über 20 Jahren beobachtet man im Mittel bei ca. 20% der Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion das Auftreten einer Leberzirrhose. Hiervon entwickeln wiederum ca. 1-4% pro Jahr ein HCC [13, 25, 27].

HCV-Genotyp und Viruslast haben keinen Einfluss auf die Krankheitsprogression, wohl aber auf die Therapieplanung.

1.1.6 Therapie der chronischen Hepatitis C Virusinfektion

Die zur Behandlung der chronischen Hepatitis C Virusinfektion eingesetzten Substanzen sind Interferon- α (IFN- α) in Kombination mit dem Nukleosidanalogen Ribavirin. Dabei zeigt die pegylierte Form des Interferons (Peginterferon) gegenüber der unpegylierten einen Vorteil hinsichtlich des Behandlungserfolges. [28, 29]. Die übliche Behandlungsdosis wird für das Peginterferon- α 2a mit 180 μ g/Woche, für Peginterferon- α 2b gewichtsadaptiert mit 1.5 μ g/kg/Woche angegeben. Das in Kombination verabreichte Ribavirin wird je nach Körpergewicht des Patienten und vorliegendem HCV-Genotyp zwischen 800 und 1400mg pro Tag dosiert [22].

Die Therapieplanung in Form von Behandlungsdauer und zu erwartendem Therapieerfolg wird maßgeblich vom vorliegenden Genotyp beeinflusst [25].

Bei den Genotypen 1, 4, 5 und 6 beträgt die aktuell empfohlene Therapiedauer 48, bei Genotyp 2 und 3 derzeit 24 Wochen, obwohl bei Genotyp 1 unter bestimmten Umständen auch eine 24-wöchige und bei Genotyp 2 und 3 eine 16-wöchige Therapie bei Patienten mit niedriger Ausgangsviruslast und schnellem Therapieansprechen ausreichend zu sein scheint [22, 30, 31].

Ist bis Therapiewoche 12 die Viruslast nicht um mindestens 2 log-Stufen gefallen, ist eine erfolgreiche Therapie mit dauerhafter Viruselimination nicht mehr zu erwarten, und die Therapie sollte abgebrochen werden [22, 25]. Es wird von einem „Nonresponse“-Ereignis (NR)

gesprochen, welches ca. 19-29% aller Patienten mit Genotyp 1 Infektion betrifft [22]. Ebenfalls sollte bei Patienten, bei denen nach Therapiewoche 24 noch HCV-RNA im Serum nachweisbar ist, in der Regel aufgrund mangelnder Erfolgsaussichten ein Therapieabbruch erfolgen. Von einer dauerhaften Viruselimination wird gesprochen, wenn innerhalb einer Nachbeobachtungsperiode von 6 Monaten nach Therapieende keine HCV-RNA mehr im Patientenserum nachgewiesen werden kann, dieser Fall wird als „sustained Response“ (SR) bezeichnet. Tritt das HCV dagegen nach Therapieende innerhalb der Nachbeobachtungsperiode erneut auf, liegt ein „Relapse“ (RL) vor, welcher ca. 18% der Patienten mit Genotyp 1 Infektion bei Standardtherapie betrifft [28]. Ist das Virus noch während der Therapie nach vorherigem Abfall unter die Nachweisgrenze erneut im Patientenserum nachzuweisen, wird dies als „Breakthrough“-Ereignis bezeichnet.

Durch eine Therapie mit Peginterferon- α 2a oder b in Kombination mit Ribavirin wird bei ca. 50% der Genotyp 1 Infektionen und ca. 80% der Genotyp 2 und 3 HCV-Infektionen eine anhaltende Viruselimination erreicht [13, 22, 29, 32].

1.1.7 Nebenwirkungen der antiviralen Therapie der chronischen HCV-Infektion

Während der Therapie der Hepatitis C Virusinfektion mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin kommt es regelmäßig zu Nebenwirkungen, die unter Umständen eine Dosisreduktion oder sogar einen Therapieabbruch erforderlich machen können.

Häufige Nebenwirkungen sind u.a. grippeähnliche Symptome, Fieber, Muskelschmerzen, Thrombozytopenie, Leukozytopenie, Hämolyse, Anämie, Depressionen und Alopezie [27].

1.1.8 Kosten der Hepatitis C Virustherapie

Die Kosten einer 48 wöchigen Therapie mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin betragen mehr als 20.000€. Werden vorzeitige Therapieabbrüche bei Patienten mit einem Nonresponse-Ereignis (Nonresponder=NR) oder aufgrund von Nebenwirkungen berücksichtigt, werden die Kosten im Durchschnitt auf ca. 15.000€ geschätzt [33].

1.2 T-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems

1.2.1 Das adaptive Immunsystem

Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind T- und B-Lymphozyten.

T-Zellen reifen im Thymus heran. Sie besitzen den nur auf T-Zellen vorkommenden membrangebundenen T-Zell-Rezeptor (TCR). Jeder TCR weist eine einmalige Epitopspezifität auf.

Durch spezifische Oberflächenmoleküle können T-Lymphozyten in zwei weitere große Gruppen unterteilt werden, nämlich CD4- bzw. CD8-positive T-Lymphozyten.

CD8-positive T-Lymphozyten erkennen nur an MHC-I-Moleküle gebundene Antigene. MHC-Moleküle sind Glykoproteine, die Peptidantigene an der Zelloberfläche präsentieren.

MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Auf ihnen werden zytoplasmatisch prozessierte Peptidfragmente präsentiert, die in der Regel von zelleigenen Proteinen oder intrazellulären Pathogenen abstammen [34].

CD8 wird vor allem von einer speziellen Gruppe von T-Zellen, den zytotoxischen T-Lymphozyten, exprimiert. Sie eliminieren unter bestimmten Bedingungen Körperzellen, die auf ihren MHC-I-Molekülen das passende Peptid gebunden haben.

CD4-positive T-Lymphozyten dagegen erkennen Antigene, die ihnen zusammen mit MHC-II-Molekülen präsentiert werden. MHC-II-Moleküle finden sich auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten und B-Zellen. Über MHC-II Moleküle werden zuvor phagozytierte und prozessierte Fremdanigene präsentiert. Eine der Hauptaufgaben von CD4-Zellen ist die Regulierung der Immunantwort durch Stimulierung weiterer Immunzellen wie zum Beispiel CD8 T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen [9, 34].

1.2.2 Aktivierung von CD4 T-Zellen

Eine naive T-Zelle ist eine T-Zelle, die vorher noch nie durch das für ihren T-Zell-Rezeptor spezifische Antigen aktiviert wurde. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Antigen das passende Epitop für den T-Zell-Rezeptor darstellt, wird auf bestenfalls ca. 1:10.000 geschätzt [34, 35]. Trifft diese Zelle auf eine antigenpräsentierende Zelle (APZ), die das für sie passende Antigen auf einem MHC-II-Molekül präsentiert, bindet der T-Zell-Rezeptor an das MHC-II-Molekül mit dem Antigen. Zusätzlich stabilisiert CD4 sowie interzelluläre Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM) die Bindung zwischen T-Zelle und APZ.

Um naive T-Zellen effektiv zu stimulieren, müssen allerdings weitere Faktoren vorliegen. Besonders wichtig ist die Gewährleistung kostimulierender Signale von der jeweiligen antigenpräsentierenden Zelle. Dieses wird unter anderem durch die Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) gewährleistet, welche sich auf der Oberfläche aktivierter APZ befinden. Der entsprechende Bindungspartner auf den T-Zellen ist CD28. CD28 gehört zur Familie der Immunglobulin Superfamilie. Die Bindung der B7-Moleküle an CD28 ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Auslösung der klonalen Expansion bzw. die Aktivierung der T-Zellen [36-41]. Nachdem es zur Aktivierung der T-Zelle gekommen ist, werden von ihr verschiedene Proteine zur Erhaltung und Modifizierung der CD28 Wirkung bzw. des Aktivierungszustands der T-Zelle produziert [42]. CD69 gehört zu den am frühesten nach Aktivierung der T-Zelle gebildeten Proteinen. Es kann schon 30 min nach der T-Zell-Stimulation nachgewiesen werden und gehört wie CD154 zu den frühen Aktivierungsmarkern [43, 44].

Das Protein CD154 (CD40 Ligand) ist ein membrangebundenes Protein aus der Tumornekrose-Faktor-Familie. Es bindet das auf antigenpräsentierenden Zellen exprimierte Molekül CD40. Hierdurch werden aktivierende Signale an die APZ und von dieser zurück an die T-Zelle gegeben. Bei den APZ führt die Bindung von CD154 an CD40 zu einer vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen, die dann wiederum über eine Bindung an CD28 zu einer anhaltenden Stimulierung der T-Zelle sowie der klonalen Expansion führen [34, 45]. CD154 ist dabei ein sehr spezifischer Aktivitätsmarker zur Darstellung von antigenaktivierten T-Zellen [46].

Die klonale Expansion wird durch die Bindung des von aktivierten T-Zellen gebildeten Zytokins Interleukin 2 (IL-2) in Verbindung mit der Stimulation durch CD28 ausgelöst und aufrecht erhalten. Die Bindung eines passenden Antigens an den T-Zell-Rezeptor in Abwesenheit von kostimulierenden Signalen führt durch den Verlust der Fähigkeit zur IL-2-Produktion zur Anergie der T-Zelle [34, 40, 47, 48].

Naive CD8-positive T-Zellen werden grundsätzlich auf dem gleichen Weg wie naive CD4 T-Zellen aktiviert. Allerdings erkennen sie nur über MHC-I-Moleküle präsentierte Antigene. Auf diesem Wege werden bevorzugt virale Antigene präsentiert. CD8 T-Zellen brauchen zur dauerhaften Aktivierung eine höhere Intensität an koaktivierenden Signalen als CD4 T-Zellen. Diese kann durch dendritische Zellen, die potentesten der antigenpräsentierenden Zellen, in Form von B7-Molekülen erfolgen. In der Regel ist zur Aktivierung der naiven CD8 T-Zelle jedoch die Gegenwart von CD4 T-Effektorzellen, die an die gleiche APZ binden können, erforderlich [34]. Durch die CD154-Produktion der T-Effektorzellen wird die APZ zur vermehrten B7-Produktion angeregt und erzeugt somit ein stärkeres kostimulatorisches Signal

für CD8 T-Zellen. Auch hier kommt es nach IL-2-Produktion zur klonalen Expansion [34, 41, 49-51].

1.2.3 Effektor-T-Zellen

Ca. 4-5 Tage nachdem die klonale Expansion begonnen hat, differenzieren sich die aktivierten naiven T-Zellen zu sogenannten Effektor-T-Zellen. Die ausdifferenzierten Effektorzellen müssen nun zunächst erneut auf „ihr“ Antigen treffen. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen können Effektor-T-Zellen bei Kontakt mit ihrem Antigen ohne kostimulatorische Signale eine Immunreaktion auslösen [52]. Grundsätzlich werden auch bei Effektor-T-Zellen CD4-positive T-Helferzellen sowie CD8-positive zytotoxische T-Zellen unterschieden. Ihre Funktionen üben T-Effektorzellen über die Sekretion von Zytokinen und Zytotoxinen sowie die Expression von membranassoziierten Proteinen aus. Zytokine binden auf den Zielzellen an spezifische Rezeptoren und können so eine Vielzahl an Reaktionen hervorrufen.

Anhand des Zytokinmusters kann man die CD4-positiven Effektor-T-Zellen weiter in TH1-, TH2- und TH17-Zellen einteilen [34, 53, 54]. Die CD4 Effektor-Zellen beginnen innerhalb ca. einer Stunde nach erfolgreicher Antigenbindung an ihren T-Zell-Rezeptor mit der Neusynthese der Zytokine [34, 55]. Einige wichtige von TH1-Zellen produzierte Zytokine sind IL-2, Interferon- γ , TNF- α und TNF- β . Interferon- γ ist das Hauptzytokin zur Makrophagenaktivierung, hemmt während der klonalen Expansion die Ausdifferenzierung der aktivierten T-Zellen zu TH2-Zellen und besitzt direkte antivirale Effekte. Auch die beiden anderen Zytokine haben einen aktivierenden Einfluss auf Makrophagen [34, 56].

TH2 Zellen produzieren unter anderem IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, die alle der B-Zellaktivierung dienen, sowie IL-10, welches die Makrophagenaktivierung hemmt. IL-4 hemmt zudem während der klonalen Expansion die Ausdifferenzierung der aktivierten T-Zellen zu TH1-Zellen [57-59].

TH1- und TH2-Zellen produzieren beide CD154, welches wie zuvor erwähnt zu einer Aktivierung der Zielzellen, insbesondere also von Makrophagen (durch TH1-Zellen) und B-Zellen (durch TH2-Zellen) sowie CD8 T-Zellen, führt [34].

Ob sich eine T-Zelle zur TH1- oder TH2-Zelle differenziert, hängt unter anderem von der antigenpräsentierenden Zelle und den von ihr produzierten Zytokinen ab. IL-12 bewirkt eine Differenzierung zu TH1-Zellen und damit zu einer verstärkt zellvermittelten Immunreaktion [60]. IL-4 bewirkt dagegen eine vermehrte TH2-Differenzierung und damit eine Verstärkung der humoralen Immunantwort [34, 53, 54]. Gleichzeitig hemmen die durch TH1- bzw. TH2-Zellen produzierten Zytokine die jeweils andere Zelllinie [50, 58, 61].

CD8 Effektor-T-Zellen produzieren vor allem die Zytokine Interferon- γ , TNF- α und TNF- β . Die antiviralen Eigenschaften von Interferon- γ setzen sich aus der direkten Hemmung der Virusreplikation, der Induktion von MHC-I-Molekülen auf den Zielzellen sowie weiteren Effekten, die eine Viruselimination aus der Zielzelle bewirken, zusammen [34, 57, 61, 62]. TNF- α und - β können neben der schon erwähnten Makrophagenaktivierung, zu der auch Interferon- γ maßgeblich beiträgt, auch direkt zum Untergang der Zielzelle führen. Mit den Zytotoxinen Perforin, Granzysin und Granulysin sowie dem membranassoziierten Molekül Fas (CD95) werden CD8 Effektor-T-Zellen ihrer Rolle als zytotoxische T-Zellen gerecht und eliminieren abnormale Zielzellen hauptsächlich durch Apoptoseinduktion. Im Gegensatz zu CD4 Effektorzellen liegen die Zytotoxine in gespeicherter Form in sogenannten Granula vor und sind damit sofort bei Bindung an eine Zielzelle vorhanden. Zusätzlich werden sie nach erfolgreicher Antigen/TCR-Bindung auf gleiche Weise wie bei CD4 Zellen nachgebildet [34, 56, 62-64].

1.2.4 Terminierung der Immunreaktion

Nach der Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch immunogene Antigene sind aus den naiven T-Zellen T-Effektorzellen geworden, die entweder in Form von zytotoxischen T-Zellen direkt infizierte Zellen eliminieren oder als T-Helferzellen zu einer Aktivierung von B-Zellen, CD8 T-Zellen oder Makrophagen und somit ebenfalls zur Beseitigung des Antigens führen. Mit der sinkenden Konzentration des Antigens im Körper wird dieses immer seltener von naiven sowie Effektor-T-Zellen gebunden. Treffen Effektor-T-Zellen nicht mehr auf ihr spezifisches Antigen, fehlen ihnen überlebenswichtige T-Zell-Rezeptorsignale und sie sterben durch Apoptoseinduktion.

Mit der Aktivierung der naiven T-Zellen wird die Bildung eines neuen Oberflächenproteins, CTLA4, induziert. CTLA4 ist ein Homolog von CD28, es wird ebenfalls von kostimulatorischen Molekülen gebunden. Dabei hat es eine höhere Affinität als CD28, wirkt aber inhibitorisch und leistet so ebenfalls einen Beitrag zur Beendigung der Immunreaktion [38].

1.2.5 T-Gedächtniszellen

Nach Abklingen einer Infektion pendelt sich die Zahl der für das Pathogen antigenspezifischen T-Zellen auf einem Wert ca. 100-1000-fach über dem vor der Infektion gemessenen Wert ein und verbleibt für lange Zeit auf diesem Niveau. Die Zunahme erklärt sich dadurch, dass bei der klonalen Expansion neben den Effektor-T-Zellen auch Gedächtnis-T-Zellen entstehen, die die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses darstellen [65].

Gedächtniszellen sind in einigen Aspekten den Effektorzellen ähnlich, sie sind nämlich voraktivierte T-Zellen. Im Falle eines erneuten Antigenkontakts können sie daher eine schnellere und effizientere Immunantwort auslösen [34, 66]. Antigen-spezifische Gedächtniszellen bleiben dem Körper über Jahrzehnte erhalten [67, 68].

B-Gedächtniszellen führen bei erneutem Antigenkontakt ebenfalls zu einer intensiveren Immunantwort auf humoraler Ebene, indem es zur schnelleren Antikörperproduktion mit Immunglobulinen höherer Affinität und anderer Klassenzugehörigkeit als bei einem Erstkontakt kommt. Durch höhere Expression von MHC-II sowie kostimulierender Moleküle können B-Gedächtniszellen schon bei niedrigeren Antigenkonzentrationen durch T-Effektorzellen aktiviert werden [34].

1.2.6 Immunantwort bei Virusinfektionen

Viren infizieren Körperzellen, um sich in diesen unter Inanspruchnahme der wirtszelleigenen Mechanismen zu replizieren. Sie sind demnach obligat intrazelluläre Pathogene, die nur während der Infektion neuer Zellen, der Phase der Virämie, extrazellulär vorzufinden sind.

Nach der Virusinfektion einer Körperzelle wird von den infizierten Zellen Interferon- α und - β gebildet und in die Umgebung abgegeben [9, 56].

Die Interferone führen an der virusinfizierten sowie den umgebenden nicht infizierten Zellen zur Transkription verschiedener Proteine, die das Virus eliminieren oder dessen Replikation hemmen können. Zusätzlich kommt es zur vermehrten Expression von MHC-I-Molekülen und zur Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [9].

Natürliche Killerzellen sind den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in ihrer Funktion ähnlich, gehören aufgrund von fehlenden antigenspezifischen Rezeptoren aber zum angeborenen Immunsystem. Nach Aktivierung sezernieren sie verschiedene Zytokine, unter anderem Interferon- γ (s.u.). Hierüber kommt es ebenfalls zur Aktivierung von APZ und zu einer Unterstützung des adaptiven Immunsystems. NK-Zellen besitzen auf gleiche Weise wie zytotoxische T-Zellen die Fähigkeit zur Eliminierung von infizierten Zellen [34, 69].

Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Phagozytieren MHC-II-exprimierende Zellen eine infizierte Zelle bzw. virale Proteine, kommt es zur Präsentation der viralen Peptide über MHC-II-Moleküle. Über die MHC-II-Moleküle können nun antigenspezifische CD4 T-Zellen und über diese wiederum antigenspezifische B-Zellen aktiviert werden. Diese zum humoralen Immunsystem gehörenden Zellen beginnen mit der Bildung antigenspezifischer Antikörper.

Die antigenspezifischen CD4 T-Effektorzellen führen über Zytokine wie Interferon- γ zur weiteren Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen. Außerdem hat Interferon antivirale Eigenschaften und bewirkt unter anderem eine erhöhte Expression von MHC-I-Molekülen der umgebenden Zellen [56]. Über MHC-I-Moleküle werden Peptidfragmente von den im Zytosol jeder Zelle produzierten Proteinen präsentiert, also auch virale Peptide in virusinfizierten Zellen. Durch die vermehrte Expression können zytotoxische T-Zellen infizierte Zellen leichter erkennen und eliminieren [34].

Der Vorgang der Antigen-Präsentation und Aktivierung von T-Zellen ist in Abbildung 2 zusammengefasst.

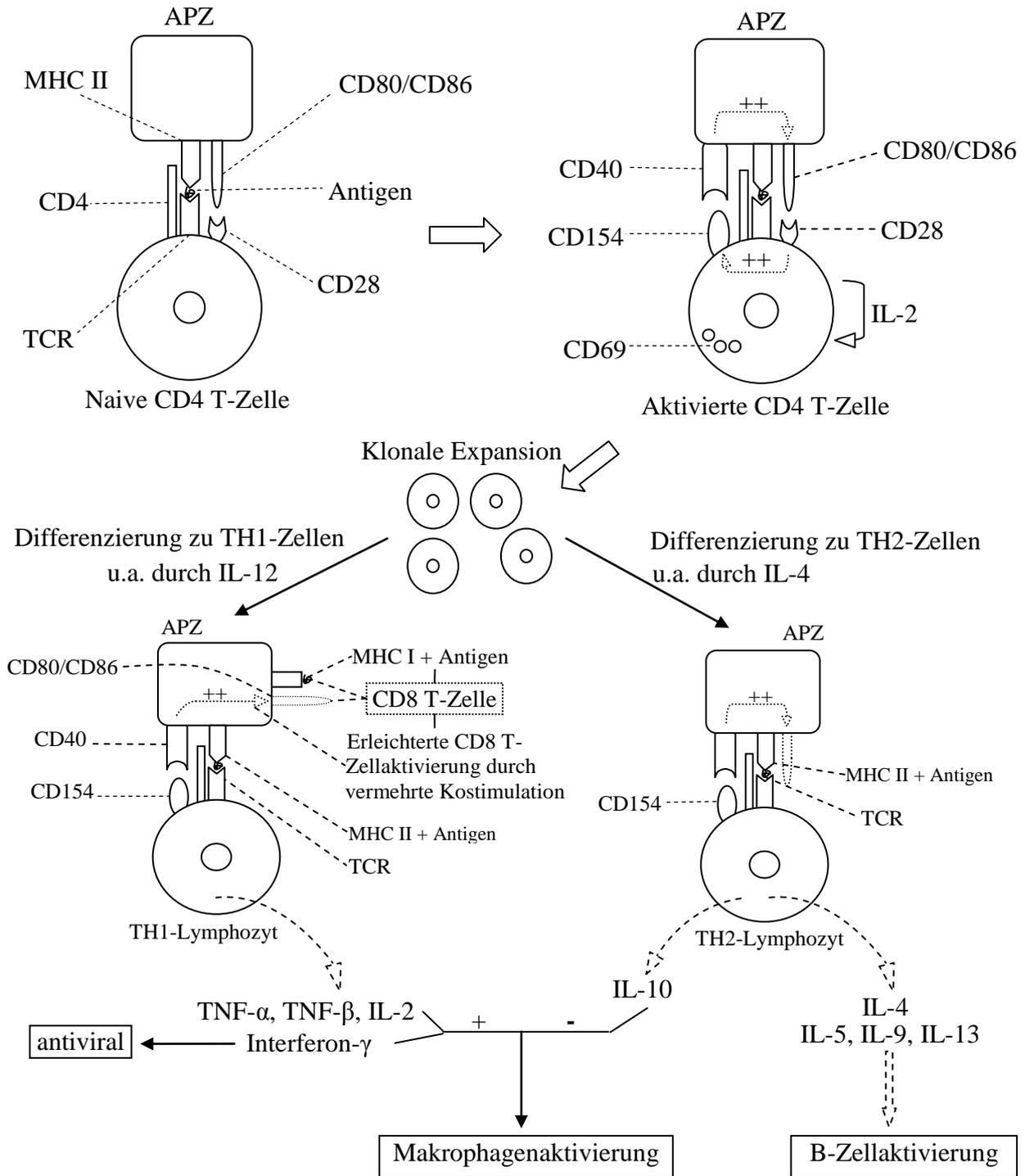


Abbildung 2: Eine professionell Antigen präsentierende Zelle präsentiert ein zuvor aufgenommenes Fremdantigen über ein MHC-II-Molekül an eine für das Antigen spezifische CD4 T-Zelle. Durch gleichzeitige Kostimulation über den B7(CD80/CD86)/CD28 Mechanismus wird die T-Zelle erfolgreich aktiviert und zur Produktion von CD154 und CD69 angeregt. CD154 führt durch Bindung an CD40 wiederum zur weiteren Aktivierung der APZ und zur vermehrten CD80/CD86 (B7) Expression. Die aktivierte CD4 T-Zelle beginnt nach autokriner IL-2 Produktion mit der klonalen Expansion. Unter Einwirkung von IL-12 kommt es zur Differenzierung der Zellklone zu TH1-Zellen, die nach erneutem Kontakt mit ihrem Antigen die Zytokine TNF- α , TNF- β , IL-2 sowie Interferon- γ mit makrophagenaktivierenden sowie antiviralen Eigenschaften (Interferon- γ) produzieren. Die durch die CD40/CD154 Interaktion vermehrte CD80/CD86 Expression sowie die durch Interferon- γ vermehrte MHC-I-Expression erleichtern zudem die Aktivierung von CD8 T-Zellen. Durch Einwirken von IL-4 während der klonalen Expansion kommt es zur Differenzierung von TH2-Zellen, die mit ihren Zytokinen die Makrophagenaktivierung hemmen und die humorale Immunantwort über B-Zellen fördern.

1.3 Immunantwort bei der Hepatitis C Virusinfektion

Trotz intensiver Forschungen sind viele Fragen zur Immunantwort bei der Hepatitis C Virusinfektion ungeklärt. Aufgrund der milden und unspezifischen Symptomatik ist insbesondere die Untersuchung der immunologischen Geschehnisse bei akuter HCV-Infektion oftmals auf die Beobachtungen im Tiermodell angewiesen. Dennoch sind gerade bei Untersuchungen der zellvermittelten Immunantwort der akuten Hepatitis C Virusinfektion eindeutigere Ergebnisse als bei der chronischen Hepatitis C Virusinfektion beobachtet worden.

Insgesamt kommt es zur Aktivierung von humoraler sowie zellvermittelter Immunabwehr, wobei die wesentlichen Abwehrmechanismen für eine erfolgreiche andauernde Viruselimination auf Seiten der zellulären Immunantwort zu liegen scheinen. Daher wird im Folgenden nur kurz auf die humorale Immunantwort im Allgemeinen eingegangen und ein Schwerpunkt auf die T-Zell vermittelte Immunantwort bei akuter und chronischer Hepatitis C Virusinfektion gelegt.

1.3.1 Humorale Immunantwort

Viruspezifische Antikörper treten bei den meisten infizierten Individuen ca. 7-8 Wochen nach der Infektion auf. Die HCV-Antikörper sind gegen Epitope nahezu aller HCV-Proteine gerichtet [9]. Besonders hervorzuheben sind sogenannte neutralisierende Antikörper, die gegen Epitope der hypervariablen Region 1 des Strukturproteins E2 gerichtet sind und so die Funktion und Virusvermehrung behindern können. Durch die Hypervariabilität dieser Bereiche kommt es jedoch häufig zu so genannten Escape-Mechanismen, d.h. die Antikörper haben für die veränderten Bereiche keine Spezifität mehr. Sowohl die Bedeutung der Antikörper insgesamt wie auch der neutralisierenden Antikörper für die erfolgreiche Viruselimination ist umstritten. Bei Schimpansen konnten neutralisierende Antikörper die Infektiosität des Hepatitis C Virus verhindern, außerdem wurde bei Patienten mit akuter HCV-Infektion zeitgleich mit dem Auftreten von neutralisierenden Antikörpern ein Sequenzwechsel in der HVR-1 beobachtet, vermutlich durch den entstehenden Selektionsdruck. Eine erhöhte Virusgenomvariabilität wurde aber insbesondere bei chronifizierender Hepatitis C Virusinfektion nachgewiesen [70].

Im Gegensatz zu älteren Studien konnte in einer neueren Studie mit homogenem Patientenkollektiv eine Korrelation zwischen dem frühen Auftreten neutralisierender Antikörper bei ausheilender akuter Hepatitis C Virusinfektion und nicht nachweisbaren bzw. niedrigen Titern oder verspäteter Serokonversion neutralisierender Antikörper bei Viruspersistenz gezeigt werden [71].

Demgegenüber steht die Tatsache, dass auf natürliche Weise erworbene Antikörper eine Reinfektion mit dem Hepatitis C Virus des gleichen oder eines neuen HCV-Genotyps nicht verhindern [72, 73]. Zudem sind Fälle bekannt, in denen es zu einer Ausheilung ohne Nachweis bzw. wesentliche Titerzunahme von HCV-spezifischen Antikörpern bei Schimpansen und Menschen gekommen ist [74, 75]. Das Vorhandensein neutralisierender Antikörper in vielen chronisch infizierten Patienten konnte durch den Nachweis verschiedener Umgehungswege bzw. der Behinderung der Wirtsabwehr durch das Hepatitis C Virus erklärt werden [76].

1.3.2 T-Zell-Immunantwort bei HCV-Infektion

Mehrere Studien zeigen die Notwendigkeit einer starken, anhaltenden und möglichst multispezifischen T-Zellantwort für eine dauerhafte Viruselimination insbesondere im Akutstadium der Hepatitis C Virusinfektion. Dabei kann zumindest am Schimpansenmodell eine erfolgreiche Viruselimination weder alleine durch CD4 [77] noch durch CD8 T-Lymphozyten [78] erreicht werden. Besondere Aufmerksamkeit wird dabei den CD4 T-Zellen geschenkt. Sie scheinen die erfolgreiche, dauerhafte und sich an Virusmutationen anpassende CD8 T-Zellfunktion aufrecht zu erhalten [79].

1.3.2.1 CD4 T-Zell-Immunantwort bei HCV-Infektion

Im Akutstadium der Hepatitis C Virusinfektion können den unterschiedlichen Krankheitsverläufen häufig bestimmte T-Zell-Reaktionsweisen zugeordnet werden. Generell zeigt sich bei Patienten mit ausheilender akuter Hepatitis C Virusinfektion eine CD4 T-Zellantwort höherer Intensität und Diversivität [79-86] gegenüber Patienten mit chronifizierender akuter Hepatitis C Virusinfektion. Mehrmals konnte eine direkte Korrelation zwischen einsetzender CD4 T-Zellantwort und sinkender bis hin zur nicht mehr nachweisbaren Viruslast bzw. nachlassender CD4 Aktivität verbunden mit einem Wiederauftreten der HCV-RNA im Patientenblut hergestellt werden [85, 87].

Bei Patienten mit ausheilender akuter Hepatitis C Virusinfektion konnte eine anhaltende kräftige CD4 T-Zellantwort festgestellt werden, insbesondere gegen die NS-Antigene, bei Patienten mit chronifizierenden Verläufen wurde dagegen höchstens eine vorübergehende CD4 Aktivierung beobachtet. Hierdurch wurde offensichtlich der für die Ausheilung notwendige dauerhafte Stimulus für das Immunsystem, insbesondere für CD8 T-Zellen, unterbrochen, und es kam gehäuft zum chronischen Verlauf der Hepatitis C Virusinfektion [79, 82, 87].

In diesem Zusammenhang ist auch die eingeschränkte bzw. fehlerhafte T-Zellfunktion mit verringerter Interferon- γ Produktion bei chronifizierender akuter Hepatitis C Virusinfektion beschrieben worden [86, 88].

Die Erkennung eines größeren Spektrums von HCV-Epitopen durch CD4 T-Zellen scheint für die Ausheilung der HCV-Infektion von Vorteil zu sein [89]. Trotz Vorhandensein einer starken CD4 T-Zellantwort kann es aber zur Chronifizierung der akuten Hepatitis C Virusinfektion kommen [82].

Die Grundlage der Chronifizierung der Hepatitis C Virusinfektion könnte also durch das Versagen einer effektiven Immunantwort im akuten Stadium der Hepatitis C Virusinfektion z. B. im Sinne der zuvor beschriebenen gestörten T-Zellfunktion liegen.

Bei Untersuchungen der T-Zell vermittelten Immunantwort im chronischen Stadium der Hepatitis C Virusinfektion konnten gegenüber der Immunantwort im akuten Stadium einige Unterschiede festgestellt werden.

Generell ist die Aktivität der CD4 T-Zellen wesentlich geringer ausgeprägt als bei Patienten mit akuter Hepatitis C Virusinfektion, insbesondere gegenüber der ausheilenden Form. Dies zeigt sich z.B. in der Anzahl der von CD4 T-Zellen erkannten HCV-Epitope. Patienten mit ausgeheilter Hepatitis C Virusinfektion erkennen in der Regel mehr Epitope als Patienten mit chronischem Verlauf [87-89].

Gerlach et al. konnten neben der zuvor erwähnten Korrelation zwischen der Stärke der CD4 T-Zellantwort im akuten Stadium und einem damit zusammenhängenden Rückgang der Viruslast feststellen, dass zwei Drittel der Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion keine signifikante T-Zellantwort zeigten [87]. Dieses Ergebnis wurde durch Ulsenheimer et al. später in ähnlicher Weise bestätigt. Hier konnten im Gegensatz zu Patienten mit akuter Hepatitis C Virusinfektion bei 50% der Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion keine antigenspezifischen Zellen mehr nachgewiesen werden. Zudem wurde ein Unterschied in der T-Zellfunktion festgestellt. Die antigenspezifischen CD4 T-Zellen scheinen bei chronischer Hepatitis C Virusinfektion eine niedrigere Proliferationskapazität und ein verändertes Zytokinprofil mit niedrigerer IL-2- [90] und IFN- γ -Produktion zu zeigen [86, 88]. In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese einer T-Zellerschöpfung bzw. Anergie der HCV spezifischen CD4 Zellen bei chronischen Verläufen aufgestellt.

Rosen et al. dagegen fanden 2002 bei der Mehrheit von Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion eine Zytokinantwort in antigenspezifischen CD4 T-Zellen. Patienten einer kleinen Gruppe (n=6) mit spontan oder nach Therapie ausgeheilter Hepatitis C Virusinfektion zeigten

aber eine stärkere Immunantwort als Patienten mit bestehender chronischer Hepatitis C Virusinfektion. Die stärkste Immunreaktion wurde wie zuvor von Gerlach et al. bei der Gruppe der HCV-RNA negativen Probanden gegen die HCV-Proteine NS3 und NS4 gefunden, bei HCV-RNA-positiven Probanden gegen das Core Antigen [87, 91].

Ergebnisse von Untersuchungen der CD4 T-Zellaktivität von Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion während einer antiviralen Therapie sind ebenfalls uneinheitlich.

Barnes et al. konnten bei Messungen vor einer antiviralen Therapie nur bei ca. 30-50% der Patienten schwache proliferative Reaktionen oder Interferon- γ -Produktion durch HCV-Antigene auslösen. Während der antiviralen Therapie zeigten sich höhere Proliferationsraten. Auch die Interferon- γ -Produktion stieg diskret an, hing aber nicht von der Anzahl der wachstumsstimulierten T-Zellen ab. Die stärksten Immunreaktionen wurden im späteren Verlauf der Therapie gemessen. Es zeigte sich allerdings keinerlei Korrelation zwischen den gemessenen Werten und einem erfolgreichen oder fehlschlagenden Therapieergebnis [92].

In ähnlicher Weise konnten Kamal et al. 2002 bei ca. 50% der Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion im Vorfeld der Therapie eine lediglich schwache Interferon- γ -Immunantwort vornehmlich gegen das Core-Antigen messen. Während und nach Therapie zeigte sich in dieser Studie jedoch eine Korrelation zwischen der CD4 T-Zellimmunreaktion und dem Therapieergebnis. Responder reagierten während und nach der Therapie deutlich kräftiger und auf ein breiteres Spektrum der HCV-Antigene als Relapser und Nonresponder [93].

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Burton et al. 2008 eine starke Abnahme der Interferon- γ -Produktion durch CD4 T-Zellen ca. 8 Wochen nach Therapiebeginn der chronischen Hepatitis C Virusinfektion. Diese erniedrigten Werte konnten auch noch 6 Monate nach Therapieende nachgewiesen werden. Zwischen den verschiedenen Patientengruppen (Responder, Relapser, Nonresponder) wurden dabei keine signifikanten Unterschiede der Messergebnisse unter Therapie gefunden. Lediglich bei den Relapsen konnte zeitgleich mit dem Wiederauftreten der HCV-RNA eine Zunahme der HCV-spezifischen Immunantwort festgestellt werden [94].

1.3.2.2 CD8 T-Zell-Immunantwort bei HCV-Infektion

Viruspezifische CD8 T-Zellen können im Durchschnitt ca. 4-8 Wochen nach Infektion nachgewiesen werden [95]. Zeitgleich mit ihrem Auftreten bzw. einer Aktivitätszunahme wurden in mehreren Studien klinische Zeichen der Leberzellschädigung wie Ikterus und erhöhte Transaminasen festgestellt [82]. Diese ist vermutlich auf Angriffe der zytotoxischen CD8 T-Zellen auf infizierte Hepatozyten zurückzuführen. Das Auftreten der HCV-spezifischen CD8 T-

Zellen ist jedoch nicht immer mit einer Abnahme der Viruslast assoziiert. Hierzu bedarf es offenbar insbesondere hinsichtlich der IFN- γ -Produktion voll funktionsfähiger CD8 T-Zellen.

Die Ergebnisse von Studien über die CD8 Immunantwort von Patienten mit einer chronifizierenden Hepatitis C Virusinfektion im Akutstadium sind uneinheitlich.

Während einige Studien bei Patienten mit chronifizierender akuter Hepatitis C Virusinfektion im Gegensatz zur ausheilenden Hepatitis C Virusinfektion keine oder eine nur stark verminderte CD8 T-Zellaktivität zeigten [82, 96], wurde in anderen Studien bei mehreren Patienten mit chronifizierender akuter Hepatitis C Virusinfektion im Anfangsstadium kein Unterschied hinsichtlich der Immunantwort gegenüber Patienten mit ausheilender Hepatitis C Virusinfektion festgestellt [79]. Erst im weiteren Verlauf kam es bei Patienten mit Viruspersistenz zu einer starken Abnahme der T-Zellaktivität [97]. Dabei wurde unter anderem die besondere Bedeutung der CD4 T-Zellantwort als bedeutende Komponente für eine dauerhafte Viruselimination unterstrichen [78, 80].

Als Besonderheit konnten in einigen Studien die früh vorhandenen CD8 T-Zellen noch keine antiviralen Zytokine wie z.B. Interferon- γ bilden [80, 82], sondern entwickelten diese Eigenschaft erst später im Infektionsverlauf. Mit Einsetzen der Interferonproduktion kam es dann zu einem plötzlichen Viruslastabfall und evtl. zur dauerhaften Viruselimination. Diese Reifung der CD8 T-Zellen könnte ebenfalls von CD4 T-Zellen abhängig sein [82].

In weiteren Studien konnten selbst viele Jahre nach Ausheilung der akuten HCV noch virusspezifische CD4 und CD8 T-Zellen nachgewiesen werden. Obwohl sie eine Reinfektion nicht verhindern, scheinen sie zumindest im Tierversuch den Krankheitsverlauf einer Reinfektion mit HCV positiv beeinflussen zu können [77].

Analog zu den CD4 T-Zellen wurde im chronischen Stadium der HCV in mehreren Studien eine sehr schwache, gegen wenige HCV-Epitope gerichtete oder gar fehlende CD8 T-Zell-Immunantwort beschrieben [95, 98].

Nur vereinzelt wurde eine gegen ein breites Epitopenspektrum gerichtete CD8 T-Zellantwort festgestellt, die dennoch einen chronischen Verlauf nicht verhindern konnte. Hierbei wurden mehrfach CD8 T-Zellen mit abnormaler Funktion, herabgesetzter Zytotoxizität und Teilungsfähigkeit sowie einem veränderten Zytokinproduktionsprofil nachgewiesen [95, 98].

Ein neuer und wichtiger Punkt ist die Assoziation spezifischer HLA-Allele des Infizierten mit dem Krankheitsverlauf der Hepatitis C Virusinfektion. Insbesondere das MHC-I Allel B27 konnte signifikant häufiger bei Patienten mit spontan ausheilender Hepatitis C Virusinfektion nachgewiesen werden [95].

Diverse Studien lassen einen Einfluss verschiedener anderer genetischer Wirtsfaktoren vermuten [99].

2 Herleitung der Fragestellung

Trotz therapeutischer Fortschritte bei der erfolgreichen Behandlung der HCV-Infektion können insgesamt immer noch ca. 40-50% der Patienten durch die erste antivirale Therapie nicht geheilt werden. Aufgrund der hohen Kosten der Therapie und der zum Teil erheblichen Nebenwirkungen wäre ein früher Indikator für ein Fehlschlagen der Therapie wünschenswert. Zudem können durch weitere Erkenntnisgewinne hinsichtlich der Gründe für das Versagen der dauerhaften Viruselimination trotz Therapie evtl. neue Ansatzpunkte zur Verbesserung der antiviralen Ansprechrate aufgedeckt werden.

Aufgrund der immunmodulierenden Wirkungsweise der Therapeutika konzentrieren sich die Untersuchungen diesbezüglich auf die Zellen des Immunsystems, vorzugsweise auf die T-Zellen. Obwohl die immunologischen Vorgänge in den verschiedenen Stadien der Hepatitis C Virusinfektion bereits mehrfach untersucht wurden, sind viele der Vorgänge, die den Therapieausgang der einzelnen Patienten bestimmen, immer noch nicht bekannt. Untersuchungen von T-Zellen im chronischen Stadium der HCV-Infektion und im Rahmen einer antiviralen Therapie sind in ihren Ergebnissen nicht eindeutig oder sogar widersprüchlich.

CD154 stellt einen relativ neuen Marker dar, dessen Bedeutung im Rahmen der HCV-Infektion bis zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht untersucht wurde. In der hier vorgelegten Arbeit sollte daher mittels einer in dieser Weise bei HCV-infizierten Patienten noch nicht durchgeführten experimentellen Technik und einer detaillierten Auswertung nach verschiedenen Zellphänotypen in Bezug zum jeweiligen Therapieansprechen verschiedenen Aspekten nachgegangen werden.

Folgende Fragestellungen sollten mit dieser Methode untersucht werden:

- Wie verhalten sich während einer Therapie die CD4 T-Zellreaktionen auf HCV-Antigene?
- Sind Assoziationen hinsichtlich des Therapieergebnisses zu beobachten?
- Sind Unterschiede zwischen den CD4 T-Zellreaktionen vor und während der antiviralen Therapie zu erkennen, und zeigen sich Assoziationen mit dem Therapieansprechen?
- Unterscheiden sich die CD4 T-Zellantworten von Patienten nach antiviraler Therapie in Gruppen mit unterschiedlichen Therapieergebnissen untereinander und im Vergleich zu therapienaiven Patienten?

- Können Hinweise auf eine Aktivierung von CD4 T-Zellen mit fehlender oder fehlerhafter Zytokinproduktion insbesondere anhand der Auswertung der verschiedenen Zellphänotypen gefunden werden?
- Sind Unterschiede in der nicht HCV-spezifischen Aktivierbarkeit der T-Zellen zwischen den verschiedenen Patientengruppen und zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten festzustellen?

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Auflistung verwendeter Materialien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Herstellerfirma
Dulbecco´s PBS (phosphate buffered saline) (1x) without Ca & Mg	PAA, Pasching
BSA (bovine serum albumin)	Sigma, Deisenhofen
FCS (fetal calf serum)	Biochrom AG, Berlin
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma, Deisenhofen
Saponin	Fluka, Buchs
SEB (Staphylococcus Enterotoxin B)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid pro analysi (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt
Potassium bicarbonate minimum 99.5% (KHCO ₃)	Sigma, Deisenhofen
Titriplex III zur Analyse (Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat = NA ₂ EDTA)	Merck, Darmstadt

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 3: Verwendete Proteine:

Bezeichnung	Ausgangskonzentration	Hersteller
r-Core	350µg/ml	Mikrogen, Neuried
r-NS 3	80µg/ml	Mikrogen, Neuried
r-NS 4	90µg/ml	Mikrogen, Neuried
r-NS 5-4	150µg/ml	Mikrogen, Neuried
r-NS 5-12	360µg/ml	Mikrogen, Neuried

Tabelle 4: Verwendete Antikörper:

Bezeichnung	Fluorochrom	Klon	Firma
Anti-human CD 4	APC, FITC	RPA-T4	Becton Dickinson, Heidelberg eBioscience, San Diego
Anti-human CD 8a	PE-Cy7	RPA-T8	eBioscience, San Diego
Anti-human CD 154	APC, FITC	TRAP1	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD 69	FITC	FN50	eBioscience, San Diego
Purified anti-human CD 28	Unkonjugiert	28.2	Becton Dickinson, Heidelberg eBioscience, San Diego
Anti-human TNF- α	PE	MAb11	eBioscience, San Diego
Anti-human IFN- γ	PE	4S.B3	eBioscience, San Diego

3.1.2 Patientenproben

Pro Patient wurden ca. 10ml frisches Heparin-Vollblut benötigt. Dieses wurde nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis unter standardisierten Bedingungen aus der Lebersprechstunde der gastroenterologischen Poliklinik der Charité-Campus Virchow Klinikum bzw. einer assoziierten Praxis gewonnen.

3.1.3 Lösungen

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Lösungen/Ansätzen

Bezeichnung	Herstellung
PBS (phosphate buffered saline)	Steriles (1x) PBS
0.5% PBS/BSA	0.5% BSA in sterilem (1x) PBS
PFA 4%	4% PFA in sterilem (1x) PBS Lichtgeschützt und unter Hitzezufuhr, pH 7
Saponin 10%	10% Saponin in sterilem (1x) PBS
Brefeldin A (c=5mg/ml)	BFA in 96% Ethanol (Vol/Vol)
Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) (c=1mg/ml)	SEB in sterilem (1x) PBS
Erythrozyten Lyse-Puffer	0.15M NH ₄ Cl 10mM KHCO ₃ 0.1mM Na ₂ EDTA ad Aqua dest. pH 7.2-7.4
<i>Soweit nicht anders bezeichnet: %-Angaben in Gewichtsprozent</i>	

3.1.3.1 PBS

Für die Versuche wurde sterile einfach (1x)-PBS-Lösung ohne Kalzium und Magnesium verwendet.

3.1.3.2 PBS/BSA-Lösung

Zur Herstellung von 0.5% PBS/BSA-Lösung wurden

2.5g reines Albumin Rinderserum

in 500ml steriler PBS-Lösung gelöst.

3.1.3.3 Paraformaldehyd (PFA)

Zum Ansetzen einer 4% PFA-Lösung wurden

20g reines Paraformaldehyd

in 500ml steriler PBS-Lösung

lichtgeschützt und unter Hitzezufuhr gelöst. Nach Abkühlung wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt.

3.1.3.4 Saponin

Zur Herstellung eines 10% Saponin-Vorrats wurden

5g reines Saponin

in 50ml sterilem PBS

gelöst.

3.1.3.5 Erythrozyten Lyse-Puffer

In einem Messzylinder wurden

0.15M NH_4Cl

10mM KHCO_3

sowie 0.1mM Na_2EDTA

abgewogen und mit Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7.2-7.4 eingestellt.

3.1.3.6 Brefeldin A (BFA)

Für die erwünschte Konzentration von $c=5\text{mg/ml}$ wurden

5mg BFA

in 1ml 96% Ethanol

gelöst.

3.1.3.7 Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)

Für $c=1\text{mg/ml}$ wurde

1mg SEB-Pulver

in 1ml sterilem PBS

gelöst.

3.1.4 Hepatitis C Virusproteine

Tabelle 6: Verdünnungsschema der Proteine

Bezeichnung	Ausgangskonzentration	Verdünnungsverhältnis	Verdünnungsmedium	Endkonzentration
r-Core	350µg/ml	1:7	PBS	50µg/ml
r-NS 3	80µg/ml	1:1.6	PBS	50µg/ml
r-NS 4	90µg/ml	1:1.8	PBS	50µg/ml
r-NS 5-4	150µg/ml	1:3	PBS	50µg/ml
r-NS 5-12	360µg/ml	1:7.2	PBS	50µg/ml

Es wurden die rekombinanten HCV-Proteine Core, NS3, NS4, NS5-4 und NS5-12 der Firma Mikrogen verwendet. Die RNA wurde ursprünglich aus dem HCV-Serotyp 1a isoliert, es besteht aber nach Aussage der Firma eine starke Kreuzreaktivität zwischen den Genotypen. Auch in durchflusszytometrischen Versuchen wurde kein Unterschied bei der Immunstimulation durch die verwendeten Proteine zwischen verschiedenen Genotypen festgestellt [91]. Die gelieferten Proteinvorräte lagen in unterschiedlichen Konzentrationen vor und wurden auf eine einheitliche Konzentration von 50µg/ml portioniert.

Core: Das Core-Protein setzt sich aus den Aminosäuren 1-115 des Vorläuferproteins zusammen. Aus dem Konzentrat (350µg/ml) wurde die Versuchslösung durch Verdünnung im Verhältnis 1 (Core) zu 7 (PBS) hergestellt (100µl Core-Protein/600µl PBS).

NS3: Das NS3-Protein setzt sich aus den Aminosäuren 1007-1534 des Vorläuferproteins zusammen und besitzt eine kombinierte Serinprotease- und Helikaseaktivität. Das Ausgangskonzentrat mit 80µg/ml wurde im Verhältnis 1 (NS3) zu 1.6 (PBS) verdünnt (100µl NS3-Protein/60µl PBS).

NS4: Das NS4-Protein setzt sich aus den Aminosäuren 1617-1864 des Vorläuferproteins zusammen. Aus dem Konzentrat (90µg/ml) wurde die Versuchslösung durch Verdünnung im Verhältnis 1 (NS4) zu 1.8 (PBS) hergestellt (100µl NS4-Protein/80µl PBS).

NS5-4: Das Protein NS5-4 ist ein Teil der RNA-Polymerase (NS5B). Das Protein setzt sich aus den Aminosäuren 2621-2867 des Vorläuferproteins zusammen. Das Ausgangskonzentrat mit 150µg/ml wurde im Verhältnis 1 (NS5-4) zu 3 (PBS) verdünnt (100µl NS5-4-Protein/200µl PBS).

NS5-12: Das Protein NS5-12 ist ein Teil der RNA-Polymerase (NS5B). Das Protein setzt sich aus den Aminosäuren 2006-2268 des Vorläuferproteins zusammen. Das Konzentrat mit 360µg/ml wurde im Verhältnis 1 (NS5-12) zu 7.2 (PBS) verdünnt (100µl NS5-12-Protein/620µl PBS).

3.1.5 Antikörper

Anti-human CD4 APC/FITC

Der monoklonale Maus IgG1 kappa Antikörper (eBioscience/BD) bindet an das Oberflächenprotein CD4 von menschlichen Zellen, welches von T-Lymphozyten, Thymozyten und in geringen Konzentrationen von Monozyten exprimiert wird [34]. Es wurden Antikörper mit Allophycocyanin (APC)- oder Fluorescein-Isothiocyanatkonjugation (FITC) verwendet.

Anti-human CD154 FITC/APC

Der Maus IgG1 kappa Antikörper Anti-human CD154 (Becton Dickinson) bindet das in aktivierten T-Lymphozyten exprimierte CD154 (CD40 Ligand), ein Glykoprotein aus der Tumornekrosefaktor-Familie. Es wurden Antikörper mit Allophycocyanin (APC)- oder Fluorescein-Isothiocyanatkonjugation (FITC) verwendet. Da CD154 gegenüber CD69 eine höhere Spezifität für antigenaktivierte T-Lymphozyten aufweist, wurde es nach anfänglichen Messungen mit CD69 bevorzugt eingesetzt [46].

Anti-human CD69 FITC

Der monoklonale Maus IgG1 kappa Antikörper (eBioscience) bindet das Oberflächenprotein CD69 auf menschlichen Zellen. CD69 ist ein früher Aktivierungsmarker, der innerhalb einer Stunde nach Aktivierung von T-Lymphozyten exprimiert wird. Monozyten und Thrombozyten können ebenfalls CD69 bilden [100, 101]. Es wurde ein mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugierter Antikörper verwendet.

Anti-human IFN- γ PE

Der monoklonale Maus IgG1 kappa Antikörper (eBioscience) bindet an menschliches Interferon- γ , ein Zytokin das von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert wird. Der verwendete Antikörper war mit dem Fluorescein Phycoerythrin (PE) konjugiert.

Anti-human TNF- α PE

Der Maus IgG1 kappa Antikörper (eBioscience) bindet an das insbesondere von aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten gebildete Zytokin TNF- α , welches eine wichtige immunmodulierende Funktion besitzt [34, 56]. Es wurde ein mit Phycoerythrin (PE) konjugierter Antikörper verwendet.

Anti-human CD28

Der monoklonale Maus IgG1 kappa Antikörper (eBioscience/BD) bindet an den auf praktisch allen menschlichen T-Lymphozyten zu findenden CD28 Rezeptor.

Anti-human CD28 stimuliert den CD28 Rezeptor und ermöglicht so unter in vitro Bedingungen eine effektive Aktivierung von T-Zellen, die auf ihr passendes Antigen treffen. Der Antikörper wurde unkonjugiert und in aufgereinigter Form verwendet [34, 36, 102, 103].

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden im Zeitraum vom 09.11.2005 bis 27.11.06 an 81 Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion CD4 T-Zellmessungen nach dem unter 3.2.2 beschriebenen Schema durchgeführt. Die Diagnose der chronischen HCV-Infektion wurde durch den Nachweis von HCV-Antikörpern sowie den direkten Nachweis von HCV-RNA mittels Nukleinsäure-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe des COBAS TaqMan HCV Test, v2.0 gesichert. Die RNA-Nachweise mussten nach einem Intervall von 6 Monaten wiederholt werden, um den chronischen Charakter der Infektion zu bestätigen.

Es wurden zwei verschiedene Patientenkohorten untersucht.

3.2.1.1 Kohorte 1

Bei der Patientenkohorte 1 handelt es sich um eine Gruppe von Patienten mit gesicherter chronischer Hepatitis C Virusinfektion vor Beginn einer Behandlung mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin. Bei diesen wurden jeweils zwei Messungen durchgeführt, eine vor Beginn der Therapie sowie im Verlauf zwischen der achten und dreizehnten Therapiewoche. Insgesamt wurden 28 Patienten in Kohorte 1 eingeschlossen. Die Patienten waren therapienaiv (n=23) oder therapieerfahren (n=5), eine vorangegangene Therapie der HCV-Infektion wurde mindestens eineinhalb Jahre zuvor beendet. Für eine detaillierte Beschreibung von Kohorte 1 siehe Tabelle 7.

3.2.1.2 Kohorte 2

In Kohorte 2 wurden 80 Patienten mit einer gesicherten chronischen Hepatitis C Virusinfektion in ihrer Krankengeschichte eingeschlossen. Bei 51 Patienten aus Kohorte 2 wurden die Versuche nach Durchführung einer HCV-Therapie mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin durchgeführt. Darunter befanden sich auch 5 Patienten aus Kohorte 1, bei denen die Messung vor erneutem Therapiebeginn zusätzlich die Einschlusskriterien für Kohorte 2 erfüllten. Die Messungen bei den 51 Patienten nach beendeter Therapie fanden während der Nachbeobachtungsperiode in einem Zeitraum von 1 - 94 Monaten nach Therapieende statt.

29 Patienten aus Kohorte 2 hatten vor Studienbeginn noch keinen Therapieversuch unternommen, sie waren also therapienaiv. Darunter befanden sich auch 22 Patienten die

zusätzlich in Kohorte 1 eingeschlossen wurden. Die Messungen bei allen therapienaiven Patienten wurden unmittelbar vor Therapiebeginn durchgeführt. Für eine detaillierte Beschreibung von Kohorte 2 siehe Tabelle 18.

3.2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien für Patienten in Kohorte 1:

- Gesicherte chronische Hepatitis C Virusinfektion
- Zeitnah geplanter Start einer Standardtherapie der HCV-Infektion mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin

Einschlusskriterien für Patienten in Kohorte 2:

- abgeschlossene Standardtherapie mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin bei gesicherter Hepatitis C Virusinfektion
- unbehandelte, gesicherte chronische HCV-Infektion

Folgende allgemeine Ausschlusskriterien galten für beide Gruppen:

- Alter <18 Jahre, >75 Jahre
- Einnahme von immunsupprimierenden Medikamenten
- Leberzirrhose Child B oder C
- HIV-Infektion
- Hepatitis B/C Koinfektion
- Autoimmunhepatitis
- sonstige Autoimmunerkrankungen

Zusätzliches Ausschlusskriterium für Patienten in Kollektiv 1:

- Ende des letzten Behandlungsversuchs liegt weniger als eineinhalb Jahre zurück

3.2.2 Praktische Durchführung der Versuche

Das Ziel der Versuche war die Darstellung der Frequenzen antigeninduzierter Zytokin- (IFN- γ , TNF- α) und bzw. oder Aktivierungsmarkereexpression (CD154, CD69) CD4-positiver T-Zellen. Die Versuchsdurchführung mit CD28 als Kostimulanz und Brefeldin A als Sekretionshemmer, Zellaufbereitung, Durchführung der extra- und intrazellulären Färbung, Inkubationszeiten mit Antigenen, Inkubationsmengen, die Wahl der Positivkontrolle sowie die Vorbereitung für die Durchflusszytometrie lehnte sich dabei an in Vorstudien erfolgreich getestete Methoden an [46, 91, 104-106]. Das besondere an der durchgeführten Methode ist die direkte Inkubation des frisch gewonnenen Heparin-Vollbluts ohne vorherige Kultur oder Konzentration der Lymphozytenpopulation und somit eine physiologischere Untersuchung der T-Zell-Antwort auf HCV-Antigene. Die HCV-Proteine agieren als Antigene für im Vollblut vorhandene antigenspezifische Gedächtnis oder Effektor T-Zellen und leiten deren Aktivierung und damit verbunden eine Zytokin- und Aktivierungsmarkereexpression ein. Während der im vorliegenden Versuchsaufbau gewählten kurzen Inkubationszeit erreichen lediglich T-Gedächtniszellen und T-Effektorzellen ein Aktivierungsstadium mit Zytokin- und Aktivierungsmarkereexpression, welche letztendlich am Durchflusszytometer dargestellt wird. Zum Untersuchungszeitpunkt evtl. vorhandene antigenspezifische naive T-Zellen werden durchflusszytometrisch nicht miterfasst. Zudem kommt es durch die kurze Inkubationszeit nur zu einer geringen unspezifischen Aktivierung [46, 105].

Bis zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführungen waren keine T-Zelluntersuchungen an HCV-Patienten unter Verwendung des Aktivierungsmarkers CD154 durchgeführt bzw. veröffentlicht worden.

3.2.2.1 Ansetzen der Blutproben mit HCV-Proteinen

Die von den Patienten gewonnenen Heparin-Vollblutproben werden sofort nach der Entnahme im Labor weiterverarbeitet.

3.2.2.1.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau umfasst 7 verschiedene Ansätze. Die jeweiligen Ansätze werden in 14ml Polypropylene Rundbodengefäßen nach einem festen Schema angefertigt:

Ansatz Nr. 1 dient als Negativkontrolle. Es handelt sich um einen Nativansatz, der 1ml Heparin-Vollblut sowie 5 μ l anti-human CD28 enthält. Die Negativkontrolle zeigt das zum Zeitpunkt der Messung auch ohne zusätzliche Antigenstimulation individuell vorhandene Aktivitätsniveau der

CD4 T-Zellen des jeweiligen Patienten an. Der gewonnene Messwert der Negativkontrolle wurde später von den Messwerten der proteinhaltigen Ansätze abgezogen, um die tatsächliche Stimulation der T-Zellen durch das jeweilige HCV-Protein zu bestimmen.

Ansatz Nr. 2 wird als Positivkontrolle gewertet. Er enthält 1ml Heparin-Vollblut, 5µl anti-human CD28 sowie 15µl SEB entsprechend einer Endkonzentration von 15µg SEB/ml Vollblut. SEB ist ein Superantigen und kann gleichzeitig an MHC II und eine bestimmte Untereinheit des T-Zell-Rezeptors (V_{β}) binden und somit direkt eine große Gruppe von Lymphozyten aktivieren, die ca. 2-20% aller T-Zellen umfasst [34, 107, 108]. SEB führt also zu einer unspezifischen T-Zellaktivierung. Durch die in vitro erzielte T-Zell-Stimulation kann später kontrolliert werden, ob die Färbung korrekt durchgeführt wurde. Die nach SEB-Stimulation erreichten Aktivitätswerte werden als maximal erreichbares Stimulationsniveau angesehen.

Die Ansätze 3-7 enthalten außer 1ml Patientenblut und 5µl anti-human CD28 zusätzlich 20µl eines HCV-Proteins bei einer Ansatzkonzentration der Proteine von 50µg/ml, also eine Endkonzentration von je 1µg HCV-Protein/ml Ansatz. Ansatz 3 enthält dabei das Core-Protein, Ansatz 4 NS3-, Ansatz 5 NS4-, Ansatz 6 NS5-4- und Ansatz 7 NS5-12-Protein.

Siehe zur Übersicht der Ansätze auch Abbildung 3.

3.2.2.1.2 Inkubation und Exozytosehemmung

Die fertigen Ansätze werden in den Reaktionsgefäßen für 2 Stunden abgedeckt bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach werden zu jedem Reaktionsansatz 1µl Brefeldin A entsprechend einer Endkonzentration von 5µg/ml gegeben. Brefeldin A ist ein Metabolit des Pilzes *Penicillium brefeldianum*. Es hemmt die Exozytose von Proteinen durch Behinderung von Transportvorgängen am Golgi-Apparat. Dadurch kommt es zur Akkumulation und Stabilisierung von intrazellulär gebildeten Substanzen wie Zytokinen oder Aktivierungsmarkern [46, 109].

Anschließend werden die Ansätze bei 37°C und 5% CO₂ für weitere vier Stunden inkubiert.

Nach der insgesamt sechsständigen Inkubationszeit können die Ansätze für die Durchflusszytometrie vorbereitet werden [46, 104-106].

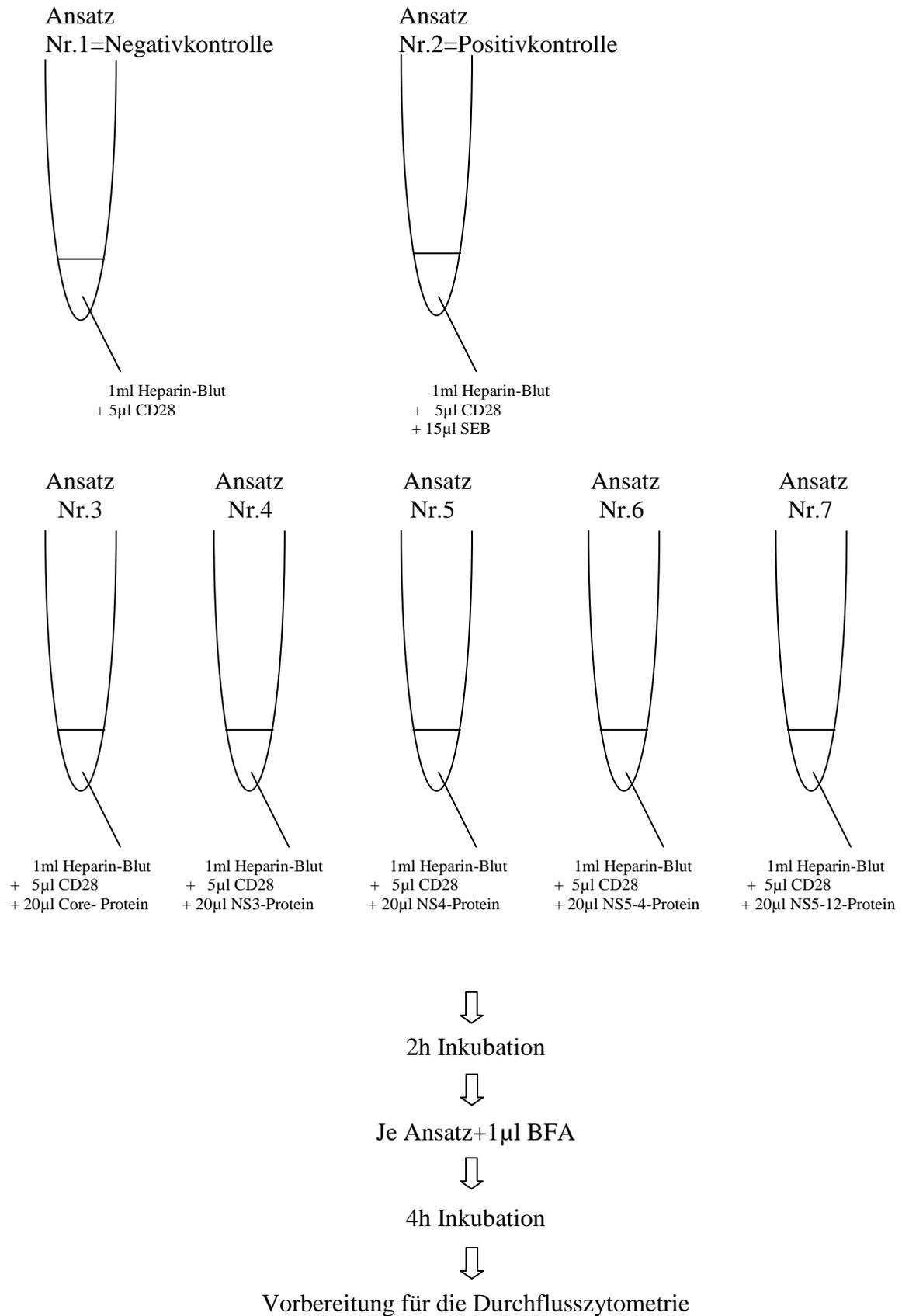


Abbildung 3: Schematische Darstellung der pro Patientenmessung angefertigten Ansätze und Inkubationszeiten

3.2.2.2 Vorbereitung der Laborproben für die Durchflusszytometrie

Die Arbeitsschritte zur Vorbereitung für die Durchflusszytometrie können in 5 Schritte eingeteilt werden:

- 1.) Isolierung der Leukozyten
- 2.) Extrazelluläre (Oberflächen-) Färbung der Leukozyten (CD4, CD69)
- 3.) Fixierung mit PFA
- 4.) Permeabilisierung mit Saponin 0.5%
- 5.) Intrazelluläre Färbung (CD154, IFN- γ , TNF- α)

3.2.2.2.1 Isolierung der Leukozyten

Zur Trennung von Blutplasma und zellulären Bestandteilen werden in alle Reaktionsgefäße 10ml PBS-Lösung gegeben und diese anschließend bei 1500upm (Umdrehungen pro Minute) und 4°C für 6min zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wird der Überstand, bestehend aus dem Blutplasma, vorsichtig bis zu den festen Zellbestandteilen am Boden des Reaktionsgefäßes abgesaugt.

Nach Auflockerung des Absatzes am Boden werden für die Lysierung der Erythrozyten zu jedem Ansatz 5ml Erythrozyten Lyse-Puffer zugegeben und für 8min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit werden die Reaktionsgefäße zur Neutralisation mit 7ml PBS/BSA aufgefüllt.

Es schließt sich erneut eine Zentrifugation mit 1500upm bei 4°C für 6min an. Wie zuvor wird der Überstand bis zum Absatz, welcher jetzt nur noch aus den Leukozyten besteht, verworfen.

Anschließend werden die Zellen am Gefäßboden in 1ml PBS/BSA resuspendiert und aus den 14ml Polypropylene Rundbodengefäßen in 1.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße umgefüllt.

Die Eppendorf-Reaktionsgefäße werden jetzt in einer Eppendorf-Zentrifuge mit 3000upm bei 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Absatz durch leichte Vibration aufgelockert. Die Leukozyten aus dem Patientenblut sind nun weitgehend isoliert und gewaschen und bereit für die extrazelluläre Färbung.

3.2.2.2.2 Die extrazelluläre (Oberflächen-) Färbung der Leukozyten (CD4, CD69)

Für die extrazelluläre Färbung wird zunächst ein einheitliches Reagenziengemisch mit den Antikörpern in einem separaten Eppendorf-Reaktionsgefäß vorbereitet. Für jedes zu färbende Ansatzgefäß werden 10 μ l CD4-Reagenz, 5 μ l FCS, sowie 85 μ l PBS/BSA bzw. bei Messungen

inklusive CD69-Färbung zusätzlich 10µl CD69-Reagenz und dementsprechend nur 75µl PBS/BSA benötigt.

Aus dem einheitlichen Reagenziengemisch werden 100µl in jedes Reaktionsgefäß gegeben und bei 4°C lichtgeschützt für 20min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird zur Trennung der Zellen und des Oberflächenfärbeansatzes in jedes Reaktionsgefäß 1ml PBS gegeben, und nach Zentrifugation bei 3000upm und 4°C für 5min in der Eppendorf-Zentrifuge wird der Überstand erneut abgenommen. Es folgt die Fixierung mit PFA.

3.2.2.2.3 Fixierung mit PFA

Um weitere Arbeits- und Stoffwechselprozesse der Zellen zu beenden, exprimierte Antigene der Zellen zu stabilisieren und um die folgende Permeabilisierung sowie die Intrazellulärfärbung zu ermöglichen werden die Zellen an diesem Punkt des Verarbeitungsprozesses fixiert.

Hierzu werden in jedes Reaktionsgefäß 500µl 2% PFA (Paraformaldehyd) gegeben und bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 10min inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut mit je 1ml PBS gewaschen. Nach Zentrifugation bei 3000upm, 4°C für 5min und Verwerfen des Überstands können die Zellen jetzt permeabilisiert werden.

3.2.2.2.4 Permeabilisierung mit Saponin

Zur Durchführbarkeit der intrazellulären Färbung ist zunächst eine Permeabilisierung der Zellen notwendig.

Als Permeabilisierungsreagenz wird hierbei Saponin in einer 0.5% Konzentration verwendet, hergestellt aus 10% Saponin durch Verdünnung im Verhältnis 1:20, entsprechend 1ml Saponin und 19ml sterilem PBS. Dabei werden durch das Saponin kleine Poren in den Zellmembranen gebildet, durch die in der folgenden Färbung die fluoreszenzmarkierten Antikörper ins Zellinnere gelangen können.

Zur Permeabilisierung wird 1ml Saponin 0.5% in jedes Reaktionsgefäß gegeben, und diese werden ohne weitere Inkubation in der Eppendorf-Zentrifuge für 5min bei 3000upm und 4°C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation und Entfernung des Überstands kann die intrazelluläre Färbung durchgeführt werden.

3.2.2.2.5 Die intrazelluläre Färbung der Leukozyten (CD154, IFN- γ , TNF- α)

Für die intrazelluläre Färbung wird ein separates Reagenziengemisch mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die Inkubationsansätze hergestellt.

Pro Reaktionsgefäß werden 0.5µl IFN- γ oder TNF- α , 10µl CD154, 10µl FCS sowie 79.5µl Saponin 0.5% benötigt. FCS, das natürlich vorkommende Immunglobuline enthält, dient dabei der Blockierung von evtl. vorhandenen unspezifischen Bindungsstellen für die Antikörper und damit der Reduzierung der Hintergrundaktivität.

Von dem einheitlichen Färbeansatz für die intrazelluläre Färbung werden 100µl pro Inkubationsansatz verwendet, und die Reagenzgefäße werden bei 4°C lichtgeschützt für 20min inkubiert. Nach 20min wird in jedes Reaktionsgefäß 1ml Saponin 0.5% gegeben, und die Reaktionsgefäße werden in der Eppendorffzentrifuge bei 3000upm und 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und die Zellen werden mit 1ml PBS/BSA gewaschen. Der erneuten Zentrifugation nach gleichem Schema und Abnehmen des Überstands schließt sich die Resuspension der Zellen in 500µl PBS/BSA pro Ansatz an. Der gesamte Inhalt der Eppendorffgefäße wird nun in spezielle, zur Zytofluorimetrie geeignete, Behältnisse umgefüllt und auf Eis gestellt.

Die Proben sind nun bereit zur durchflusszytometrischen Auswertung.

3.2.2.3 Die durchflusszytometrische Messung

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Identifizierung, Sortierung und Zuordnung von Zellen in einer Zellsuspension. Dabei werden vorerst bestimmte Zellbestandteile wie z. B. Oberflächenmoleküle oder auch intrazelluläre Zytokine von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gebunden.

Ein Gemisch von Zellen mit den entsprechend markierten Zellen wird anschließend durch einen Laserstrahl geleitet. Jede einzelne Zelle passiert somit den Laserstrahl, wobei es an den Zellen zu einer Lichtstreuung kommt. Vorwärts gestreutes Licht wird als Forward Scatter (FSC) bezeichnet und erlaubt eine Aussage über die Größe der Zelle. Rechtwinklig abgestrahltes Licht wird als Sidescatter (SSC) bezeichnet und erlaubt Aussagen zur Granularität der Zelle. Zusätzlich wird durch Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich emittiert und von speziellen Photodetektoren registriert. Je mehr nachzuweisendes Antigen die untersuchte Zelle exprimiert, desto mehr fluoreszenzmarkierte Antikörper werden auf der Zelle gebunden. Die Intensität des registrierten Lichts ist demnach proportional zur Menge des gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpers bzw. zum nachzuweisenden Antigen. Das hier benutzte Durchflusszytometer kann dabei 4 verschiedene Farbfluoreszenzen entsprechend 4 verschiedenen gebundenen Antikörpern gleichzeitig registrieren. Somit kann vom Computer die Größe und Granularität sowie das Vorhandensein

bzw. insbesondere auch die Quantität von spezifischen mittels Antikörpern gebundenen Strukturen für jede einzelne Zelle ermittelt und dargestellt werden [34].

4 Ergebnisse

4.1 Darstellung der Ergebnisse

Die vom Durchflusszytometer ermittelten Daten wurden mit dem Programm Cellquest Pro bearbeitet und in Form von Zytogrammen dargestellt. Dabei wurden anhand von Zellgröße und Granularität Bereiche zur weitgehend selektiven Auswertung von Lymphozyten festgelegt, von denen wiederum durch das Setzen von Auswertungsbereichen nur die CD4-exprimierenden T-Zellen auf die Expression der mitgefärbten Aktivitätsmarker und Zytokine untersucht wurden.

Anhand der Negativkontrolle wurden die mittels Cellquest Pro erstellten Zytogramme für die separate Auswertung der verschiedenen CD4 T-Zell-Phänotypen in vier Quadranten aufgeteilt. Auf der Abszisse der Zytogramme war die Expressionsintensität des Aktivierungsmarkers dargestellt, auf der Ordinate die Expressionsintensität des gefärbten Zytokins. Die Quadranten entsprachen damit Zellen ohne jegliche Zytokin- oder Aktivierungsmarkerexpression, Zellen mit reiner Zytokinexpression ohne Aktivierungsmarkerexpression, Zellen mit reiner Aktivierungsmarkerexpression ohne Zytokinexpression (Aktivierungsmarker+ Zytokin- bzw. Akt+Zyt-) sowie Zellen mit Aktivierungsmarkerexpression und gleichzeitiger Zytokinexpression (Aktivierungsmarker+ Zytokin+ bzw. Akt+Zyt+). Für die späteren Auswertungen wurden nur die Quadranten mit Akt+Zyt- und Akt+Zyt+ Zellen berücksichtigt. Zudem wurden beide Quadranten zusammengefasst entsprechend aller Zellen mit Aktivierungsmarkerexpression mit oder ohne Zytokinexpression (Aktivierungsmarker+ Zytokin+/- bzw. Akt+Zyt+/-) ausgewertet. Die anhand der Zytogramme der Negativkontrolle ermittelten Quadrantengrenzen wurden für die anderen Zytogramme der jeweiligen Patientenmessung übernommen.

Der Anteil von Zytokin- bzw. Aktivierungsmarkerexprimierenden Zellen an der gemessenen Gesamt-CD4-Zellzahl wurde in Prozent wiedergegeben. Der in der Negativkontrolle gemessene prozentuale Anteil in den verschiedenen Quadranten wurde als unspezifische Hintergrundaktivierung gewertet und von den nach Stimulation mit den verschiedenen HCV-Proteinen gemessenen Werten subtrahiert, um selektiv die durch das HCV-Antigen entstandene Aktivierung festzustellen.

In den Messungen nach Inkubation mit HCV-Proteinen wurde nach Subtraktion der Hintergrundaktivität ein Anteil von $\geq 0.01\%$ CD4 T-Zellen in dem jeweils untersuchten Quadranten als positiv zu wertende Reaktion festgelegt.

Siehe zur Darstellung der Messergebnisse und Einteilung der Quadranten auch das Beispielzytogramm eines Patienten in Abbildung 4.

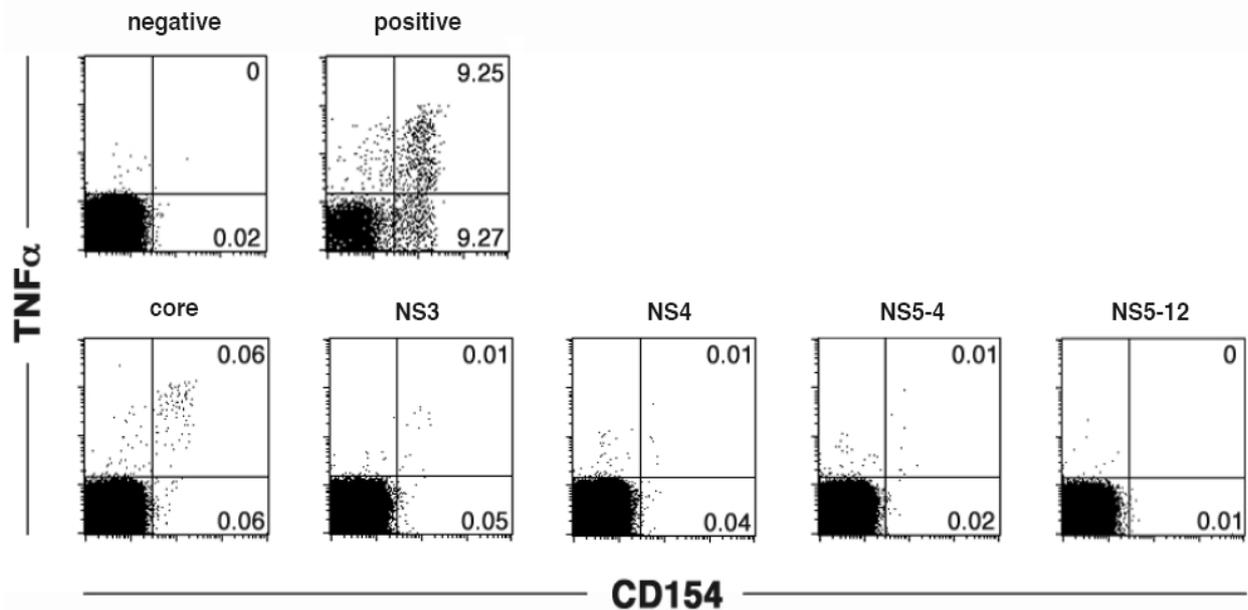


Abbildung 4: Darstellung der durchflusszytometrischen Daten eines Patienten mittels Zytogrammen. Oben links die Ergebnisse der Negativkontrolle, oben rechts nach Stimulation mit SEB. Punkte im oberen rechten Quadranten zeigen Aktivierungsmarker+ Zytokin+ Zellen an, die Zahl in dem Quadranten gibt den prozentualen Anteil an der jeweils gemessenen Gesamt-CD4-Zellzahl an. Der rechte untere Quadrant zeigt dementsprechend Aktivierungsmarker+ Zytokin- Zellen. Von den nach HCV-Proteinstimulation (untere Reihe) gemessenen Werten werden die jeweiligen Quadrantenwerte der Negativkontrolle subtrahiert. In diesem Fall wäre der Anteil von spezifisch durch das HCV-Core Protein zur reinen CD154-Expression (Akt+Zyt-) stimulierten CD4-Zellen demnach 0.04% (0.06-0.02). 0.06% der insgesamt gemessenen CD4-Zellen reagierten mit einer kombinierten CD154 und TNF- α Produktion. Ebenfalls positiv würden die Messwerte der CD154+TNF- α + Zellen nach NS3-, NS4- und NS5-4-Inkubation gewertet werden.

4.2 Auswertung der Ergebnisse

Beide Kohorten wurden getrennt ausgewertet.

Die Auswertungen wurden jeweils für die Zellphänotypen Akt+Zyt+, Akt+Zyt- und Akt+Zyt+/- durchgeführt.

In beiden Kohorten wurde der prozentuale Anteil der Probanden mit positiver Reaktion auf die einzelnen HCV-Antigene ermittelt. Weiterhin wurde die Anzahl der HCV-Proteine bestimmt, die von den CD4 T-Zellen des Patienten erkannt wurden und zu einer Reaktion führten. Die Gruppen mit unterschiedlichem Therapieansprechen wurden hinsichtlich der Anzahl dieser positiven Reaktionen untereinander verglichen. In einer weiteren Auswertung wurde die Anzahl der positiven Reaktionen in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich eine mit Reaktionen auf 0-2 Proteine und eine mit Reaktionen auf 3-5 Proteine. Schließlich wurde die Anzahl erkannter

Proteine als Mittelwert ausgedrückt und zwischen den Gruppen mit unterschiedlichem Therapieansprechen verglichen.

In Kohorte 1 wurde die Messung vor Therapie (Messung 1) zusätzlich mit der Messung während der antiviralen Therapie (Messung 2) verglichen.

Außerdem wurde in Kohorte 1 der Einfluss einiger bekannter Faktoren mit Einfluss auf das Therapieergebnis untersucht (Genotyp, Viruslast).

Zuletzt wurde in beiden Kohorten eine Auswertung der Reaktionsintensität nach Stimulation mit SEB (=Positivkontrolle) durchgeführt.

4.3 Subgruppenanalysen

Neben der Gesamtkohorte wurde die Auswertung nochmals für bestimmte Subgruppen durchgeführt.

Eine Subgruppe bestand nur aus den Daten von Patienten, bei denen CD154 als Aktivitätsmarker verwendet wurde. Alle Messungen mit CD69 als Aktivitätsmarker wurden in dieser Subgruppenanalyse nicht berücksichtigt. Durch diese Auswahl wurde die in einer Studie nachgewiesene höhere Spezifität von CD154 in Bezug auf antigenspezifische T-Zellen berücksichtigt und die Gruppe in Bezug auf den Aktivitätsmarker vereinheitlicht.

Eine weitere Subgruppenanalyse wurde zur selektiven Auswertung von Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 durchgeführt. Da der HCV-Genotyp 1 durch eine höhere Rate an Therapieversagern gekennzeichnet ist, wurden die immunologischen Reaktionen für diesen Genotyp nochmals gesondert betrachtet. Hinsichtlich des Genotyps wurde so eine Vereinheitlichung der Gruppe erreicht.

4.4 Statistik

Die Daten wurden mit SPSS 15.1 ausgewertet. Als statistische Tests kamen der χ^2 -Test, der exakte Test nach Fisher sowie zum Vergleich von Mittelwerten der Anova-Test und der Student-T-Test zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde bei $p=0.05$ festgelegt.

4.5 Auswertung der Ergebnisse von Kohorte 1

4.5.1 Beschreibung der Kohorte

Tabelle 7: Patientencharakteristika der Kohorte 1 (vor/während Therapie)

		Gesamt n (%)	SR n (%)	NR n (%)	RL n (%)	NR/RL n (%)
Anzahl		28 (100)	20 (71.4)	3 (10.7)	5 (17.9)	8 (28.6)
Alter	Median Min./Max.	43.50 21/65	42.00 21/58	48.00 34/65	48.00 40/56	48.00 34/65
Geschlecht	m w	12 (42.9) 16 (57.1)	7 (35.0) 13 (65.0)	2 (66.7) 1(33.3)	3 (60.0) 2 (40.0)	5 (62.5) 3 (37.5)
Ethnizität	Kaukasier	22 (78.6)	16 (80.0)	3 (100)	3 (60.0)	6 (75.0)
Genotyp	1 2 3 4 5	16 (57.1) 3 (10.7) 7 (25.0) 1 (3.6) 1 (3.6)	9 (45.0) 2 (10.0) 7 (35.0) 1 (5.0) 1 (5.0)	3 (100) 0 (0.0) 0 (0.0) 0 (0.0) 0 (0.0)	4 (80.0) 1 (20.0) 0 (0.0) 0 (0.0) 0 (0.0)	7 (87.5) 1 (12.5) 0 (0.0) 0 (0.0) 0 (0.0)
Viruslast Tx-Beginn (IU/ml)	Mittelwert ± SA	4.976.173 ± 8.946.543	5.349.884 ± 10.290.076	5.840.000 ± 884.760	2.459.750 ± 3.526.176	3.908.429 ± 3.121.296
GPT Tx- Beginn (U/l)	Mittelwert ± SA	83 ± 60	67 ± 44	80 ± 22	148 ± 94	122 ± 80
Anzahl CD4-Zellen 1.BE	Mittelwert ± SA	91.107 ± 69.407	82.250 ± 61.954	74.333 ± 56.518	136.600 ± 97.457	113.250 ± 85.898
Anzahl CD4- Zellen 2. BE	Mittelwert ± SA	117.054 ± 59.871	107.775 ± 60.351	124.000 ± 31.193	150.000 ± 67.709	140.250 ± 55.487
Zytokin	TNF IFN	13 (46.4) 15 (53.6)	9 (45.0) 11 (55.0)	1(33.3) 2 (66.7)	3 (60.0) 2 (40.0)	4 (50.0) 4 (50.0)
Oberfläche	CD154 CD69	20 (71.4) 8 (28.6)	13 (65.0) 5 (35.0)	2 (66.7) 1 (33.3)	5 (100) 0 (0.0)	7 (87.5) 1 (12.5)

SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert
SA=Standardabweichung ; Tx=Therapie ; BE=Blutentnahme

In Kohorte 1 wurden 28 Patienten eingeschlossen und ausgewertet.

Bei 20 (71.4%) der 28 Patienten kam es unter der Therapie zu einer dauerhaften Viruselimination (sustained Response), 3 (10.7%) Patienten zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Viruselimination (Nonresponse), und 5 (17.9%) Patienten zeigten während der Therapie einen Abfall der Viruslast bis unter die Nachweisgrenze und nach Therapieende ein erneutes Auftreten von HCV-RNA (Relapse). Für die späteren Auswertungen wurden Nonresponder (NR) und Relapser (RL) zu einer Gruppe der Therapieversager zusammengefasst und mit den Respondern (SR) verglichen.

Der Altersmedian lag bei 43.5 Jahren, die Altersspanne reichte von 21 bis 65 Jahren. 57.1% der Patienten waren Frauen, 78.6% waren kaukasischer Herkunft.

Insgesamt wiesen 57.1% den Genotyp 1 auf, Genotyp 3 war mit einem Anteil von 25.0% am zweithäufigsten vertreten. Der Genotyp 2 trat zweimal, die Genotypen 4 und 5 jeweils einmal auf.

Der Mittelwert der Viruslast bei Therapiebeginn lag bei ca. 5Mio. IU/ml, der der GPT bei 83U/l. Bei der Messung vor Therapiebeginn wurden im Mittel 91.000 CD4-Zellen durchflusszytometrisch erfasst, bei der zweiten Messung während der antiviralen Therapie 117.000 CD4-Zellen.

Zu weiteren Parametern der Patientenkohorte 1 sowie der Beschreibung der einzelnen Untergruppen siehe Tabelle 7.

4.5.2 Einfluss etablierter Faktoren auf das Therapieansprechen

Wie in 4.5.1 erwähnt, wurden für alle Auswertungen von Kohorte 1 Patienten mit einer dauerhaften Viruselimination (SR) mit der zusammengefassten Gruppe der Therapieversager (NR+RL) verglichen. Zunächst wurde die Bedeutung von Faktoren mit bekanntem Einfluss auf den Therapieverlauf in Kohorte 1 untersucht. Dabei wurde hinsichtlich Geschlecht und der Höhe der GPT vor Therapiebeginn kein signifikanter Einfluss auf das Therapieergebnis gefunden. Ebenso war eine Kategorisierung der Viruslast vor Therapiebeginn über oder unter 800.000IU/ml nicht prädiktiv für das Therapieergebnis. Eine Viruslast unter 800.000IU/ml zur Woche 4 wurde dagegen häufiger bei der Gruppe der SR gefunden, der p-Wert lag mit 0.070 jedoch über dem Signifikanzniveau. Eine frühe vollständige Virus-RNA-Elimination zu Therapiewoche 4 wurde dagegen signifikant häufiger in der Gruppe der SR nachgewiesen werden ($p=0.007$). Der HCV-Genotyp ist ein bekannter Faktor mit Einfluss auf das Therapieergebnis. Die Genotypen 1 und 4 wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und gegen die anderen vorhandenen Genotypen (2, 3 und 5) ausgewertet. Obwohl die Genotypen 2, 3 und 5

in der Gruppe der NR/RL nur einmal vorkamen (12.5%) und in der Gruppe der Responder 10 Patienten (50%) diesen Genotyp aufwiesen, ergab sich nach Auswertung mit dem exakten Test nach Fisher kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0.099$). Für weitere Details siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Einfluss etablierter Faktoren auf das Therapieansprechen

		SR (n=20) n (%)	NR/RL (n=8) n (%)	p
Geschlecht	m	7 (35.0)	5 (62.5)	0.231°
	w	13 (65.0)	3 (37.5)	
Viruslast vor Tx	<800.000	10 (50.0)	2 (28.6)	0.408°
	>800.000	10 (50.0)	5 (71.4)	
Viruslast 4 Wo in Tx *	<800.000	18 (100)	5 (71.4)	0.070°
	>800.000	0 (0.0)	2 (28.6)	
Viruslast 4 Wo in Tx *	neg	14 (77.8)	1 (14.3)	0.007°
	pos	4 (22.2)	6 (85.7)	
Genotyp	1/4	10 (50.0)	7 (87.5)	0.099°
	2/3/5	10 (50.0)	1 (12.5)	
GPT bei Tx-Beginn	<2x Norm	13 (65.0)	3 (37.5)	0.231°
	>2x Norm	7 (35.0)	5 (62.5)	

SR=Sustained Responder ; NR= Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert

Tx=Therapie ; Wo=Wochen; Viruslast in IU/ml

°=exakter Test nach Fisher (2-seitig)

* SR n=18, NR/RL n=7

4.5.3 Prozentuale Häufigkeit positiver Reaktionen auf einzelne HCV-Proteine in Abhängigkeit des Therapieansprechens

Von den getesteten HCV-Antigenen führte vor Therapie das Core-Protein am häufigsten zu einer positiven Reaktion. 25% aller Patienten reagierten positiv mit dem Nachweis spezifischer Akt+Zyt+ Zellen. 30% der Responder gegenüber 12.5% der Nonresponder und Relapser reagierten derart auf das Core-Antigen. Auf die Nichtstrukturproteine reagierten dagegen Nonresponder und Relapser im allgemeinen prozentual häufiger als die Responder (ca. 25% NR

vs. 5-15,8% SR). Eine Ausnahme hiervon war die Reaktion auf NS4 (Tabelle 9), auf das ein größerer Anteil der Responder Akt+Zyt+ reagierte.

Unter der antiviralen Therapie blieben die Ansprechraten auf das Core-Protein bezüglich der Akt+Zyt+ Expression unverändert, jedoch zeigte sich bei beiden Gruppen keine positive Reaktion mehr auf sämtliche Nichtstrukturproteine.

Bezüglich der Akt+Zyt- Zellen zeigten sich vor Therapie bei Auswertung der Gesamtkohorte mit ca. 40% die höchsten Ansprechraten auf das NS4- und das Core-Antigen. Im Vergleich reagierten auf das Core- (50%) und die NS-Antigene (bis zu 62.5%) jeweils mehr Patienten in der Gruppe der NR/RL als der Responder, in der höchstens 35% auf ein Antigen reagierten. Während der Therapie reagierten 70% der Responder auf das Core-Protein Akt+Zyt-, auf die Nichtstrukturproteine wurden gleichbleibende oder tendenziell höhere Ansprechraten beobachtet. Mit einem Anteil von 25% reagierten die NR/RL unter Therapie am häufigsten auf das Core-Protein, die NS-Proteine wurden jeweils von 12.5% der NR/RL erkannt. Im Vergleich kam es unter der Therapie bei SR demnach zu einer Zunahme Akt+Zyt- Reaktionen insbesondere auf das Core-Protein (35% vor Therapiebeginn und 70% unter Therapie), während bei NR/RL eine Abnahme der Reaktionen auf sämtliche getesteten HCV-Proteine zu verzeichnen war.

Bei der Auswertung des Akt+Zyt+/- Phänotyps zeigte sich in der Gesamtkohorte vor Therapie mit einem Anteil von ca. 68% erneut die höchste Ansprechrate auf das Core-Protein. Durch alle HCV-Antigene konnten mehr Nonresponder/Relapser als Responder stimuliert werden. Bei den Nonrespondern/Relapsen reagierten 87.5% der Patienten vor Therapie auf das Core-Antigen mit einer Produktion von Aktivierungsmarker (Akt+Zyt+/-).

Während der Therapie ließ sich erneut bei den NR/RL eine generelle Abnahme der Aktivierungsmarkerexpression nach Stimulation durch sämtliche HCV-Antigene nachweisen, bei der Gruppe der SR wurde mit Ausnahme von NS4 ein höherer Anteil stimuliert.

Eine Zusammenfassung der Häufigkeit positiver Reaktionen auf die einzelnen HCV-Proteine in den verschiedenen Gruppen ist in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 9: Prozentuale Häufigkeit positiver Reaktionen auf die einzelnen HCV-Proteine in Abhängigkeit des Therapieansprechens in Kohorte 1 bei 1. (vor Therapie) und 2. (während der antiviralen Therapie) Messung

	Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-			
	Gesamt (n=28)	SR (n=20)	NR/RL (n=8)	Gesamt (n=28)	SR (n=20)	NR/RL (n=8)	Gesamt (n=28)	SR (n=20)	NR/RL (n=8)	
Vor Therapie (1. BE)	Core (%)	25.0	30.0	12.5	39.3	35.0	50.0	67.9	60.0	87.5
	NS3 (%)	14.3	10.0	25.0	35.7	35.0	37.5	42.9	40.0	50.0
	NS4 (%)	10.7	15.0	0.0	42.9	35.0	62.5	50.0	45.0	62.5
	NS5-4 (%)	18.5	15.8	25.0	25.9	10.5	62.5	33.3	21.1	62.5
	NS5-12 (%)	10.7	5.0	25.0	21.4	10.0	50.0	25.0	15.0	50.0
In Therapie (2. BE)	Core (%)	25.0	30.0	12.5	57.1	70.0	25.0	75.0	85.0	50.0
	NS3 (%)	0.0	0.0	0.0	28.6	35.0	12.5	46.4	50.0	37.5
	NS4 (%)	0.0	0.0	0.0	21.4	25.0	12.5	21.4	25.0	12.5
	NS5-4 (%)	0.0	0.0	0.0	25.0	30.0	12.5	28.6	35.0	12.5
	NS5-12 (%)	0.0	0.0	0.0	28.6	35.0	12.5	28.6	35.0	12.5

Gesamt=Gesamtkohorte ; SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Vor Therapie=Messung vor Beginn der Therapie (entspricht der 1. Blutentnahme=1.BE)

In Therapie= Messung während der antiviralen Therapie (entspricht der 2. Blutentnahme=2.BE)

4.5.4 Auswertung der Daten hinsichtlich der Anzahl von HCV-Proteinen, auf die eine positive Reaktion eintrat

Bei der Auswertung der Akt⁺ (CD69, CD154) Zyt⁺ (IFN- γ , TNF- α) Zellen in der Gesamtkohorte zeigte sich zwischen den Respondern (SR) und Therapieversagern (RL/NR) hinsichtlich der Anzahl (0,1,2,3,4, oder 5) der getesteten HCV-Proteine mit positiver Reaktion vor antiviraler Therapie kein signifikanter Unterschied. Auch bei der Zusammenfassung von Patienten in Gruppen mit 0-2 sowie 3-5 erkannten HCV-Proteinen und beim Vergleich der Mittelwerte wurde zwischen SR und RL/NR vor Therapie kein signifikanter Unterschied festgestellt (Tabelle 10).

Unter der antiviralen Therapie (Messung 2) ergaben sich bei den verschiedenen Auswertungen der Akt⁺Zyt⁺ Zellen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen SR und RL/NR. Auffallend war jedoch, dass bei keinem Patienten mehr als 1 HCV-Protein zu einer signifikanten Zytokinexpression der CD4-Zellen führte, was sich auch in der Auswertung in Gruppen von 0-2 und 3-5 erkannter HCV-Proteine und in der Auswertung der Mittelwerte darstellen ließ.

Während einer antiviralen Therapie wurden demnach weniger HCV-Antigene Akt⁺Zyt⁺ erkannt als vor der Therapie, der Abfall war jedoch statistisch nicht signifikant (Tabelle 11 und 12).

Bei der Auswertung des Akt⁺Zyt⁻ Zellphänotyps zeigte sich vor Therapie in der Anzahl erkannter HCV-Antigene sowie bei der Gruppenauswertung (0-2 und 3-5 erkannte HCV-Proteine) zwischen SR und RL/NR ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Im Mittel erkannten Therapieversager mit 2.63 mehr Proteine als Responder mit einem Mittelwert von 1.25. Der p-Wert lag mit 0.058 allerdings knapp über dem statistischen Signifikanzniveau (Tabelle 10).

Unter der Therapie konnte zwischen SR und NR/RL in allen durchgeführten Auswertungen Akt⁺Zyt⁻ Zellen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei SR führte jedoch eine höhere Anzahl von HCV-Proteinen zur Bildung Akt⁺Zyt⁻ Zellen als vor Therapie, RL/NR zeigten demgegenüber eine Abnahme der Zahl von HCV-Protein, die zu einer Reaktion führten. Die Veränderungen waren besonders deutlich, wenn NR und RL gruppiert wurden und die Mittelwerte der Anzahl der Proteine betrachtet wurden, die zu einer Reaktion führten. Die gegenläufigen Veränderungen bei SR und RL/NR im Therapieverlauf waren mit $p=0.044$ statistisch signifikant. 75% der NR/RL reagierten unter der Therapie auf weniger Proteine als zu Therapiebeginn, 55% der SR reagierten dagegen unter der Therapie auf mehr Proteine. Bei Auswertung der Mittelwerte verfehlte die Auswertung des Abfalls der Zahl erkannter HCV-Antigene im Therapieverlauf bei RL/NR mit $p=0.056$ knapp das statistische Signifikanzniveau. Der Mittelwertanstieg bei SR (1.25 vs. 1.95) war statistisch nicht signifikant ($p=0.198$) (Tabelle 11 und 12).

Tabelle 10: Auswertung der Messergebnisse vor Therapiebeginn in Kohorte 1
Gesamtes Patientengut

Vor Therapie (Messung 1)		Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
		SR (N=20)	NR/RL (n=8)	P	SR (N=20)	NR/RL (n=8)	P	SR (N=20)	NR/RL (n=8)	P
Anzahl erkannter HCV- Proteine	0	60.0 %	75.0 %	0.203*	50.0 %	12.5 %	0.203*	25.0 %	0.0 %	0.414*
	1	30.0 %	0.0 %		15.0 %	12.5 %		30.0 %	12.5 %	
	2	0.0 %	0.0 %		10.0 %	37.5 %		10.0 %	25.0 %	
	3	0.0 %	12.5 %		15.0 %	0.0 %		20.0 %	25.0 %	
	4	5.0 %	12.5 %		5.0 %	12.5 %		5.0 %	12.5 %	
	5	5.0 %	0.0 %	5.0 %	25.0 %	10.0 %	25.0 %			
	Chi-Wert			5.950			5.950			5.017
	0-2	90.0 %	75.0 %	0.555°	90.0 %	75.0 %	0.555°	65.0 %	37.5 %	0.231°
	3-5	10.0 %	25.0 %		10.0 %	25.0 %		35.0 %	62.5 %	
	MW	0.75	0.88	0.838 ⁺	1.25	2.63	0.058 ⁺	1.80	3.13	0.058 ⁺
	SA	1.372	1.642		1.585	1.847		1.642	1.458	

*= χ^2 -Test ; °=exakter Test nach Fisher (2-seitig) ; ⁺= Student-T-Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Tabelle 11: Auswertung der Messergebnisse während der antiviralen Therapie in Kohorte 1
Gesamtes Patientengut

In Therapie (Messung 2)		Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
		SR (N=20)	NR/RL (n=8)	p	SR (N=20)	NR/RL (n=8)	p	SR (N=20)	NR/RL (n=8)	p
Anzahl erkannter HCV- Proteine	0	70.0 %	87.5 %	0.334*	25.0 %	75.0 %	0.239*	15.0 %	37.5 %	0.569*
	1	30.0 %	12.5 %		30.0 %	12.5 %		25.0 %	37.5 %	
	2	0.0 %	0.0 %		5.0 %	0.0 %		20.0 %	12.5 %	
	3	0.0 %	0.0 %		20.0 %	0.0 %		10.0 %	0.0 %	
	4	0.0 %	0.0 %		5.0 %	0.0 %		15.0 %	0.0 %	
	5	0.0 %	0.0 %	15.0 %	12.5 %	15.0 %	12.5 %			
	Chi-Wert			0.933			6.761			3.868
	0-2	100 %	100 %	na	60.0 %	87.5 %	0.214°	60.0 %	87.5 %	0.214°
	3-5	0.0 %	0.0 %		40.0 %	12.5 %		40.0 %	12.5 %	
	MW	0.30	0.13	0.299 ⁺	1.95	0.75	0.119 ⁺	2.30	1.25	0.153 ⁺
SA	0.47	0.354		1.791	1.753		1.720	1.669		

*= χ^2 -Test ; °=exakter Test nach Fisher (2-seitig) ; ⁺= Student-T-Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung ; na=not applicable

SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Tabelle 12: Vergleich der Ergebnisse aus Messung 1 (vor Therapiebeginn) und 2 (während der antiviralen Therapie) in Kohorte 1
Gesamtes Patientengut

Vergleich Messung 1 vs Messung 2	Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
	SR (n=20)	NR/RL (n=8)	p	SR (n=20)	NR/RL (n=8)	P	SR (n=20)	NR/RL (n=8)	p
(%) Messung 2>1	20.0	12.5		55.0	12.5		50.0	12.5	
(%) Messung 2=1	45.0	62.5	0.702*	20.0	12.5	0.044*	10.0	12.5	0.176*
(%) Messung 2<1	35.0	25.0		25.0	75.0		40.0	75.0	
Anzahl erkannter HCV- Proteine Chi-Wert			0.708			6.225			3.479
Mittelwert Messung 1 SA	0.75 1.372	0.88 1.642	0.838 ⁺	1.25 1.585	2.63 1.847	0.058 ⁺	1.80 1.642	2.30 1.720	0.058 ⁺
Mittelwert Messung 2 SA	0.30 0.470	0.13 0.354	0.299 ⁺	1.95 1.791	0.75 1.753	0.119 ⁺	3.13 1.458	1.25 1.669	0.153 ⁺
p	0.178 ⁺	0.244 ⁺		0.198 ⁺	0.056 ⁺		0.353 ⁺	0.031 ⁺	

*= χ^2 -Test ; ⁺= Student-T-Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Gleiche Ergebnisse ergab die Auswertung der Akt+Zyt+/- Zellen. Hierbei standen sich Mittelwerte von 3.13 HCV-Proteinen, die auf Seiten der NR/RL zur Aktivierung von CD4 T-Zellen führten und 1.80 in der Gruppe der SR gegenüber. Der mittels Student T-Test errechnete p-Wert lag ebenfalls knapp über dem Signifikanzniveau ($p=0.058$). Siehe hierzu auch Tabelle 10. Bei den Akt+Zyt- sowie Akt+Zyt+/- Zellen zeigten sich keine statistisch signifikanten oder richtungsweisenden Unterschiede zwischen SR und Therapieversagern. Im Gegensatz zur Auswertung der Akt+Zyt+ Zellen reagierten aber bei beiden Gruppen (Responder und NR/RL) Patienten auf mehr als ein HCV-Protein (Tabelle 11).

Bei der Auswertung der Akt+Zyt- Zellen war im Therapieverlauf eine Abnahme der Anzahl erkannter Proteine innerhalb der Gruppe der NR/RL festzustellen, die mit $p=0.056$ knapp über dem statistischen Signifikanzniveau lag. SR erkannten dagegen im Mittel mehr HCV-Proteine während der antiviralen Therapie als vor Beginn der Therapie (1.80 vs. 3.13; $p=0.353$).

Die Veränderung der Anzahl Akt+Zyt- Zellen zwischen den beiden Messungen war signifikant unterschiedlich ($p=0.044$) zwischen SR und NR/RL. 75% der NR/RL reagierten unter der Therapie auf weniger Proteine als zu Therapiebeginn, 55% der SR reagierten dagegen unter der Therapie auf mehr Proteine. Hinsichtlich der Akt+Zyt+/- Zellen zeigte sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied. Die Abnahme der Mittelwerte der HCV-Proteine, die zur Bildung Akt+Zyt+/- Zellen führte, war bei NR/RL mit 2.3 vor Therapie und 1.25 während der Therapie dagegen statistisch signifikant ($p=0.031$). Siehe hierzu auch Tabelle 12.

4.5.4.1 Subgruppenanalyse: CD154-gefärbte Patienten

Wie in 4.3 beschrieben wurden für diese Auswertung nur die Daten von Patienten berücksichtigt, bei denen CD154 gefärbt wurde, und alle Punkte der Auswertung aus 4.5.4 wurden für diese Subgruppe wiederholt. Die Gesamtgröße der Subgruppe betrug $n=20$, darunter 13 Responder (SR) und 7 Nonresponder/Relapser (NR/RL).

Zwischen Respondern und Therapieversagern zeigte sich bezüglich CD154+Zyt+ (IFN- γ , TNF- α) Zellen vor Beginn der Therapie kein signifikanter Unterschied. Während der Therapie reagierten SR und NR/RL wie im Gesamtkollektiv auf weniger HCV-Proteine mit einer kombinierten Expression von CD154 und Zytokin (Akt+Zyt+) als vor der Therapie, der p-Wert bezüglich des Unterschieds zwischen SR und NR/RL sowie für die Veränderung innerhalb der Gruppen vor und während der Therapie lag jeweils über dem Signifikanzniveau (Tabelle 13, 14 und 15).

NR/RL zeigten vor Therapie auf mehr HCV-Antigene eine Akt+Zyt- Reaktion als SR, der p-Wert lag mit 0.052 nur knapp über dem Signifikanzniveau. In der gruppierten Auswertung (0-2

und 3-5 Proteine) zeigte sich kein Unterschied, der Mittelwert der Anzahl erkannter Proteine lag hingegen bei NR/RL signifikant höher als bei Respondern (2.71 vs. 0.92; $p=0.032$) (Tabelle 13). Die Messungen unter der Therapie ergaben hinsichtlich der Akt+Zyt- Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen SR und NR/RL. Wie in der Auswertung der Gesamtkohorte erkannten SR unter Therapie mehr HCV-Proteine als vor Therapie, während bei NR/RL ein Abfall der Zahl erkannter Proteine zu verzeichnen war (Tabelle 14). Die Ungleichverteilung der prozentualen Veränderungen im Therapieverlauf innerhalb der Gruppe der SR (61.5% mit höheren Ansprechraten vs. 15.4% mit niedrigerer Ansprechrate) und NR/RL (14.3% mit höherer Ansprechrate vs. 71.4% niedrigere Ansprechrate) erreichte statistische Signifikanz ($p=0.038$). Der Mittelwert der Anzahl erkannter Proteine in der Gruppe der Responder stieg während der Therapie von 0.92 auf 2.23 ($p=0.072$), bei den NR/RL fiel der Wert von 2.71 auf 0.86 ($p=0.096$) (Tabelle 15).

Der CD154+Zyt+/- Phänotyp zeigte vor Therapie weitgehend identische Ergebnisse wie die Auswertung Akt+Zyt- Zellen. Der Unterschied der Mittelwerte zwischen SR und NR/RL war mit $p=0.036$ signifikant (Tabelle 13). Erneut führten bei SR unter Therapie mehr HCV Proteine zur Generierung von T-Zellen mit CD154+Zyt+/- Phänotyp als bei den Therapieversagern (Tabelle 14), das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht.

Die Veränderung der Mittelwerte der Anzahl erkannter Antigene im Therapieverlauf erreichte bei den NR/RL mit 3.29 erkannten Antigenen vor Therapie und 1.29 erkannten Proteinen während der Therapie statistische Signifikanz ($p=0.043$). Siehe dazu auch Tabelle 15.

4.5.4.2 Subgruppenanalyse: HCV-Genotyp 1 Patienten

Wie in 4.3 beschrieben, wurden hier nur die Daten von Patienten mit nachgewiesenem HCV-Genotyp 1 berücksichtigt ($n=16$, darunter 9 SR und 7 NR/RL), und alle Punkte der Auswertung wurden wiederholt. Hierbei ergaben sich in allen Auswertungen zwischen Respondern und NR/RL sowie innerhalb der beiden Gruppen im Therapieverlauf keine statistisch signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 13: Auswertung der Messergebnisse vor Therapiebeginn in Kohorte 1
Nur CD154-gefärbte Patienten (n=20)

Vor Therapie (Messung 1)		Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
		SR (N=13)	NR/RL (n=7)	p	SR (N=13)	NR/RL (n=7)	p	SR (N=13)	NR/RL (n=7)	p
Anzahl erkannter HCV- Proteine	0	76.9 %	71.4 %	0.253*	61.5 %	14.3 %	0.052*	38.5 %	0.0 %	0.418*
	1	15.4 %	0.0 %		15.4 %	14.3 %		23.1 %	14.3 %	
	2	0.0 %	0.0 %		0.0 %	28.6 %		7.7 %	14.3 %	
	3	0.0 %	14.3 %		15.4 %	0.0 %		15.4 %	28.6 %	
	4	0.0 %	14.3 %		7.7 %	14.3 %		7.7 %	14.3 %	
	5	7.7 %	0.0 %	0.0 %	28.6 %	7.7 %	28.6 %			
	Chi-Wert			5.348			10.965			4.982
	0-2	92.3 %	71.4 %	0.270°	76.9 %	57.1 %	0.613°	69.2 %	28.6 %	0.160°
	3-5	7.7 %	28.6 %		23.1 %	42.9 %		30.8 %	71.4 %	
	MW	0.54	1.00	0.524 ⁺	0.92	2.71	0.032 ⁺	1.54	3.29	0.036 ⁺
SA	1.391	1.732		1.441	1.976		1.713	1.496		

*= χ^2 -Test ; °=exakter Test nach Fisher (2-seitig) ; ⁺= Student-T-Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Tabelle 14: Auswertung der Messergebnisse während der antiviralen Therapie in Kohorte 1
Nur CD154-gefärbte Patienten (n=20)

In Therapie (Messung 2)		Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
		SR (n=13)	NR/RL (n=7)	p	SR (n=13)	NR/RL (n=7)	p	SR (n=13)	NR/RL (n=7)	p
Anzahl erkannter HCV- Proteine	0	69.2 %	85.7 %	0.417*	30.8 %	71.4 %	0.549*	15.4 %	42.9 %	0.588*
	1	30.8 %	14.3 %		15.4 %	14.3 %		15.4 %	28.6 %	
	2	0.0 %	0.0 %		7.7 %	0.0 %		23.1 %	14.3 %	
	3	0.0 %	0.0 %		15.4 %	0.0 %		7.7 %	0.0 %	
	4	0.0 %	0.0 %		7.7 %	0.0 %		15.4 %	0.0 %	
	5	0.0 %	0.0 %	23.1 %	14.3 %	23.1 %	14.3 %			
	Chi-Wert	0.659			4.005			3.736		
	0-2	100 %	100 %	na	53.8 %	85.7 %	0.329°	53.8 %	85.7 %	0.329°
	3-5	0.0 %	0,0 %		46.2 %	14.3 %		46.2 %	14.3 %	
	MW	0.31	0.14	0.444 ⁺	2.23	0.86	0.158 ⁺	2.62	1.29	0.139 ⁺
SA	0.480	0.378		2.048	1.864		1.850	1.799		

*= χ^2 -Test ; °=exakter Test nach Fisher (2-seitig) ; += Student-T-Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung ; na=not applicable

SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Tabelle 15: Vergleich der Ergebnisse aus Messung 1 (vor Therapiebeginn) und 2 (während der antiviralen Therapie) in Kohorte 1
Nur CD154-gefärbte Patienten (n=20)

Vergleich Messung 1 vs Messung 2	Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
	SR (n=13)	NR/RL (n=7)	p	SR (n=13)	NR/RL (n=7)	p	SR (n=13)	NR/RL (n=7)	p
(%) Messung 2>1	23.1	14.3		61.5	14.3		61.5	14.3	
(%) Messung 2=1	53.8	57.1	0.887*	23.1	14.3	0.038*	7.7	14.3	0.127*
(%) Messung 2<1	23.1	28.6		15.4	71.4		30.8	71.4	
Anzahl erkannter HCV- Proteine Chi-Wert			0.240			6.517			4.127
Mittelwert Messung 1 SA	0.54 1.391	1.00 1.732	0.524 ⁺	0.92 1.441	2.71 1.976	0.032 ⁺	1.54 1.713	3.29 1.496	0.036 ⁺
Mittelwert Messung 2 SA	0.31 0.480	0.14 0.378	0.444 ⁺	2.23 2.048	0.86 1.864	0.158 ⁺	2.62 1.850	1.29 1.799	0.139 ⁺
p	0.577 ⁺	0.244 ⁺		0.072 ⁺	0.096 ⁺		0.137 ⁺	0.043 ⁺	

*= χ^2 -Test ; ⁺= Student-T-Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

4.5.5 Auswertung des maximalen Aktivierungsniveaus von CD4-Zellen nach T-Zellrezeptor unspezifischer Stimulation mit SEB

In der folgenden Auswertung wurde nach Stimulation mit SEB der prozentuale Anteil der CD4-Zellen mit kombinierter Aktivierungsmarker- (CD69, CD154) und Zytokin- (IFN- γ , TNF- α) expression (Akt+Zyt+), Aktivierungsmarkerexpression ohne gleichzeitige Zytokinexpression (Akt+Zyt-) und Aktivierungsmarkerexpression mit oder ohne Zytokinexpression (Akt+Zyt+/-) bestimmt. Die Mittelwerte wurden auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der Responder (SR) und der Therapieversager (NR/RL) sowie innerhalb der Gruppen vor und nach Therapie untersucht.

In der Gruppe der Responder ließen sich vor Therapie signifikant mehr Zellen mit einem Akt+Zyt+ Profil stimulieren (6.52%) als bei den NR/RL (3.8%; $p=0.046$). Während der Therapie kam es in der Gruppe der SR zu keiner wesentlichen Steigerung der Aktivierbarkeit, dagegen näherte sich der Wert in der Gruppe der NR/RL (6.7%) dem Wert der Responder (7.22%) an. Der Anstieg von 3.8% auf 6.7% Akt+Zyt+ CD4-Zellen bei den NR/RL war allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0.112$).

Bei dem Akt+Zyt- Zellphänotyp zeigten sich vor und während der Therapie keine signifikanten Unterschiede zwischen SR und NR/RL bzw. innerhalb der Gruppen.

Bei der Auswertung Akt+Zyt+/- Zellen ließ sich der bereits beim Akt+Zyt+ Zellphänotyp abgebildete Unterschied zwischen Respondern (15.53%) und NR/RL (10.89%) vor Therapie noch als Trend abbilden ($p=0.062$). Während der Therapie ergab sich wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Innerhalb der NR/RL kam es zu einer Zunahme stimulierter Zellen von 10.89% auf 14.68% ($p=0.22$) im Gegensatz zum gleichbleibenden Aktivitätslevel bei SR (15.53% auf 15.75%; p =nicht signifikant). Siehe auch Tabelle 16.

4.5.5.1 Subgruppenanalyse: CD154-gefärbte Patienten nach SEB-Stimulation

Bei selektiver Auswertung der mit CD154 gefärbten Proben nach SEB-Stimulation ergab sich hinsichtlich der CD154+Zyt+ (IFN- γ , TNF- α) Expression ein ähnliches Bild wie in der Gesamtkohorte.

Vor Therapie reagierten signifikant mehr Zellen der Responder (7.55%) als der Therapieversager (4.23%) auf die SEB-Inkubation ($p=0.048$). Während der Therapie ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die Zunahme der stimulierten Zellen bei den NR/RL auf 7.53% unter Therapie lag mit $p=0.070$ über dem Signifikanzniveau.

Bei den Akt+Zyt- und Akt+Zyt+/- Auswertungen ergaben sich vor und während der Therapie zwischen SR und NR/RL bzw. innerhalb der Gruppen keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 17).

4.5.5.2 Subgruppenanalyse: HCV-Genotyp 1 Patienten nach SEB-Stimulation

Bei der Auswertung der Messdaten von Patienten aus Kohorte 1 mit dem HCV-Genotyp 1 (n=16) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SR (n=9) und NR/RL (n=7) oder innerhalb der Gruppen im Therapieverlauf (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 16: Auswertung der Messergebnisse aus Kohorte 1 (vor und während Therapie) nach Stimulation mit SEB
Gesamtes Patientengut (n=28)

	Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
	SR (n=20)	NR/RL (n=8)	p	SR (n=20)	NR/RL (n=8)	p	SR (n=20)	NR/RL (n=8)	p
Vor Therapie (Messung 1)									
% positive									
CD4-Zellen									
MW	6.52	3.80	0.046 ⁺	9.01	7.08	0.297 ⁺	15.53	10.89	0.062 ⁺
SA	4.63	2.21		4.78	2.79		7.68	4.59	
In Therapie (Messung 2)									
% positive									
CD4-Zellen									
MW	7.22	6.70	0.795 ⁺	8.53	7.98	0.744 ⁺	15.75	14.68	0.724 ⁺
SA	4.91	4.30		4.06	3.69		7.18	7.05	
Messung 1 vs. Messung 2									
p	0.644 ⁺	0.112 ⁺		0.731 ⁺	0.592 ⁺		0.927 ⁺	0.222 ⁺	

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ
SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert
MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung
⁺= Student-T-Test

Tabelle 17: Auswertung der Messergebnisse aus Kohorte 1 (vor und während Therapie) nach Stimulation mit SEB
Nur CD154-gefärbte Patienten (n=20)

	Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
	SR (n=13)	NR/RL (n=7)	p	SR (n=13)	NR/RL (n=7)	p	SR (n=13)	NR/RL (n=7)	p
Vor Therapie (Messung 1)									
% positive	7.55	4.23	0.048 ⁺	7.45	7.53	0.960 ⁺	15.01	11.77	0.236 ⁺
CD4-Zellen	4.92	1.99		3.75	2.68		7.65	4.16	
In Therapie (Messung 2)									
% positive	8.58	7.53	0.656 ⁺	7.39	8.80	0.353 ⁺	15.97	16.33	0.915 ⁺
CD4-Zellen	5.44	3.91		3.20	3.09		7.60	5.71	
Messung 1 vs. Messung 2									
p	0.617 ⁺	0.070 ⁺		0.962 ⁺	0.428 ⁺		0.750 ⁺	0.113 ⁺	

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ
SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; NR/RL= NR und RL kombiniert
MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung
⁺= Student-T-Test

4.6 Auswertung der Ergebnisse von Kohorte 2

4.6.1 Beschreibung der Kohorte

Tabelle 18: Patientencharakteristika der Kohorte 2 (nach Therapie und therapienaive)

		Gesamt n (%)	SR n (%)	NR n (%)	RL n (%)	Naive n (%)
Anzahl		80 (100)	16 (20.0)	16 (20.0)	19 (23.8)	29 (36.3)
Alter	Median	48.00	47.50	55.00	50.00	45.00
	Min./Max.	19 / 75	29 / 67	19 / 75	34 / 72	21 / 65
Geschlecht	m	29 (36.3)	4 (25.0)	7 (43.8)	6 (31.6)	12 (41.4)
	w	51 (63.8)	12 (75.0)	9 (56.3)	13 (68.4)	17 (58.6)
Ethnizität	Kaukasier	72 (90.0)	15 (93.8)	16 (100)	17 (89.5)	24 (82.8)
Genotyp	1	59 (73.8)	12 (75.0)	16 (100)	16 (84.2)	15 (51.7)
	2	6 (7.5)	2 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (13.8)
	3	12 (15.0)	2 (12.5)	0 (0.0)	2 (10.5)	8 (27.6)
	4	2 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	1 (3.4)
	5	1 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.4)
Viruslast BE (IU/ml)	Mittelwert ± SA	3.089.409 ± 6.374.266	0.0 ± 0.0	3.411.679 ± 3.723.887	1.989.965 ± 2.463.092	5.344.923 ± 9.280.671
GPT bei BE (U/l)	Mittelwert ± SA	67 ± 48	21 ± 20	77 ± 44	91 ± 51	70 ± 43
Anzahl CD4-Zellen	Mittelwert ± SA	121.787 ± 77.676	138.937 ± 80.900	132.750 ± 72.106	148.579 ± 77.473	88.724 ± 76.000
Zytokin	TNF	62 (77.5)	16 (100)	15 (6.3)	17 (89.5)	14 (48.3)
	IFN	18 (22.5)	0 (0.0)	1 (93.8)	2 (10.5)	15 (51.7)
Oberfläche	CD154	72 (90.0)	16 (100.0)	15 (93.8)	18 (94.7)	23 (79.3)
	CD69	8 (10.0)	0 (0.0)	1 (6.3)	1 (5.3)	6 (20.7)

SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; Naive=therapienaive Patienten
SA=Standardabweichung ; Tx=Therapie ; BE=Blutentnahme

Wie in 3.2.1 beschrieben wurden 80 Patienten in Kohorte 2 eingeschlossen und ausgewertet.

Bei 16 Patienten (20.0%) hatte die vorherige antivirale Therapie zu einer dauerhaften Viruselimination geführt (sustained Responder, SR), 16 Patienten (20.0%) erfüllten die Kriterien für Nonresponder (NR), und bei 19 Patienten (23.8%) kam es nach Beendigung der Therapie zu einem erneuten Nachweis von HCV-RNA (Relapse, RL). Bei 29 Patienten (36.3%) wurde die

Untersuchung vor Beginn einer ersten antiviralen Therapie durchgeführt (therapienaive Patienten).

Der Altersmedian in Kohorte 2 lag bei 48 Jahren mit einer Spannweite von 19 bis 75 Jahren. 63.8% der Patienten waren Frauen, 90.0% waren kaukasischer Herkunft.

73.8% hatten Infektionen mit dem HCV-Genotyp 1, Genotyp 3 war mit einem Anteil von 15.0% am zweithäufigsten vertreten, gefolgt von Genotyp 2 (7.5%), Genotyp 4 (2.5%) und zuletzt Genotyp 5 mit 1.3 prozentigem Anteil.

Der Mittelwert der Viruslast lag in der Gesamtkohorte am Tag der Probenentnahme für die durchflusszytometrische Messung bei 3.1Mio. IU/ml. Der Mittelwert der GPT lag zum Zeitpunkt der Probeentnahme für die Messungen bei 67U/l.

Bei der Durchflusszytometrie wurden im Mittel 120.000 CD4-Zellen gemessen.

Zu weiteren Parametern der Patientenkohorte 2 sowie der Beschreibung der Parameter in den verschiedenen Untergruppen siehe Tabelle 18.

4.6.2 Häufigkeit positiver Reaktionen auf die einzelnen HCV-Proteine in Abhängigkeit des Therapieansprechens und bei therapienaiven Patienten

Von den 80 Patienten in Kohorte 2 reagierten am meisten Patienten auf das Core-Protein (16.3%), wenn die kombinierte Aktivierungsmarker- (CD69, CD154) und Zytokin- (IFN- γ , TNF- α) Expression (Akt+Zyt+) zugrunde gelegt wurde. Eine Aktivierung durch die anderen HCV-Proteine ließ sich nur bei 5-6% der Proben nachweisen. Therapienaive Patienten reagierten in 24.1% mit der Generierung Akt+Zyt+ Zellen auf das Core-Protein. Auch hier konnte durch die anderen HCV-Proteine nur selten eine Akt+Zyt+ Expression ausgelöst werden. Kein Patient aus der Gruppe der Responder (SR), Relapser (RL) oder Nonresponder (NR) reagierte auf mehr als 3 verschiedene Proteine mit der Ausbildung Akt+Zyt+ Zellen. Auf die Inkubation mit dem NS5-4-Protein reagierte kein Patient, der zuvor behandelt worden war (SR, NR, RL).

Die Akt+Zyt- Reaktionen fielen insgesamt mit einem Anteil von bis zu 32.5% (Core) höher aus als die Akt+Zyt+ Reaktionen. In der Gruppe der therapienaiven Patienten wurden mehr positive Reaktionen beobachtet als in vorbehandelten Patienten. Bei den NR wurde das geringste Ausmaß an positiven Reaktionen beobachtet. Eine Ausnahme zeigte sich nur nach Stimulation mit NS5-12. Bei den SR wurden durch Stimulation mit den HCV-Proteinen Core und NS3 37.5% bzw. 31.3% der Proben stimuliert, bei NR (18.8% bzw. 12.5%) und RL (31.6% bzw. 26.3%) jeweils weniger.

Tabelle 19: Prozentuale Häufigkeit positiver Reaktionen auf die einzelnen HCV-Proteine in Abhängigkeit des Therapieansprechens in Kohorte 2 (nach Therapie und therapienaive)

		Core (%)	NS3 (%)	NS4 (%)	NS5-4 (%)	NS5-12 (%)
Aktivierungsmarker+ Zytokin+	Gesamt (n=80)	16.3	6.3	5.0	5.0	6.3
	SR (n=16)	6.3	0.0	6.3	0.0	6.3
	NR (n=16)	18.8	6.3	0.0	0.0	0.0
	RL (n=19)	10.5	0.0	0.0	0.0	5.3
	Naive (n=29)	24.1	13.8	10.3	13.8	10.3
Aktivierungsmarker+ Zytokin-	Gesamt (n=80)	32.5	26.3	31.3	17.5	10.0
	SR (n=16)	37.5	31.3	31.3	12.5	6.3
	NR (n=16)	18.8	12.5	25.0	12.5	6.3
	RL (n=19)	31.6	26.3	36.8	15.8	5.3
	Naive (n=29)	37.9	31.0	31.0	24.1	17.2
Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-	Gesamt (n=80)	55.0	35.0	38.8	21.3	15.0
	SR (n=16)	43.8	37.5	50.0	12.5	18.8
	NR (n=16)	43.8	18.8	31.3	18.8	6.3
	RL (n=19)	52.6	42.1	36.8	15.8	5.3
	Naive (n=29)	69.0	37.9	37.9	31.0	24.1

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD 69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ ; Gesamt=Gesamtkohorte ; SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser ; Naive=therapienaive Patienten

Bei mehr als der Hälfte der Gesamtkohorte (55.0%) wurde nach Inkubation mit dem Core-Antigen eine Akt+Zyt+/- Reaktion nachgewiesen. Den insgesamt geringsten Anteil positiver Reaktionen erzielte das HCV-Protein NS5-12 (15%). Siehe auch Tabelle 19.

4.6.3 Auswertung der Daten hinsichtlich der Anzahl von HCV-Proteinen, auf die positiv reagiert wurde

4.6.3.1 Vergleich zwischen therapieerfahrenen und therapienaiven Patienten

Der Vergleich von Patienten aus Kohorte 2 ohne Therapieerfahrung (naiv) mit Patienten nach Abschluss einer antiviralen HCV-Therapie (SR, RL, NR zusammengefasst als „therapieerfahren“) ließ hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Anzahl erkannter HCV-Proteine bei Auswertung der Akt+ (CD69, CD154) Zyt+ (IFN- γ , TNF- α) und Akt+Zyt- Reaktionen keine signifikanten Unterschiede erkennen. Bei der Auswertung Akt+Zyt+/- Reaktionen konnte zwischen naiven und therapieerfahrenen Patienten dagegen eine signifikante Ungleichverteilung festgestellt werden ($p=0.020$).

Bei der Zusammenfassung der Patienten in Gruppen mit 0-2 bzw. 3-5 erkannten Proteinen reagierten 10.3% der therapienaiven Patienten auf 3 oder mehr Proteine mit der Ausbildung Akt+Zyt+ Zellen während kein therapieerfahrener Patient auf 3 oder mehr HCV-Proteine reagierte. Der Unterschied war mit $p=0.044$ statistisch signifikant. Bei der Auswertung der Akt+Zyt- und Akt+Zyt+/- Reaktionen ergaben sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede.

Der Vergleich der Mittelwerte Akt+Zyt- Reaktionen zeigte, dass therapienaive Patienten auf eine höhere Anzahl von HCV-Proteinen reagierten als therapieerfahrene (0.72 vs. 0.20; $p=0.051$).

Akt+Zyt- und Akt+Zyt+/- Zellen wurden bei therapienaiven Patienten als Reaktion auf eine höhere Zahl an HCV-Proteinen nachgewiesen als bei therapieerfahrenen Patienten, der Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz. Siehe auch Tabelle 20.

4.6.3.1.1 Subgruppenanalyse: CD154-gefärbte Patienten

Wie bei den Auswertungen in Kohorte 1 wurden die Daten der Patienten, deren Proben mit CD154 gefärbt wurden, nochmals in Form einer Subgruppenanalyse wiederholt. Die Subgruppe ($n=72$) teilte sich in 23 therapienaive Patienten sowie 49 Patienten mit vorangegangener Therapie auf (SR, NR, RL).

Die Verteilung der Anzahl erkannter Proteine zwischen therapienaiven und therapieerfahrenen Patienten zeigte mit Ausnahme der Auswertung der Akt+ (CD154) Zyt+/- (IFN- γ , TNF- α) Reaktionen keine statistisch signifikanten Differenzen. Bei den Akt+Zyt+/- Zellen konnte die schon bei der Auswertung der Gesamtkohorte 2 (siehe 4.6.3.1) beobachtete statistisch signifikante Ungleichverteilung zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von 0.013 bestätigt werden.

Bei den Akt+Zyt+ Reaktionen zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen therapienaiven und therapieerfahrenen Patienten, wenn eine Unterteilung in Reaktionen auf 0-2 und 3-5 Proteine vorgenommen wurde. Naive Patienten reagierten häufiger auf 3 oder mehr Proteine ($p=0.030$) als therapieerfahrene Patienten.

Bei Auswertung der Akt+Zyt- Reaktionen fiel der Unterschied zwischen naiven und therapieerfahrenen Patienten nicht signifikant aus, mit 30.4% erkannte aber ein prozentual höherer Anteil der therapienaiven Patientengruppe 3 oder mehr Proteine als therapieerfahrene Patienten (12.2%; $p=0.098$). Die Auswertung Akt+Zyt+/- Reaktionen ergab im Vergleich zur Auswertung der Gesamtkohorte 2 (siehe 4.6.3.1.) keine Unterschiede.

Beim Vergleich der Mittelwerte Akt+Zyt+ Reaktionen fiel der Unterschied zwischen naiven und therapieerfahrenen Patienten nicht signifikant aus ($p=0.065$). Der Vergleich der übrigen Mittelwerte ergab weder statistisch signifikante Unterschiede noch erkennbare Trends. Siehe auch Tabelle 21.

Tabelle 20: Auswertung der Messergebnisse in Kohorte 2 (nach Therapie und therapienaive Patienten)
Gesamtes Patientengut (n=80) ; Naive vs. Andere (SR/RL/NR)

		Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
		Naive (n=29)	Andere (n=51)	p	Naive (n=29)	Andere (n=51)	p	Naive (n=29)	Andere (n=51)	p
Anzahl erkannter HCV- Proteine	0	65.5 %	82.4 %	0.172*	44.8 %	49.0 %	0.670*	20.7 %	37.3 %	0.020*
	1	20.7 %	15.7 %		17.2 %	17.6 %		31.0 %	13.7 %	
	2	3.4 %	2.0 %		13.8 %	19.6 %		13.8 %	21.6 %	
	3	0.0 %	0.0 %		10.3 %	9.8 %		10.3 %	23.5 %	
	4	6.9 %	0.0 %		3.4 %	2.0 %		10.3 %	2.0 %	
	5	3.4 %	0.0 %	10.3 %	2.0 %	13.8 %	2.0 %			
	Chi-Wert			6.391			3.195			13.443
	0-2	89.7 %	100 %	0.044°	75.9 %	86.3 %	0.359°	65.5 %	34.5 %	0.613°
	3-5	10.3 %	0.0 %		24.1 %	13.7 %		72.5 %	27.5 %	
	MW	0.72	0.20	0.051 ⁺	1.41	1.04	0.306 ⁺	2.00	1.45	0.121 ⁺
SA	1.360	0.448	1.701		1.264	1.732		1.361		

*= χ^2 -Test ; °=exakter Test nach Fisher (2-seitig) ; ⁺= Student-T-Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

Naive=therapienaive Patienten ; Andere=Sustained Responder (SR), Relapser (RL) und Nonresponder (NR) kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD 69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Tabelle 21: Auswertung der Messergebnisse in Kohorte 2 (nach Therapie und therapienaive Patienten)
Nur CD154-gefärbte Patienten (n=72) ; Naive vs. Andere (SR/RL/NR)

		Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
		Naive (n=23)	Andere (n=49)	p	Naive (n=23)	Andere (n=49)	p	Naive (n=23)	Andere (n=49)	p
Anzahl erkannter HCV- Proteine	0	69.6 %	85.7 %	0.125*	47.8 %	49.0 %	0.240*	26.1 %	38.8 %	0.013*
	1	13.0 %	12.2 %		17.4 %	18.4 %		26.1 %	12.2 %	
	2	4.3 %	2.0 %		4.3 %	20.4 %		8.7 %	22.4 %	
	3	0.0 %	0.0 %		13.0 %	8.2 %		8.7 %	22.4 %	
	4	8.7 %	0.0 %		4.3 %	2.0 %		13.0 %	2.0 %	
	5	4.3 %	0.0 %	13.0 %	2.0 %	17.4 %	2.0 %			
	Chi-Wert			7.206			6.749			14.527
	0-2	87.0 %	100 %	0.030°	69.6 %	87.8 %	0.098°	60.9 %	73.5 %	0.289°
	3-5	13.0 %	0.0 %		30.4 %	12.2 %		39.1 %	26.5 %	
	MW	0.78	0.16	0.065 ⁺	1.48	1.02	0.291 ⁺	2.09	1.43	0.146 ⁺
SA	1.506	0.426	1.855		1.250	1.905		1.369		

*= χ^2 -Test ; °=exakter Test nach Fisher (2-seitig) ; ⁺= Student-T-Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

Naive=therapienaive Patienten ; Andere=Sustained Responder (SR), Relapser (RL) und Nonresponder (NR) kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Tabelle 22: Auswertung der Messergebnisse in Kohorte 2 (nach Therapie und therapienaive Patienten)
Nur Genotyp 1 Patienten (n=59) ; Naive vs. Andere (SR/RL/NR)

		Aktivierungsmarker+ Zytokin+			Aktivierungsmarker+ Zytokin-			Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-		
		Naive (n=15)	Andere (n=44)	p	Naive (n=15)	Andere (n=44)	p	Naive (n=15)	Andere (n=44)	p
Anzahl erkannter HCV- Proteine	0	60.0 %	81.8 %	0.055*	40.0 %	52.3 %	0.047*	6.7 %	38.6 %	0.001*
	1	26.7 %	15.9 %		6.7 %	20.5 %		40.0 %	15.9 %	
	2	0.0 %	2.3 %		20.0 %	15.9 %		20.0 %	20.5 %	
	3	0.0 %	0.0 %		6.7 %	9.1 %		0.0 %	22.7 %	
	4	13.3 %	0.0 %		6.7 %	2.3 %		13.3 %	2.3 %	
	5	0.0 %	0.0 %	20.0 %	0.0 %	20.0 %	0.0 %			
	Chi-Wert			7.600			11.223			21.596
	0-2	86.7 %	100 %	0.061°	66.7 %	88.6 %	0.104°	66.7 %	75.0 %	0.522°
	3-5	13.3 %	0.0 %		33.3 %	11.4 %		33.3 %	25.0 %	
	MW	0.80	0.20	0.120 ⁺	1.93	0.89	0.073 ⁺	2.33	1.34	0.058 ⁺
SA	1.373	0.462	2.017		1.125	1.759		1.275		

*= χ^2 -Test ; °=exakter Test nach Fisher (2-seitig) ; ⁺= Student-T-Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

Naive=therapienaive Patienten ; Andere=Sustained Responder (SR), Relapser (RL) und Nonresponder (NR) kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD 69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

4.6.3.1.2 Subgruppenanalyse: Genotyp 1 Patienten

59 Patienten aus Kohorte 2 waren mit dem HCV-Genotyp 1 infiziert. Die Subgruppe teilte sich in 15 therapienaive sowie insgesamt 44 therapieerfahrene Patienten auf.

Hinsichtlich der Anzahl an Akt+ (CD69, CD154) Zyt+ (IFN- γ , TNF- α) T-Zellreaktionen auf HCV-Proteine ergab sich zwischen therapienaiven und therapieerfahrenen Patienten kein signifikanter Unterschied ($p=0.055$). Bei den Akt+Zyt- T-Zellreaktionen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0.047$), ebenso bei Akt+Zyt+/- T-Zellreaktionen ($p=0.001$). Die detaillierten Daten sind in Tabelle 22 gezeigt.

Die prozentuale Verteilung auf die Gruppen, die auf 0-2 und 3-5 Proteine reagierten, war hingegen bei allen drei untersuchten Zellphänotypen nicht signifikant verschieden.

Der Vergleich der Mittelwerte zeigte bei den Akt+Zyt+ Reaktionen keinen statistisch signifikanten Unterschied, bei den Akt+Zyt- und Akt+Zyt+/- Reaktionen fielen die Unterschiede zwischen therapienaiven Patienten und therapieerfahrenen Patienten numerisch größer aus als in den Auswertungen der Gesamtkohorte und der Subgruppenanalyse CD154-gefärbter Patienten, auch wenn das Signifikanzniveau von $p=0.05$ nicht erreicht wurde. Eine Zusammenfassung der Subgruppenanalyse zeigt Tabelle 22.

4.6.3.2 Vergleich der Daten von Respondern (SR), Nonrespondern (NR) und Relapsern (RL) nach HCV-Proteinstimulation

In dieser Auswertung wurden die Messergebnisse der therapieerfahrenen Patienten, also der Responder ($n=16$), Nonresponder ($n=16$) und Relapser ($n=19$) aus Kohorte 2 miteinander verglichen.

Zwischen Respondern (SR), Nonrespondern (NR) und Relapsern (RL) gab es bei Auswertung der Akt+ (CD69, CD154) Zyt+ (IFN- γ , TNF- α), Akt+Zyt- und Akt+Zyt+/- Reaktionen keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Anzahl erkannter Proteine.

Weder SR noch NR und nur 1 Relapser (5.3%) zeigte auf mehr als 1 HCV-Protein eine signifikante Akt+Zyt+ T-Zellreaktion. Die Auswertung in Gruppen (0-2 bzw. 3-5 erkannte Proteine) ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Auswertung aller drei Reaktionstypen.

Beim Vergleich der Mittelwerte der 3 Therapieverlaufsgruppen zeigten sich in allen Auswertungen keine signifikanten Unterschiede oder statistisch erkennbaren Trends, NR zeigten jedoch die geringste Anzahl Akt+Zyt- und Akt+Zyt+/- Reaktionen, RL verhielten sich dagegen ähnlich wie SR. Akt+Zyt+ Reaktionen wurden in allen Gruppen nur vereinzelt beobachtet, die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Therapieverlaufsgruppen waren sehr gering (0.19

[SR] vs. 0.25 [NR] vs. 0.16 [RL] erkannter Proteine). Siehe zum Vergleich der Messergebnisse von SR, NR und RL in Kohorte 2 auch Tabelle 23.

Die Subgruppenanalysen von CD154-gefärbten Patienten und Genotyp 1 Patienten ergaben ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede bzw. erkennbare Trends (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 23: Auswertung der Messergebnisse in Kohorte 2 (nach Therapie)
Nur Patienten nach Therapie (n=51) ohne therapienaive ; SR vs. NR vs. RL

		Aktivierungsmarker+ Zytokin+				Aktivierungsmarker+ Zytokin-				Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-			
		SR (n=16)	NR (n=16)	RL (n=19)	p	SR (n=16)	NR (n=16)	RL (n=19)	p	SR (n=16)	NR (n=16)	RL (n=19)	p
Anzahl erkannter HCV- Proteine	0	81.3 %	75.0 %	89.5 %	0.379*	50.0 %	50.0 %	47.4 %	0.481*	31.3 %	43.8 %	36.8 %	0.726*
	1	18.8 %	25.0 %	5.3 %		6.3 %	31.3 %	15.8 %		12.5 %	12.5 %	15.8 %	
	2	0.0 %	0.0 %	5.3 %		31.3 %	12.5 %	15.8 %		31.3 %	25.0 %	10.5 %	
	3	0.0 %	0.0 %	0.0 %		6.3 %	6.3 %	15.8 %		18.8 %	18.8 %	31.6 %	
	4	0.0 %	0.0 %	0.0 %		0.0 %	0.0 %	5.3 %		0.0 %	0.0 %	5.3 %	
	5	0.0 %	0.0 %	0.0 %	6.3 %	0.0 %	0.0 %	6.3 %	0.0 %	0.0 %			
	Chi-Wert				4.205				9.547				6.993
	0-2	100 %	100 %	100 %	na*	87.5 %	93.8 %	78.9 %	0.441*	75,0 %	81,3 %	63.2 %	0.473*
	3-5	0.0 %	0.0 %	0.0 %		12.5 %	6.3 %	21.1 %		25,0 %	18,8 %	36.8 %	
	Chi-Wert								1.637				1.498
MW	0.19	0.25	0.16	0.834 [#]	1.19	0.75	1.16	0.551 [#]	1.63	1.19	1.53	0.641 [#]	
SA	0.403	0.447	0.501		1.471	0.931	1.344		1.455	1.223	1.429		

*= χ^2 Test ; [#]=1-way-Anova Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung ; na= not applicable

SR=Sustained Responder ; NR=Nonresponder ; RL=Relapser

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD 69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

4.6.4 Auswertung des maximalen Aktivierungsniveaus von CD4 T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit SEB

Die Auswertung der Messungen nach SEB-Stimulation wurde wie in Kohorte 1 durchgeführt (siehe 4.5.5). Es wurde der prozentuale Anteil der CD4-Zellen mit den verschiedenen Zellphänotypen (Akt⁺ (CD69, CD154) Zyt⁺ (IFN- γ , TNF- α), Akt⁺Zyt⁻, Akt⁺Zyt^{+/-}) bestimmt, und die Mittelwerte von therapienaiven Patienten wurden mit denen von SR, NR und RL verglichen. Weiterhin wurde ein Vergleich der Mittelwerte von SR, NR und RL untereinander, von SR mit der zusammengefassten Gruppe von NR und RL sowie von SR mit der zusammengefassten Gruppe aus NR, RL und naiven Patienten (entsprechend Patienten mit HCV-RNA-freiem vs. HCV-RNA-haltigem Blut) durchgeführt.

Beim Vergleich der Werte therapienaiver mit denen therapieerfahrener Patienten (SR, NR, RL) ergaben sich bei Auswertung der Akt⁺Zyt⁺, Akt⁺Zyt⁻ und Akt⁺Zyt^{+/-} Phänotypen keine signifikanten Differenzen.

Der Vergleich von SR, NR und RL untereinander zeigte zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, in den Auswertungen unter Berücksichtigung der Zytokinexpression (Akt⁺Zyt⁺ und Akt⁺Zyt^{+/-}) wiesen Responder (Akt⁺Zyt⁺ 9.32%, Akt⁺Zyt^{+/-} 17.19%) aber höhere Ansprechraten auf als NR (Akt⁺Zyt⁺ 6.27%, Akt⁺Zyt^{+/-} 13.46%) und RL (Akt⁺Zyt⁺ 6.83%, Akt⁺Zyt^{+/-} 13.76%), die beide niedrigere Werte in einem vergleichbaren Bereich erreichten. Der Unterschied bei den Akt⁺Zyt⁺ T-Zellen erreichte einen p-Wert von 0.083.

Wie in Kohorte 1 wurden Nonresponder (NR) und Relapser (RL) zu einer Gruppe zusammengefasst und mit den Respondern (SR) verglichen. Dabei zeigte sich bei den SR eine signifikant höhere Zahl Akt⁺Zyt⁺ T-Zellen als bei NR/RL (p=0.028).

Schließlich wurde bei NR und RL noch die Gruppe der therapienaiven Patienten (naive) eingeschlossen. Die naiven Patienten (6.87%) zeigten als Einzelgruppe bei den Akt⁺Zyt⁺ Zellen ähnlich hohe Ansprechraten nach SEB-Stimulation wie NR (6.27%) und RL (6.83%). Alle Patienten der 3 zusammengefassten Gruppen besaßen zum Zeitpunkt der SEB-Stimulation noch HCV-RNA im Blut. Sie wurden mit den Respondern, bei denen sich keine HCV-RNA mehr im Blut nachweisen ließ, verglichen. Die Ergebnisse waren mit denen der Auswertung von Respondern vs. NR/RL vergleichbar.

Bei Auswertung der Akt⁺Zyt⁻ Zellen zeigten sich zwischen den verschiedenen Gruppen aus Kohorte 2 keine statistisch signifikanten Unterschiede oder statistisch erkennbaren Trends.

Die Auswertung der Zellen mit einem Akt⁺Zyt^{+/-} Phänotyp erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, SR konnten mit 17.19% jedoch einen größeren Zellanteil aktivieren als NR/RL (13.62%) oder NR/RL/Naive (14.43%). Siehe auch Tabelle 24.

Tabelle 24: Auswertung der Messergebnisse aus Kohorte 2 (Patienten nach Therapie) nach Stimulation mit SEB

Gesamtes Patientengut (n=80)

Naive (n=29) vs. Andere (n=51) ; SR (n=16) vs. NR (n=16) vs. RL (n=19) ; SR vs. NR/RL (n=35) ; SR vs. NR/RL/Naive (n=64)

		Naive	Andere	SR	NR	RL	SR vs. NR/RL	SR vs. NR/RL/Naive
Aktivierungsmarker+ Zytokin+	MW (% positive CD4-Zellen)	6.87	7.44	9.32	6.27	6.83	9.32 vs. 6.58	9.32 vs. 6.71
	SA	4.72	4.17	4.58	3.00	4.32	4.58 vs. 3.72	4.58 vs. 4.17
	p	0.582 ⁺		0.083 [#]		0.028 ⁺		0.031 ⁺
Aktivierungsmarker+ Zytokin-	MW (% positive CD4-Zellen)	8.53	7.30	7.87	7.19	6.92	7.87 vs. 7.05	7.87 vs. 7.72
	SA	4.52	3.83	4.19	4.27	3.24	4.19 vs. 3.69	4.19 vs. 4.11
	p	0.201 ⁺		0.766 [#]		0.481 ⁺		0.896 ⁺
Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-	MW (% positive CD4-Zellen)	15.41	14.74	17.19	13.46	13.76	17.19 vs. 13.62	17.19 vs. 14.43
	SA	7.47	7.15	7.67	6.67	6.93	7.67 vs. 6.71	7.67 vs. 7.06
	p	0.695 ⁺		0.257 [#]		0.098 ⁺		0.173 ⁺

⁺=Student-T-Test ; [#]=1-way-Anova Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

Naive=therapienaive Patienten ; Andere=Sustained Responder (SR), Relapser (RL) und Nonresponder (NR) kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD 69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Tabelle 25: Auswertung der Messergebnisse aus Kohorte 2 (Patienten nach Therapie) nach Stimulation mit SEB

Nur CD154-gefärbte Patienten (n=72)

Naive (n=23) vs. Andere (n=49) ; SR (n=16) vs. NR (n=15) vs. RL (n=18) ; SR vs. NR/RL (n=33) ; SR vs. NR/RL/Naive (n=56)

		Naive	Andere	SR	NR	RL	SR vs. NR/RL	SR vs. NR/RL/Naive
Aktivierungsmarker+ Zytokin+	MW (% positive CD4-Zellen)	7.48	7.59	9.32	6.34	7.09	9.32 vs. 6.75	9.32 vs. 7.05
	SA	4.76	4.17	4.58	3.06	4.30	4.58 vs. 3.75	4.58 vs. 4.17
	p	0.920 ⁺		0.112 [#]		0.042 ⁺		0.064 ⁺
Aktivierungsmarker+ Zytokin-	MW (% positive CD4-Zellen)	8.03	7.12	7.87	6.64	6.86	7.87 vs. 6.76	7.87 vs. 7.28
	SA	4.00	3.72	4.19	3.78	3.32	4.19 vs. 3.48	4.19 vs. 3.72
	p	0.351 ⁺		0.620 [#]		0.333 ⁺		0.588 ⁺
Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-	MW (% positive CD4-Zellen)	15.50	14.71	17.19	12.98	13.95	17.19 vs. 13.51	17.19 vs. 14.33
	SA	6.99	6.99	7.67	6.62	7.08	7.67 vs. 6.78	7.67 vs. 6.88
	p	0.662 ⁺		0.232 [#]		0.094 ⁺		0.157 ⁺

⁺=Student-T-Test ; [#]=1-way-Anova Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

Naive=therapienaive Patienten ; Andere=Sustained Responder (SR), Relapser (RL) und Nonresponder (NR) kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

Tabelle 26: Auswertung der Messergebnisse aus Kohorte 2 (Patienten nach Therapie) nach Stimulation mit SEB

Nur Genotyp 1 Patienten (n=59)

Naive (n=15) vs. Andere (n=44) ; SR (n=12) vs. NR (n=16) vs. RL (n=16) ; SR vs. NR/RL (n=32) ; SR vs. NR/RL/Naive (n=47)

		Naive	Andere	SR	NR	RL	SR vs. NR/RL	SR vs. NR/RL/Naive
Aktivierungsmarker+ Zytokin+	MW (% positive CD4-Zellen)	5.96	7.44	9.87	6.27	6.80	9.87 vs. 6.53	9.87 vs. 6.35
	SA	4.52	4.27	4.79	2.97	4.48	4.79 vs. 3.75	4.79 vs. 3.97
	p	0.257 ⁺		0.062 [#]		0.019 ⁺		0.011 ⁺
Aktivierungsmarker+ Zytokin-	MW (% positive CD4-Zellen)	8.89	7.49	8.70	7.19	6.87	8.70 vs. 7.03	8.70 vs. 7.62
	SA	5.51	4.02	4.38	4.27	3.53	4.38 vs. 3.86	4.38 vs. 4.48
	p	0.376 ⁺		0.472 [#]		0.226 ⁺		0.459 ⁺
Aktivierungsmarker+ Zytokin+/-	MW (% positive CD4-Zellen)	14.85	14.93	18,57	13.46	13.67	18.57 vs. 13.57	18.57 vs. 13.98
	SA	7.42	7.45	7,76	6.68	7.48	7.76 vs. 6.97	7.76 vs. 7.06
	p	0.970 ⁺		0.140 [#]		0.046 ⁺		0.054 ⁺

⁺=Student-T-Test ; [#]=1-way-Anova Test

MW= Mittelwert ; SA=Standardabweichung

Naive=therapienaive Patienten ; Andere=Sustained Responder (SR), Relapser (RL) und Nonresponder (NR) kombiniert

Aktivierungsmarker+ = Aktivierungsmarkerpositiv (CD 69, CD154) ; Zytokin+ = Zytokinpositiv (TNF- α , IFN- γ) ; Zytokin+/- = Zytokin positiv oder negativ

4.6.4.1 Subgruppenanalyse: CD154-gefärbte Patienten nach SEB-Stimulation

Der Vergleich der therapienaiven mit therapieerfahrenen (SR, NR, RL) Patienten und der Ergebnisse der therapieerfahrenen Gruppen untereinander ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Zwischen den Mittelwerten der SR und NR/RL ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Akt+ (CD69, CD154) Zyt+ (IFN- γ , TNF- α) Zellen mit höheren Ansprechraten bei den SR ($p=0.042$). Die Auswertung des gleichen Phänotyps bei SR vs. NR/RL/Naive verfehlte das statistische Signifikanzniveau ($p=0.064$).

Die nach der SEB-Stimulation gemessenen Anteile Akt+Zyt- Zellen bei Respondern und NR/RL sowie NR/RL/naiven lagen bei allen Gruppen im Bereich von 6.7% (NR/RL) bis 7.9% (SR), es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die Analyse von Akt+Zyt+/- Zellen zeigte insbesondere beim Vergleich von SR und NR/RL einen statistischen Trend zugunsten der Responder, bei denen ein prozentual höherer Anteil der gemessenen CD4-Zellen reagierte ($p=0.094$). Die Ergebnisse nach SEB-Stimulation der CD154-Patienten sind nochmals in Tabelle 25 dargestellt.

4.6.4.2 Subgruppenanalyse: Genotyp 1 Patienten nach SEB-Stimulation

Die Subgruppe setzte sich aus 44 Patienten aus Kohorte 2 mit Genotyp 1, davon 12 Responder (SR), 16 Nonresponder (NR), 16 Relapser (RL) und 15 therapienaive (Naive) Patienten zusammen.

Zwischen therapienaiven und therapieerfahrenen („Andere“) Patienten gab es bei Auswertung aller Zellphänotypen keine signifikanten Unterschiede.

Der Vergleich zwischen SR, NR und RL zeigte bei den Respondern einen höheren Anteil von Akt+Zyt+ und Akt+Zyt+/- Zellen als bei den anderen Gruppen. Der Unterschied hinsichtlich der Akt+Zyt+ Zellen lag mit $p=0.062$ knapp über dem Signifikanzniveau.

Zwischen Respondern und NR/RL wurden bei Auswertung der Akt+Zyt+ Zellen ($p=0.019$) und der Akt+Zyt+/- Zellen ($p=0.046$) statistisch signifikante Unterschiede festgestellt. In beiden Fällen reagierte bei SR ein größerer Anteil der CD4-Zellen.

Bei Auswertung der Patienten mit HCV-RNA im Blut (therapienaive Patienten, NR und RL) gegenüber virusfreien Patienten (SR) zeigte sich bei SR ein signifikant höherer Anteil Akt+Zyt+ reagierender CD4 T-Zellen als bei Patienten mit Virus im Blut ($p=0.011$).

Der Unterschied der Häufigkeit Akt+Zyt+/- Zellen nach SEB-Stimulation lag in der Auswertung der SR vs. NR/RL/Naive statistisch mit $p=0.054$ knapp über dem Signifikanzniveau.

Der Anteil von Akt+Zyt- reagierenden CD4 T-Zellen war bei SR und den anderen Gruppen (NR/RL und NR/RL/Naive) ungefähr gleich. Siehe hierzu auch Tabelle 26.

5 Diskussion

Es ist nicht vollständig bekannt, welche Faktoren bei der Behandlung einer chronischen Hepatitis C Virusinfektion bei einigen Patienten zu einer andauernden Viruselimination führen, während andere Patienten nicht auf die Therapie ansprechen. Eine naheliegende Erklärung sind Unterschiede in der Funktion des Immunsystems. Besondere Aufmerksamkeit wird dabei der Funktion der T-Zellen gewidmet. Die Untersuchungen zur T-Zellantwort bei chronischer Hepatitis C Virusinfektion sind bisher uneinheitlich ausgefallen.

Bei der hier durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchung von CD4 T-Zellen wurde systematisch die Immunreaktion nach Stimulation mit HCV-Proteinen vor, während und nach Therapie hinsichtlich der Aktivierungsmarker- und Zytokinexpression untersucht. Die Stimulation mit dem Superantigen SEB ermöglicht zusätzlich eine Aussage über die maximale Stimulierbarkeit der CD4 T-Zellen bei Patienten mit verschiedenen Therapieverläufen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

5.1 Methodik

Es wurde eine etablierte Methode zur durchflusszytometrischen Messung des Aktivierungsstatus von T-Zellen angewendet [46, 91, 105, 106]. Eine Besonderheit gegenüber einigen zuvor durchgeführten Studien zur Immunantwort bei Hepatitis C Virusinfektion war die sofortige Weiterverarbeitung des gewonnenen Frischbluts einschließlich der durchflusszytometrischen Erfassung bei jedem Patienten. Das Blut war dadurch nie den physikalischen Einflüssen einer Kryokonservierung und Wiederaufbereitung oder längeren Wartezeiten bis zur Bearbeitung ausgesetzt [110].

Während der Inkubation waren alle Blutbestandteile in ihrer auch im Körper vorkommenden Konzentration zur Interaktion untereinander vorhanden. Hierdurch konnte eine natürlichere Reaktionsumgebung gewährleistet werden als bei Versuchsmethoden mit vorheriger mehrtägiger Kultur antigenspezifischer T-Zellen.

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung und Auswertung war keine Studie zur Messung der T-Zellantwort bei chronischer Hepatitis C Virusinfektion unter Verwendung von CD154 als Aktivierungsmarker veröffentlicht. Obwohl CD69 als Aktivierungsmarker allgemein anerkannt ist [110], haben neue Studien die Vorzüge von CD154 gegenüber CD69 gezeigt [46, 86]. CD154 wird selektiver durch die vom zu untersuchenden Antigen stimulierten T-Zellen exprimiert, und die CD154-Expression ist stärker an eine Stimulation über den T-Zellrezeptor der

antigenspezifischen T-Zelle gebunden als die CD69-Expression, welche auch nach lokaler Einwirkung von Zytokinen auf Zellen gefunden wird [46].

Ein Vorteil der verwendeten durchflusszytometrischen Methode gegenüber anderen Methoden ist die Möglichkeit der unmittelbaren Inkubation von ganzen Proteinen mit all ihren bekannten und evtl. auch unbekanntem T-Zellepitopen. Ebenso ist keine vorherige HLA-Typisierung und Auswahl der Patienten wie bei der Tetramermethode notwendig [110], was die Durchflusszytometrie weniger aufwendig und für alle Patienten zugänglich macht.

Ein Nachteil insbesondere gegenüber der Elispot-Methode ist die ca. 10-100 fach geringere Sensitivität für antigenspezifische T-Zellen [110]. Es gibt auch Hinweise darauf, dass die Durchflusszytometrie für die Messung der schwachen Reaktionen von antigenspezifischen T-Zellen im Stadium der chronischen Hepatitis C Virusinfektion aus diesem Grund problematisch ist. Im akuten Stadium der Hepatitis C Virusinfektion sind Messungen jedoch durchaus erfolgreich gewesen [110]. Es muss daher diskutiert werden, ob die Methode im chronischen Stadium tatsächlich ungeeignet ist, oder ob die zu messenden Immunreaktionen zu schwach bzw. nicht vorhanden sind, um eine ausreichende Wirkung auf den Organismus bzw. den Krankheitsverlauf zu erzielen und gerade das Fehlen der Messbarkeit ein relevantes Ergebnis darstellt. Weiterhin wurden bisher weitgehend Zytokinmessungen zur T-Zellanalyse durchgeführt. Es gibt jedoch mittlerweile vermehrt Hinweise darauf, dass ein Problem der Zytokinsekretion bei HCV-spezifischen CD4 T-Zellen vorliegt [86].

Ein weiterer Nachteil der verwendeten wie auch der anderen immunologischen Methoden sind die uneinheitlichen Kriterien zur Definition einer positiven Reaktion [110].

Die hier verwendete Grenze eines 0.01% Anteils positiver Zellen an der Gesamt-CD4-Zellzahl nach Proteinstimulation ist zwar ein willkürlich gesetzter Wert und eine relativ niedrig angesetzte Grenze, galt aber nach Abzug des jeweiligen Wertes der Negativkontrolle und war aufgrund der zu erwartenden niedrigen Ansprechraten (max. 1/10.000 Zellen) gerechtfertigt. In einer neu veröffentlichten Studie wurde eine CD4 T-Zellaktivierung von 0.01% nach Antigenstimulation bei chronischer HCV als signifikanter Anstieg festgestellt [86].

Des Weiteren wurden in der hier vorliegenden Arbeit in den meisten Auswertungen nicht die absolute Höhe bzw. der prozentuale Anteil an CD4-Zellen mit einem bestimmten Phänotyp nach Antigenstimulation, sondern die Breite bzw. Diversivität der Immunreaktion anhand der Anzahl der HCV-Proteine, auf die reagiert wurde, getestet und verglichen.

Nur nach SEB-Stimulation wurden die Mittelwerte der prozentual reagierenden CD4 T-Zellanteile direkt zwischen den Gruppen verglichen und auf signifikante Unterschiede untersucht. Hierbei wurden aber Unterschiede von teilweise mehreren Prozentpunkten gemessen,

die auch bei Berücksichtigung von Positivkriterien in anderen Studien gleiche Ergebnisse geliefert hätten [91].

5.2 Einfluss bekannter Faktoren, die eine Auswirkungen auf das Therapieergebnis haben

Der Einfluss von Faktoren, die sich bekanntermaßen auf das Therapieergebnis bzw. Therapieansprechen auswirken, konnte in Kohorte 1 nur teilweise bestätigt werden. So wurden zwar 13 von 16 Frauen (81.25%) gegenüber 7 von 12 Männern (58.33%) SR, der Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz. In der Literatur wird das weibliche Geschlecht als prognostisch günstiger Faktor zum Erreichen einer dauerhaften Viruselimination angegeben. Wird dagegen der Gewichtsunterschied zwischen Männern und Frauen berücksichtigt, hat das weibliche Geschlecht keinen Einfluss auf das Therapieergebnis mehr [99].

Die Höhe der Viruslast, insbesondere die vollständige Elimination 4 Wochen nach Beginn einer Interferontherapie hatte in Kohorte 1, wie auch in der Literatur beschrieben, einen deutlich signifikanten Einfluss auf das Therapieergebnis [22].

Einer der bekanntermaßen zu Therapiebeginn wichtigsten und therapieentscheidenden Einflussfaktoren, der HCV-Genotyp, konnte ebenfalls bestätigt werden [99]. Von 17 Patienten mit Genotyp 1 oder 4 erreichten 10 eine dauerhafte Viruselimination (SR), was einem Anteil von 58% entspricht und damit im Bereich der erwarteten Ansprechrate liegt [31]. Von 11 Patienten mit den Genotypen 2, 3 oder 5 wurden 10 Patienten SR entsprechend einem Anteil von 90.9%. Hier liegt die Rate der SR sogar leicht über dem erwarteten Wert. Dass der gemessene Einfluss des Genotyps auf das Therapieergebnis in Kohorte 2 trotzdem nur ein Signifikanzniveau von $p=0.099$ erreicht, ist am ehesten durch die geringe Fallzahl der NR/RL ($n=8$) verschuldet.

Es sollte bei der Interpretation der anderen Auswertungen aus Kohorte 2 mit ähnlichen oder signifikanten p -Werten berücksichtigt werden, dass ein so eindeutiger Einflussfaktor einen so verhältnismäßig geringen statistischen Einfluss auf die Kohorte erreicht hat.

5.3 Maximale Antigen-unspezifische Reaktion von CD4 T-Zellen

Nach SEB-Stimulation konnten in beiden Kohorten hinsichtlich Akt⁺ (CD69, CD154) Zyt⁺ (IFN- γ , TNF- α) Zellen signifikante Unterschiede festgestellt werden. In Kohorte 1 konnte vor Therapie bei späteren SR ein signifikant höherer Anteil der CD4 T-Zellen stimuliert werden als bei späteren NR/RL. Während der antiviralen Therapie verlor sich der Unterschied zwischen SR und NR/RL vor allem aufgrund des starken Zuwachses in der Gruppe der NR/RL. Der während der Therapie gemessene Wert der SR lag dagegen im Bereich des vor Therapie gemessenen Wertes. Die Unterschiede waren in der Subgruppenanalyse der CD154-gefärbten Patienten

ebenfalls signifikant. Bei der Subgruppenanalyse der HCV Genotyp 1 Patienten waren die Unterschiede numerisch zu erkennen, sie erreichten aber vermutlich aufgrund der niedrigen Gruppengröße (n=16) keine statistische Signifikanz mehr.

Als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse vor Therapie ist eine generell defekte bzw. behinderte oder gar erschöpfte Zytokinsekretion der CD4 T-Zellen der späteren NR/RL in Betracht zu ziehen, welche erst durch das Einwirken von Interferon- α mit seinen immunmodulierenden Eigenschaften im Rahmen der antiviralen HCV-Therapie aufgehoben wird. Die Verstärkung der Zytokinproduktion durch Interferon- α ist einer der bekannten Hauptwirkmechanismen von Interferon- α [34, 92].

Unterstützend für die Hypothese eines Problems im Bereich der Zytokinproduktion vor Therapie ist der Vergleich mit den Ergebnissen der Auswertung von Akt+Zyt- Zellen. Zwischen SR und NR/RL zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied. Der Anteil der durch SEB aktivierten Zellen war in beiden Verlaufsgruppen sehr ähnlich. Die späteren SR erreichten in der CD154-Subgruppenanalyse vor Therapiebeginn einen Anteil von 7.45%, spätere NR/RL dementsprechend 7.53% Akt+Zyt- CD4 T-Zellen.

Nach der Therapie (Kohorte 2) wiesen SR erneut ein höheres maximales Aktivierungsniveau hinsichtlich der Akt+Zyt+ Zellen auf als NR, RL und therapienaive Patienten. SR erreichten Werte über 9% Akt+Zyt+ Zellen, NR/RL zwischen 6 und 7%. Dieser Unterschied war wie bereits vor Therapiebeginn (Kohorte 1) statistisch signifikant (p=0.042).

Als Erklärung für das bessere Abschneiden der SR zumindest nach Therapieende könnte ein offensichtlicher Unterschied zwischen SR und der Gruppe der NR/RL verantwortlich sein, nämlich das Fehlen von HCV-RNA im Blut der SR. Bekannterweise zeigt das Virus einen negativen immunmodulierenden Einfluss auf die T-Zellen.

Passend zu dieser Hypothese stellten Tang et al. in den ersten Wochen der antiviralen Therapie eine Zunahme der Interferon- γ -Produktion durch CD4 T-Zellen sowie eine positive Reaktion auf ein größeres Spektrum an HCV-Proteinen insbesondere bei Patienten mit schnell fallenden Virustitern fest [111].

Die Hypothese wird zusätzlich durch die Ergebnisse aus der Gruppe therapienaiver Patienten unterstützt, die HCV-RNA positiv sind und einen Anteil um 7% Akt+Zyt+ Zellen aufwiesen, also in etwa im Bereich der NR/RL nach Therapie oder der SR aus Kohorte 1 vor Therapie.

Die Tatsache, dass der signifikante Unterschied bezüglich der aktivierten zytokinproduzierenden Zellen zwischen SR und NR/RL in Kohorte 1 vor Therapie besteht, obwohl zu diesem Zeitpunkt alle Patienten HCV-RNA positiv sind und die Mittelwerte der Viruslast bei den SR sogar über

denen der NR/RL liegen, spricht hingegen gegen eine lineare Beziehung zwischen Viruslast und T-Zellhemmung.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse nach unspezifischer Stimulation von T-Zellen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion vor, während und nach Therapie mit den Ergebnissen anderer Studien ist schwierig, da eine so differenzierte Auswertung der meist im Rahmen einer Positivkontrolle durchgeführten SEB-Stimulierung der T-Zellen in anderen Studien nicht durchgeführt wurde.

Rosen et al. stellten bei einem Vergleich der Zytokinexpression (IFN- γ , TNF- α) zwischen Patienten mit spontan bzw. nach antiviraler Therapie ausgeheilter Hepatitis C Virusinfektion, Patienten mit unterschiedlichen Stadien der Leberschädigung sowie einer gesunden Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede fest. Hier wurde jedoch mit einer niedrigeren Fallzahl als in unserer Studie gearbeitet und keine kombinierte Expression eines Zytokins mit einem Aktivierungsmarker separat ausgewertet, sondern die Zytokinexpression aller CD4 T-Zellen, die wiederum in unseren Ergebnissen nicht berücksichtigt wurde [91]. Zudem wurden die verschiedenen getesteten Gruppen anhand des Stadiums der Leberschädigung bzw. Krankheitsprogression und nicht anhand des Therapieergebnisses einer antiviralen Therapie eingeteilt.

Barnes et al. erwähnten nur eine starke Interferon- γ -Produktion von T-Zellen seiner Patienten nach Phytohämagglutinin (PHA) -Stimulation, ohne eine Quantifizierung vorzulegen [92].

In einer 2010 veröffentlichten Studie von Semmo et al. konnten keine Unterschiede in der generellen Aktivierbarkeit von CD4 T-Zellen von Patienten mit chronischer HCV nach Stimulation mit CMV festgestellt werden. Die einzelnen Daten wurden allerdings nicht gezeigt, es handelte sich um eine Patientenkohorte mit lediglich 13 Patienten und es wurde nicht genau beschrieben, ob bei der Auswertung der Daten die alleinige Zytokinproduktion oder die kombinierte Zytokin- und Aktivierungsmarkerexpression berücksichtigt wurde [86].

Auch Burton et al. fanden nach Stimulation mit verschiedenen CMV-Antigenen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion bezüglich der Gesamt-Interferon- γ -Produktion durch CD4 T-Zellen keine signifikanten Unterschiede, vor, während und nach Therapie [94]. Es wurde dabei aber keine separate Auswertung der verschiedenen Therapieverläufe vorgenommen. In einigen Studien wurde auch nur eine sehr geringe Anzahl von Patienten mit den Kontrollantigenen wie CMV oder Tetanustoxin getestet [90, 91].

Die Hypothese einer generellen Schwäche des Immunsystems konnte in mehreren anderen Studien nicht bestätigt werden [93].

5.4 Stimulation durch rekombinante HCV-Proteine

Vor der Therapie waren hinsichtlich der Akt+Zyt+ Zellen kaum Unterschiede in der Anzahl erkannter HCV-Proteine zwischen SR und NR/RL festzustellen. Bei Zytokin-negativen (Akt+Zyt-) Zellen zeigte sich dagegen ein Unterschied zu Gunsten der NR/RL, der in der Auswertung der Patienten mit CD154 als Aktivierungsmarker sogar bei Auswertung des numerischen Mittelwerts statistisch signifikant war (0.92 (SR) vs. 2.71 (NR/RL), $p=0.032$).

Unter dem Einfluss der antiviralen Therapie kam es zu gravierenden Änderungen der Immunantwort auf die HCV-Proteine, insbesondere bezüglich der Zytokinproduktion nach Antigenstimulation. Sowohl bei SR als auch bei NR/RL kam es nach Inkubation mit HCV-Proteinen seltener zu einer kombinierten Expression von Aktivierungsmarkern und Zytokinen als vor der Therapie. Der Abfall war bei den NR/RL ausgeprägter als bei den SR, jedoch reagierte in beiden Gruppen während der Therapie kein Patient auf mehr als 1 HCV-Protein mit einer Zytokinproduktion (Akt+Zyt+).

Die vorgelegten Ergebnisse decken sich mit denen von Burton Jr. et al. Hier wurde ebenfalls eine Abnahme der Zytokinexpression (IFN- γ) von antigenspezifischen CD4 T-Zellen zur Therapiewoche 8 festgestellt. Die Ergebnisse bei Burton et al. sind anders als in unserer vorliegenden Studie statistisch hoch signifikant, dabei wurden die Messungen mittels der sensitiven Elispot-Technik durchgeführt [94]. Burton et al. bewerteten auch nicht das Spektrum an HCV-Proteinen, auf die reagiert wurde, sondern die Anzahl der antigenspezifischen Zellen und die Menge der Interferon- γ -Produktion.

Im Gegensatz dazu zeigten Barnes et al., dass es während der antiviralen Therapie zu einer Zunahme der Proliferationskapazität und insgesamt zu einem etwas höheren Niveau der IFN- γ -Produktion von HCV-spezifischen T-Zellen kam. Die T-Zellstimulation ließ nach Beendigung der Therapie aber wieder nach. Zudem wurde während der antiviralen Therapie teilweise eine T-Zellproliferation ohne Zytokinproduktion nachgewiesen [92].

Bezüglich des Therapieansprechens konnte bei Burton et al. und Barnes et al. wie in der hier durchgeführten Studie kein statistisch signifikanter Zusammenhang zur gemessenen T-Zellreaktion festgestellt werden.

Passend zur Diskrepanz der beiden Studien hinsichtlich Interferon- γ Produktion und Proliferationskapazität sind die Ergebnisse der Gruppe von Semmo et al., die an Patienten mit chronischer Hepatitis C nach Antigenstimulation eine nicht messbare Interferon- γ Produktion bei erhaltener Proliferationskapazität HCV-antigenspezifischer T-Zellen zeigen konnte [86].

Eine Stärke der von uns durchgeführten Studie ist die separate Auswertung von Zellen mit kombinierter Aktivierungsmarker- und Zytokinproduktion (Akt+Zyt+), aktivierten antigen-

spezifischen Zellen ohne Zytokinproduktion (Akt+Zyt-) sowie Zellen mit Aktivierungsmarkerexpression unabhängig von der Zytokinproduktion (Akt+Zyt+/-) für die verschiedenen Therapieverläufe. So ist ersichtlich, dass es bei späteren SR unter der Therapie im Gegensatz zur bereits erwähnten Abnahme bei Akt+Zyt+ Reaktionen zu einer Ausweitung des Spektrums erkannter HCV-Proteine kommt, wenn die Messung Akt+Zyt- Reaktionen zu Grunde gelegt wird. Der Anstieg führt zu Werten, die höher liegen als die bei späteren Therapieversagern. Als Ursache kann entweder (wie von Burton et al. vermutet) ein Verlust von antigenspezifischen Zellen während der Therapie oder ein bei den NR/RL gravierender in Erscheinung tretendes Problem der Zytokinexpression, möglicherweise im Rahmen einer T-Zellerschöpfung, in Frage kommen. Hinsichtlich der möglichen T-Zellerschöpfung oder Anergie ist auch die vor Therapie gemessene erhöhte Aktivierungsmarkerexpression relevant.

Zusätzlich oder unabhängig davon könnten genetische Einflüsse (Patientengene oder virale Gene), ein hemmender Einfluss viraler Faktoren auf das Immunsystem bzw. die T-Zellen, oder auch die Migration von HCV-spezifischen T-Zellen in die Leber eine Rolle spielen [86, 99].

Noch mehrere Monate nach Beendigung der antiviralen Therapie mit Interferon- α und Ribavirin bleibt das während der Therapie eingetretene eingengegte Spektrum erkannter viraler Proteine mit niedriger Zytokinexpression nach Antigenkontakt bei Patienten aller Verlaufsgruppen bestehen. Es zeigt sich in unserer Auswertung nach antiviraler Therapie (Kohorte 2) ein ähnliches Bild wie in der Auswertung während der Therapie (Kohorte 1).

In Kohorte 2 ergaben sich zwischen SR, NR und RL zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, NR zeigten bei der Analyse Akt+Zyt- und Akt+Zyt+/- Reaktionen jedoch jeweils auf die geringste Anzahl an HCV-Proteinen eine T-Zellantwort, RL zeigten ähnliche Resultate wie SR. Auch hier sind Parallelen zu den Ergebnissen aus Kohorte 1 während der antiviralen Therapie zu erkennen.

Die Bedeutung der Ergebnisse aus Kohorte 2 liegt zum einen in der Bestätigung der Ergebnisse aus Kohorte 1, zum anderen zeigen sie den nachhaltigen Einfluss der antiviralen Therapie auf die antigenspezifischen CD4 T-Zellen der Patienten. Die durch die Therapie ausgelösten Veränderungen im Bereich des erworbenen Immunsystems zeigen ihre Wirkung also innerhalb der ersten Wochen der Therapie und bleiben weit über das Ende der antiviralen Therapie bestehen.

Auch Barnes et al. konnten nach antiviraler Therapie keinen signifikanten Unterschied bezüglich der T-Zell-Zytokinproduktion zwischen SR und NR feststellen [92].

Kamal et al. stellten während der antiviralen Therapie mit Peginterferon- α und Ribavirin eine Zunahme der Proliferationskapazität und der Interferon- γ -Produktion der antigenspezifischen CD4 T-Zellen fest. Hierbei zeigten SR deutlich höhere Werte als NR. [93].

Nach antiviraler Therapie fanden Kamal et al. dagegen im Vergleich zu CD4 T-Zellmessungen vor Therapie eine gesteigerte T-Zellantwort auf ein breiteres Spektrum hinsichtlich IFN- γ -Expression und Stimulationsindex, insbesondere bei SR. NR zeigten demgegenüber keine wesentlichen Reaktionen nach Inkubation mit HCV-Proteinen. Kamal et al. führten die Messungen der T-Zellantwort mittels Elispot durch. Es wurden 16 Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion nach Therapie mit Peginterferon- α und Ribavirin untersucht und damit deutlich weniger als in der hier vorliegenden Arbeit [93]. Zudem wurde bei Kamal et al. für die Ermittlung des Stimulationsindex eine fünftägige bzw. zur Elispotanalyse der Zytokinproduktion eine 48-stündige Inkubationsdauer mit den HCV-Antigenen durchgeführt, was möglicherweise zur Reaktion naiver T-Zellen führte.

Zuletzt sollte nochmals darauf hingewiesen werden, dass in der hier vorliegenden Arbeit die Anzahl der HCV-Proteine, auf die qualitativ positive Reaktionen beobachtet wurden, und nicht wie in vielen Studien die quantitative Höhe der Zytokinexpression gemessen und verglichen wurde.

5.5 Zytokinproduktion der CD4 T-Zellen und T-Zellerschöpfung

Die differenzierte Auswertung der verschiedenen T-Zellphänotypen zeigt insbesondere im Hinblick auf die Zytokinexpression von CD4 T-Zellen interessante Aspekte. Es werden zunächst die Aspekte der unspezifischen T-Zellstimulation diskutiert.

Vor Beginn der antiviralen Therapie sind signifikante Unterschiede nach SEB-Stimulation zwischen SR und NR/RL hinsichtlich der Akt+Zyt+ Antwort festzustellen. Aktivierte Zellen, die keine Zytokine produzieren (Akt+Zyt-), sind dagegen in beiden Gruppen zu nahezu gleichen Anteilen vorhanden. Die Ergebnisse können als ein Problem der CD4 T-Zellen von NR/RL interpretiert werden, nach Aktivierung eine adäquate Zytokinproduktion zu induzieren bzw. aufrecht zu erhalten.

Während der antiviralen Therapie kann das T-Zell Zytokinexpressionsdefizit auf Seiten der NR/RL weitgehend ausgeglichen werden, das Aktivierungsniveau der SR lag dagegen während der antiviralen Therapie kaum höher als vor Therapie.

Nach der Therapie (Kohorte 2) wurde bei NR und RL nach SEB-Stimulation immer noch ein ähnlich hohes Aktivierungsniveau gefunden wie unter der Therapie. Bei SR steigerte sich der Anteil Akt+Zyt+ Zellen nach vollendeter antiviraler Therapie nochmals. Es könnte hier eine

Korrelation zwischen dem maximal möglichen unspezifischen Stimulationsniveau des Akt+Zyt+ Phänotyps und dem Therapieansprechen vorliegen. Wie bereits angesprochen, führt evtl. auch die Elimination des Virus aus dem Blut zu einer Verbesserung der Zytokinproduktion. Wichtig ist auch nochmal der Hinweis, dass anhand der Ergebnisse nach SEB-Stimulation nicht ohne Weiteres Rückschlüsse auf die HCV-spezifische Immunantwort gezogen werden können.

Hier ist bezüglich der stärkeren Immunantwort der Responder auf die Stimulation mit SEB besonders die Art der T-Zellaktivierung bzw. Stimulation zu beachten. Als Superantigen stimuliert SEB die T-Zellen über eine sequentielle Bindung an den MHC-II Komplex (α -Kette) sowie an die variable Region der β -Kette des T-Zellrezeptors ($V\beta$). Bei SEB sind die Hauptbindungsziele an der $V\beta$ -Kette 1.1, 3.2, 6.4, 15.1. Hierdurch wird durch SEB nur ein bestimmtes T-Zellrepertoire bei jedem Patienten stimuliert, man geht davon aus, dass durch ein Superantigen max. ca. 20% der T-Zellpopulation stimuliert werden kann. Die Aktivierung der T-Zellen läuft demnach über einen von der antigenspezifischen T-Zellaktivierung zu unterscheidenden Weg. Eine genaue Untersuchung der $V\beta$ Ketten wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Dass die gemessenen Unterschiede in der T-Zellaktivität nach SEB-Stimulation durch verschiedene $V\beta$ -Ketten der Patienten, und damit genetisch bedingt sind, kann demnach nicht ausgeschlossen werden [108, 112].

Die gemessenen Ergebnisse können demnach auf zwei Weisen interpretiert werden. Erstens kann tatsächlich eine unterschiedliche Immunantwort auf den gleichen Stimulus (SEB) aufgrund einer vorliegenden verminderten Erregbarkeit der T-Zellen von Nonrespondern vorliegen. Zweitens könnten bei Respondern und Nonrespondern unterschiedliche $V\beta$ -Repertoire vorliegen. In Anbetracht der Tatsache dass MHC-II Allele mit der Ausheilung der Hepatitis C assoziiert sind [113] und die chronische Hepatitis C Virusinfektion das Spektrum der von den CD4 T-Zellen verwendeten $V\beta$ -Ketten ändert gibt dem zweiten Punkt besondere Bedeutung [114].

Dem insgesamt gestiegenen Anteil Akt+Zyt+ Zellen nach unspezifischer SEB-Stimulation nach Interferon- γ /Ribavirin Behandlung steht ein schmaleres Spektrum bzw. ein niedrigerer Anteil der Akt+Zyt+ Zellantwort nach spezifischer HCV-Proteinstimulation gegenüber.

Ein Verlust oder die Umverteilung antigenspezifischer CD4-Zellen könnte eine mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse sein. Allerdings würde diese Vermutung hauptsächlich die Ergebnisse bei NR/RL erklären. Hier kam es zu einer Einengung des erkannten Proteinspektrums im Akt+Zyt+ und Akt+Zyt- Bereich. SR reagierten zwar auch auf eine geringere Anzahl von HCV-Proteinen mit Akt+Zyt+ Reaktionen, jedoch reagierten sie auf ein größeres Spektrum mittels Akt+Zyt- Reaktionen (Tabelle 12, 15). Dieser Befund spricht gegen einen Verlust von

antigenspezifischen CD4 T-Zellen bei SR im Rahmen der HCV-Therapie und für eine Reduktion der Zytokinproduktion. Barnes et al. zeigten zudem bei Patienten während der antiviralen Therapie eine Zunahme der Proliferation antigenspezifischer CD4 T-Zellen ohne jedoch dabei zwischen verschiedenen Therapieverläufen zu differenzieren [92].

In Bezug auf die häufig diskutierte T-Zellerschöpfung müsste es unter Berücksichtigung der Ergebnisse nach SEB-Stimulation zur selektiven Erschöpfung und verminderten Zytokinproduktion von T-Zellen gekommen sein, die gegen die HCV-Proteine gerichtet sind.

Eine ähnliche Entdeckung beschrieben Ulsenheimer et al. Sie fanden bei Untersuchungen von CD4 T-Zellen im akuten Stadium der Hepatitis C Virusinfektion eine spontane Ausheilung bei Patienten mit starker T-Zellantwort und Interferon- γ -Produktion, während bei Patienten mit fehlerhafter bzw. unzureichender Interferonproduktion ein Fortschreiten ins chronische Stadium beobachtet wurde. Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion ließen sich zwar antigenspezifische Zellen mit Expression von CD25, einem Aktivierungsmarker, nachweisen, jedoch ohne gleichzeitige IFN- γ -Expression. Bei Chronifizierung der akuten Hepatitis C Virusinfektion konnte der Übergang von aktivierten CD4 T-Zellen in ein anerges Stadium sowie der Verlust der Teilungsfähigkeit mit späterem Abfall der Zytokinproduktion beobachtet werden. Letzteres wurde als T-Zellerschöpfung bezeichnet [88].

Semmo et al. zeigten ebenfalls bei Patienten mit chronischer Hepatitis C eine nicht nachweisbare oder stimulierbare Interferon- γ Expression von HCV-antigenspezifischen CD4 T-Zellen bei erhaltener Proliferationskapazität und gemessener Aktivierungsmarkerexpression [86].

In einer Studie von Barnes et al. wurde gleichfalls eine fehlende Interferon- γ -Produktion von proliferierenden T-Zellen festgestellt [92]. Weiterhin beobachteten sie eine im fortgeschrittenen Therapieverlauf unabhängig vom Therapieergebnis eintretende Steigerung der antigenspezifischen Immunantwort. Demgegenüber sprechen unsere Ergebnisse für eine anhaltend schwache Immunantwort auch nach Therapieende.

Unsere Ergebnisse decken sich zudem mit den in mehreren Studien an Patienten mit chronischer oder chronifizierender akuter Hepatitis C Virusinfektion gemessenen schwachen Zytokinantworten von CD4 T-Zellen, wobei teilweise eine selektive Störung der Zytokinsekretion von HCV-spezifischen CD4 T-Zellen nachgewiesen wurde [80, 90].

In einigen Studien wurde auch das Spektrum von durch CD4 T-Zellen erkannten HCV-Antigenen untersucht. Dabei wurde bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion ein deutlich eingeengtes Spektrum gegenüber Patienten mit spontan ausgeheilter Hepatitis C Virusinfektion beobachtet [89, 90]. Bei Day et al. erkannten Patienten mit chronischer Hepatitis

C nur ein Epitop aus dem HCV-Protein NS5. In der Studie wurden allerdings nur 8 Patienten ohne Zusammenhang mit einer antiviralen Therapie untersucht.

Der Abfall der Zytokinexpression nach begonnener Therapie könnte also im Rahmen der T-Zellerschöpfung evtl. mit einer durch die chronische Infektion bedingten Dauerstimulation erklärt werden. Hierbei scheint auch eine insbesondere in den ersten Wochen der Interferontherapie eintretende zusätzliche Erschöpfung der T-Zellen stattzufinden.

Möglicherweise ist deshalb auch der weitgehende Viruslastabfall innerhalb dieser Zeit bestimmend für den Erfolg der Therapie. Tang et al. fanden in einer Studie bei Patienten mit schnellerem Viruslastabfall stärkere CD4 T-Zellantworten und dauerhafte Viruselimination (SR) [111].

Gegen die Hypothese der T-Zellerschöpfung spricht, dass sinkende HCV-RNA Titer eher eine Erholung der Zytokinproduktion nach sich ziehen sollten. Die Messungen in Kohorte 2 zeigten bei SR gegenüber NR und RL und auch gegenüber den Ergebnissen während der antiviralen Therapie in Kohorte 1 dagegen keine stärkere Zytokinproduktion nach antigenspezifischer Stimulation durch HVC-Proteine.

Anstelle der T-Zellerschöpfung wird auch eine eintretende bzw. eingetretene Anergie der T-Zellen diskutiert [88]. Da während der antiviralen Therapie eine höhere Aktivierungsmarkerexpression bei SR festgestellt wurde, würde dieser Punkt wiederum nur auf die Gruppe der NR/RL zutreffen.

Als mögliche Ursache der insgesamt unter antiviraler Therapie steigenden unspezifischen Immunantwort bei scheinbar sinkender Stimulierbarkeit spezifischer T-Zellen sollte auch eine therapiebedingte Umverteilung der T-Zellen diskutiert werden. Day et al. wiesen bei Patienten mit spontan ausgeheilter Hepatitis C Virusinfektion HCV-spezifische T-Gedächtniszellen mit einem CCR7+CD45RA-CD27+ Phänotyp nach, also T-Zellen die sich auch in sekundären lymphatischen Organen aufhalten [83]. Möglicherweise sammeln sich CCR7- CD4 T-Zellen in der Leber an. Eine antivirale Therapie mit Interferon- α könnte zu einem Wechsel zu einem CCR7- Phänotypen und einer Migration HCV-spezifischer CD4 T-Zellen beitragen. Hierzu passen die von uns gemessenen niedrigen Immunantworten nach Therapie sowie die Tatsache, dass CD4 T-Zellen aus dem peripheren Blut von therapieerfahrenen Patienten weniger HCV-Proteine Akt+Zyt+ erkennen als von therapie-naive Patienten.

Day et al. konnten nach erfolgreicher Viruselimination im Verlauf der Zeit eine abnehmende virusspezifische T-Zellpopulation feststellen. Passend hierzu werden nach Beginn der Therapie in unserer Studie weniger HCV-Proteine durch Akt+Zyt+ CD4 T-Zellen erkannt. Lediglich bei SR ist bei Akt+Zyt- T-Zellen eine Steigerung zu beobachten. Hier wäre eine Messung des CCR7-Phänotyps und damit eine Korrelation zum Therapieansprechen interessant gewesen.

Semmo et al. wiesen bei Patienten mit chronischer HCV unabhängig von einer antiviralen Therapie in der Leber vermehrt antigenspezifische CD4 T-Zellen mit erhaltener Zytokinexpressionsfähigkeit nach. Im Vergleich hierzu zeigte sich im peripheren Blut eine niedrigere Anzahl von HCV-spezifischen T-Zellen und keine nachweisbare Zytokinexpression [86]. Die Migrationshypothese liefert aber keine Erklärung dafür, warum bei SR keine adäquate Zytokinsekretion trotz vermehrt vorhandenen aktivierungsmarkerpositiven CD4 T-Zellen gemessen werden kann.

Zusammenfassend könnten unsere Ergebnisse folgendermaßen interpretiert werden:

Das generell schwache Niveau der Zytokinproduktion von aktivierten antigenspezifischen CD4 T-Zellen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion nimmt während der antiviralen Therapie weiter ab und steht im Gegensatz zu einer erhaltenen oder sogar gesteigerten Aktivierungsmarkerexpression der HCV-spezifischen CD4 T-Zellen. Die abgeschwächte und auf wenige HCV-Proteine gerichtete CD4 T-Zell Zytokinantwort lässt sich auch noch mehrere Monate nach Beendigung der Therapie nachweisen.

Das maximale Niveau von Aktivierungsmarkerexpression und Zytokinsekretion nach unspezifischer Immunstimulation steigt unter der Therapie dagegen an. Insbesondere bei SR ist es nach der Therapie nochmals gesteigert und liegt höher als bei den anderen Verlaufsgruppen und therapienaiven Patienten.

T-Zellerschöpfung bzw. Anergie oder auch eine evtl. Umverteilung von antigenspezifischen CD4 T-Zellen in die Leber liefern Erklärungsansätze für die abnehmende HCV-spezifische T-Zellimmunantwort.

5.6 Hemmender Einfluss des HCV auf das Immunsystem

Semmo et al. konnten nach Antigenstimulation durch die HCV-Proteine NS3-5 bei Patienten mit Nachweis von HCV-RNA eine schwächere Interferon- γ Produktion durch antigenspezifische CD4 T-Zellen im Blut nachweisen als bei Patienten ohne Nachweis von HCV-RNA [90].

Mit der daraus abgeleiteten Vermutung, HCV-RNA könnte einen hemmenden Einfluss auf das Immunsystem haben, lassen sich am ehesten die Ergebnisse aus Kohorte 2 nach unspezifischer

Immunstimulation mit SEB (SR vs. NR/RL) vereinbaren. HCV-RNA hätte demnach einen antigenunspezifischen immunmodulierenden Einfluss auf das Immunsystem. Semmo et al. konnten jedoch keine generelle Beeinflussung des Immunsystems durch HCV-RNA in Versuchen mit CMV- und tetanustoxinspezifischen CD4 T-Zellreaktionen nachweisen [86, 90]. Zusätzlich spricht der ebenfalls signifikante Unterschied hinsichtlich der Reaktion auf SEB-Stimulation vor Therapie zwischen späteren SR, die eine stärkere Akt+Zyt+ T-Zellreaktion zeigten, und NR/RL (Kohorte 1) gegen einen Zusammenhang von T-Zellreaktivität und Höhe der HCV-RNA, zumal die SR (5.3 Mio IU/ml) zu Therapiebeginn eine höhere Viruslast vorweisen konnten als NR/RL (3.9 Mio IU/ml).

Anders als bei Semmo et al. konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine selektive Hemmung antigenspezifischer CD4 T-Zellen weder in Kohorte 1 noch 2 nachgewiesen werden.

Das von Semmo et al. festgestellte breitere Spektrum erkannter HCV-Antigene bei HCV-RNA negativen Patienten konnte in unseren Untersuchungen ebenfalls nicht nachvollzogen werden. Nur ein kleiner Teil virusfreier Patienten erkannte das Core-Protein, das bei Semmo et al. von der Mehrheit HCV-RNA negativer Patienten erkannt wurde. HCV-RNA positive Patienten erkannten das Core-Protein dagegen häufiger. Vor Therapie war es das am häufigsten mittels zytokinpositiven Reaktionen (Akt+Zyt+) erkannte HCV-Protein. Der Unterschied zu den Ergebnissen von Semmo et al. liegt am ehesten in den verschiedenen Vergleichsgruppen sowie der detaillierten Auswertung dieser Arbeit. Bei Semmo et al. bestand die HCV-RNA negative Gruppe aus Patienten mit spontan ausgeheilter akuter Hepatitis C. Diese Patienten zeigen bekannterweise höhere CD4 T-Zellansprechraten auf HCV-Proteine im Vergleich zu Patienten mit chronischer HCV. Zudem wurde bei Semmo et al. 2005 auf die gleichzeitige Auswertung einer Aktivierungsmarkerexpression verzichtet, während in unserer Arbeit die kombinierte Expression von Aktivierungsmarker und Zytokin durch T-Zellen ausgewertet wurde. Der Vergleich zu den Ergebnissen der 2010 von Semmo et al. publizierten Daten deckt sich dagegen mit unseren Ergebnissen soweit, dass bei CD4 T-Zellen von Patienten mit chronischer Hepatitis C eine Diskrepanz zwischen geringer HCV-antigenstimulierter Interferonproduktion bei vorhandener Aktivierungsmarkerexpression besteht. Dieser Fakt spricht gegen den hemmenden Einfluss von HCV-RNA auf die CD4 T-Zellimmunantwort.

Ein rein selektiver Einfluss des Virus auf die Zytokinproduktion von antigenspezifischen T-Zellen mit dem Ergebnis einer fehlerhaften bzw. fehlenden Zytokinproduktion ist ebenfalls kritisch zu sehen, da in diesem Fall nach Viruselimination zumindest bei SR eine Besserung der Zytokinproduktion zu erwarten wäre, welche sich in Kohorte 2 jedoch nicht beobachten ließ.

5.7 Bedeutung unterschiedlicher Aktivierungsmarker

Nachdem anfangs noch mit dem Aktivierungsmarker CD69 gearbeitet wurde, verwendeten wir aufgrund der Ergebnisse der Studie von Frensch et al. später den Aktivierungsmarker CD154, der - wie oben beschrieben - Vorteile gegenüber CD69 aufweist [46].

Da bis zum Zeitpunkt des Beginns der Versuchsdurchführung für diese Arbeit noch keine Daten von CD4 T-Zellimmunantworten bei Patienten mit HCV publiziert wurden, war die Verwendung von CD154 zusätzlich wissenschaftlich interessant. Eine zwischenzeitlich veröffentlichte Arbeit von Semmo et al. unter Verwendung von CD154 zeigt mittlerweile bereits erste Ergebnisse nach Antigenstimulation bei Patienten mit spontan ausgeheilter HCV im Vergleich zu Patienten mit chronischer Hepatitis C. Die Methode unter Verwendung von CD154 wird hierbei als valide und zuverlässig befunden und deckt sich mit unserer Einschätzung sowie teilweise mit unseren Ergebnissen [86]. Eine Auswertung von Patienten im Therapieverlauf wurde in der von uns vorgelegten Arbeit erstmalig durchgeführt.

Es wurden jeweils Auswertungen der Gesamtkohorte und der Subgruppe CD154-gefärbter Proben durchgeführt. Insbesondere aufgrund unserer differenzierten Auswertung mit Berücksichtigung des Akt+Zyt- Phänotyps war dieser Schritt sinnvoll. Demgegenüber stand die Tatsache, dass in den Gesamtkohorten 1 und 2 jeweils 8 Patienten mit CD69-Färbung enthalten waren und die Gruppengröße der Subgruppe sich somit um $n=8$ zu Lasten der statistischen Aussagekraft verringerte.

Insgesamt sind die Ergebnisse von Gesamtkohorte und CD154-Auswertungen gut miteinander vereinbar. Vor Therapie zeigen die Auswertungen der CD154-gefärbten Subgruppe in Kohorte 1 insbesondere hinsichtlich Akt+Zyt- Ereignisse statistisch signifikante Unterschiede. Gerade bei Betrachtung dieses Reaktionstyps sollte den Auswertungen der CD154-Patienten aufgrund der höheren Antigenpezifität und geringeren Störanfälligkeit besondere Beachtung zuteil werden. Bei den Messungen während der antiviralen Therapie (Messung 2) zeigen die Ergebnisse der Gesamtkohorte und der CD154-gefärbten Subgruppe keine nennenswerten Unterschiede.

Ähnlich verhält es sich auch beim Vergleich der Ergebnisse in Kohorte 2. Die größten Unterschiede zwischen Gesamtkohorte und Subgruppe ergeben sich hier ebenfalls im Akt+Zyt-Bereich, auf das grundsätzliche Ergebnis der Auswertungen hatte die Auswahl der Subgruppe aber keinen Einfluss.

5.8 Einfluss des HCV-Genotyps

Da mehrere Studien zur CD4 T-Zellantwort bei der Hepatitis C Virusinfektion ihre Untersuchungen ausschließlich oder überwiegend an Patienten mit einer Genotyp 1 HCV-

Infektion durchgeführt haben [92-94, 111], wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse eine Subgruppenanalyse mit allen Genotyp 1 infizierten Patienten durchgeführt. Zusätzlich sollte so ein selektives Ansprechen Genotyp 1 infizierter Patienten auf die rekombinanten Proteine im Gegensatz zu den Patienten mit anderen HCV-Genotypen untersucht werden.

Ein weiteres Argument zur Durchführung der Subgruppenanalyse war die mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die HCV-Proteine, die laut Herstellerinformation ursprünglich aus dem HCV-Genotyp 1 isoliert wurden. Dabei wäre aber gerade in der Genotyp 1-Subgruppe eine vermehrte Reaktion erwartet worden. Unsere Ergebnisse lassen keine Beeinflussung in dieser Weise vermuten. Zusätzlich sind laut dem Hersteller Mikrogen die HCV-Proteine für alle in der Arbeit vorkommenden Genotypen in gleicher Weise anwendbar, da eine hohe Grenzreaktivität vorliegt. In anderen vergleichbaren Studien wurden ebenfalls rekombinante Proteine der gleichen Art und Firma verwendet [91].

Die Subgruppenanalyse der Patienten mit Genotyp 1 erbrachte in den meisten Auswertungen keine signifikanten Ergebnisse, hierzu hat wahrscheinlich insbesondere in Kohorte 1 mit n=16 die geringe Fallzahl beigetragen. Auch in Kohorte 2 wirkt sich die geringere Größe der Subgruppe (n=44) natürlich negativ auf die statistische Aussagekraft aus. Dieser Einfluss kann z. B. gut anhand der Auswertung Akt+Zyt+ Ereignisse beim Vergleich der Mittelwerte therapienaiver und therapieerfahrener Patienten in der Gesamtkohorte 2 (Tabelle 20) und der dazugehörigen Subgruppenanalyse der Genotyp 1 Patienten (Tabelle 22) gezeigt werden. In der Gesamtkohorte wurden Mittelwerte von 0.72 (Naive) und 0.20 (Andere) verglichen und ein p-Wert von 0.051 berechnet, bei den Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 ergab sich bei Mittelwerten im gleichen Bereich (0.80 vs. 0.20) ein p-Wert von 0.120. Trotz des Verfehlens des Signifikanzniveaus zeigen jedoch die Untersuchungen in dieser Subgruppe die gleichen numerischen Unterschiede wie die Gesamtkohorte und unterstützen damit die Ergebnisse.

5.9 Antigenpezifität der CD4 T-Zellen

Die Messungen vor Beginn der Interferontherapie (HCV-positive Patienten) zeigten die häufigste zytokinpositive Reaktion (Akt+Zyt+) auf das Core-Antigen und decken sich damit mit früher durchgeführten Studien [90-93].

Während vor Therapiebeginn noch mehrere Responder und Nonresponder/Relapser auf NS-Proteine wie z.B. NS5-4 und NS3 mit einer Akt+Zyt+ CD4 T-Zellantwort reagierten, kam es unter der Therapie in beiden Gruppen nur noch nach Inkubation mit dem Core-Protein zu einer signifikanten Akt+Zyt+ Reaktion.

Die bei Semmo et al. beschriebene höhere Diversivität der T-Zellantwort auf die verschiedenen HCV-Antigene bei HCV-RNA negativen Patienten konnte in unseren Untersuchungen dagegen nicht nachvollzogen werden [90]. In Kohorte 2 reagierte nur ein kleiner Teil der SR (6.3%) auf das Core-Protein Akt+Zyt+, wohingegen bei Semmo et al. die Mehrheit der Patienten eine positive Reaktion zeigte. NR (18.8%) und RL (10.5%) aus Kohorte 2 erkannten das Core-Protein dagegen häufiger.

In einigen Studien, so auch in denen von Semmo et al. 2005 und 2010, wurde ein Vergleich zwischen Patienten mit spontan ausgeheilter Hepatitis C Virusinfektion (HCV-RNA-negativ) und Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion angestellt. Es ist bekannt, dass bei Patienten mit spontan ausgeheilter Hepatitis C Virusinfektion intensivere CD4 T-Zellantworten gemessen werden können. Die hier vorliegenden Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion.

Wie schon erwähnt wurde in anderen Studien meist auch nicht die Auswertung von CD4 T-Zellen mit gleichzeitiger Aktivierungsmarkerexpression (Akt+Zyt+), sondern isoliert die Zytokinexpression (Zyt+) oder ggf. die Zytokinexpression mit Koexpression eines weiteren Markers verwendet (bei Semmo et al. 2005 z.B. IL-2).

Das Akt+Zyt- Reaktionsmuster wurde vor Therapie vor allem in der Gruppe der NR/RL auf verschiedene HCV-Antigene gezeigt. Die späteren NR/RL zeigten hierbei eine häufigere Reaktion als SR. Am häufigsten wurde das Core-, NS4- und NS5-4-Protein erkannt.

Unter der Therapie zeigte sich im Gegensatz zum Akt+Zyt+ Reaktionsmuster weiterhin ein Akt+Zyt- Ansprechen bei SR und NR/RL, wobei hier nun tatsächlich SR eine deutlich frequentere und gleichzeitig breite CD4 T-Zellantwort auf die HCV-Proteine zeigten als NR/RL, bei denen ein Rückgang der Ansprechrate im Vergleich zum Therapiebeginn zu verzeichnen war. Auf das Core-Protein wurde auch während der Therapie in beiden Gruppen am häufigsten Akt+Zyt- reagiert.

Semmo et al. veröffentlichten 2010 hierzu passende Daten, wonach bei Patienten mit chronischer Hepatitis C nach Antigenstimulation mit einem Gemisch aus den HCV-Antigenen NS3, NS4 und NS5 die CD4 T-Zellantwort eine signifikante CD154-Expression bei fehlender Interferon- γ Expression zeigte. Die HCV-Antigene wurden dabei nicht einzeln gemessen, dazu erfolgten die Messungen auch nicht im Therapieverlauf.

In Kohorte 2 reagierten in allen Gruppen nur vereinzelt Patienten auf die HCV-Proteine mit einer Zytokinproduktion. Die in Kohorte 1 während der Therapie festgestellte geringere Reaktionshäufigkeit nach Inkubation mit den verschiedenen NS-Proteinen war noch immer nachzuvollziehen.

Hinsichtlich Akt+Zyt- Reaktionen zeigten SR solidere Ergebnisse als die anderen Verlaufsgruppen, wenn auch nicht so häufig wie unter Therapie.

Zusammenfassend kam es unter dem Einfluss der antiviralen HCV-Therapie bezüglich des Akt+Zyt+ Reaktionsmusters zu einer Einengung der Immunreaktion auf das HCV-Core-Protein, während die antigenspezifische Aktivierung von CD4-Zellen ohne Zytokinproduktion nach HCV-Proteinstimulation bei SR häufiger und NR/RL seltener auftrat. Die unter Therapie beobachteten Ergebnisse ließen sich auch noch nach beendeter antiviraler Therapie in abgeschwächter Form nachweisen.

5.10 Bewertung der eigenen Studie

Ein anzusprechender und kritisch zu sehender Punkt ist die Größe der Kohorten. Die Gesamtgröße der Kohorten mit $n=28$ (Kohorte 1) und $n=80$ (Kohorte 2) lag zwar im Vergleich zu anderen Studien in einem vergleichbaren oder sogar überdurchschnittlichen Bereich [86, 88, 89, 93, 94], durch Gruppierung und Auswertung der Kohorten entsprechend des Therapieergebnisses entstanden jedoch teilweise recht kleine Untergruppen, so dass bestimmte Therapieverläufe sinnvoll zusammengefasst wurden (z.B. NR und RL). Der unterdurchschnittliche Anteil an NR und RL ($n=8$ entsprechend 28.6%) in Kohorte 1 konnte nicht vorhergesehen werden und war für die späteren statistischen Berechnungen sicher nicht von Vorteil.

Durch ähnliche Ergebnisse anderer Studien, vor allem der von Burton Jr. et al., werden die von uns für Kohorte 1 beschriebenen Sachverhalte jedoch gestützt und verleihen unseren Daten so zusätzliche Bedeutung [94]. Besonders zu erwähnen ist dabei, dass unsere durchflusszytometrischen Messungen mit den per Elispot-Technik erhobenen Ergebnissen von Burton et al. in der Tendenz weitgehend übereinstimmen. Somit scheint das von uns benutzte durchflusszytometrische Verfahren auch für die T-Zellmessung im Stadium der chronischen Hepatitis C Virusinfektion geeignet zu sein. Auch andere Studien kamen in Teilen zu den gleichen Ergebnissen wie wir, z. B. im Ansprechverhalten auf die einzelnen HCV-Proteine oder dem schmaleren Spektrum erkannter Antigene bei chronischer Hepatitis C Virusinfektion [89,

90] oder auch in Bezug auf die Verwendbarkeit der angewandten Methode bzw. des verwendeten Aktivierungsmarkers [86].

Die hier angewandte Durchflusszytometrie bietet für die Analyse der kombinierten Expression verschiedener Marker Vorteile gegenüber der Elispot-Technik.

So wurde hier die detaillierte Auswertung verschiedener Phänotypen möglich, die unter anderem bei der Diskussion zur T-Zellerschöpfung zusätzliche nützliche Informationen erbracht hat.

Im Rahmen einer Hepatitis C Infektion aufgetretene Veränderungen des Virusgenoms [70] oder auch genetische Wirtsfaktoren mit Einfluss auf die T-Zellantwort oder Therapieansprechen [99] wurden in unserer Studie nicht untersucht und können als Ansatzpunkte für künftige Studien dienen.

6 Zusammenfassung

Über 80% der akuten Infektionen mit dem Hepatitis C Virus zeigen einen chronischen Verlauf. Die Standardtherapie der chronischen Hepatitis C Virusinfektion mit Peg-Interferon- α und Ribavirin führt je nach HCV-Genotyp in ca. 50-80% der Patienten zur dauerhaften Viruselimination. Die genauen Gründe für Erfolg bzw. Versagen der Therapie sind nicht vollständig bekannt. Die CD4 T-Zellfunktion scheint hierbei für die dauerhafte Viruselimination entscheidend zu sein. Diesbezügliche Untersuchungen weisen jedoch bisher generell schwache Immunreaktionen der T-Zellen mit teilweise uneinheitlichen Ergebnissen auf.

In der hier durchgeführten Studie wurde die CD4 T-Zellfunktion von Patienten mit chronischer HCV im Therapieverlauf in zwei Kohorten untersucht. In Kohorte eins wurden 28 Patienten zu Beginn sowie 8-13 Wochen nach Therapiebeginn, in Kohorte zwei 51 Patienten nach beendeter Therapie sowie 29 therapienaive Patienten untersucht. Die T-Zellfunktion wurde dabei nach Antigenstimulation mit den HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5-4 und NS5-12 sowie mit SEB anhand der Aktivierungsmarker- und einer evtl. gleichzeitig vorhandenen TH1 Zytokinexpression durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurde neben CD69 als bewährter Aktivierungsmarker erstmalig die CD154-Expression durch CD4 T-Zellen im Therapieverlauf der chronischen Hepatitis C untersucht. Die Daten wurden mit dem Therapieansprechen korreliert.

Bei der Auswertung der zytokinexprimierenden CD4 T-Zellen zeigte sich nach HCV-Antigenstimulation vor und während der Therapie kein signifikanter Unterschied im Spektrum der erkannten HCV-Proteine zwischen SR und RL/NR. Insgesamt konnte unter der Therapie seltener eine Zytokinexpression der CD4 T-Zellen induziert werden. Die niedrige Zytokinexpressionsrate nach HCV-Antigeninkubation hielt auch nach beendeter Therapie unabhängig vom Therapieergebnis an.

Demgegenüber reagierten spätere SR während der Therapie auf mehr HCV-Proteine mit einer Aktivierungsmarkerexpression als vor der Therapie, während spätere NR/RL auf weniger HCV-Proteine reagierten. Diese gegensätzliche Veränderung war mit $p=0.044$ statistisch signifikant. Nach Therapieende verloren sich die Unterschiede wieder.

Insgesamt reagierten CD4 T-Zellen von therapieerfahrenen Patienten auf weniger HCV-Proteine mit einer Zytokinproduktion als CD4 T-Zellen von therapienaiven Patienten ($p=0.051$).

Bei der unspezifischen T-Zellstimulation mit SEB zeigte vor Therapiebeginn ein signifikant höherer Anteil an CD4 T-Zellen von SR eine gleichzeitige Aktivierungsmarker- und Zytokinexpression als bei NR/RL ($p=0.046$). Während der Therapie zeigte sich kein

Unterschied, wogegen nach beendeter antiviraler Therapie erneut CD4 T-Zellen von NR/RL signifikant weniger Zytokin nach SEB-Stimulation exprimierten als SR ($p=0.028$). Bezüglich der reinen Aktivierungsmarkerexpression ergab sich nach SEB-Stimulation zu keinem Therapiezeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang mit dem Therapieergebnis.

Unsere Versuche haben gezeigt, dass sich CD154 als Aktivierungsmarker zur Messung der CD4 T-Zellimmunantwort bei Patienten mit chronischer Hepatitis C eignet und die Verwendung gegenüber CD69 für zukünftige Studien von Vorteil sein könnte.

Durch die detaillierte Auswertung der verschiedenen T-Zellphänotypen deuten unsere Ergebnisse nach HCV-Antigenstimulation insbesondere auf ein Problem der Zytokinproduktion von CD4 T-Zellen chronisch HCV-infizierter Patienten hin. Ein Erklärungsansatz bietet die im Rahmen der chronischen Hepatitis C schon mehrfach diskutierte T-Zellerschöpfung bzw. Anergie, möglicherweise durch eine dauerhafte Aktivierung antigenspezifischer CD4 T-Zellen ausgelöst. Auch eine CD4 T-Zellmigration z.B. in die Leber im Rahmen der antiviralen Therapie ist insbesondere in Zusammenschau mit bereits veröffentlichten Studien zu diskutieren.

Eine unter der Therapie steigende Anzahl mittels Aktivierungsmarkerexpression erkannter HCV-Antigene ist im Gegensatz zu einer sinkenden Anzahl erkannter HCV-Antigene ein Hinweis auf ein positives Therapieergebnis.

Die Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen SR und NR/RL nach unspezifischer T-Zellstimulation mit SEB könnten durch genetische Unterschiede bzw. auf eine HCV-induzierte V β -Kettenselektion bedingt sein. Der Zusammenhang mit dem späteren Therapieergebnis sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Für einen allgemein hemmenden Einfluss viraler RNA auf das Immunsystem liegen keine eindeutigen Hinweise vor.

7 Literaturverzeichnis

1. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
2. Dienstag, J.L. and H.J. Alter, *Non-A, non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective*. Semin Liver Dis, 1986. **6**(1): p. 67-81.
3. Prince, A.M., et al., *Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus*. Lancet, 1974. **2**(7875): p. 241-6.
4. Feinstone, S.M., et al., *Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B*. N Engl J Med, 1975. **292**(15): p. 767-70.
5. Brass, V., D. Moradpour, and H.E. Blum, *Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update*. Int J Med Sci, 2006. **3**(2): p. 29-34.
6. Schulze zur Wiesch, J., et al., *The proteins of the Hepatitis C virus: their features and interactions with intracellular protein phosphorylation*. Arch Virol, 2003. **148**(7): p. 1247-67.
7. Choo, Q.L., et al., *Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2451-5.
8. Dubuisson, J., et al., *Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6147-60.
9. Thimme, R., V. Lohmann, and F. Weber, *A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus*. Antiviral Res, 2006. **69**(3): p. 129-41.
10. Lohmann, V., et al., *Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8416-28.
11. Houghton, M., et al., *Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease*. Hepatology, 1991. **14**(2): p. 381-8.
12. Simmonds, P., et al., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 962-73.
13. Herold, G., *Innere Medizin*. 2008.
14. Davidson, F., et al., *Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region*. J Gen Virol, 1995. **76** (Pt 5): p. 1197-204.
15. Shepard, C.W., L. Finelli, and M.J. Alter, *Global epidemiology of hepatitis C virus infection*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(9): p. 558-67.
16. www.rki.de. *Situationsbericht 2007: Virushepatitis B, C und D* Epid Bull 46/08. 2008 [cited].
17. Esteban, J.I., S. Sauleda, and J. Quer, *The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe*. J Hepatol, 2008. **48**(1): p. 148-62.
18. Tong, M.J., et al., *Evaluation of sexual transmission in patients with chronic hepatitis C infection*. Clin Diagn Virol, 1995. **3**(1): p. 39-47.
19. Ohto, H., et al., *Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group*. N Engl J Med, 1994. **330**(11): p. 744-50.
20. Syriopoulou, V., et al., *Mother to child transmission of hepatitis C virus: rate of infection and risk factors*. Scand J Infect Dis, 2005. **37**(5): p. 350-3.
21. Pawlotsky, J.M., *Use and interpretation of virological tests for hepatitis C*. Hepatology, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S65-73.

22. Zeuzem, S., et al., *Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C*. J Viral Hepat, 2009. **16**(2): p. 75-90.
23. Farci, P., et al., *Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure*. N Engl J Med, 1996. **335**(9): p. 631-4.
24. Alter, H.J., *To C or not to C: these are the questions*. Blood, 1995. **85**(7): p. 1681-95.
25. *National Institutes of Health Consensus Development Conference statement Management of Hepatitis C: 2002 June 10-12, 2002*. HIV Clin Trials, 2003. **4**(1): p. 55-75.
26. Tong, M.J., et al., *Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C*. N Engl J Med, 1995. **332**(22): p. 1463-6.
27. Lauer, G.M. and B.D. Walker, *Hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2001. **345**(1): p. 41-52.
28. Manns, M.P., et al., *Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial*. Lancet, 2001. **358**(9286): p. 958-65.
29. Fried, M.W., et al., *Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2002. **347**(13): p. 975-82.
30. von Wagner, M., et al., *Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 522-7.
31. Hadziyannis, S.J., et al., *Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose*. Ann Intern Med, 2004. **140**(5): p. 346-55.
32. Chevaliez, S. and J.M. Pawlotsky, *Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2461-6.
33. Siebert, U., et al., *Cost effectiveness of peginterferon alpha-2b plus ribavirin versus interferon alpha-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C*. Gut, 2003. **52**(3): p. 425-32.
34. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M., *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 6th ed. 2005, New York: Garland Science.
35. Blattman, J.N., et al., *Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 657-64.
36. Ward, S.G., *CD28: a signalling perspective*. Biochem J, 1996. **318** (Pt 2): p. 361-77.
37. Zhang, Y.Q., et al., *B7-CD28 interaction is a late acting co-stimulatory signal for human T cell responses*. Int Immunol, 1997. **9**(8): p. 1095-102.
38. Bour-Jordan, H. and J.A. Blueston, *CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals*. J Clin Immunol, 2002. **22**(1): p. 1-7.
39. Gonzalo, J.A., et al., *Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 1-5.
40. Appleman, L.J., et al., *CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 144-51.
41. Blazevic, V., C.M. Trubey, and G.M. Shearer, *Analysis of the costimulatory requirements for generating human virus-specific in vitro T helper and effector responses*. J Clin Immunol, 2001. **21**(4): p. 293-302.
42. Nishioka, Y. and P.E. Lipsky, *The role of CD40-CD40 ligand interaction in human T cell-B cell collaboration*. J Immunol, 1994. **153**(3): p. 1027-36.
43. Lopez-Cabrera, M., et al., *Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-*

- type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors.* J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 537-47.
44. Nylander, S. and I. Kalies, *Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry.* J Immunol Methods, 1999. **224**(1-2): p. 69-76.
45. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation.* Immunol Rev, 1996. **153**: p. 85-106.
46. Frensch, M., et al., *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression.* Nat Med, 2005. **11**(10): p. 1118-24.
47. Schwartz, R.H., *T cell anergy.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 305-34.
48. Vanhove, B., et al., *Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody.* Blood, 2003. **102**(2): p. 564-70.
49. Andreasen, S.O., et al., *Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses.* J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3689-97.
50. Seder, R.A. and R. Ahmed, *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation.* Nat Immunol, 2003. **4**(9): p. 835-42.
51. Weninger, W., N. Manjunath, and U.H. von Andrian, *Migration and differentiation of CD8+ T cells.* Immunol Rev, 2002. **186**: p. 221-33.
52. London, C.A., M.P. Lodge, and A.K. Abbas, *Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells.* J Immunol, 2000. **164**(1): p. 265-72.
53. Ansel, K.M., D.U. Lee, and A. Rao, *An epigenetic view of helper T cell differentiation.* Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 616-23.
54. Holzer, U., et al., *Differential antigen sensitivity and costimulatory requirements in human Th1 and Th2 antigen-specific CD4+ cells with similar TCR avidity.* J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1218-23.
55. Shaw, G. and R. Kamen, *A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation.* Cell, 1986. **46**(5): p. 659-67.
56. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Cytokine-mediated control of viral infections.* Virology, 2000. **273**(2): p. 221-7.
57. Amel-Kashipaz, M.R., et al., *Quantitative and qualitative analysis of the balance between type 1 and type 2 cytokine-producing CD8(-) and CD8(+) T cells in systemic lupus erythematosus.* J Autoimmun, 2001. **17**(2): p. 155-63.
58. Santana, M.A. and Y. Rosenstein, *What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms.* J Cell Physiol, 2003. **195**(3): p. 392-401.
59. Prezzi, C., et al., *Virus-specific CD8(+) T cells with type 1 or type 2 cytokine profile are related to different disease activity in chronic hepatitis C virus infection.* Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 894-906.
60. Chang, J.T., B.M. Segal, and E.M. Shevach, *Role of costimulation in the induction of the IL-12/IL-12 receptor pathway and the development of autoimmunity.* J Immunol, 2000. **164**(1): p. 100-6.
61. Woodland, D.L. and R.W. Dutton, *Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells.* Curr Opin Immunol, 2003. **15**(3): p. 336-42.
62. Harty, J.T., A.R. Tvinnereim, and D.W. White, *CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 275-308.
63. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 361-70.
64. Smyth, M.J., et al., *Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins.* J Leukoc Biol, 2001. **70**(1): p. 18-29.

65. Kaech, S.M., et al., *Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation*. Cell, 2002. **111**(6): p. 837-51.
66. Rogers, P.R., C. Dubey, and S.L. Swain, *Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2338-46.
67. Hammarlund, E., et al., *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1131-7.
68. Black, F.L. and L. Rosen, *Patterns of measles antibodies in residents of Tahiti and their stability in the absence of re-exposure*. J Immunol, 1962. **88**: p. 725-31.
69. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
70. Farci, P., et al., *The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies*. Science, 2000. **288**(5464): p. 339-44.
71. Pestka, J.M., et al., *Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(14): p. 6025-30.
72. Farci, P., et al., *Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus*. Science, 1992. **258**(5079): p. 135-40.
73. Lai, M.E., et al., *Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children*. Lancet, 1994. **343**(8894): p. 388-90.
74. Cooper, S., et al., *Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus*. Immunity, 1999. **10**(4): p. 439-49.
75. Post, J.J., et al., *Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort*. J Infect Dis, 2004. **189**(10): p. 1846-55.
76. Thimme, R., et al., *Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine*. Biol Chem, 2008.
77. Shoukry, N.H., et al., *Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection*. J Exp Med, 2003. **197**(12): p. 1645-55.
78. Grakoui, A., et al., *HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help*. Science, 2003. **302**(5645): p. 659-62.
79. Kaplan, D.E., et al., *Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C*. Gastroenterology, 2007. **132**(2): p. 654-66.
80. Urbani, S., et al., *Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses*. Hepatology, 2006. **44**(1): p. 126-39.
81. Diepolder, H.M., et al., *Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection*. Lancet, 1995. **346**(8981): p. 1006-7.
82. Thimme, R., et al., *Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection*. J Exp Med, 2001. **194**(10): p. 1395-406.
83. Day, C.L., et al., *Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers*. J Clin Invest, 2003. **112**(6): p. 831-42.
84. Schulze zur Wiesch, J., et al., *Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3603-13.
85. Aberle, J.H., et al., *Prospective study of viral clearance and CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection*. J Clin Virol, 2006. **36**(1): p. 24-31.

86. Mueller, M., et al., *Virus-specific CD4+ T cell responses in chronic HCV infection in blood and liver identified by antigen-specific upregulation of CD154*. J Hepatol. **52**(6): p. 800-11.
87. Gerlach, J.T., et al., *Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C*. Gastroenterology, 1999. **117**(4): p. 933-41.
88. Ulsenheimer, A., et al., *Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1189-98.
89. Day, C.L., et al., *Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 12584-95.
90. Semmo, N., et al., *Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection*. Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1019-28.
91. Rosen, H.R., et al., *Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages*. Hepatology, 2002. **35**(1): p. 190-8.
92. Barnes, E., et al., *The dynamics of T-lymphocyte responses during combination therapy for chronic hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2002. **36**(3): p. 743-54.
93. Kamal, S.M., et al., *Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1070-83.
94. Burton, J.R., Jr., et al., *Prospective analysis of effector and regulatory CD4+ T cells in chronic HCV patients undergoing combination antiviral therapy*. J Hepatol, 2008. **49**(3): p. 329-38.
95. Neumann-Haefelin, C., et al., *Host and viral factors contributing to CD8+ T cell failure in hepatitis C virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(36): p. 4839-47.
96. Gruener, N.H., et al., *Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5550-8.
97. Cox, A.L., et al., *Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C*. Hepatology, 2005. **42**(1): p. 104-12.
98. Lauer, G.M., et al., *High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection*. Gastroenterology, 2004. **127**(3): p. 924-36.
99. Kau, A., J. Vermehren, and C. Sarrazin, *Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C*. J Hepatol, 2008. **49**(4): p. 634-51.
100. Mehta, B.A. and V.C. Maino, *Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4+ T lymphocytes by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1997. **208**(1): p. 49-59.
101. Arva, E. and B. Andersson, *Kinetics of cytokine release and expression of lymphocyte cell-surface activation markers after in vitro stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with Streptococcus pneumoniae*. Scand J Immunol, 1999. **49**(3): p. 237-43.
102. Linsley, P.S. and J.A. Ledbetter, *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 191-212.
103. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 116-26.
104. Picker, L.J., et al., *Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry*. Blood, 1995. **86**(4): p. 1408-19.
105. Suni, M.A., L.J. Picker, and V.C. Maino, *Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1998. **212**(1): p. 89-98.
106. Waldrop, S.L., et al., *Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency*. J Clin Invest, 1997. **99**(7): p. 1739-50.

107. Damle, N.K., et al., *Proliferation of human T lymphocytes induced with superantigens is not dependent on costimulation by the CD28 counter-receptor B7*. J Immunol, 1993. **150**(3): p. 726-35.
108. Proft, T. and J.D. Fraser, *Bacterial superantigens*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(3): p. 299-306.
109. Hudson, T.H. and F.G. Grillo, *Brefeldin-A enhancement of ricin A-chain immunotoxins and blockade of intact ricin, modeccin, and abrin*. J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18586-92.
110. Rehmann, B. and N.V. Naoumov, *Immunological techniques in viral hepatitis*. J Hepatol, 2007. **46**(3): p. 508-20.
111. Tang, K.H., et al., *Relationship between early HCV kinetics and T-cell reactivity in chronic hepatitis C genotype 1 during peginterferon and ribavirin therapy*. J Hepatol, 2005. **43**(5): p. 776-82.
112. Fraser, J.D. and T. Proft, *The bacterial superantigen and superantigen-like proteins*. Immunol Rev, 2008. **225**: p. 226-43.
113. Semmo, N. and P. Klenerman, *CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(36): p. 4831-8.
114. Woitas, R.P., et al., *Differential expansion of T-cell receptor variable beta subsets after antigenic stimulation in patients with different outcomes of hepatitis C infection*. Immunology, 2002. **106**(3): p. 419-27.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

8.2 Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden publiziert als Poster

Schott E, Möller JF, Wiedenmann B, Berg T. *Analysis of peripheral blood CD4 T-cell responses in patients with chronic HCV infection according to CD154 expression.* Hepatology 2008; 48: 757A.

und als Artikel

Möller JF, Möller B, Wiedenmann B, Berg T, Schott E. *CD154, a marker of antigen-specific stimulation of CD4 T cells, is associated with response to treatment in patients with chronic HCV infection.* Journal of Viral Hepatitis. Accepted for publication November 2010, in press.

8.3 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Jonas Florian Möller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Analyse der CD4 T-Zell Immunantwort gegen HCV-Proteine bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

8.4 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater PD Dr. Eckart Schott für die Überlassung des Themas und für die gute Betreuung. Trotz seines vollen Terminkalenders hat er jederzeit ein offenes Ohr für Probleme und Fragen in Zusammenhang mit dieser Arbeit gehabt.

Professor Thomas Berg danke ich für die Anregungen insbesondere zu Beginn der Arbeiten.

Großer Dank geht auch an die Sprechstunden- und Studienschwestern und an die ärztlichen Mitarbeiter der Lebersprechstunde der Charité-CVK sowie des Leberzentrums Checkpoint für ihre Hilfe bei der Rekrutierung von geeigneten Patienten.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Labor AG Hepatologie für ihre Anleitung bei den Laborversuchen.

Ich danke auch meiner gesamten Familie, allen voran meiner Freundin und meinen Eltern, für ihre Unterstützung und wiederholte Motivation. Besonderer Dank geht hierbei an meinen Vater Dr. Dr. Bernd Möller für seine fachliche Unterstützung und Beratung.