

**Regulation und funktionelle Bedeutung der zellulären und  
humoralen Immunantwort in der Pathogenese der  
chronischen Hepatitis C Virusinfektion**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften,,

am Fachbereich Biologie

der Johannes-Gutenberg-Universität

in Mainz

vorgelegt von

Gerd Hempel

geb. in Rüsselsheim

Mainz, im Mai 2001





---

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Virologie	1
1.2. Epidemiologie, Klinik und Diagnose der HCV-Infektion	2
1.3. Pathogenese und Immunologie der HCV-Infektion	4
1.4. Ziele dieser Arbeit	7
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1. Material	8
2.1.1. Laborgeräte	8
2.1.2. Verbrauchsmaterial	9
2.1.3. Zellkulturmedien und –Zusätze	9
2.1.4. Chemikalien	10
2.1.5. Kits	11
2.1.6. Antikörper	12
2.1.7. Zusammensetzung der Zellkulturmedien	12
2.1.8. Lösungen	13
2.2. Patienten	17
2.2.1. Patientenkollektiv	17
2.3. Methoden	19
2.3.1. HCV Virämie	19
2.3.2. Isolation von PBMC	19
2.3.2.1. Zellzahlbestimmung	20
2.3.2.2. Kryokonservierung von Zellen	20
2.3.3. Proliferationsassay	20
2.3.4. Zytokin-ELISA	21
2.3.5. HCV-Antikörper-ELISA	22
2.3.6. Separation von CD4, CD14 und CD56 positiven Zellen	23

---

2.3.7.	Quantitative Analyse von HCV-spezifischen T-Zellen durch intrazelluläre Zytokinfärbung	23
2.3.8.	Kopplung der Antigene auf die Affinitätschromatographiesäule	24
2.3.9.	Aufreinigen von HCV-Antikörpern	25
2.3.10.	Antikörperbindungsstudie	25
2.3.10.1.	Antikörperbindungsstudie mit Molt-4 Zellen	25
2.3.10.2.	Antikörperbindungsstudie mit UHCV-11 Zellen	26
2.3.11.	Analyse der Antikörper-vermittelten zytotoxischen Aktivität (ADCC)	26
2.3.11.1.	ADCC mit Daudi und Molt-4 Zellen	26
2.3.11.2.	ADCC mit UHCV-11 Zellen	27
2.3.12.	Komplement-vermittelte Lyse	27
2.3.13.	Statistische Auswertung	28
<b>III. Ergebnisse</b>		<b>29</b>
3.1.	HCV spezifische proliferative T-Zellantwort	29
3.2.	Zytokinsekretion von HCV stimulierten PBMC	31
3.3.	Nachweis intrazellulärer Zytokine mittels Durchflußzytometrie	37
3.4.	Quantitative Anti-HCV Antikörperanalyse und IgG Subklassenbestimmung	39
3.5.	Bindung von Anti-HCV Antikörper an Zielzellen	41
3.5.1.	Bindung von Anti-HCV Antikörpern an UHCV-11 Zellen	41
3.5.2.	Bindung von Anti-HCV Antikörpern an Molt-4 Zellen	42
3.6.	Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) vermittelt durch Anti-HCV Antikörper	44
3.6.1.	ADCC bei Molt-4 und Daudi Zellen vermittelt durch Anti-HCV Antikörper	44
3.6.2.	ADCC bei UHCV-11 Zellen vermittelt durch Anti-HCV Antikörper	47
3.7.	Komplement-vermittelte Lyse durch Anti-HCV Antikörper	50
3.7.1.	Komplement-vermittelte Lyse bei Molt-4 Zellen	50
3.7.2.	Komplement-vermittelte Lyse bei UHCV-11 Zellen	53

<b>IV. Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>V. Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>VII. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>VIII. Anhang</b>	<b>76</b>

## Einleitung

### 1.1. Virologie

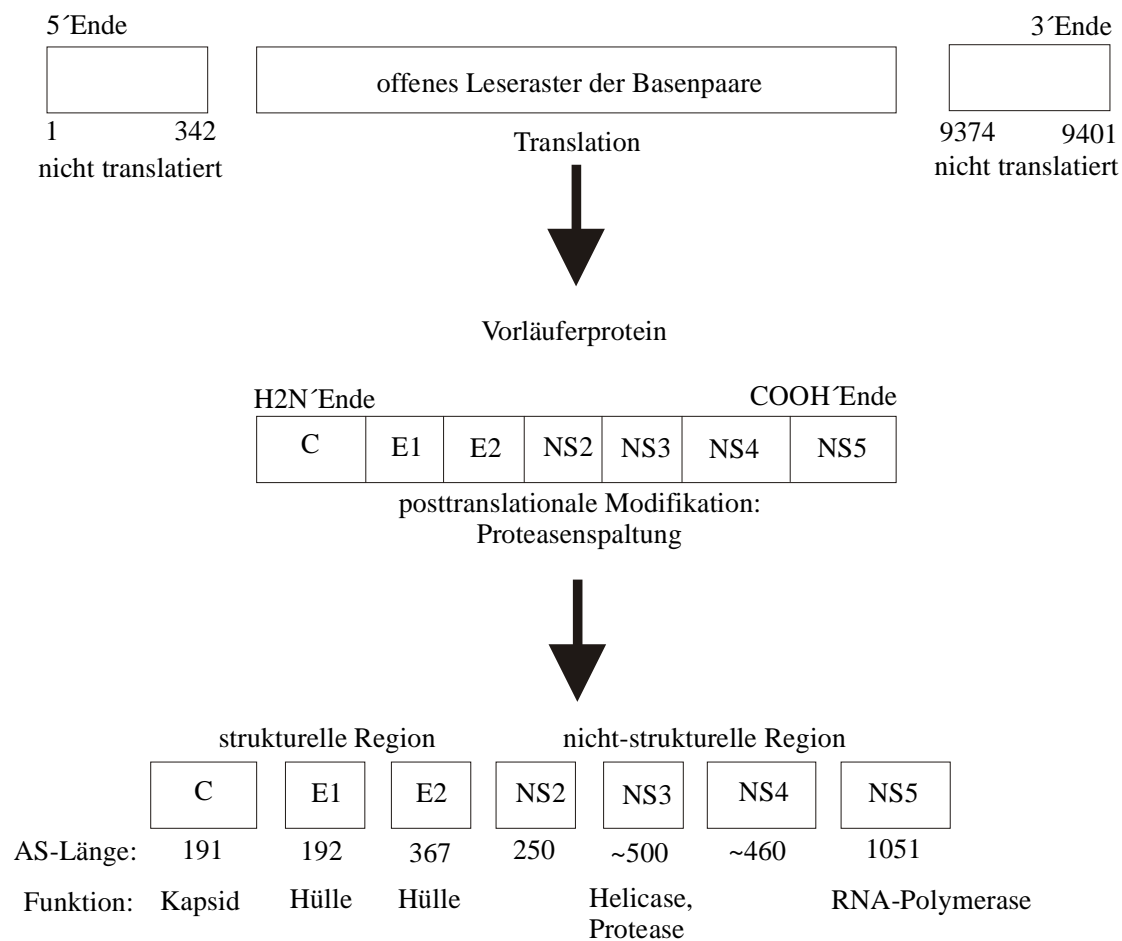
Das Hepatitis C Virus (HCV) wurde erstmals 1989 auf molekularer Ebene als Hauptverursacher der vormals als Non-A-Non-B-Hepatitis bezeichneten Infektion charakterisiert. Es ist ein umhülltes, lineares, einzelsträngiges RNA-Virus und gehört zur Familie der Flaviviridae (Choo *et al.* 1989 und Kuo *et al.* 1989). Das HCV-Genom besteht aus einem großen, offenen Leserahmen, der für ein virales Vorläufer-Protein mit strukturellen und nicht-strukturellen Domänen kodiert und das post-translational proteolytisch gespalten wird. Die strukturellen Proteine, zum einen das Kern-Antigen (Core-Ag), zum anderen die zwei Glykoproteine E1 und E2 (Envelope, Hülle), befinden sich am 5'-Ende. Die nicht-strukturellen Proteine NS-2, NS-3, NS-4 und NS-5 stammen von der 3'-Region (Houghton *et al.* 1991 und Lin *et al.* 1994). Für NS-3 wird die Funktion einer Serinprotease / RNA-Helicase und für NS-5 die einer RNA-abhängigen-RNA-Polymerase angenommen. Das NS-4A-Polypeptid scheint ein Kofaktor der NS-3-vermittelten Proteolyse zu sein (Grakoui *et al.* 1993, Bartenschlager *et al.* 1993 und Tomei *et al.* 1993) (Abb. 1).

Das Hepatitis C Virus ist durch eine hohe genetische Variabilität gekennzeichnet. Die Mutationsrate der Nukleotidsequenz wird auf etwa  $10^{-3}$  pro RNA-Strang und Jahr geschätzt. Die meisten Basenveränderungen treten in der hypervariablen Region E2, aber auch in der Core- und NS5-Region, sowie in dem noch wenig charakterisierten nichttranslatierten 3'-Ende des Virus auf (Simmonds *et al.* 1995 und Bukh *et al.* 1995). Die Hypervariabilität steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Viruspersistenz, da das Hepatitis C Virus dadurch einer effektiven Immunantwort entgehen kann.

Entsprechend den Ähnlichkeiten der Nukleotidsequenz in der NS5-Region und der darin vermuteten phylogenetischen Herkunft der bisher entdeckten Hepatitis C Viren wurden sechs verschiedene Genotypen und mehr als 80 Subtypen weltweit identifiziert (Simmonds *et al.* 1994). Zwischen den einzelnen Genotypen bestehen annähernd 65%ige Homologien und bei verwandten Subtypen sogar bis zu 77-79%. Das 5' nicht-translatierte Ende des HCV-Genoms enthält eine relativ hoch konservierte Region mit 92%igen Homologien zwischen den verschiedenen Genotypen (Simmonds *et al.* 1993, Simmonds *et al.* 1995 und Bukh *et al.* 1993). Bei den sechs Genotypen wurden Unterschiede in der Schwere der Erkrankung, dem Therapieansprechen sowie den Virus-Wirt-Interaktionen nachgewiesen. Zum Beispiel ist der

Genotyp 1b, der zusammen mit dem Genotyp 1a am häufigsten in den USA und in Nordeuropa vertreten ist, mit hohen HCV-RNA-Serumspiegeln, progredientem Krankheitsverlauf und schlechtem Ansprechen auf eine Interferon-Therapie verbunden (Yoshioka *et al.* 1992, Shakil *et al.* 1995 und Noursbaum *et al.* 1995). Die Genotypen 1b, 2a und 2b treten gehäuft in Japan und Taiwan auf. Dagegen findet sich der Genotyp 3 vor allem in Thailand, Nordeuropa und Australien. Im Mittleren Osten dominiert der Genotyp 4, wohingegen der Genotyp 5 in Südafrika vorherrscht. In Hongkong wurde ein gehäuftes Auftreten des Genotyp 6 beschrieben (McOmish *et al.* 1994).

**Abb. 1:** Positiv einzelsträngige RNA des Hepatitis C Virus



## 1. 2 Epidemiologie, Klinik und Diagnose der HCV-Infektion

Weltweit werden etwa 200 Millionen mit dem Hepatitis C Virus infizierte Menschen angenommen. In Deutschland nimmt die HCV-Infektion mittlerweile zahlenmäßig den größten Teil in der Häufigkeit von allen Virushepatitiden ein (0,4%) (Kuo *et al.* 1989 und



Aach *et al.* 1991). Das Hepatitis C Virus wird parenteral übertragen, vor allem durch Blut. Nachweisbar ist das Virus aber auch in anderen Körperflüssigkeiten wie z.B. Speichel oder Sperma (Liou *et al.* 1993). Eine vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind findet bei der HCV-Infektion eher selten statt, bei sehr hohen mütterlichen viralen Titern oder einer mütterlichen HIV-Koinfektion ist eine perinatale Infektion jedoch nicht ungewöhnlich (Ohto *et al.* 1994 und Lin *et al.* 1994). Die Risikogruppen entsprechen weitgehend denen der HBV-Infektion. Der Übertragungsweg bleibt aber bei 40-50% aller HCV-Infektionen ungeklärt (Laufs *et al.* 1994).

Ein großes klinisch-epidemiologisches Problem ist es, daß ca. 60-80% der HCV-Infektionen chronisch mit zum Teil asymptomatischen bzw. wenig symptomatischen Veränderungen einhergehen. Nach einer Inkubationszeit von 7-8 Wochen können drei klinisch-symptomatische Verlaufsformen unterschieden werden (Farci *et al.* 1992 und Shimizu *et al.* 1990): Erstens, Patienten mit akuter, selbstlimitierender Infektion die durch einen monophasischen entzündlichen Schub mit hohen Serumtransaminasen und nachfolgendem Abfall auf Normalwerte gekennzeichnet ist. Diese Patienten eliminieren meist die HCV-RNA aus dem Serum und gelten als ausgeheilt. Zweitens, Patienten deren Infektionsverlauf asymptomatisch verläuft. Sie sind gekennzeichnet durch einen initial biphasischen Transaminasenverlauf mit nachfolgender Reduktion auf niedrig-pathologische Werte. Diese Patienten zeigen danach oft für viele Jahre nur geringe Transaminasenerhöhung trotz nachweisbarer Virämie. Drittens, Patienten mit einem primär chronischen Verlauf mit von Beginn an nur wenig erhöhten schwankenden Transaminasen. 10-20% der Patienten mit chronischer Hepatitis C entwickeln nach ca. 20 jährigem Verlauf eine Leberzirrhose oder ein primäres Leberzellkarzinom (Shakil *et al.* 1995), es gibt jedoch auch asymptomatische Langzeitverläufe mit normalen Transaminasen und in einer Minderheit auch Verläufe, die binnen weniger Jahre eine rasche Progredenz aufweisen. Das hepatozelluläre Karzinom entsteht häufig erst bei Patienten mit Leberzirrhose und selten bei alleiniger chronischer HCV-Infektion (Kiyosawa *et al.* 1990 und De Mitri *et al.* 1995). Zudem ist die chronische Hepatitis C häufig mit anderen Erkrankungen, wie z.B. der Porphyria cutanea tarda, der membranoproliferativen Glomerulonephritis, der Kryoglobulinämie Typ II sowie der LKM-1 Antikörper positiven autoimmunen Hepatitis, assoziiert (De Castro *et al.* 1993, Agnello *et al.* 1992, Johnson *et al.* 1993 und Michel *et al.* 1992).

Therapeutisch wird neuerdings eine Kombinationstherapie aus Interferon- $\alpha$  und dem Nukleosidanalogon Ribavirin eingesetzt, die in ca. 45% zur dauerhaften Viruselimination

führt (Gary *et al.* 1998 und McHutchinson *et al.* 1998). Alternative Therapieansätze, die die Immunpathogenese der chronischen Hepatitis C berücksichtigen, sind dringend erforderlich. Bislang steht noch keine Vakzine zur Verfügung (Farci *et al.* 1992).

Die Diagnose der HCV-Infektion erfolgt indirekt durch den Nachweis virusspezifischer Antikörper, die gegen verschiedene strukturelle und nicht-strukturelle Antigene gerichtet sind oder direkt durch den Nachweis der HCV-RNA mittels reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) (Malnick *et al.* 1997).

### 1.3 Pathogenese und Immunologie der HCV-Infektion

Da für das Hepatitis C Virus bislang kein direkter zytopathischer Effekt nachgewiesen werden konnte (Okanue *et al.* 1996 und Jin *et al.* 1997), wird angenommen, daß die Pathogenese der Zerstörung von virusinfizierten Zellen und die Viruselimination durch zelluläre und humorale Immunreaktionen auf strukturelle und nicht-strukturelle Hepatitis C Virusantigene bedingt wird (Missale *et al.* 1996). Vieles deutet daraufhin, daß die Stärke der HCV-spezifischen Klasse II restringierten CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort, die gegen die nicht-strukturellen Antigene NS3 und NS4 gerichtet ist, die Viruselimination bei akuter Hepatitis C Virusinfektion vermitteln könnte (Diepolder *et al.* 1995 und Ferrari *et al.* 1994). Funktionell, sekretieren die NS3 und NS4 spezifischen T-Helferzellen in der akuten Hepatitis C große Mengen Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und weisen damit auf ein TH1 Zytokinprofil hin (Ferrari *et al.* 1994 und Diepolder *et al.* 1997).

Patienten mit chronischer HCV-Infektion zeigen dagegen eine geringere proliferative Antwort der peripheren Blut T-Zellen und eine Kompartimentalisierung der spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen im Lebergewebe (Cerny *et al.* 1999, Löhr *et al.* 1996, Minutello *et al.* 1993). Die longitudinale Analyse der zellulären Immunantwort in IFN- $\alpha$  behandelten chronischen HCV-Trägern erbrachte, daß bei Patienten mit dauerhaftem Therapieansprechen bevorzugt NS3, NS4 und Helicase spezifische T-Helferzellen induziert werden, während die Patienten mit Nichtansprechen auf die Therapie bevorzugt Core und NS5 spezifische T-Zellreaktionen beobachtet werden konnten (Löhr *et al.* 1998 und Leroux-Roels *et al.* 1996).

Basierend auf ihrem Zytokinsekretionsprofil können zwei Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen unterschieden werden, T-Helfer 1 (TH1) und T-Helfer 2 (TH2) (Mosmann *et al.* 1986). TH1 Zellen produzieren hauptsächlich IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$  und fördern damit die

zelluläre Immunantwort. TH2 Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 oder IL-13 und bedingen damit eine Verstärkung der humoralen Immunantwort (Del Prete *et al.* 1994). Obwohl die Dichotomie der TH1 und TH2 ähnlichen Helferzellen im Menschen weniger stark ausgeprägt ist, wird in experimentellen Mausmodellen diskutiert, ob ein Ungleichgewicht dieser T-Zellensubpopulationen sich auf die Chronizität und den Verlauf von Infektionen ausüben kann (Mosmann *et al.* 1986 und Romagnani *et al.* 1994). Zytokine, die eine pathogenetische Rolle für die Viruselimination oder -persistenz bei der humanen HCV-Infektion spielen können, sind besonders IFN- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF) - $\alpha$ , Interleukin (IL) -4, IL-5 und IL-10.

Die Zytokinsekretion von HCV-stimulierten T-Zellen bei chronischen HCV-Infektionen wird kontrovers diskutiert. Die meisten Studien zeigten bisher eine starke IFN- $\gamma$  Sekretion von HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen, welche aus Lebergewebe und peripherem Blut isoliert werden konnten (Löhr *et al.* 1996, Leroux-Roels *et al.* 1996 und Lechmann *et al.* 1999). Andere Forscher stellten eine fehlende IL-12 Sekretion von HCV-stimulierten peripheren mononukleären Zellen (PBMC) bei Patienten mit chronischer Hepatitis C fest. Dies könnte bewirken, daß Patienten mit chronischer Hepatitis C Virusinfektion eine unzureichende TH1-Helferzellantwort oder sogar überwiegend TH2 ähnliche Zytokinproduktion HCV-stimulierter T-Zellen hätten (Rossol *et al.* 1997 und Tsai *et al.* 1997).

Durch die hoch sensitive ELISPOT Technik wurde unlängst gezeigt, daß erhöhte Frequenzen von HCV-spezifischen Klasse I restringierten zytotoxischen T-Zellen (CTL) mit der Viruselimination in IFN- $\alpha$  behandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C korrelieren (Löhr *et al.* 1999). Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) gehören zu den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Ihr Wachstum und ihre Differenzierung werden hauptsächlich durch das TH1 Zytokin IL-2 angeregt und ihre zytotoxischen Eigenschaften vermitteln sie durch die Sekretion von Perforinen und Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , - $\beta$  und IFN- $\gamma$  (Wong *et al.* 1996 und Griffiths *et al.* 1995). Somit könnten virusinfizierte Zellen durch den zellulären Arm der Immunantwort, die TH1-Helferzell- und CTL-Induktion, kontrolliert werden. Andererseits sind nahezu alle Patienten mit akuter und chronischer HCV-Infektion durch das Auftreten von multispezifischen Anti-HCV-Antikörpern charakterisiert. Bislang existieren jedoch nur limitierte Daten bezüglich ihrer pathogenetischen Relevanz (Chen *et al.* 1999).

Nachweise einer polyklonalen Hypergammaglobulinämie, einer quantitativen IgG-Vermehrung sowie virusspezifischer Antikörper im Serum deuten indirekt auf eine wichtige Rolle der HCV-spezifischen humoralen Immunantwort hin. Zudem finden sich häufig Kryoglobuline und zirkulierende Immunkomplexe im Serum, in denen neben

virusspezifischen Antigenen und Antikörpern auch HCV-RNA gebunden ist (Marcellin *et al.* 1993 und Misani *et al.* 1994). HCV-spezifische Antikörper der IgM- und IgG-Klasse im Serum korrelierten mit der entzündlichen Aktivität und waren nach Viruselimination durch eine Interferontherapie nicht mehr nachweisbar (Brillanti *et al.* 1991, Quiroga *et al.* 1992 und Löhr *et al.* 1996). Die *in vitro* von aktivierten Lymphozyten produzierten Anti-HCV-Antikörper korrelierten ebenfalls mit der entzündlichen Aktivität, der Virämie, der Therapieantwort auf Interferon und der extrahepatischen Virusreplikation in PBMC (Löhr *et al.* 1994 und 1995). Die oben genannten Untersuchungen könnten vermuten lassen, daß die humorale Immunantwort gegen das HCV kein Epiphänomen darstellt, sondern daß die Antikörper womöglich eine Rolle in der Pathogenese der hepatozellulären Schädigung spielen.

Blockierende und neutralisierende Aktivitäten wurden vorgeschlagen, besonders für Antikörper, die spezifisch sind für die hypervariable Region-1 (HVR-1) innerhalb des HCV-Hüllantigens-2. Es zeigte sich jedoch, daß HCV-Antikörper positive Schimpansen nicht gegen eine Reinfektion geschützt werden konnten (Rosa *et al.* 1996, Zibert *et al.* 1995, Farci *et al.* 1992). Möglicherweise könnten die Antikörper an zytotoxischen Reaktionen beteiligt sein. Zu diesen zytotoxischen Reaktionen gehört eine antikörperabhängige zellvermittelte zytotoxische Reaktion (ADCC), bei der antikörperbehaftete Zielzellen durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) erkannt werden (Shimizu *et al.* 1994). Sie wird ausgelöst, wenn Antikörper, die an die Oberfläche einer Zelle gebunden sind, mit den Fc-Rezeptoren auf einer NK-Zelle in Kontakt treten (Lanier *et al.* 1986). Eine weitere zytotoxische Reaktion stellt die Komplement vermittelte Lyse dar, bei der das C1q-Komplementmolekül mit den an Zielzellen haftenden Antikörpern assoziiert und damit den klassischen Weg der Komplementaktivierung auslöst (Tomlinson *et al.* 1993). Hypothetisch könnten anti-HCV-Antikörper mit der zellulären virusspezifischen Immunantwort interferieren, so daß z.B. HCV-spezifische CTL in ihrer Aktivität gehemmt werden könnten. Diese Antikörper könnten möglicherweise neutralisierende Effekte, wie Inhibition der Bindung an Zellen oder Verstärkung der Opsonisierung von viralen Partikeln vermitteln (Zibert *et al.* 1997, Ishii *et al.* 1998 und Rosa *et al.* 1996).

#### 1. 4. Ziele dieser Arbeit

Aufgrund der bisher noch unzureichenden Befunde über die Pathogenese der HCV Infektion ist anzunehmen, daß sowohl die zelluläre Immunantwort ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) als auch die HCV-spezifische Immunglobulinsynthese an der Pathogenese der Hepatitis C Virusinfektion beteiligt sein könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, die Regulation der HCV-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort im Krankheitsverlauf einer Gruppe eindeutig definierter Patienten mit chronischer Hepatitis C zu untersuchen und die gewonnenen Ergebnisse mit dem Ausgang der Therapie zu korrelieren. Hierdurch sollten Aussagen über eine mögliche funktionelle Bedeutung der humoralen Immunantwort in der Pathogenese der chronischen Hepatitis C Infektion gemacht werden.

Da die Immunglobulinsynthese im Allgemeinen abhängig ist von Interaktionen mit T-Helferzellen und den von ihnen produzierten Zytokinen, sollte neben der Analyse der HCV-spezifischen Antikörpersynthese und ihrer IgG-Subklassenverteilung die Antigen-spezifische proliferative T-Helferzellantwort anhand der  $^3[H]$ -Thymidin Einbaurate bestimmt werden. Zusätzlich sollten die von den PBMC auf Antigen-spezifische Stimulation hin sezernierten Zytokine quantitativ gemessen werden.

Im weiteren sollte geprüft werden, ob affinitätsgereinigte HCV-spezifische Antikörper solche Zellen binden und lysieren können, die Virusantigene exprimieren. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Komplement-vermittelte Lyse und den Nachweis einer Antikörper-vermittelten zytotoxischen Aktivität (ADCC) gelegt.

## Material und Methoden

### **Material**

#### **2.1. Material**

##### **2.1.1. Laborgeräte**

Auflichtmikroskop	Leitz DME, Wetzlar
CO <sub>2</sub> Inkubator	Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer FACScan	Becton-Dickinson, Hamburg
Magnetische Separationseinrichtungen :	
2. MiniMACS Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
(Hochenergie-Permanentmagnet)	
ELISA-Reader: Lambda E	MWG-Biotech, Ebersberg
ELISA-Reader Software KC4 Junior	Bio-Tek Instruments, Vermont, USA
Reinraumbank Lamin Air HA2472	Heraeus, Hanau
Stereo-Dissektionsauflichtmikroskop SV6	Zeiss, Oberkochen
Taumelschüttler	Heidolph, Kehlheim
Zellerntegerät: Harvester 96	Tomtec, Hamden, USA
Flüssig Scintillationscounter:	
Betaplate Model 1205	Wallac, Freiburg
Gamma-Counter: Cobra II	Canberra Packard, Sprendlingen
Zentrifuge 1.0 Sepatech	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 2.0 RS Sepatech	Heraeus, Hanau
SPSS für Windows 8.0	SPSS inc., Chicago, USA
Peristaltikpumpe	Pharmacia, Freiburg

### 2.1.2. Verbrauchsmaterial

Ammonium-Heparin-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einfrierbehälter, Nr. 5100	Nalgene, Brüssel, Belgien
Einfrierröhrchen, (Cryotube) 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Erntefilter	LKB-Wallac, Bad Wildbad
ELISA-Mikrotiterplatten, 96 Well	Costar, Bodenheim
FACS Röhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Fuchs-Rosenthal Zellzählkammer	Labotec, Wiesbaden
Neubauer Zellzählkammer	Labotec, Wiesbaden
Mikrotiterplatten, 96 Well, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten, 96 Well, Rundboden	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatten, 96 Well, Spitzboden	Greiner, Frickenhausen
15 ml Reaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen
50 ml Reaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen
PS-Röhrchen 0,6 ml	Greiner, Frickenhausen
Pipette mit Spitze 2 ml; 5ml; 10 ml	Greiner, Frickenhausen
Trennsäulen, Typ MS+	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Sterilfilter, 0,2 µm Porengröße	Schleicher & Schuell, Dassel
Sterilfilter, 0,45 µm Porengröße	Schleicher & Schuell, Dassel
HiTrap Affinity Column 1ml (NHS-activated)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PD-10 Säule	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

### 2.1.3. Zellkulturmedien und -Zusätze

Fötale Kälberserum (FCS)	Vitromex, Vilshofen
Gentamycin	Gibco BRL, Eggenheim
Geneticin (G418)	Sigma, Deisenhofen
HEPES (2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-1-piperazinyl]- äthansulfonsäure)	Gibco BRL, Eggenheim
Humanserum AB (HUS)	Blutbank, Universität Mainz
L-Glutamin 200 mM	Gibco BRL, Eggenheim

Penicillin/Streptomycin	Biochrom Seromed, Berlin
RPMI 1640	PAA, Cölbe
IMDM	PAA, Cölbe
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen

#### 2.1.4. Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Brefeldin A	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Eosinrot	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure, mind. 99,8%	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
Ficoll 1,077	Biochrom Seromed, Berlin
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
HCV-Core (aa: 1-115)	Mikrogen, München
HCV-Helicase (aa: 1207-1488)	Mikrogen, München
HCV-NS3 (aa: 1007-1534)	Mikrogen, München
HCV-NS4 (aa: 1680-1796)	Mikrogen, München
HCV-NS5-4 (aa: 2622-2868)	Mikrogen, München
Kaninchen-Komplement	Behringwerke, Marburg
Na <sub>2</sub> [ <sup>51</sup> Cr]O <sub>4</sub>	Amersham Pharmacia, Buckinghamshire
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
N, N-Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
PBS Instamed	Biochrom Seromed, Berlin
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen



Schwefelsäure, 97%ige	Merck, Darmstadt
Szintillationsflüssigkeit Rotiszint 11 eco	Roth, Karlsruhe
3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin	Fluka, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
<sup>3</sup> [H]-Tritium-Thymidin (5 mCi/ml)	Amersham, Braunschweig
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid 30%ig	Merck, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

### 2.1.5. Kits

Simultest IMK-Lymphocyte Kit	Becton-Dickinson, Heidelberg
MACS-CD4-Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS-CD14-Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS-CD56-Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Peroxidase-konjugiertes Streptavidin	Dako, Heidelberg
Vectastain Elite ABC Standard Kit	Camon, Wiesbaden
QIAamp Blood Kit <sup>TM</sup>	Qiagen, Hilden
Amplicor sample preparation kit	Roche Molecular systems, Grenzach-Wyhlen
HCV-Amplicor	Roche Molecular systems, Grenzach-Wyhlen
HCV-Amplicor Monitor	Roche Molecular systems, Grenzach-Wyhlen
INNO-LiPA II test system	Innogenetics, Belgium
AxSYM System (HCV version 3.0)	Abbott, Wiesbaden-Delkenheim
PeliKine Compact:	
Human IL-10 ELISA Kit	Hiss, Freiburg
Human IL-4 ELISA Kit	Hiss, Freiburg
Human IFN- $\gamma$ ELISA Kit	Hiss, Freiburg
OptEIA ELISA Set IL-5	Pharmingen, Heidelberg
OptEIA ELISA Set IL-12 (p70)	Pharmingen, Heidelberg

Cytofix/Cytoperm Kit	Pharmingen, Heidelberg
Perm/Wash Buffer Kit	Pharmingen, Heidelberg

### 2.1.6. Antikörper

anti-human CD3 (Orthoclone-3)	
anti-human CD28	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-Rabbit IgG, Peroxidase gekoppelt	Dianova, Hamburg
anti-human CD3-Cy-Chrome	Diaclone, Köln
anti-human IL-10-PE	Pharmingen, Heidelberg
anti-human IFN- $\gamma$ -FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-CD69-Cy-Chrome	Pharmingen, Heidelberg
Rabbit anti-human IgG1	Dianova, Hamburg
Rabbit anti-human IgG2	Dianova, Hamburg
Rabbit anti-human IgG3	Dianova, Hamburg
Rabbit anti-human IgG4	Dianova, Hamburg

### 2.1.7. Zusammensetzung der Zellkulturmedien

#### RPMI

RPMI 1640	
2 mM L-Glutamin	
0,1 % (v/v) Gentamycin	
0,1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	
0,1 % (v/v) HEPES	

#### 5% FCS-Medium

RPMI 1640	95 ml
fötales Kälberserum	5 ml
(hitzeinaktiviert bei 56°C 30 min)	

**5% HUS-Medium**

RPMI 1640	95 ml
Humanserum AB	5 ml

(hitzeinaktiviert bei 56°C 30 min)

**UHCV-Medium mit Tetracyclin**

IMDM	176 ml
fötale Kälberserum	20 ml
Penicilin	1 ml
Streptomycin	1 ml
Genitacin	2 ml
Tetracyclin	0,007 ml

**Einfriermedium für PBMC und T-Zellen (2x)**

50 % (v/v) RPMI 1640
2 mM L-Glutamin
30 % (v/v) fötale Kälberserum
20 % (v/v) DMSO
0,1% (v/v) Gentamycin
0,1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
0,1% (v/v) HEPES

**2.1.8. Lösungen****Paraformaldehyd 1% (Fixierung von Zellen)**

Paraformaldehyd	10 g
PBS (1x)	ad 1 l

bei 37°C lösen

**PBS-Puffer (10x)**

PBS Instamed	95,5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

autoklavieren

**PBS + 0.5% BSA**

Bovines Serum Albumin	0,5 g
PBS (1x)	ad 100 ml

sterilfiltrieren

**PBS + 0.1% BSA**

Bovines Serumalbumin	0.1 g
PBS (1x)	ad 100 ml

**PBS + 2% FCS**

PBS (1x)	98 ml
fötales Kälberserum	2 ml

**Absättigungspuffer (ELISA)**

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	12.1 g
dest. H <sub>2</sub> O	400 ml
pH 7.5	
dest. H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**Abstopplösung (ELISA)**

Schwefelsäure, 97%ige	28 ml
dest. H <sub>2</sub> O	500 ml

**Beschichtungspuffer (ELISA)**

Lösung A:

Natriumcarbonat	1.03 g
dest. H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Lösung B:

Natriumhydrogencarbonat	1.68 g
dest. H <sub>2</sub> O	ad 200 ml

pH von Lösung A mit Lösung B 9.6

**Substratpuffer (ELISA)**

Zitronensäure-Monohydrat	6.3 g
dest. H <sub>2</sub> O	ad 800 ml
pH auf 4.1 einstellen	
dest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**TMB-Lösung (ELISA)**

3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin	240 mg
Aceton	5 ml
lösen	
Ethanol	45 ml
Wasserstoffperoxid, 30%ig	300 µl
lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahren	

**Start-Puffer**

20 mM Na-Phosphat( NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7,0;  
1,2 g in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen, auf pH 7 einstellen.

**Elutions-Puffer**

0,1 M Glycine-HCl, pH 2,7  
für 1 M Lösung:  
75,1 g Glycine in 900 ml H<sub>2</sub>O lösen;  
mit konz. HCl auf pH 2,7 einstellen;  
auf 1 l auffüllen.  
Für 0,1 M 1:10 verdünnen

**1M Tris-HCl, pH 9,0**

121 g Tris in 800 ml H<sub>2</sub>O lösen,  
auf pH 9,0 einstellen mit konz. HCL (14 ml HCl),  
auf 1 l auffüllen.

**Standard coupling Puffer**

0,2 M NaHCO<sub>3</sub>

8,4 g NaHCO<sub>3</sub> in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen

0,5 M NaCl, pH 8,3

14,61 g NaCl in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen und pH einstellen

**Puffer A**

0,5 M Ethanolamine

15,27 g Ethanolamine in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen

0,5 M NaCl, pH 8,3

14,61 g NaCl in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen und pH einstellen

**Puffer B**

0,1 M Na-Acetat

6,8 g Na-Acetat in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen

0,5 M NaCl; pH 4,0

14,61 g NaCl in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen und pH einstellen

**Lagerpuffer**

0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

3,55 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen

0,1 % NaN<sub>3</sub>, pH 7,0

0,5 g Natriumazid in 500 ml lösen, pH einstellen

## 2.2. Patienten

### 2.2.1. Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 31 Patienten mit chronischer Hepatitis C Infektion und fünf gesunde Blutspender als Kontrollen ausgesucht. Die chronischen Hepatitis C Patienten wurden bezüglich ihres Ansprechens auf eine IFN- $\alpha$  Therapie unterteilt in Patienten, die keine IFN- $\alpha$  Therapie erhielten (unbehandelt, UTR, n=10), Patienten mit biochemischem und virologischem Ansprechen auf Therapie (normale Serumtransaminasen und negative Serum HCV-RNA) mindestens sechs Monate nach Beendigung der IFN- $\alpha$  Therapie (sustained complete responder, SCR, n=8) und Patienten, bei denen es nicht zur Normalisierung der Transaminasen während der Behandlung mit IFN- $\alpha$  kam und die virämisch blieben (Nonresponder, NR, n=13). Die HCV Infektion wurde in allen Patienten bestätigt durch den Nachweis von Anti-HCV Antikörpern. Alle Patienten waren HCV-RNA positiv vor dem Beginn der IFN- $\alpha$  Behandlung. Die Patienten wurden mit 3 x 3 bis 3 x 6 Millionen Injektionseinheiten (IE) Interferon- $\alpha$  2x pro Woche behandelt. Der Therapiezeitraum betrug durchschnittlich 12 Monate (5-16 Monate) bei SCR und 8,3 Monate (3-15 Monate) bei NR. Ein SCR und zwei NR wurden in Kombination mit 800 mg Ribavirin pro Tag behandelt. Koinfektionen mit HIV und chronischer Hepatitis B wurden serologisch ausgeschlossen und nur in einem NR wurden geringe Titer antinukleäre Autoantikörper detektiert. Alanin-Aminotransferasen (ALT)-Spiegel und quantitative virologische und serologische Marker wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmt. Patienten ohne Anti-HCV Antikörper, HCV-RNA und mit normalen ALT dienten als gesunde Kontrollen (HC) (Tabelle 1). Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und gaben ihre Einwilligung gemäß der Helsinki Deklaration für ethische Richtlinien.

Tabelle 1:

Klinische und virologische Daten von chronischen HCV Patienten zum Zeitpunkt der Studie

Fall	Geschlecht (m/w)	Alter (Jahre)	ALT (U/l)	HCV- RNA	Anti- HCV	HCV Genotyp	Behandlungs- Ansprechen
1	w	44	44	+	+	2	UTR
2	m	47	38	+	+	4	UTR
3	w	26	19	+	+	1	UTR
4	w	66	31	+	+	1	UTR
5	w	28	113	+	+	1b	UTR
6	m	29	63	+	+	1a/1b	UTR
7	m	62	165	+	+	1	UTR
8	m	48	54	+	+	1	UTR
9	w	33	202	+	+	1	UTR
10	w	65	136	+	+	1	UTR
11	w	41	10	-	+	3	SCR
12	w	34	12	-	+	2	SCR
13	w	40	32	-	+	1	SCR
14	m	60	21	-	+	1	SCR
15	w	42	17	-	+	3	SCR
16	w	38	13	-	+	1	SCR
17	m	58	23	-	+	1	SCR
18	m	33	23	-	+	3	SCR
19	w	45	82	+	+	1	NR
20	w	36	283	+	+	1	NR
21	m	58	78	+	+	1	NR
22	w	49	79	+	+	1	NR
23	m	46	36	+	+	1	NR
24	m	39	609	+	+	2	NR
25	m	44	96	+	+	1	NR
26	m	47	67	+	+	1a	NR
27	w	55	50	+	+	1b	NR
28	m	48	247	+	+	1, 4	NR
29	w	35	144	+	+	1	NR
30	w	52	123	+	+	1	NR
31	w	46	125	+	+	1	NR

ALT, Alanin Aminotransferase Spiegel (normal > 38 U/l);

HCV Genotypen gemäß der Simmonds' Klassifikation (Simmonds et al. 1993);

UTR: unbehandelte chronische HCV Träger;

SCR: Patienten mit anhaltendem Therapieansprechen mindestens sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie;

NR: IFN- $\alpha$  Therapie Nonresponder



## **Methoden**

### **2.3. Methoden**

#### **2.3.1. HCV Virämie**

Zur Bestimmung einer HCV-Infektion wurden die Blutproben der Patienten in Serumprobenröhrchen gesammelt. Aus dem Serum wurde die RNA nach dem Protokoll des Qiagen RNeasy Kit isoliert. Die so gewonnene RNA wurde in dem Amplicor Hepatitis C Virus Testsystem eingesetzt. Dieser Test basiert auf vier Hauptprozessen: Reverse Transkription der Ziel-RNA zur Generation komplementärer DNA (cDNA); Vermehrung der Ziel-cDNA mittels PCR durch den Einsatz von HCV-spezifischen komplementären Primern; Hybridisierung der vermehrten PCR Produkte gegen Oligonukleotid-Sonden, spezifisch für die Ziel-DNA; und Nachweis der an die vermehrten PCR Produkte gebundenen Sonden durch Messen einer Farbstoffreaktion.

Zur Bestimmung der HCV-Genotypen wurde das INNO-LiPA II Testsystem eingesetzt. Dieser Test basiert auf einer Line-Probe reversen Hybridisierung, deren Zuverlässigkeit durch eine direkte Festphasen Sequenzierung mittels biotinylierten Amplicons überprüft wurde. Diese Amplicons wurden mit universellen Primern generiert, die gegen die 5'-untranslatierte Region des HCV-Genoms gerichtet waren. Die HCV-Genotypen wurden gemäß der Nomenklatur nach Simmonds klassifiziert (Simmonds et al. 1994).

#### **2.3.2. Isolation von PBMC**

Die Fraktion mononukleärer Zellen (PBMC) wurden jeweils aus 20 - 40 ml heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (Böyum 1968). Dazu wurden 20 ml Heparinblut mit 15 ml Ficoll der Dichte 1,077 g/ml unterschichtet und 20 Minuten bei 2000 rpm und 4°C (800 x g) zentrifugiert. Die in der Interphase befindlichen Zellen wurden abgenommen und zweimal in RPMI bei 1200 rpm und 4°C für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die PBMC in RPMI + 5% HUS aufgenommen und auf Eis gelagert.

### 2.3.2.1. Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit einer 1%igen Eosinrotlösung verdünnt und die Zellzahl anschließend in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Da der Farbstoff von vitalen Zellen aktiv durch die Membran nach außen transportiert wird, ließen sich diese von nicht-vitalen Zellen abgrenzen, indem diese sich rot anfärbten. Zur Berechnung der Zellkonzentration diene die folgende Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times 100 / (\text{Anzahl gezählter Quadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor})$$

### 2.3.2.2. Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurde die Zellsuspension tropfenweise in einem Verhältnis von 1:2 mit gekühltem Einfriermedium verdünnt und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden in einem isopropanolhaltigen Einfriergefäß schonend (1°C/Minute) auf -75°C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen kurz in der Hand angetaut und tropfenweise Medium zugesetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in RPMI + 5% FCS aufgenommen.

### 2.3.3. Proliferationsassay

Zur Untersuchung der proliferativen Antwort von PBMC auf verschiedene HCV-Antigene, wurden  $1 \times 10^5$  PBMC jeweils in 100 µl RPMI + 5% HUS aufgenommen und in eine 96 Loch Rundboden-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 100 µl der Antigenlösung hinzugegeben. Die in Voruntersuchungen als optimal ermittelten Konzentrationen der HCV-Antigene waren 1 µg/ml (Core), 0,5 µg/ml (Helikase) sowie je 2,5 µg/ml (NS-3, NS-4 und NS-5-4). Als Positivkontrolle diene eine Stimulation mit den Antikörpern Anti-CD3 und Anti-CD28 (eingesetzte Konzentration: 1 µg/ml) und als Negativkontrolle Medium ohne Antigen. Von jedem Ansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach einer

Inkubation von sechs Tagen bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung, erfolgte die Zugabe von 0,15 µCi <sup>3</sup>[H]-Thymidin in 25 µl RPMI + 1% FCS. Die Einbaurrate (cpm, counts per minute) des radioaktiv markierten Thymidins in die proliferierenden T-Zellen wurde nach weiteren 24 Stunden Inkubation bestimmt. Dazu wurde die Zell-DNA mittels eines Erntegerätes an einen Glasfaserfilter gebunden. Nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit erfolgte die Messung in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Betaplate). Der Stimulationsindex wurde relativ zum Mediumwert (Negativkontrolle) angegeben und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Stimulationsindex} = \text{cpm}_{\text{Antigen}} / \text{cpm}_{\text{Medium}}$$

Ein Stimulationsindex > 3 wurde als positiv gewertet.

#### **2.3.4. Zytokin-ELISA**

Die Bestimmung der Zytokine erfolgte aus den Zellkulturüberständen der Proliferationsassays. Für die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-12 wurden die Überstände nach 24 Stunden und für IFN-γ die Überstände nach 48 Stunden entnommen.

Für die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN-γ wurden zusammengestellte ELISAs von der Firma Hiss verwendet und für die Zytokine IL-4 und IL-12 zusammengestellte ELISAs von der Firma Pharmingen. Im ersten Schritt wurde der Beschichtungs-Antikörper 1:100 in Beschichtungspuffer verdünnt und mit einem Volumen von 40µl in eine 96 Loch ELISA-Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert, um dem Antikörper zu ermöglichen kovalent an den Boden der Mikrotiterplatte zu binden. Im nächsten Schritt wurde der überschüssige Beschichtungsantikörper aus der Platte entfernt und die Mikrotiterplatte 4 mal mit PBS gewaschen. Die freien Bindungsstellen wurden im nun folgenden Schritt durch Inkubation mit 100µl Blockingpuffer pro Loch für eine Stunde abgesättigt. Nach weiteren vier Waschschritten mit PBS/Tween, wurden die Zellkulturüberstände und der Standard in Zweierwerten in die Platte gegeben. Die Zellkulturüberstände für die Zytokine IL-4, IL-5, IFN-γ wurden 1:2 und für IL-10 1:3 mit Verdünnungspuffer verdünnt. Der Überstand zur Bestimmung von IL-12 wurde unverdünnt eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur (RT) wurde die Mikrotiterplatte erneut vier Mal mit PBS/Tween

gewaschen und für eine Stunde bei RT mit einem enzymgekoppelten Antikörper inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100µl Substratlösung zugegeben. Die Farbstoffreaktion wurde nach 30 Minuten Inkubation bei RT durch Zugabe von 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung abgestoppt. Die Messung der Farbstoffreaktion erfolgte bei 490 nm im ELISA-Reader. Die Auswertung der gemessenen Adsorptionen wurde mit der Software KCjunior von MWG-Biotech vorgenommen.

### 2.3.5. HCV-Antikörper-ELISA

Um die Diagnose einer HCV-Infektion zu bestätigen, wurden die HCV-spezifischen Antikörper in den Patientenseren durch den Einsatz des AxSYM Systems (HCV-Version 3.0) gemessen. Dieser Test wurde gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Test wurde entworfen, um Antikörper gegen die HCV-Antigene HCr43 (Fusionsprotein exprimiert in *E. coli*, Aminosäuren 1-150 und 1192-1457), c200 (Fusionsprotein exprimiert in *s. cerevisiae*, Aminosäuren 1192-1931), c100-3 (Fusionsprotein exprimiert in *s. cerevisiae*, Aminosäuren 1569-1931), und NS5 (Fusionsprotein exprimiert in *s. cerevisiae*, Aminosäuren 2054-2995) nachzuweisen.

Die Bestimmung der HCV-spezifischen Antikörpertiter und der entsprechenden Subklassen erfolgte aus dem Serum der Patienten.

Zu Beginn dieses Testes wurden ELISA-Mikrotiterplatten mit den HCV-Antigenen Core und Helicase beschichtet, indem die Antigene in einer Konzentration von 1µg/ml in Beschichtungspuffer aufgenommen und mit 40µl/Loch über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden die freien Bindungsstellen besetzt durch Inkubation mit 100µl Blockingpuffer pro Loch für 1h. Nach erneutem viermaligen Waschen mit PBS/Tween, wurden die Patientenseren in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:5; 1:25; 1:125; 1:625; 1:3125) und zu Zweierwerten in die Mikrotiterplatte pipettiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach weiteren vier Waschschriften wurden Antikörper gegen humane Antikörper und deren Subklassen (IgG1 1:1000, IgG2 1:500, IgG3 1:1000, IgG4 1:1000 und IgG 1:1000) eingesetzt und für 1h bei RT inkubiert. Ein Anti-Maus Antikörper gekoppelt mit Meerrettichperoxidase wurde nach wiederholtem Waschen 1:2000 verdünnt in die ELISA-Platte gegeben und für 1h bei RT inkubiert. Abschließend wurde nach dem

Waschen der ELISA-Platte 100µl der Substratlösung zu den Proben gegeben und nach 30 Minuten Inkubation die Farbstoffreaktion mit 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung abgestoppt. Die Messung der Farbstoffreaktion erfolgte bei 560 nm im ELISA-Reader und die Auswertung der gemessenen Adsorptionen wurde mit der Software KCjunior von MWG-Biotech vorgenommen. Zur Quantifizierung der HCV-spezifischen Antikörper wurden eine Standardreihe bestehend aus den verschiedenen Immunglobulinsubklassen mitgeführt.

### **2.3.6. Separation von CD4, CD14 und CD56 positiven Zellen**

Bei dieser Methode wurden monoklonale anti-humane CD4, CD14 und CD56 Antikörper, die an magnetische Partikel gekoppelt waren, zur Positivselektion der T-Helferzellen und NK-Zellen verwendet. Aufgrund ihrer geringen Größe (50 nm) reagieren sie ähnlich wie Makromoleküle und müssen nach der Separation nicht wieder entfernt werden (Miltenyi *et al.* 1990; Semple *et al.* 1993). Den aufgearbeiteten PBMC wurden 80 µl PBS + 0,5% BSA und 20 µl Anti-CD-Mikroperlen zugesetzt und anschließend resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min. bei 4°C wurden 2 ml PBS + 0,5% BSA hinzugefügt und nachfolgend bei 1200 rpm für zehn Minuten gewaschen. Das Zellsediment wurde in 500 µl PBS + 0,5% BSA aufgenommen und die Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die in einer Magnethalterung eingesetzt wurde. Die Säule wurde kurz zuvor mit 500 µl PBS + 0,5% BSA äquilibriert. Nachdem die Zellsuspension durch die Säule gelaufen war, wurde die Säule viermal mit 500 µl PBS + 0,5% BSA gewaschen. Dann wurde die Trennsäule vom Magneten entfernt und 1 ml PBS + 0,5% BSA zugesetzt. Mit Hilfe eines „Stempels“ wurden die Mikroperlen markierten T-Lymphozyten schließlich aus der Säule gedrückt, bei 1200 rpm für zehn Minuten gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt.

### **2.3.7. Quantitative Analyse von HCV-spezifischen T-Zellen durch intrazelluläre Zytokinfärbung**

Zur Detektion von intrazellulären Zytokinen wurden aus den PBMC von Probanden die CD4<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup> T-Zellen separiert. Diese Zellen wurden im CD4<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Verhältnis von 10:1 (5 x 10<sup>5</sup> : 5 x 10<sup>4</sup>) in 96-Loch Rundbodenplatten für 18 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden

die Zellen nur mit Medium inkubiert. Die Stimulation erfolgte mit HCV-Core (1 µg/ml) und HCV-NS3 (2,5 µg/ml) und als positive Stimulationkontrolle wurde PMA (25 ng/ml) / Ionomycin (1 µg/ml) eingesetzt. Für weitere 6 h wurde Brefeldin A (10µg/ml) zu den Proben gegeben. Nach Abschluß der Stimulation wurden die Zellen in FACS-Probenröhrchen überführt und zweimal mit „Staining“-Puffer (PBS, 1% FCS) gewaschen. Im anschließenden Schritt wurden die Zelloberflächenantigene gefärbt. Zu diesem Zweck wurde Fluorochrome-konjugierter Anti-CD3 Antikörper (5µl Antikörperlösung in 50µl Puffer) zu dem Zellsediment gegeben und nach Resuspendieren für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden nach einem weiteren Waschschrift zur Fixierung und Permeabilisierung in „Cytofix/Cytoperm“-Puffer resuspendiert und 20 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit „Perm/Wash“-Lösung wurden die Zellen in 50µl „Perm/Wash“-Lösung resuspendiert und die Antikörper gegen CD69 (5µl) und die Zytokine IL-10 (1,5µl) und IFN-γ (7µl) hinzugegeben und bei 4°C für 30 min inkubiert. Im Anschluß an den abschließenden Waschschrift, wurden die Zellen in 400µl „Staining“-Puffer aufgenommen und im FACS-Meßgerät analysiert. Für die Analyse wurden  $5 \times 10^4$  Zellen gemessen.

### **2.3.8. Kopplung der Antigene auf die Affinitätschromatographiesäule**

Zum Aufreinigen von HCV-spezifischen Antikörpern aus Patientenseren wurden jeweils die HCV-Antigene Core, Helicase und NS3 in einer Konzentration von 3mg/ml in 1 ml Standard-Kopplungspuffer gelöst. Nach Entfernen des oberen Säulenverschlusses wurde ein Tropfen eiskalte 1mM HCl auf die Säule gegeben, um Luftblasen in der Säule zu vermeiden. Nach Anbringen des Schlauchadapters wurde der untere Verschluss der Säule entfernt. Zur Aktivierung der Säule wurde das Isopropanol aus der Säule durch dreimaliges Waschen mit 2ml 1mM HCl ausgewaschen. Die Flußrate wurde in allen Waschsritten auf 1ml/min beschränkt. Im Anschluß wurde sofort die Ligandenlösung auf die Säule gegeben, diese verschlossen und für 30 min bei 25°C inkubiert. Nach der Liganden-Kopplung wurde die Säule deaktiviert und überschüssige Liganden entfernt durch jeweils dreimaliges Waschen mit 2ml Puffer A, 2ml Puffer B und 2ml Puffer A. Anschließend wurde nach 30 min Inkubation die Säule noch einmal gewaschen mit je drei Mal 2ml Puffer B, Puffer A und Puffer B. Abschließend wurde der pH-Wert der Säule durch Waschen mit einem pH neutralen Puffer

eingestellt und somit für die Aufreinigung der Antikörper vorbereitet. Bei Nichtgebrauch wurde die Säule in einer Lösung aus: 0,05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% NaN<sub>3</sub>, pH 7,0 gelagert.

### **2.3.9. Aufreinigen von HCV-Antikörpern**

Vor Gebrauch der HCV-Antigen beschichteten Affinitätschromatographiesäulen wurden die Säulen mit 3ml Startpuffer gewaschen, gefolgt von 3ml Elutionspuffer. Anschließend wurde die Säule mit Startpuffer äquilibriert. Die Serumproben wurden vor dem Aufbringen auf die Säule mit einem 0,45µm Filter filtriert, um Verstopfungen in der Säule zu vermeiden. Die Proben wurden mit einer Flußgeschwindigkeit von 1ml/min luftblasenfrei auf die Säule gegeben. Im Anschluß daran wurde die Säule mit Startpuffer gewaschen, bis kein Probenmaterial mehr im Ausfluß sichtbar war. Die Elution der Antigen-spezifischen Antikörper erfolgte durch Zugabe von 3ml Elutionspuffer. Zur sofortigen Neutralisation der Antikörper-Elutionslösung waren die Probengefäße mit 1 M Tris-HCl, pH 9,0 gefüllt. In einem weiteren Schritt wurden die Antikörperproben mit PD-10 Säulen umgepuffert in PBS.

### **2.3.10. Antikörperbindungsstudie**

#### **2.3.10.1. Antikörperbindungsstudie mit Molt-4 Zellen**

Für den Nachweis, ob die aufgereinigten anti-HCV Antikörper an die Molt-4 Zellen binden können, wurden je Testansatz, bestehend aus  $1 \times 10^5$  Molt-4 Zellen, die entweder über Nacht mit hoch-titrigem HCV-Serum inkubiert wurden oder Hepatitis C Virus frei waren, mit PBS gewaschen und anschließend in 50µl PBS aufgenommen. Danach wurden pro Ansatz 20µl aufgereinigte Antikörperlösung oder Patientenserum zu den Zellen gegeben. Als Positiv-Kontrolle wurde ein anti-HLA Klasse I Antikörper (W6/32) eingesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Proben zweimal gewaschen und in 50µl PBS aufgenommen. Im nun folgenden Schritt wurden die Proben mit einem FITC gekoppelten anti-Human IgG Antikörper für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen, wurden die Zellen zur Fixierung in 1% PFA-Lösung aufgenommen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte im FACScan.

### 2.3.10.2. Antikörperbindungsstudie mit UHCV-11 Zellen

Zur Überprüfung in welchem Umfang die aufgereinigten anti-HCV Antikörper an die UHCV-11 Zellen binden können, wurde jeder Testansatz, bestehend aus  $1 \times 10^5$  UHCV-11 Zellen, die entweder HCV-Proteine exprimierten oder HCV-Protein frei waren, mit PBS gewaschen und anschließend in 50µl PBS aufgenommen. Danach wurden pro Ansatz 20µl aufgereinigte Antikörperlösung oder Patientenserum zu den Zellen gegeben. Als positiv-Kontrolle wurde ein anti-HLA Klasse I Antikörper (W6/32) eingesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Proben zweimal gewaschen und in 50µl PBS aufgenommen. Im nun folgenden Schritt wurden die Proben mit einem FITC gekoppelten anti-Human IgG Antikörper für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen, wurden die Zellen zur Fixierung in 1% PFA-Lösung aufgenommen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte im FACScan.

### 2.3.11. Analyse der Antikörper-vermittelten zytotoxischen Aktivität (ADCC)

#### 2.3.11.1. ADCC mit Daudi und Molt-4 Zellen

Um zu überprüfen in welchem Umfang die Anti-HCV Antikörper die Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) vermitteln können, wurde die T-Zelllinie Molt-4 als Zielzelle eingesetzt, die zuvor entweder mit HCV-Serum infiziert oder Virusfrei gehalten worden waren (Shimizu *et al.* 1992). Durch Inkubation mit 100µCi radioaktivem Natriumchromat ( $^{51}\text{[Cr]}$ ) für 1h bei 37°C wurden  $1 \times 10^6$  dieser Zellen markiert. Nach zweimaligem Waschen mit Medium wurden jeweils  $5 \times 10^3$  Zellen pro Loch in eine 96-Loch Spitzbodenplatte ausgebracht. Zur Vermittlung der Lyse wurden Antikörper eingesetzt, die mittels Affinitätschromatographie antigenspezifisch aus Patientenseren aufgereinigt worden waren. Die Antikörper waren gegen die Antigene HCV-Core und HCV-Helicase gerichtet. Sie wurden in den Konzentrationen 0,5µg/Loch und 5µg/Loch eingesetzt. Als Effektorzellen dienten aus „Buffy-Coat“ isolierte  $\text{CD56}^+$  Zellen. Diese wurden in verschiedenen Verhältnissen von Effektor- zu Zielzellen (10:1; 30:1 und 60:1) eingesetzt. Nach 4h Inkubation bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre wurden 100µl Überstand von den Ansätzen



abgenommen und im Gamma-Counter gemessen. Die prozentuale Lyserate wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = 100 * \frac{(\text{experimentelle Lyse} - \text{spontane Lyse})}{(\text{maximale Lyse} - \text{spontane Lyse})}$$

### 2.3.11.2. ADCC mit UHCV-11 Zellen

Für die Methode der Antikörper vermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC) wurden Osteosarcomzellen als Zielzellen eingesetzt, die mit Teilen des HCV-Genoms transfiziert worden waren (UHCV-11) (Moradpour *et al.* 1998). Durch Inkubation mit 100µCi radioaktivem Natriumchromat ( $^{51}\text{[Cr]}$ ) für 1h bei 37°C wurden  $1 \times 10^6$  dieser Zellen markiert. Nach zweimaligem Waschen mit Medium wurden jeweils  $5 \times 10^3$  Zellen pro Loch in einer 96-Loch Spitzbodenplatte ausgebracht. Als HCV-Protein produzierende Zellen dienten UHCV-11 Zellen, die für 24 h in Abwesenheit von Tetracyclin wuchsen, dienten als Negativ-Kontrollzellen, die in Tetracyclin-haltigem Medium expandiert wurden. Zur Vermittlung der Lyse wurden Antikörper eingesetzt, die mittels Affinitätschromatographie antigenspezifisch aus Patientenseren aufgereinigt worden waren. Die Antikörper waren gegen die Antigene HCV-Core, HCV-NS3 und HCV-Helicase gerichtet. Sie wurden in den Konzentrationen 1µg/Loch, 5µg/Loch und 25µg/Loch eingesetzt. Aus „Buffy-Coat“ isolierte PBMC wurden als Effektorzellen in diesem Test mit verschiedenen Verhältnissen von Effektor- zu Zielzellen (10:1; 50:1 und 250:1) eingesetzt. Nach 4h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre wurden 100µl Überstand von den Asätzen abgenommen und im Gamma-Counter gemessen. Die prozentuale Lyserate wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = 100 * \frac{(\text{experimentelle Lyse} - \text{spontane Lyse})}{(\text{maximale Lyse} - \text{spontane Lyse})}$$

### 2.3.12. Komplement vermittelte Lyse

Zur Bestimmung der Antikörper abhängigen Komplement vermittelten Lyse wurden sowohl Molt-4 Zellen als auch UHCV-11 Zellen mit radioaktivem Chrom ( $^{51}\text{[Cr]}$ ) markiert, indem diese Zellen für 1h mit 100µCi Natriumchromat bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und mit  $5 \times 10^3$  Zellen pro Loch in einer

96-Loch Spitzbodenplatte ausgebracht. Als HCV-Protein tragende Zellen dienten zum einen UHCV-11 Zellen, die für 24 h unter Abwesenheit von Tetracyclin wuchsen und zum anderen Molt-4 Zellen, die mit HCV-Serum infiziert wurden. Als Negativ-Kontrolle wurden UHCV-11 Zellen eingesetzt, die in Tetracyclin-haltigem Medium expandiert wurden oder Molt-4 Zellen, die nicht infiziert worden waren. Zur Vermittlung der Lyse wurden Antikörper eingesetzt, die mittels Affinitätschromatographie antigenspezifisch aus Patientenseren aufgereinigt worden waren. Die Antikörper waren gegen die Antigene HCV-Core, HCV-NS3 und HCV-Helicase gerichtet. Sie wurden in den Konzentrationen 1µg/Loch, 5µg/Loch und 25µg/Loch eingesetzt. Das Komplement wurde in den Verdünnungsstufen 1:16 und 1:4 eingesetzt. Zur Bestimmung spontaner Lyse, ausgelöst durch Antikörper oder Komplement alleine, wurden Testansätze ohne Antikörper und ohne Komplement durchgeführt. Desweiteren wurde ein Anti-MHC I Antikörper (W6/32) als Positiv-Kontrolle und menschliches Immunglobulin von gesunden Spendern als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Nach 4h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre wurden 100µl Überstand von den Ansätzen abgenommen und im Gamma-Counter gemessen. Die prozentuale Lyserate wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = 100 * \frac{(\text{experimentelle Lyse} - \text{spontane Lyse})}{(\text{maximale Lyse} - \text{spontane Lyse})}$$

### 2.3.13. Statistische Auswertung

Der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung eines Einzelwertes einer Stichprobe sowie die Standardabweichung der Mittelwerte einer Stichprobe (SEM) wurden berechnet (Harms 1992 a).

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen wurde der Wilcoxon-Test (Rangsummentest) für unverbundene Stichproben (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) herangezogen (Harms 1992 a).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. HCV spezifische proliferative T-Zellantwort

Zur Identifizierung einer HCV spezifischen zellulären Immunantwort, die mit der Viruselimination bei IFN- $\alpha$  behandelten chronischen Hepatitis C Patienten assoziiert ist, wurden PBMC von 8 SCR, 13 NR, 10 UTR und 5 gesunden Kontrollen mit verschiedenen HCV-Antigenen stimuliert. Sieben SCR reagierten mit den Antigenen NS3 und Helicase (87,5 %) und sechs SCR reagierten mit dem Core Antigen (75 %), während sechs UTR einen positiven Stimulationsindex (SI) auf das Core (60 %) und vier auf das NS3 und Helicase Antigen (40 %) hatten. Von den 13 NR zeigten nur fünf Probanden eine proliferative Antwort auf das Core und NS3 Antigen (38 %) und drei NR auf das Helicase Antigen (23 %).

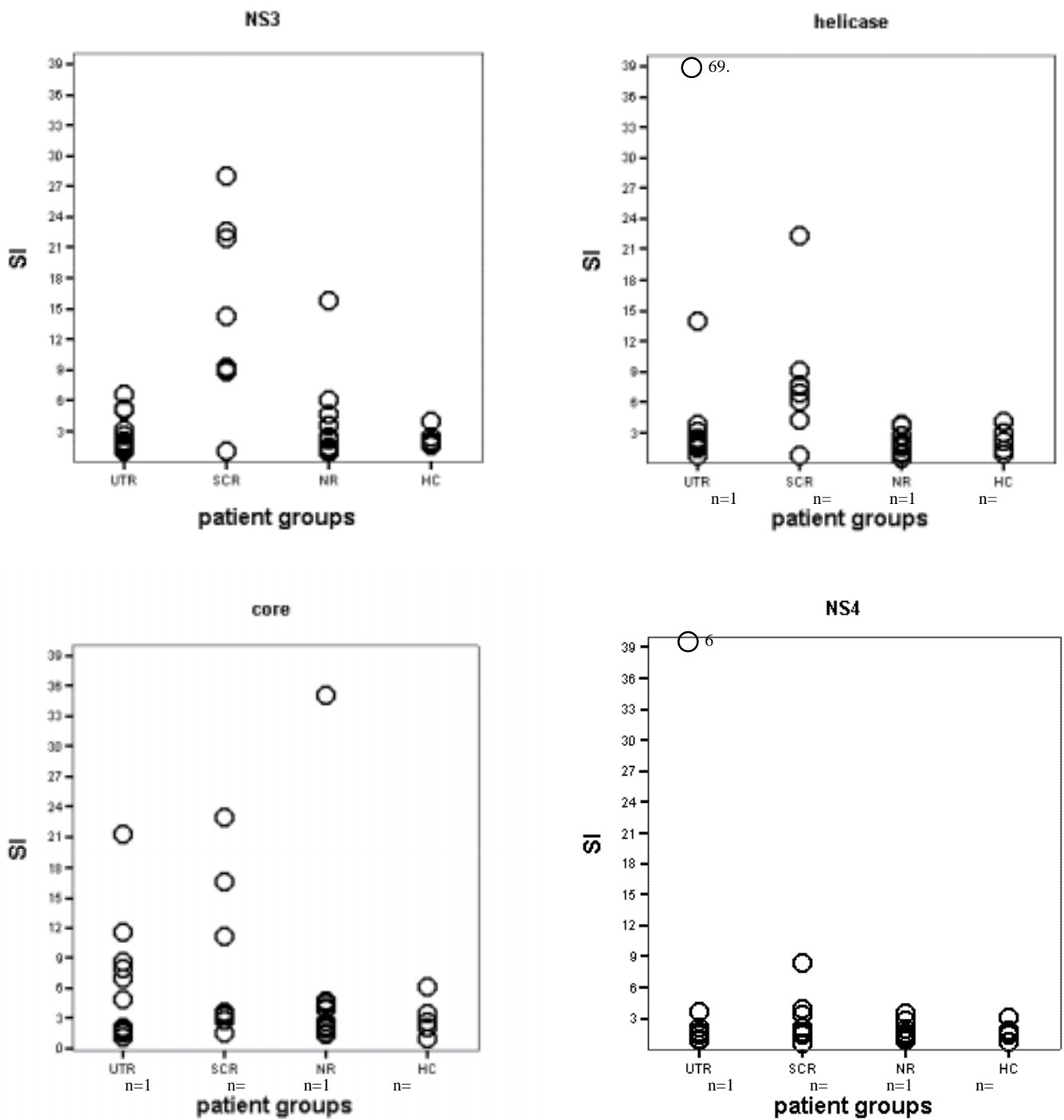
Im besonderen Hinblick auf die positive T-Zellantwort bei den SCR zeigte sich eine signifikant stärkere (Median) NS3 spezifische T-Zellstimulation im Vergleich zu den anderen Patientengruppen (SI: SCR: 16,3 (range: 8,9-28,1, n=7) vs. UTR: 5,2 (range: 3,2-6,6, n=4)  $p=0,006$  vs. NR: 6,1 (range:3,6-15,9, n=5)  $p=0,03$  vs. HC: 4,0 (n=1)  $p=0,04$ ).

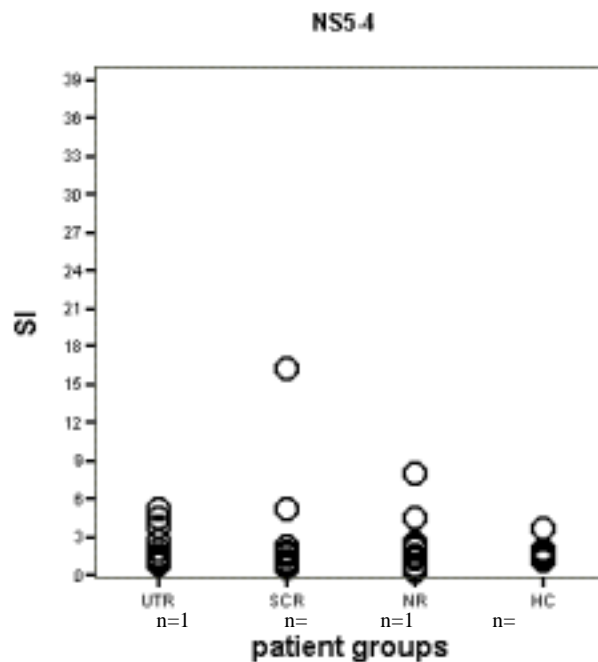
Im Vergleich zu den NR Patienten und HC konnte in den SCR und UTR eine weniger auffallende, aber signifikant höhere (Median) proliferative T-Zellantwort auf das teilweise überlappende Helicase Antigen festgestellt werden (SI: SCR: 7,7 (range: 4,4-22,3, n=7) und UTR: 8,9 (range: 3,3-69,7, n=4) vs. NR: 3,8 (range: 3,8-3,9, n=3)  $p=0,02$  vs. HC: 3,6 (range: 3,0-4,2, n=2)  $p=n.s.$ ).

Eine ähnliche, aber nicht signifikant stärkere (Median) proliferative T-Zellantwort spezifisch für das HCV-Core Antigen konnte in den SCR und UTR gegenüber den NR und HC festgestellt werden (SI: SCR: 7,4 (range: 3,3-22,9, n=6) vs. UTR: 8,4 (5,0-21,3, n=6)  $p=n.s.$  vs. NR: 4,5 (3,9-35,1, n=5)  $p=n.s.$  vs. HC: 4,8 (3,5-6,1, n=2)  $p=n.s.$ ).

Die anderen HCV-Antigene, NS4 und NS5-4 wurden weniger häufig erkannt und zwischen den Patientengruppen zeigten sich keine großen Unterschiede. Im Detail zeigten nur drei SCR, ein NR und zwei UTR eine proliferative Antwort auf das NS4 Antigen. Zwei SCR, zwei NR und drei UTR zeigten eine Antwort auf das NS5-4 Antigen (Abb. 2).

**Abb.2:** Proliferative Antwort auf verschiedene HCV-Antigene bei chronischen HCV-Patienten

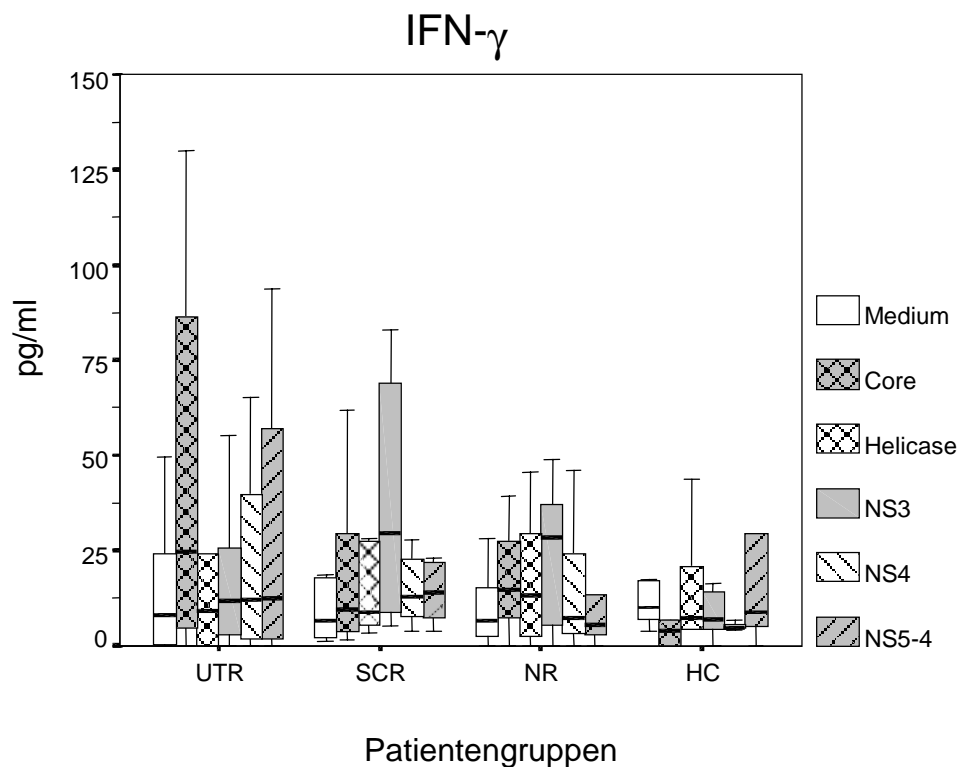




Die proliferative Antwort der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC;  $1 \times 10^5$ ) von Patienten mit anhaltender Therapieresponse (SCR) und Non-Respondern (NR) sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie sowie von unbehandelten HCV-Patienten und gesunden Kontrollen (HC) wurde nach Stimulation mit den rekombinanten HCV-Antigenen Core, Helicase, NS3, NS4 und NS5-4 mittels Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt (SI: Stimationsindex). Dabei zeigten die SCR eine signifikant stärkere NS3 und Helicase spezifische zelluläre Immunantwort verglichen mit den NR ( $p < 0,006$ ), UTR ( $p < 0,004$ ) und HC ( $p < 0,003$ ).

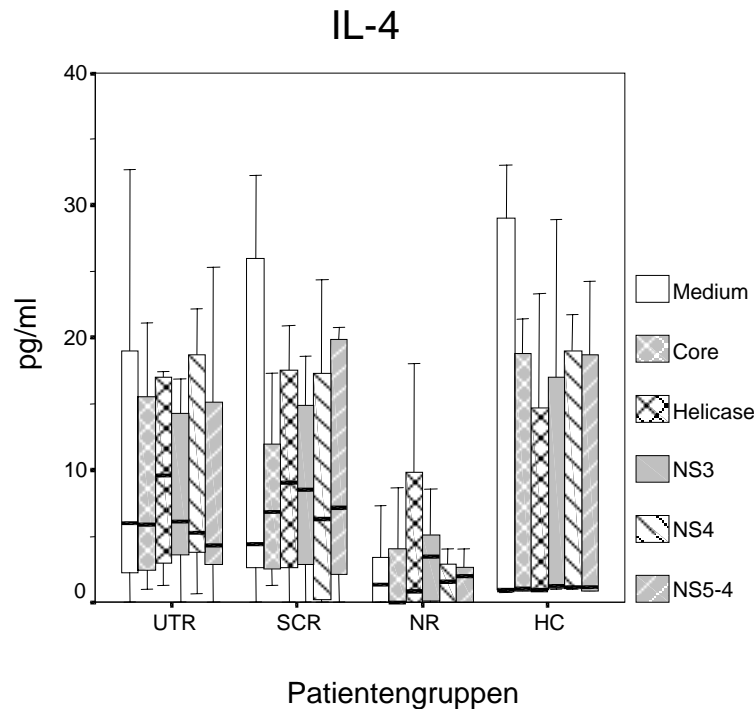
### 3.2. Zytokinsekretion von HCV stimulierten PBMC

Die HCV stimulierten T-Helferzellen wurden funktionell durch Messen ihrer Zytokinsekretion in den PBMC Überständen mittels ELISA untersucht. Sowohl die HCV-Antigen stimulierten PBMC von SCR, als auch die PBMC von NR sind charakterisiert durch eine starke IFN- $\gamma$  Sekretion auf eine NS3-spezifische Stimulation im Vergleich zu den UTR und den HC. Im Detail sind die Median-Werte und die 25 und 75 Percentilen: SCR: 29,4 pg/ml (7,6-75,9 pg/ml) vs. NR: 28,4 pg/ml (4,7-41,6 pg/ml),  $p = \text{n.s.}$  vs. UTR: 11,8 pg/ml (2,8-32,9 pg/ml),  $p = \text{n.s.}$  vs. HC: 6,9 pg/ml (2,2-15,2 pg/ml),  $p = 0,05$ . Eine starke IFN- $\gamma$  Sekretion konnte auch nach PBMC Stimulation mit dem Core-Antigen in UTR festgestellt werden (24,6 pg/ml, 3,7-90,0 pg/ml) (Abb. 3a).

**Abb. 3a:** IFN- $\gamma$  Sekretion

Die Zytokinsekretion der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC;  $1 \times 10^5$ ) von Patienten mit anhaltender Therapieresponse (SCR) und Non-Respondern (NR) sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie sowie von unbehandelten HCV-Patienten und gesunden Kontrollen (HC) wurde nach Stimulation mit den rekombinanten HCV-Antigenen Core, Helicase, NS3, NS4 und NS5-4 mittels ELISA bestimmt (pg/ml). Dabei zeigten die HCV-stimulierten PBMC von SCR und NR eine starke IFN- $\gamma$  Sekretion auf eine NS3-spezifische Stimulation im Vergleich zu den UTR und den HC ( $p < 0,05$ ).

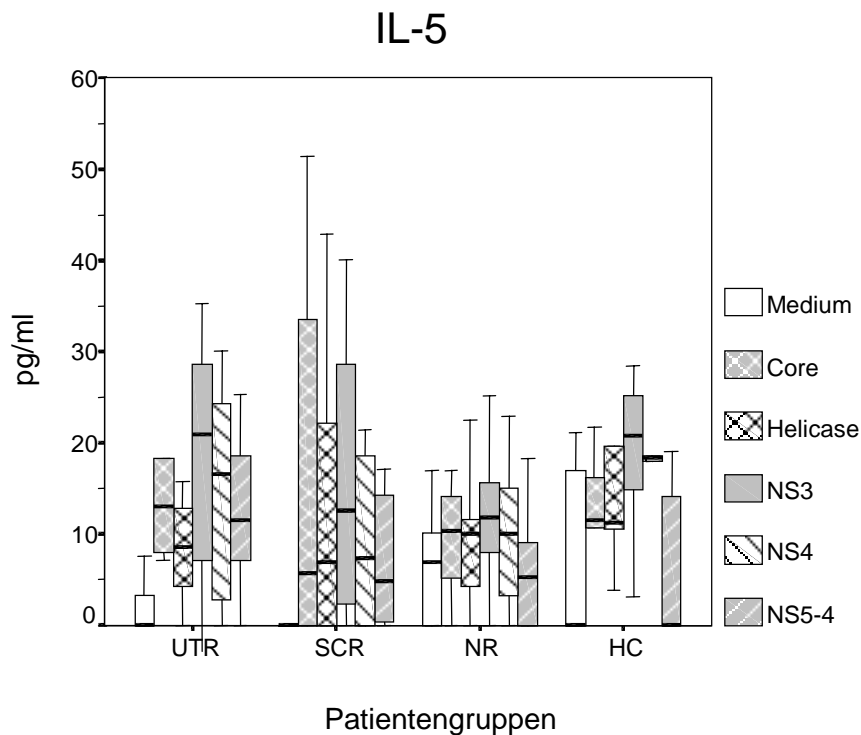
In Hinsicht auf das TH2 Markerzytokin IL-4 konnte eine leicht reduzierte Sekretion in NR PBMC nach Stimulation mit rekombinanten HCV-Antigenen im Vergleich zu den UTR und den SCR festgestellt werden (Abb. 3b). Im Detail sind die Median-Werte und die 25 und 75 Perzentilen: Core: 0,0 pg/ml (0,0-4,0 pg/ml; NR) vs. 5,9 pg/ml (2,2-16,2 pg/ml; UTR),  $p=0,01$  vs. 6,8 pg/ml (82,5-13,2 pg/ml; SCR),  $p=0,02$  vs. 1,0 pg/ml (0,9-20,1 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; Helicase: 0,8 pg/ml (0,0-10,4 pg/ml; NR) vs. 9,6 pg/ml (2,9-16,9 pg/ml; UTR),  $p=n.s.$  vs. 9,1 pg/ml (2,0-17,9 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 0,9 pg/ml (0,9-19,0 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; NS3: 3,5 pg/ml (0,07-5,6 pg/ml; NR) vs. 6,1 pg/ml (3,4-14,7 pg/ml; UTR),  $p=n.s.$  vs. 8,5 pg/ml (1,9-15,2 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 1,3 pg/ml (1,0-22,9 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; NS4: 1,5 pg/ml (0,0-3,4 pg/ml; NR) vs. 5,3 pg/ml (3,6-19,1 pg/ml; UTR),  $p=0,003$  vs. 6,3 pg/ml (80,1-17,8 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 1,1 pg/ml (1,0-20,4 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; NS5-4: 2,0 pg/ml (0,0-2,7 pg/ml; NR) vs. 4,2 pg/ml (2,6-17,1 pg/ml; UTR),  $p=0,01$  vs. 7,1 pg/ml (1,5-20,0 pg/ml; SCR),  $p=0,03$  vs. 1,1 pg/ml (0,9-21,5 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ .

**Abb. 3b:** IL-4 Sekretion

Die Zytokinsekretion der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC;  $1 \times 10^5$ ) von Patienten mit anhaltender Therapieresponse (SCR) und Non-Respondern (NR) sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie sowie von unbehandelten HCV-Patienten und gesunden Kontrollen (HC) wurde nach Stimulation mit den rekombinanten HCV-Antigenen Core, Helicase, NS3, NS4 und NS5-4 mittels ELISA bestimmt (pg/ml). Dabei zeigten die HCV-stimulierten PBMC von NR eine leichte Reduktion der IL-4 Sekretion im Vergleich zu den UTR und den SCR.

Desweiteren sekretierten PBMC von SCR und UTR größere Mengen IL-5 auf Stimulation mit den Antigenen Core, Helicase und NS3 als die PBMC von NR. Diese waren jedoch nicht verschiedenen zu den Grundspiegeln, die in HC festgestellt wurden (Abb. 3c). Im Detail sind die Median-Werte und die 25 und 75 Perzentilen: Core: 5.7 pg/ml (0.0-42.4 pg/ml; SCR); 13.1 pg/ml (7.9-18.3 pg/ml; UTR) vs. 10.4 pg/ml (2.6-14.3 pg/ml; NR),  $p=n.s.$  vs. 11.6 pg/ml (5.4-19.0 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; helicase: 6.9 pg/ml (0.0-26.1 pg/ml; SCR); 8.6 pg/ml (3.2-13.0 pg/ml; UTR) vs. 10.0 pg/ml (2.1-12.5 pg/ml; NR),  $p=n.s.$  vs. 11.2 pg/ml (7.2-19.7 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; NS3: 12.6 pg/ml (1.2-28.6 pg/ml; SCR); 20.9 pg/ml (5.4-29.3 pg/ml; UTR) vs. 11.9 pg/ml (4.1-19.8 pg/ml; NR),  $p=n.s.$  vs. 20.8 pg/ml (9.0-26.8 pg/ml; HC),  $p=n.s.$  (Fig. 3c).

Abb. 3c: IL-5 Sekretion



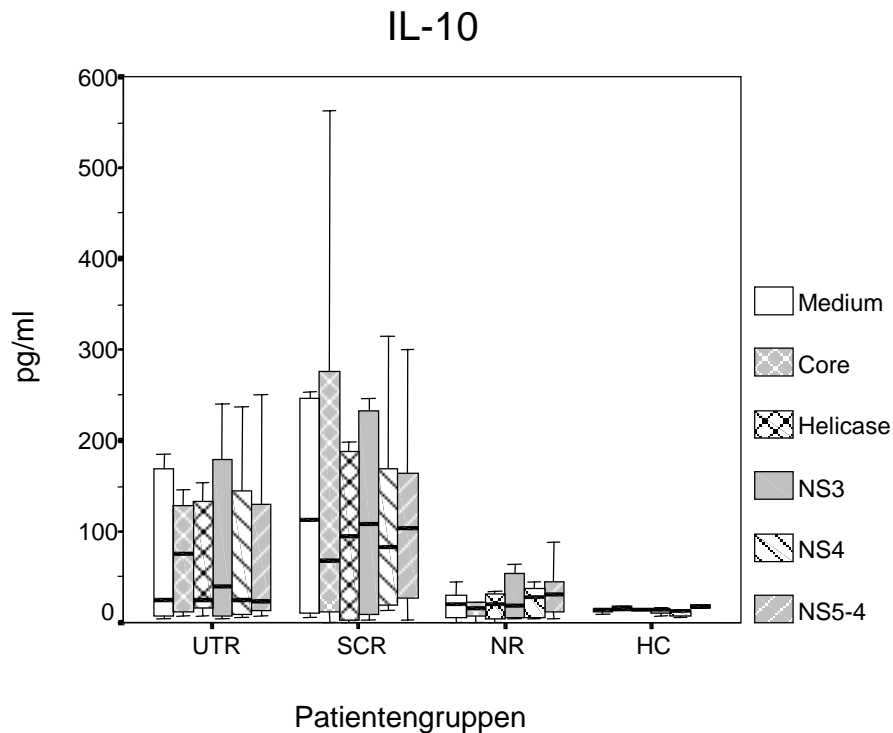
Die Zytokinsekretion der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC;  $1 \times 10^5$ ) von Patienten mit anhaltender Therapieresponse (SCR) und Non-Respondern (NR) sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie sowie von unbehandelten HCV-Patienten und gesunden Kontrollen (HC) wurde nach Stimulation mit den rekombinanten HCV-Antigenen Core, Helicase, NS3, NS4 und NS5-4 mittels ELISA bestimmt (pg/ml). Die IL-5 Produktion offenbarte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen.

Zusätzlich wurde die Sekretion von IL-10, einem weiteren Anti-inflammatorischen TH2 ähnlichem Zytokin, in den Zellkulturüberständen von HCV-Antigen stimulierten PBMC bestimmt. Wiederum konnte eine nicht signifikant verringerte Sekretion von IL-10 in den NR nach Stimulation mit allen HCV-Antigenen im Vergleich zu den UTR und den SCR festgestellt werden (Abb. 3d). Im Detail sind die Median-Werte und die 25 und 75 Perzentilen für Core: 15,9 pg/ml (6,7-37,1 pg/ml; NR) vs. 75,7 pg/ml (10,3-129,7 pg/ml; UTR),  $p=n.s.$  vs. 67,2 pg/ml (11,4-354,6 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 16,1 pg/ml (10,1-17,5 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; Helicase: 20,8 pg/ml (2,3-31,5 pg/ml; NR) vs. 24,4 pg/ml (14,6-133,2 pg/ml; UTR),  $p=n.s.$  vs. 94,8 pg/ml (1,5-193,5 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 14,6 pg/ml (13,8-16,1 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; NS3: 18,8 pg/ml (6,2-54,2 pg/ml; NR) vs. 39,8 pg/ml (6,9-187,2 pg/ml; UTR),  $p=n.s.$  vs. 108,2 pg/ml (7,2-239,6 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 13,9 pg/ml (9,3-15,2 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; NS4: 28,1 pg/ml (5,1-37,2 pg/ml; NR) vs. 24,8 pg/ml (8,8-157,9 pg/ml; UTR),  $p=n.s.$  vs. 83,1 pg/ml (18,6-174,3 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 13,4 pg/ml (6,7-13,7 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; NS5-5: 30,4



pg/ml (10,7-48,4 pg/ml; NR) vs. 23,1 pg/ml (13,7-145,8 pg/ml; UTR),  $p=n.s.$  vs. 103,6 pg/ml (22,2-168,0 pg/ml, SCR),  $p=n.s.$  vs. 17,4 pg/ml (12,5-18,9 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ .

**Abb. 3d:** IL-10 Sekretion

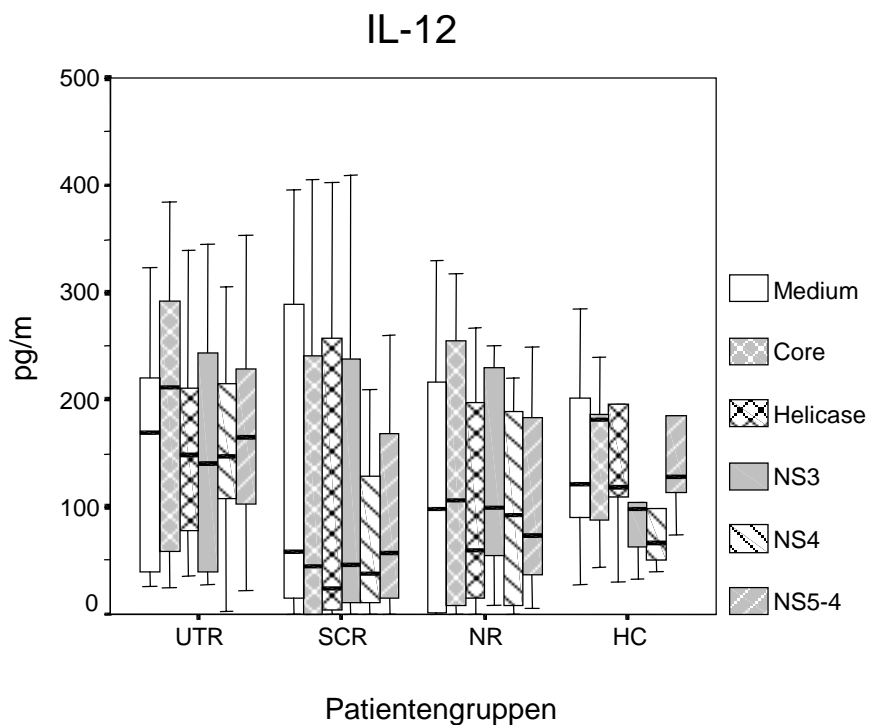


Die Zytokinsekretion der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC;  $1 \times 10^5$ ) von Patienten mit anhaltender Therapieresponse (SCR) und Non-Respondern (NR) sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie sowie von unbehandelten HCV-Patienten und gesunden Kontrollen (HC) wurde nach Stimulation mit den rekombinanten HCV-Antigenen Core, Helicase, NS3, NS4 und NS5-4 mittels ELISA bestimmt (pg/ml). Dabei zeigten die NR nach Stimulation mit allen HCV-Antigenen im Vergleich zu den UTR und den SCR eine verringerte IL-10 Sekretion.

Zum Schluß wurde die Sekretion von IL-12 durch Antigen präsentierende Zellen innerhalb der PBMC analysiert, da dieses Zytokin möglicherweise eine regulatorische Rolle spielt bei einer Veränderung der zellulären Immunantwort in Richtung eines TH1 Zytokinprofils. Es konnten allerdings keine Unterschiede bei der Stimulation mit den rekombinanten HCV-Antigenen zwischen UTR, SCR, NR und HC festgestellt werden (Abb. 3e). Im Detail sind die Median-Werte und die 25 und 75 Perzentilen für Core: 212,0 pg/ml (50,3-313,5 pg/ml; UTR) vs. 45,2 pg/ml (0,0-306,6 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 105,6 pg/ml (4,2-261,1 pg/ml; NR),  $p=n.s.$  vs. 181,5 pg/ml (65,9-213,2 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; Helicase: 149,1 pg/ml (68,0-213,9 pg/ml; UTR) vs. 24,0 pg/ml (1,9-292,3 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 59,4 pg/ml (9,8-221,3 pg/ml; NR),  $p=n.s.$  vs. 118,2 pg/ml (69,6-267,7 pg/ml; HC),  $p=n.s.$ ; NS3: 139,9 pg/ml (40,1-264,8 pg/ml; UTR) vs. 45,3 pg/ml (6,4-289,9 pg/ml; SCR),  $p=n.s.$  vs. 99,7 pg/ml (53,0-233,3 pg/ml; NR),

p=n.s. vs. 97,7 pg/ml (48,0-155,0 pg/ml; HC), p=n.s.; NS4: 147,1 pg/ml (92,7-221,9 pg/ml; UTR) vs. 37,5 pg/ml (5,8-132,4 pg/ml; SCR), p=n.s. vs. 93,1 pg/ml (6,5-193,1 pg/ml; NR), p=n.s. vs. 66,6 pg/ml (45,1-144,8 pg/ml; HC), p=n.s.; NS5-4: 165,0 pg/ml (93,0-259,6 pg/ml; UTR) vs. 56,8 pg/ml (13,1-194,9 pg/ml; SCR), p=n.s. vs. 73,6 pg/ml (36,8-186,8 pg/ml; NR), p=n.s. vs. 127,5 pg/ml (93,7-315,4 pg/ml; HC), p=n.s..

**Abb. 3e:** IL-12 p70 Sekretion



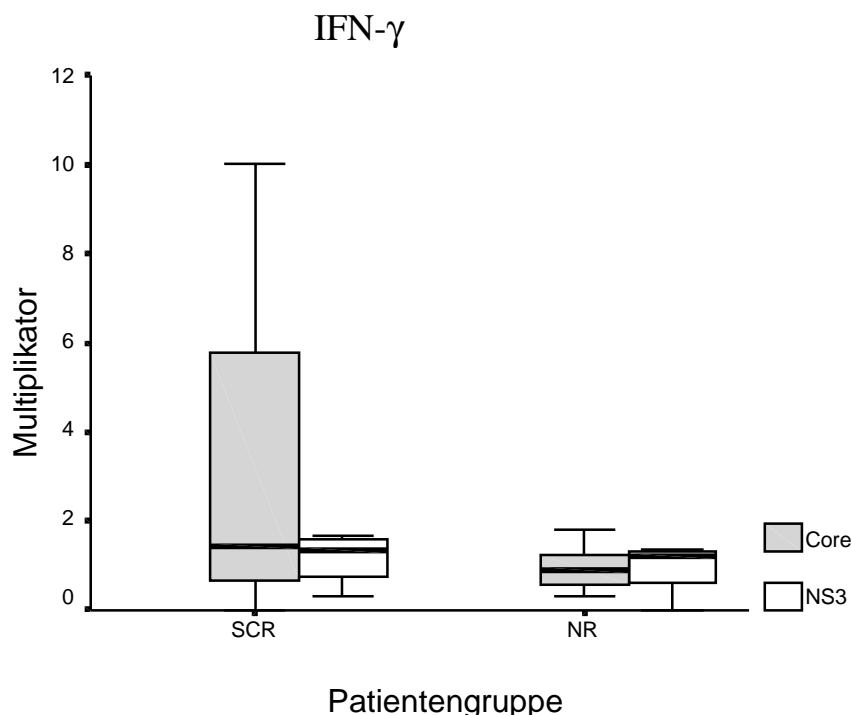
Die Zytokinsekretion der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC;  $1 \times 10^5$ ) von Patienten mit anhaltender Therapiereponse (SCR) und Non-Respondern (NR) sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie sowie von unbehandelten HCV-Patienten und gesunden Kontrollen (HC) wurde nach Stimulation mit den rekombinanten HCV-Antigenen Core, Helicase, NS3, NS4 und NS5-4 mittels ELISA bestimmt (pg/ml). Dabei zeigten die HCV-stimulierten PBMC von allen Patientengruppen keine Unterschiede bei der Sekretion des Zytokins IL-12 p70.

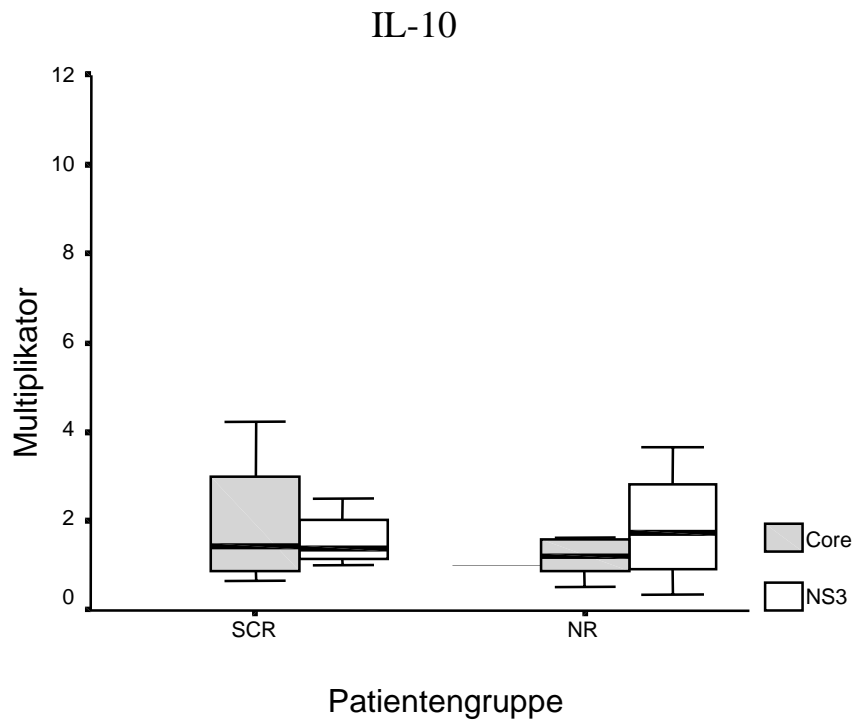
### 3.3. Nachweis intrazellulärer Zytokine mittels Durchflußzytometrie

Um zur proliferativen Antwort und der daraus resultierenden Zytokinsekretion detailliertere Informationen über die Frequenzen der Zytokin-produzierenden-T-Zellen zu erhalten, wurde die sehr sensitive Methode des intrazellulären Zytokin Nachweises mittels Durchflußzytometrie eingesetzt. Von fünf SCR und sieben NR wurden die CD4<sup>+</sup> T Zellen nach Stimulation mit den HCV-Antigenen Core und NS3 auf die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-10 gefärbt.

Hinsichtlich der IFN- $\gamma$  sekretierenden TH1 Zellen hatten die SCR eine nicht signifikant höhere Frequenz von HCV-Core und NS3 spezifischen T-Zellen verglichen mit den NR. Im Detail waren die Medianwerte und die 25/75 Perzentilen für Core: 0,49 % (0,18-0,9 %; SCR) vs. 0,09 % (0,06-0,26 %; NR), p=n.s.; NS3: 0,3 % (0,18-0,45 %; SCR) vs. 0,07 % (0,06-0,26 %; NR), p=n.s.). Die Frequenzen der IL-10 sezernierenden TH2-Zellen zeigten eine sehr ähnliche Verteilung zwischen den SCR und den NR auf Stimulation mit den Antigenen Core und NS3. Im Detail waren die Medianwerte und die 25/75 Perzentilen für Core: 0,56 % (0,3-0,83 %; SCR) vs. 0,4 % (0,29-0,83 %; NR), p=n.s.; NS3: 0,47 % (0,25-1,0 %; SCR) vs. 0,51 % (0,33-0,86 %; NR), p = n.s. (Abb. 4).

**Abb.4:** Intrazelluläre Zytokin Färbung



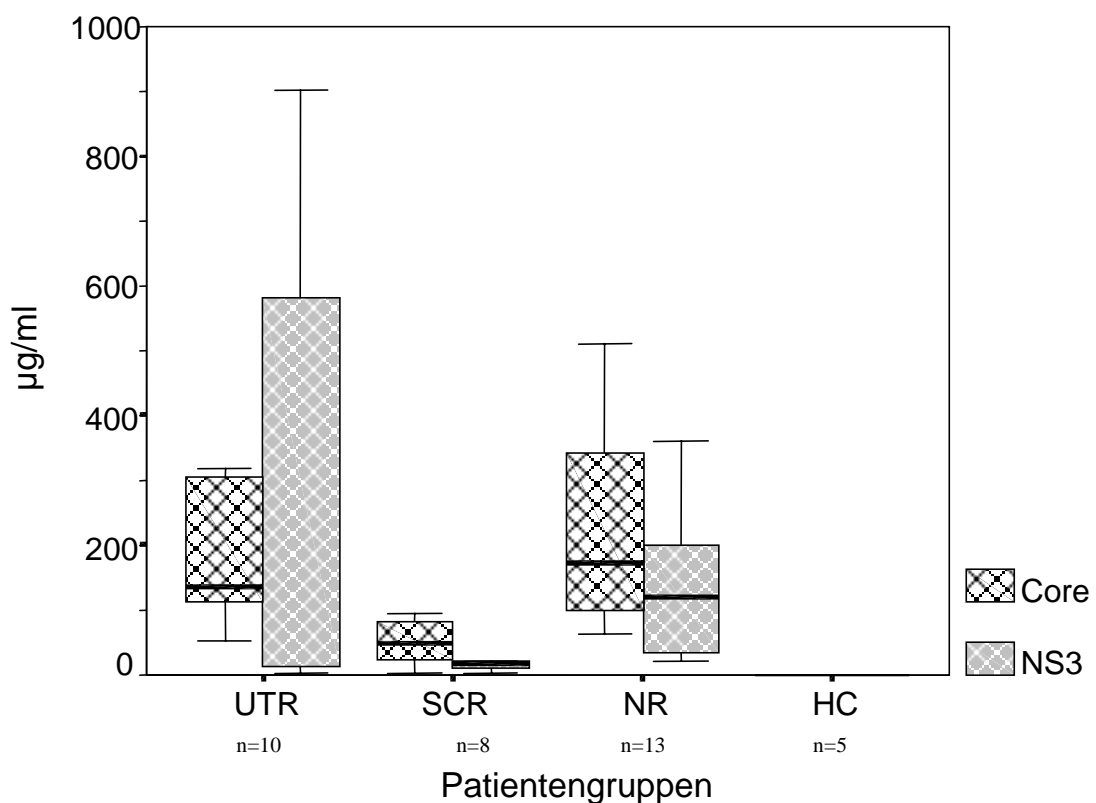


Zur Bestimmung der intrazellulären Zytokinsekretion wurden CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten von Patienten mit anhaltender Therapieresponse (SCR) und Therapie Non-Respondern (NR) sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie im Verhältnis 10:1 für 24h mit den rekombinaten HCV-Antigenen Core (Abb. A) und NS3 (Abb. B) stimuliert und anschließend die Anzahl der Zytokin-sekretierenden CD4+ Zellen bestimmt. Hinsichtlich der IFN- $\gamma$  sekretierenden TH1 Zellen hatten die SCR eine nicht signifikant höhere Frequenz von HCV-Core und NS3 spezifischen T Zellen gegenüber den NR. Die Frequenzen der IL-10 sezernierenden TH2 Zellen zeigten eine sehr ähnliche Verteilung zwischen den SCR und den NR auf Stimulation mit den Antigenen Core und NS3.

### 3.4. Quantitative Anti-HCV Antikörperanalyse und IgG Subklassenbestimmung

Bei der quantitativen Anti-HCV Antikörperanalyse konnten in den gesunden Kontrollen durch den Einsatz eines „Inhouse“ ELISAs keine Anti-HCV Antikörper nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Anti-HCV Antikörper in den chronischen HCV Patienten zeigte signifikant geringere absolute Mengen von Core und NS3 spezifischen Antikörpern in SCR im Vergleich zu den NR und UTR (Median und 25/75 Perzentilen); Core: 49,8  $\mu\text{g/ml}$  (21,7-87,9  $\mu\text{g/ml}$ ; SCR) vs. 171,2  $\mu\text{g/ml}$  (96,5-398,5  $\mu\text{g/ml}$ ; NR),  $p = 0,006$  vs. 135,1  $\mu\text{g/ml}$  (53-1214  $\mu\text{g/ml}$ ; UTR),  $p = 0,009$ ; NS3: 16,9  $\mu\text{g/ml}$  (6,9-21,2  $\mu\text{g/ml}$ , SCR) vs. 121,0  $\mu\text{g/ml}$  (30,2-279,9  $\mu\text{g/ml}$ ; NR),  $p < 0,001$  vs. 93,5  $\mu\text{g/ml}$  (12,2-625,9  $\mu\text{g/ml}$ , UTR),  $p = \text{ns}$ . (Abb. 5a).

**Abb.5a:** Quantitative Anti-HCV Antikörperanalyse

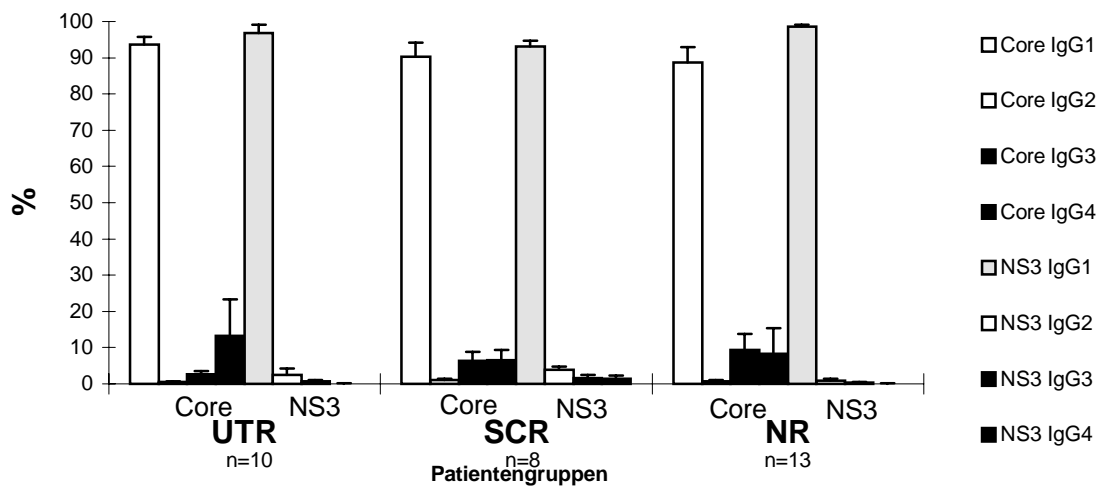


Die quantitative Analyse der Anti-HCV Core und NS3 spezifischen Antikörper aus dem Serum von Patienten mit anhaltender Therapieresponse (SCR) und Non-Respondern (NR) sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie sowie unbehandelten HCV-Patienten und gesunden Kontrollen (HC) zeigte eine signifikant geringere absolute Mengen von Core und NS3 spezifischen Antikörpern in SCR im Vergleich zu den NR und UTR. In den gesunden Kontrollen konnten keine Anti-HCV spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der relativen HCV-spezifischen Antikörper IgG Subklassenverteilung zeigte sich, daß mehr als 90% der Core und NS3 spezifischen Antikörper dem Subtyp IgG1 angehören. Antikörper vom Subtyp IgG2 konnten überhaupt nicht detektiert werden und nur geringe Mengen der Subtyp-Antikörper IgG3 und IgG4 waren in einigen Patientenseren detektierbar (Abb. 5b).

Zusätzlich, waren die absoluten Konzentrationen der HCV-Core und NS3 spezifischen IgG1 Antikörper signifikant geringer in den SCR gegenüber den NR und UTR (Median und 25/75 Perzentilen); Core: 40,9 µg/ml (20,3-85,2 µg/ml, SCR) vs. 120,0 µg/ml (85,8-373,2 µg/ml; NR),  $p=0,006$  vs. 132,4 µg/ml (90,8-300,0 µg/ml; UTR),  $p=0,016$ ; NS3: 15,8 µg/ml (6,5-19,8 µg/ml; SCR) vs. 120,0 µg/ml (29,6-279,3 µg/ml; NR),  $p<0,001$  vs. 92,4 µg/ml (11,8-625,3 µg/ml; UTR),  $p=n.s.$

**Abb. 5b:** HCV-spezifische IgG Subklassenverteilung



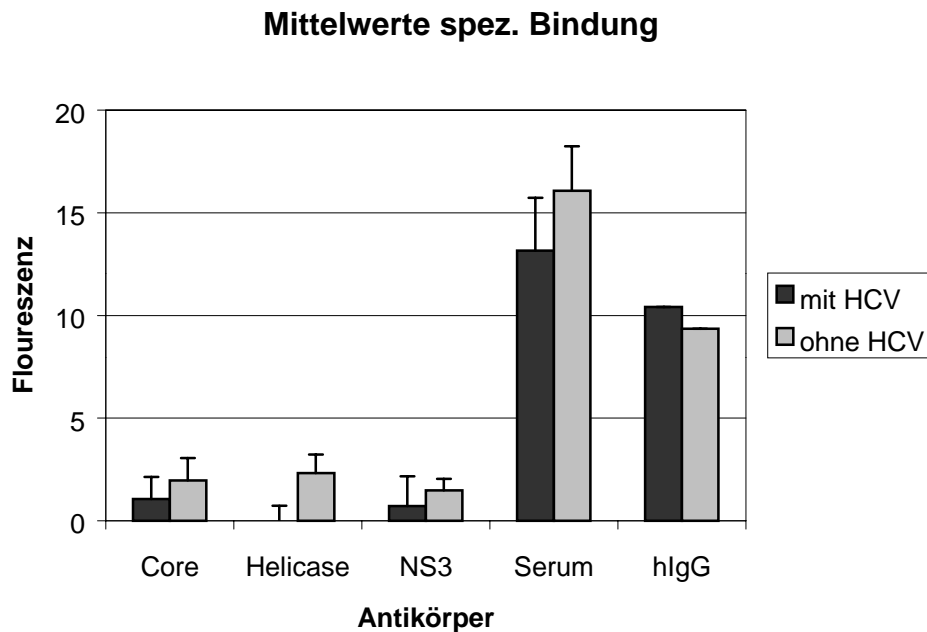
Die quantitative Analyse der Anti-HCV Core und NS3 spezifischen IgG Subklassenverteilung im Serum von Patienten mit anhaltender Therapiereponse (SCR), Non-Respondern (NR) sechs Monate nach IFN- $\alpha$  Therapie und unbehandelten HCV-Patienten zeigte, daß mehr als 90% der Core und NS3 spezifischen Antikörper dem Subtyp IgG1 angehören. Antikörper vom Subtyp IgG2 konnten überhaupt nicht detektiert werden und nur geringe Mengen der Subtyp-Antikörper IgG3 und IgG4 waren detektierbar in einigen Patientenseren. Zusätzlich waren die absoluten Konzentrationen der HCV-Core und NS3 spezifischen IgG1 Antikörper signifikant geringer in den SCR gegenüber den NR und UTR.

### **3.5. Bindung von Anti-HCV Antikörpern an Zielzellen**

Eine Grundvoraussetzung, um eine Antikörper vermittelte Lyse ablaufen zu lassen, ist die Bindung der spezifischen Antikörper an die Zielzelle. Aus diesem Grund wurde bestimmt, in welchem Umfang die HCV-spezifischen Antikörper, die für die Bestimmung der ADCC und Komplement vermittelte Lyse eingesetzt wurden an entsprechende Zielzellen binden. Als Zielzellen wurden entweder Hepatitis C Virus freie oder infizierte Molt-4 Zellen eingesetzt. Zusätzlich wurden UHCV-11 Zellen eingesetzt, die in Abhängigkeit der Zusammensetzung des Mediums HCV Proteine exprimieren. Für die weiteren Versuche wurden sowohl die aus Patientenserum Antigen spezifisch aufgereinigten Anti-HCV Antikörper als auch die Patientenseren selbst mit den Zielzellen inkubiert und mittels Fluoreszenz markiertem Zweitantikörper die gebundenen Antikörper detektiert und im Durchflußzytometer die Bindung nachgewiesen.

#### **3.5.1. Bindung von Anti-HCV Antikörpern an UHCV-11 Zellen**

Bei der Bestimmung der Anti-HCV-Antikörper Bindungskapazität an UHCV-11 Zellen zeigte sich, daß die Antigen-spezifisch aufgereinigten Antikörper nur in einem sehr geringen Umfang an die UHCV-11 Zellen binden im Vergleich zur negativen Kontrolle bestehend aus humanen Antikörpern von gesunden Spendern. Zwischen den HCV-Protein exprimierenden Zellen und den HCV-Protein freien Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede unabhängig von der Antigen-Spezifität der Antikörper festgestellt werden (Abb. 6). Bei den Antikörpern aus den entsprechenden Patientenseren konnte eine stärkere Bindung an die UHCV-11 Zellen beobachtet werden im Vergleich zu den aufgereinigten HCV-spezifischen Antikörpern. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen HCV-Antigen produzierenden und nicht produzierenden Zellen festgestellt werden (Abb. 6).

**Abb. 6:** Bindung aufgereinigter Anti-HCV Antikörpern an UHCV-11 Zellen

Zur Bestimmung der Bindung von Anti-HCV Antikörpern an UHCV-11 Zellen wurden sowohl die affinitätsgereinigten Anti-HCV Antikörper, als auch Patientenseren zu UHCV-11 Zellen gegeben, die entweder HCV Proteine exprimierten oder HCV Protein frei waren. Mit Hilfe von Fluoreszenz markierten Anti-Human Ig Antikörpern wurden die gebundenen Antikörper detektiert und mittels Durchflußzytometrie die unterschiedlichen Bindungskapazitäten bestimmt. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede in der Bindungskapazität zwischen den Zellen mit und ohne HCV Proteinen.

### 3.5.2. Bindung von Anti-HCV Antikörper an Molt-4 Zellen

In einem weiteren Ansatz wurde die Bindung der HCV-spezifischen Antikörper an die T-Zelllinie Molt-4 untersucht, die entweder mit dem Hepatitis C Virus infiziert wurde oder zur Kontrolle virusfrei gehalten wurde.

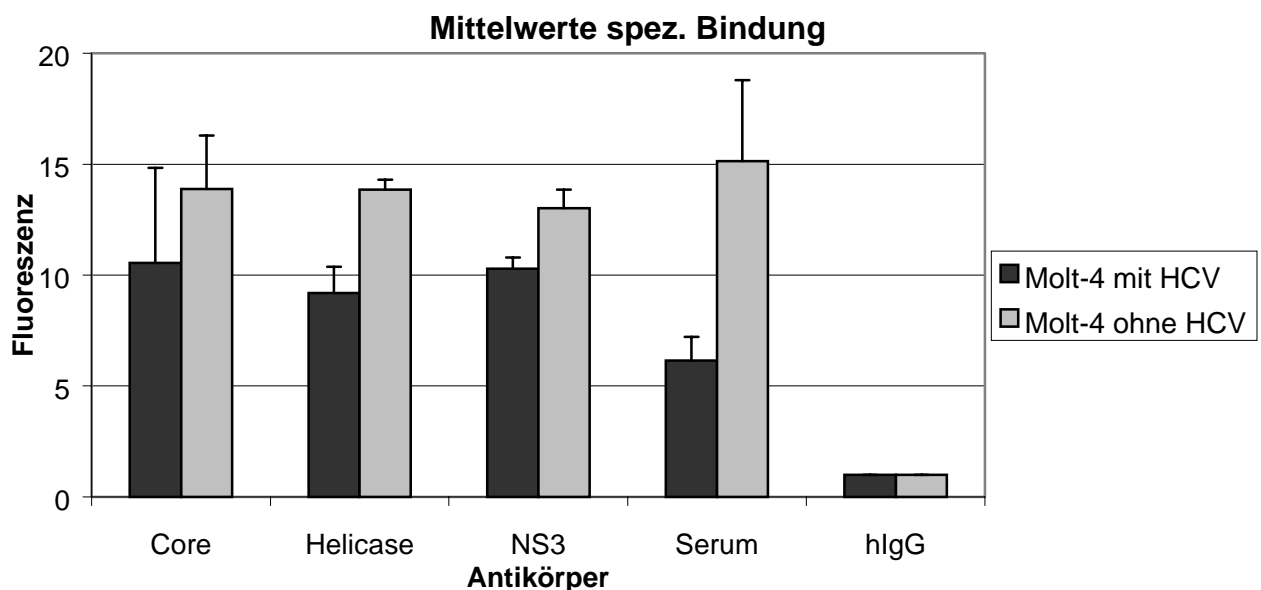
Zu diesem Zweck wurden sowohl die aufgereinigten Anti-HCV Antikörper als auch die Patientenseren mit den Zielzellen inkubiert und mittels Fluoreszenz-markiertem Zweit-Antikörper detektiert und im FACS die Bindung nachgewiesen.

Dabei zeigte sich, daß die Antigen-spezifisch aufgereinigten Antikörper nur in einem sehr geringen Umfang an die mit Hepatitis C Virus beladenen Molt-4 Zellen binden. Im Vergleich zu den unspezifischen Antikörpern zeigten die aufgereinigten Anti-HCV Antikörper eine stärkere Bindung an die Molt-4 Zellen, sowohl bei den unbeladenen als auch bei den mit Hepatitis C Virus beladenen Zellen. Im weiteren Vergleich zwischen den beladenen und den



unbeladenen Molt-4 Zellen zeigte sich bei den nicht infizierten Zellen eine nicht signifikant höhere spezifische Bindung der aufgereinigten Anti-HCV Antikörper im Vergleich zu den infizierten Zellen. Dieser Unterschied findet sich sowohl bei den Anti-HCV Core Antikörpern als auch bei den Antikörpern spezifisch für die Antigene Helicase und NS3 wieder. Einen etwas größeren Unterschied erhält man beim Einsatz von Anti-HCV Antikörper-haltigem Serum zwischen den mit dem Hepatitis C-Virus infizierten Molt-4 Zellen und den nicht infizierten Zellen.

**Abb. 7:** Bindung aufgereinigter Anti-HCV Antikörper an Molt-4 Zellen



Zur Bestimmung der Bindung von Anti-HCV Antikörpern an Molt-4 Zellen wurden sowohl die affinitätsgereinigten Anti-HCV Antikörper als auch Patientenserum zu Molt-4 Zellen gegeben, die entweder mit dem HC Virus infiziert wurden oder HCV frei gehalten wurden. Mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Anti-Human Ig Antikörpern wurden die gebundenen Antikörper detektiert und mittels Durchflußzytometrie die unterschiedlichen Bindungskapazitäten bestimmt. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede in der Bindungskapazität zwischen den Zellen mit und ohne HCV Proteinen. Dabei zeigte sich, daß die Antigen-spezifisch aufgereinigten Antikörper nur in einem sehr geringen Umfang an die mit Hepatitis C Virus beladenen Molt-4 Zellen binden. Im Vergleich zu den unspezifischen Antikörpern zeigten die aufgereinigten Anti-HCV Antikörper eine stärkere Bindung an die Molt-4 Zellen, sowohl bei den unbeladenen als auch bei den mit Hepatitis C Virus beladenen Zellen.

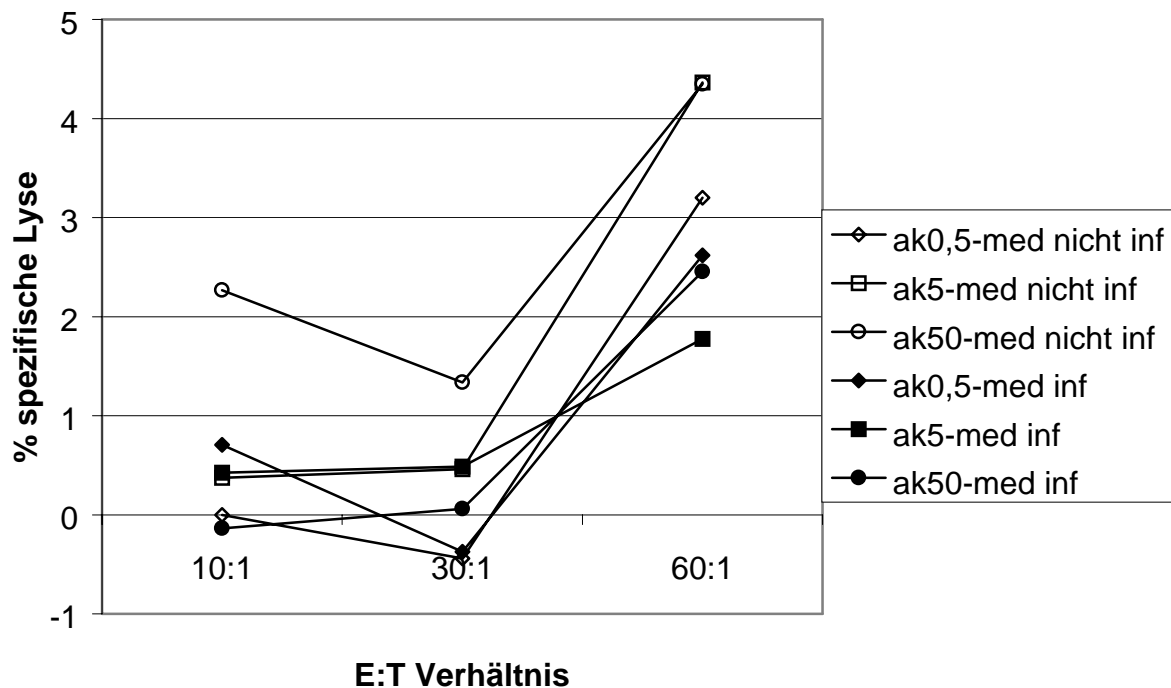
---

### **3.6. Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) vermittelt durch Anti-HCV Antikörper**

Eine Art der Antikörper-vermittelten Lyse ist die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Bei dieser Form der Zytotoxizität wird der spezifisch auf der Zielzelle gebundene Antikörper durch den Fc-Rezeptor der NK-Zelle erkannt und die NK-Zelle erhält so die Möglichkeit die Zielzelle zu lysieren.

#### **3.6.1. ADCC bei Molt-4 und Daudi Zellen vermittelt durch Anti-HCV Antikörper**

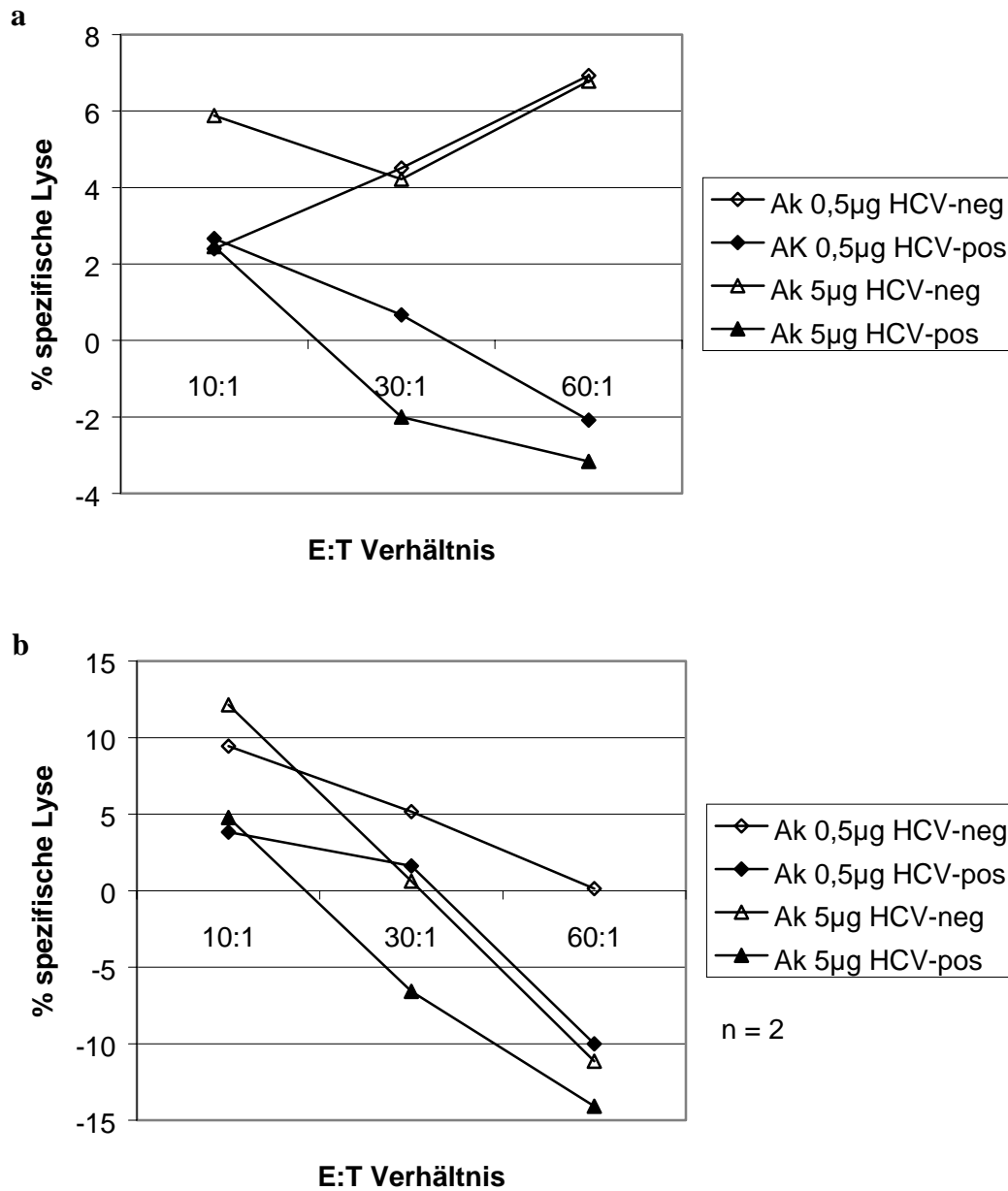
Zur Bestimmung einer möglichen Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität vermittelt durch Anti-HCV Antikörper wurden sowohl Daudi- als auch Molt-4 Zellen mit dem Hepatitis C Virus infiziert oder zur Kontrolle virusfrei gehalten. Dabei zeigte sich unabhängig vom Infektionsstatus und von der eingesetzten Antikörper Konzentration bei den Daudi Zellen eine Zunahme der spezifischen Lyse. Bei den mit dem Hepatitis C Virus infizierten Daudi Zellen zeigte sich eine geringfügig schwächere Lyserate gegenüber den nicht infizierten Zellen. Der Einsatz von verschiedenen Antikörperkonzentrationen erbrachte keine signifikanten Unterschiede bei der spezifischen Lyse (Abb.8).

**Abb. 8:** ADCC mit Anti-HCV Core Antikörpern bei Daudi Zellen

Zur Bestimmung der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC), vermittelt durch Anti-HCV Core Antikörper bei Daudi Zellen wurden HCV infizierte und virusfreie Daudi Zellen ( $1 \times 10^3$ /Test) mit radioaktivem Chrom  $^{51}\text{[Cr]}$  beladen und mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen und verschiedenen Mengen NK-Zellen (CD56+) für 4h inkubiert. Dabei zeigte sich unabhängig vom Infektionsstatus und von der eingesetzten Antikörperkonzentration bei den Daudi Zellen eine Zunahme der spezifischen Lyse. Bei den mit dem Hepatitis C Virus infizierten Daudi Zellen zeigte sich eine geringfügig schwächere Lyserate gegenüber den nicht infizierten Zellen.

Beim Einsatz der Molt-4 Zellen in das ADCC *in vitro* Testsystem mit Anti-HCV Core Antikörpern zeigte sich eine geringe Abnahme der Antikörper spezifischen Lyse bei den infizierten Zellen bei zunehmender E:T Ratio. Bei den HCV-negativen Zellen konnte hingegen eine leichte Zunahme der Lyse detektiert werden bei zunehmender E:T Ratio (Abb. 9a).

Bei den HCV-Helicase Antikörpern zeigte sich sowohl bei den infizierten Zellen als auch bei den nicht infizierten Zellen eine Abnahme der Antikörper spezifischen Lyserate bei zunehmender E:T Ratio. Diese Abnahme zeigte keine Korrelation mit der Antikörperkonzentration (Abb.9b).

**Abb. 9:** ADCC mit Anti-HCV Antikörpern bei Molt-4 Zellen

Zur weiteren Bestimmung der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) vermittelt durch Anti-HCV Core und Helicase Antikörper bei Molt-4 Zellen wurden HCV infizierte und virusfreie Molt-4 Zellen ( $1 \times 10^3$ /Test) mit radioaktivem Chrom  $^{51}\text{[Cr]}$  beladen und mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen und verschiedenen Mengen NK-Zellen (CD56+) für 4h inkubiert. Beim Einsatz der Molt-4 Zellen in das ADCC *in vitro* Testsystem mit Anti-HCV Core Antikörpern zeigte sich eine geringe Abnahme der Antikörper spezifischen Lyse bei den infizierten Zellen bei zunehmender E:T Ratio. Bei den HCV-negativen Zellen konnte hingegen eine leichte Zunahme der Lyse detektiert werden bei zunehmender E:T Ratio (Abb. 9a). Bei den HCV-Helicase Antikörpern zeigte sich sowohl bei den infizierten Zellen, als auch bei den nicht infizierten Zellen eine Abnahme der Antikörper spezifischen Lyserate bei zunehmender E:T Ratio. Diese Abnahme zeigte keine Korrelation mit der Antikörperkonzentration (Abb.9b).

### 3.6.2. ADCC bei UHCV-11 Zellen vermittelt durch Anti-HCV Antikörper

Da das ADCC *in vitro* Zellkultursystem mit infizierten B-Zell- und T-Zelllinien keine Vergleichbarkeit bei der Infektionsrate zulässt, wurde in diesem *in vitro* Testsystem die Zelllinie UHCV-11 eingesetzt, die Hepatitis C Proteine exprimiert (Mordpour *et. al.* 1998).

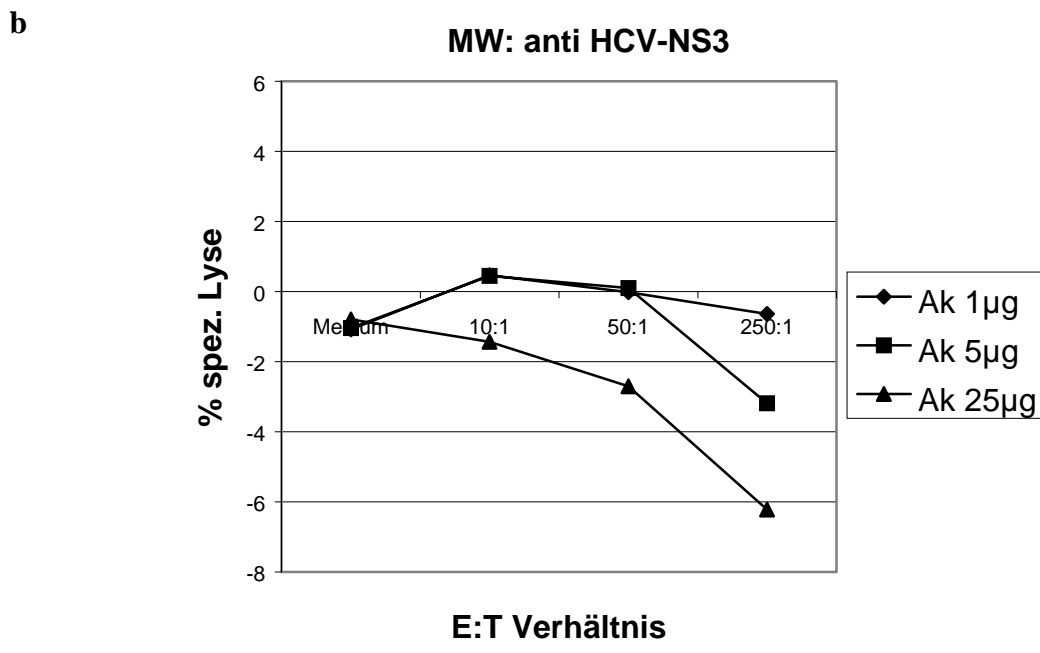
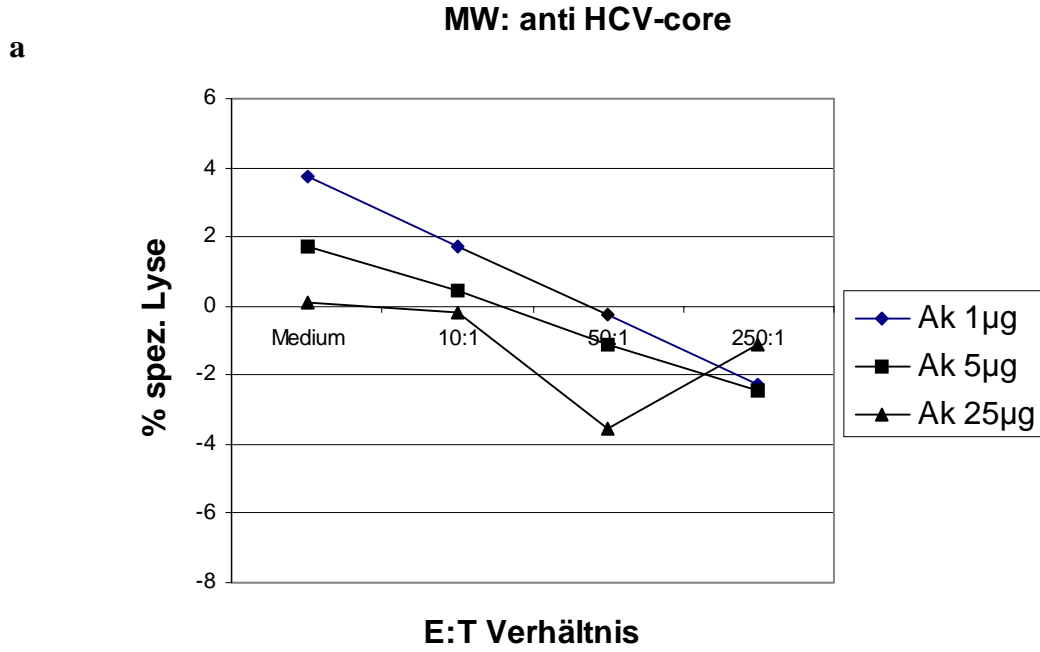
Bei Einsatz der affinitätsgereinigten Anti-HCV-Core Antikörper in das *in vitro* Testsystem zeigte sich eine Abnahme der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) bei zunehmender E:T Ratio ausgehend vom Mediumwert. Auch der Einsatz von verschiedenen Antikörperkonzentrationen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der spezifischen Lyserate (Abb. 10a).

Bei der Zugabe von Anti-HCV-NS3 Antikörpern zeigte sich nur bei den geringeren Antikörperkonzentrationen (1 $\mu$ g und 5 $\mu$ g) eine leichte Zunahme der Lyserate bei den E:T Ratios von 10:1 und 50:1. Bei der Antikörperkonzentration von 25 $\mu$ g konnte nur eine Abnahme der spezifischen Lyse bei zunehmenden E:T Ratios festgestellt werden (Abb. 10b).

Ein ähnliches Bild wie bei den NS3 Antikörpern ergab sich auch bei den Anti-HCV-Helicase Antikörpern. Auch hier zeigte sich nur bei der geringsten Antikörperkonzentration eine leichte Zunahme der spezifischen Lyserate gegenüber dem Mediumwert. Bei der Antikörperkonzentration von 25 $\mu$ g zeigte sich auch hier eine Abnahme der Lyserate (Abb. 10c).

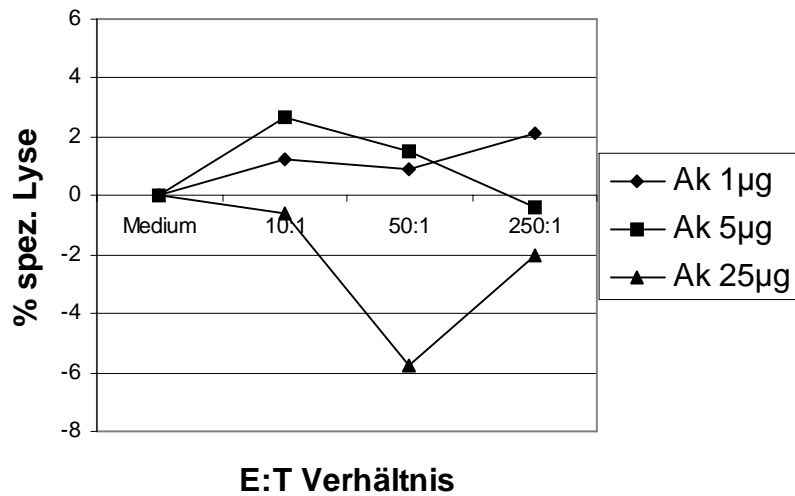
Setzte man das Serum der entsprechenden HCV-Patienten in diesem Testsystem ein, so zeigte sich bei allen Antikörperkonzentrationen eine leichte Zunahme der spezifischen Lyse bis zur E:T Ratio 50:1 ausgehend vom Mediumwert. Bei der E:T Ratio von 250:1 konnte bei keiner Antikörperkonzentration eine Lyseaktivität detektiert werden (Abb. 10d).

**Abb.10:** ADCC mit Anti-HCV Antikörpern bei UHCV-11 Zellen



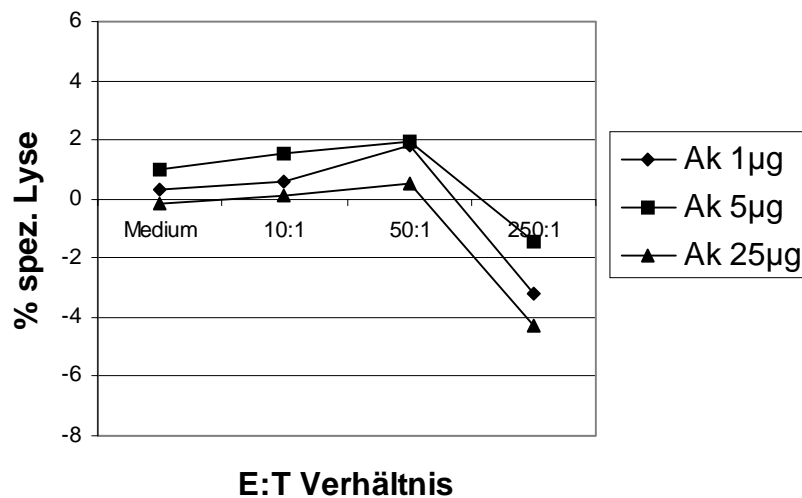
c

## MW: anti HCV-Helicase



d

## MW: HCV-Serum



Zur weiteren Bestimmung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) vermittelt durch Anti-HCV Antikörpern bei UHCV-11 Zellen wurden UHCV-11 Zellen eingesetzt, die entweder HCV-Proteine exprimieren oder HCV-Protein frei waren ( $1 \times 10^3$ /Test) mit radioaktivem Chrom  $^{51}\text{[Cr]}$  beladen und mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen und verschiedenen Mengen PBMC für 4h inkubiert. Bei Einsatz der Anti-HCV-Core Antikörper zeigte sich eine Abnahme der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität bei zunehmender E:T Ratio ausgehend vom Mediumwert. Auch der Einsatz von verschiedenen Antikörperkonzentrationen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der spezifischen Lyserate (Abb. 10a).

Bei Zugabe von Anti-HCV-NS3 Antikörpern zeigte sich nur bei den geringeren Antikörperkonzentrationen (1 µg und 5 µg) eine leichte Zunahme der Lyserate bei den E:T Ratios von 10:1 und 50:1. Bei der Antikörperkonzentration von 25 µg konnte nur eine Abnahme der spezifischen Lyse bei zunehmenden E:T Ratios festgestellt werden (Abb. 10b).

Ein ähnliches Bild wie bei den NS3 Antikörpern ergibt sich auch bei den Anti-HCV-Helicase Antikörpern. Hier zeigte sich nur bei der geringsten Antikörperkonzentration eine leichte Zunahme der spezifischen Lyserate gegenüber dem Mediumwert. Bei der Antikörperkonzentration von 25 µg zeigte sich auch hier eine Abnahme der Lyserate (Abb. 10c).

Setzte man das Serum der entsprechenden HCV-Patienten in diesem Testsystem ein, so zeigt sich bei allen Antikörperkonzentrationen eine leichte Zunahme der spezifischen Lyse bis zur E:T Ratio 50:1 ausgehend vom Mediumwert. Bei der E:T Ratio von 250:1 konnte bei keiner Antikörperkonzentration eine Lyseaktivität detektiert werden (Abb. 10d).

### **3.7. Komplement-vermittelte Lyse durch Anti-HCV Antikörper**

Die Komplement-vermittelte Lyse stellt eine weitere Art der Antikörper-vermittelten Lyse dar. Bei ihr wird durch den Fc-Teil des an die Zielzelle gebundenen spezifischen Antikörpers die Komplementkaskade aktiviert und die Zielzelle lysiert.

#### **3.7.1. Komplement-vermittelte Lyse bei Molt-4 Zellen**

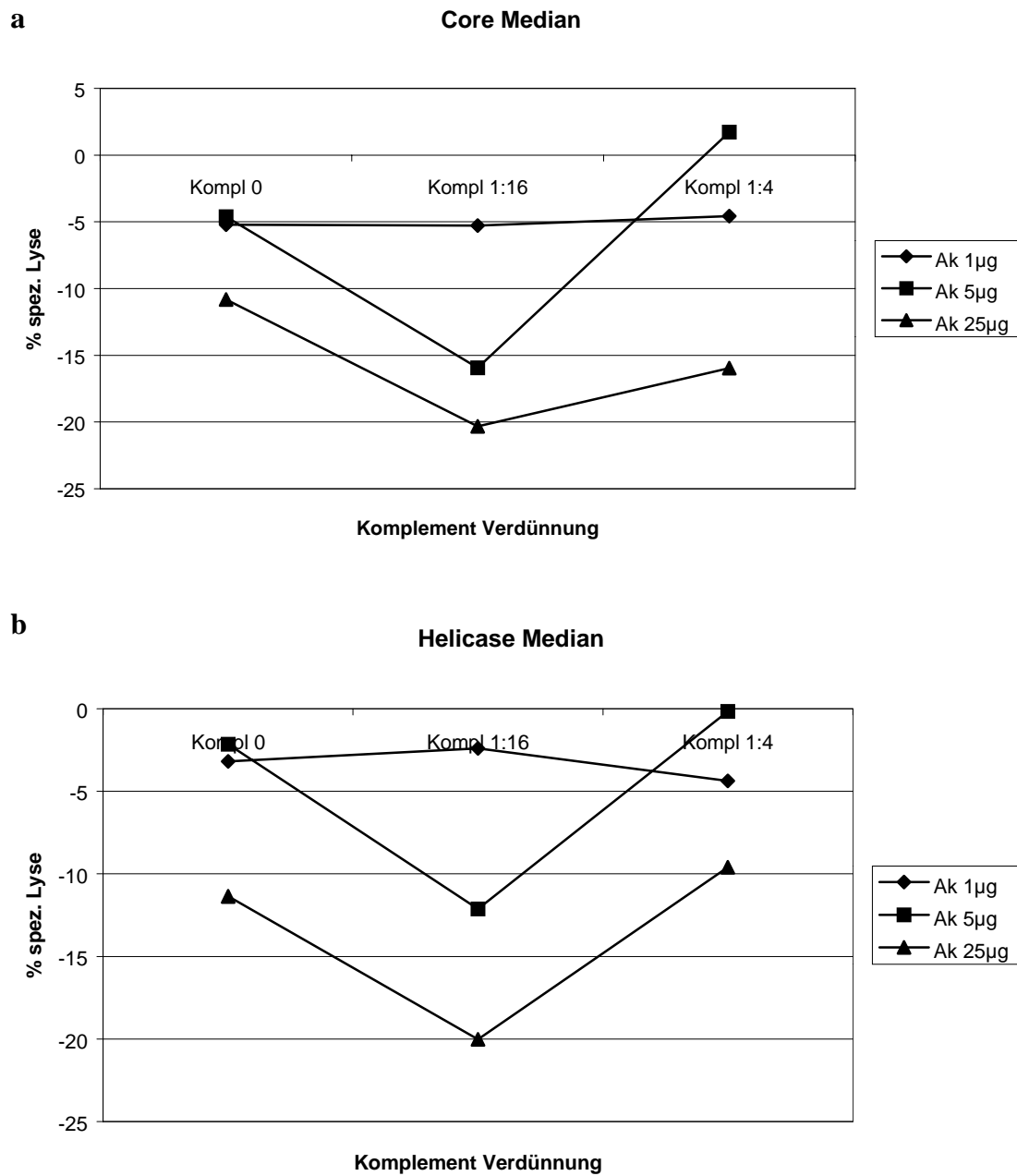
Zur Bestimmung einer möglichen Komplement-vermittelten Lyse durch die Anti-HCV Antikörper bei Molt-4 Zellen, die mit dem Hepatitis C Virus infiziert wurden, wurden affinitätsgereinigte HCV-Antikörper mit bekannter Spezifität in einem *in vitro* Zellkultursystem eingesetzt.

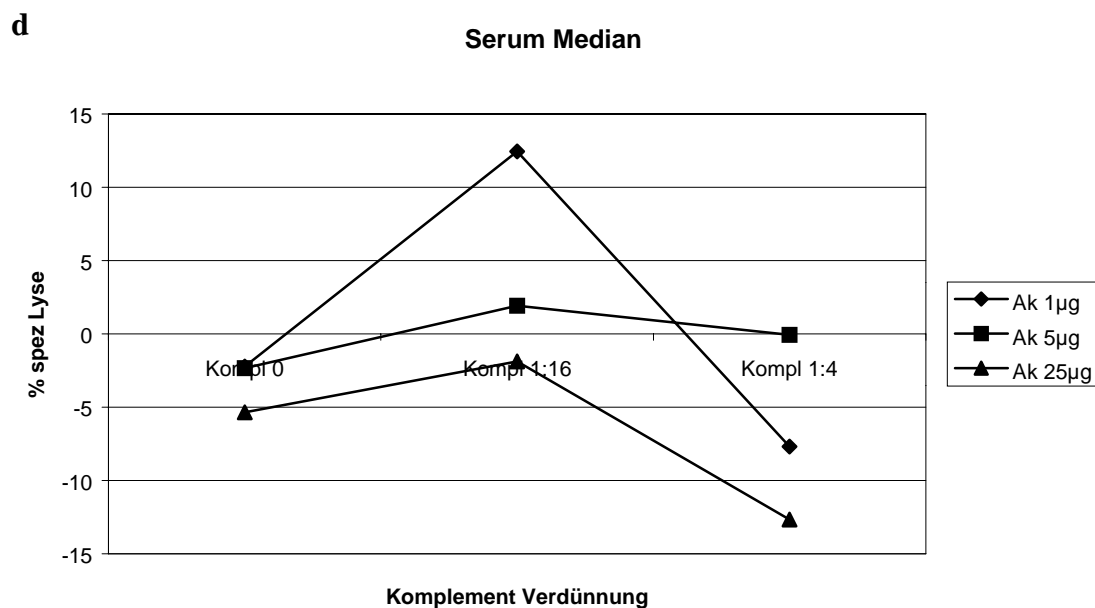
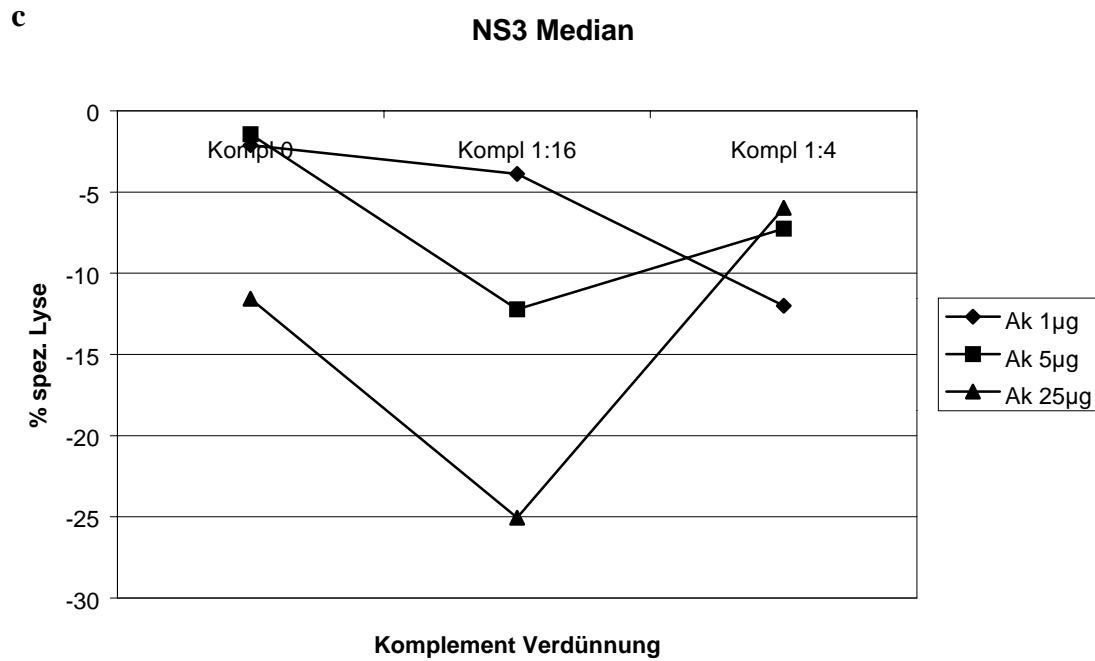
Bei Einsatz der HCV-Core Antikörper konnte keine spezifische Lyse festgestellt werden unabhängig von der Menge der eingesetzten Antikörpermenge. Auch höhere Komplementkonzentrationen zeigten keine Auswirkungen auf die Lyserate (Abb. 11a).

Auch die Zugabe von HCV-Helicase und HCV-NS3 spezifischen Antikörpern führte nicht zu einer spezifischen Komplement-vermittelten Lyse. Wie auch bei den HCV-Core Antikörpern zeigten sowohl höhere Antikörper- als auch höhere Komplementkonzentrationen keine Zunahme der Komplement vermittelten Lyse (Abb. 11 b, c).

Bei Zugabe von Anti-HCV Antikörper-haltigem Serum zeigte sich bei einer Antikörpermenge von 1µl/Well und bei der niedrigen Komplementkonzentration erst eine Zunahme der Komplement-vermittelten Lyse, die aber bei der höchsten Komplementkonzentration wieder auf Mediumwerte abfiel. Bei einer Serummenge von 5µl zeigte sich nur eine schwache Zunahme der Lyserate bei Zunahme der Komplementkonzentration. Bei der höchsten Serummenge zeigte sich keine spezifische Lyse mehr (Abb. 11d).



**Abb. 11:** Komplement vermittelte Lyse bei Molt-4 Zellen durch Anti-HCV Antikörper



Zur Bestimmung der Komplement-vermittelten Lyse vermittelt durch Anti-HCV Antikörper bei Molt-4 Zellen wurden HCV infizierte und virusfreie Molt-4 Zellen ( $1 \times 10^3$ /Test) mit radioaktivem Chrom  $^{51}\text{Cr}$  beladen und mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen und verschiedenen Mengen Komplement für 4h inkubiert. Bei Einsatz der HCV-Core Antikörper konnte keine spezifische Lyse festgestellt werden unabhängig von der eingesetzten Antikörpermenge. Auch höhere Komplementkonzentrationen zeigten keine Auswirkungen auf die Lyserate (Abb. 11a). Die Zugabe von Anti-HCV-Helicase und -NS3 Antikörpern führte nicht zu einer spezifischen Komplement-vermittelten Lyse. Höhere Antikörper- oder höhere Komplementkonzentrationen führten zu keiner Zunahme der Komplement vermittelten Lyse (Abb. 11 b, c). Zugabe von Anti-HCV Antikörper-haltigem Serum zeigte bei der Antikörpermenge von  $1 \mu\text{l}$  und bei der niedrigen Komplementkonzentration eine Zunahme der Komplement-vermittelten Lyse, die bei der höchsten Komplementkonzentration wieder auf Mediumwerte abfiel. Bei einer Serummenge von  $5 \mu\text{l}$ /Test zeigte sich nur eine schwache Zunahme der Lyserate bei Zunahme der Komplementkonzentration. Bei der höchsten Serummenge zeigte sich keine spezifische Lyse mehr (Abb. 11d).

### 3.7.2. Komplement vermittelte Lyse bei UHCV-11 Zellen

Zur Überprüfung einer Komplement-vermittelten Lyse in einem weiteren *in vitro* Testsystem wurden die affinitätsgereinigten Antikörper auf UHCV-11 Zellen eingesetzt.

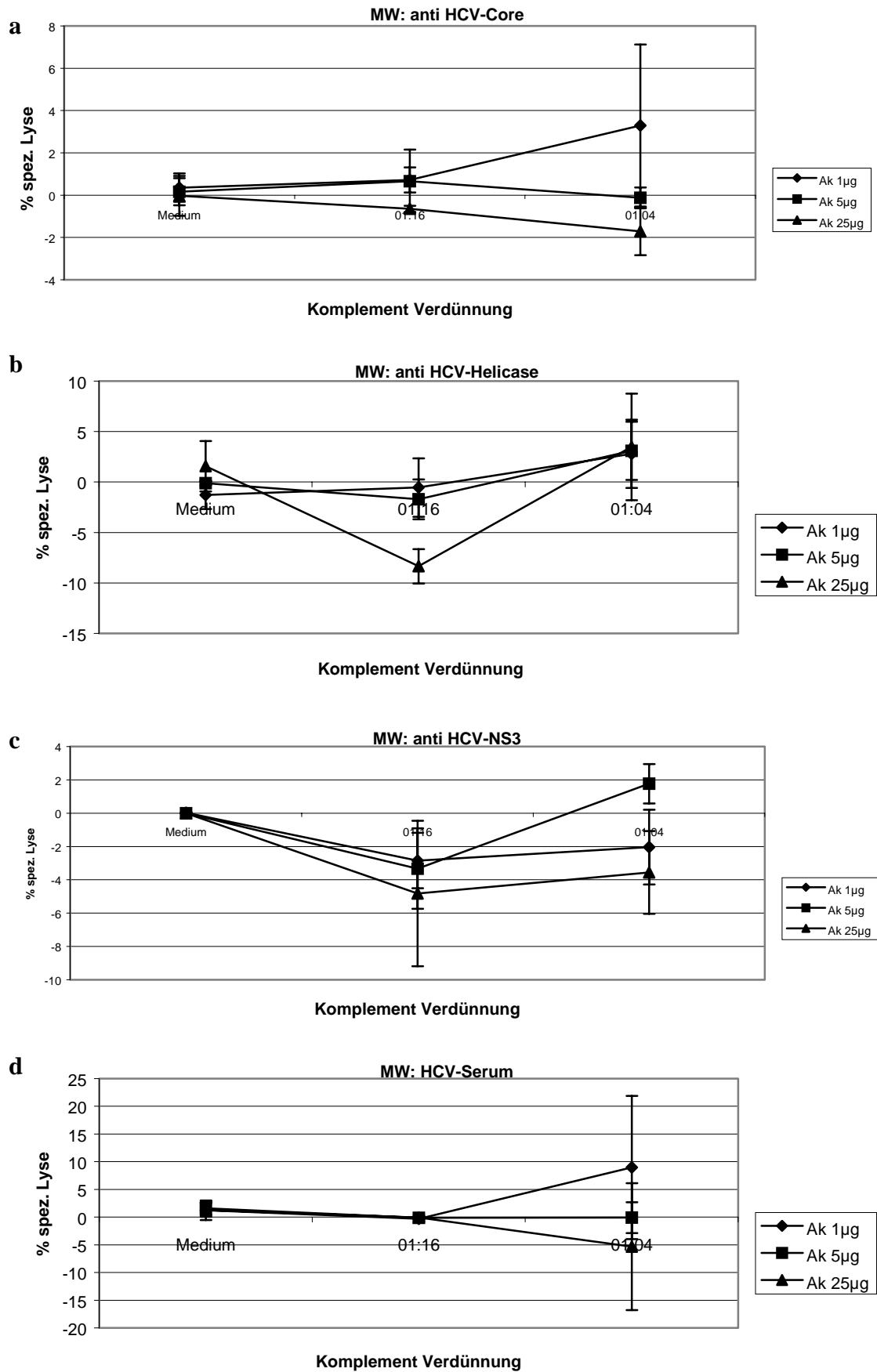
Bei der Anti-HCV-Core Antikörperkonzentration von 1µg/Well zeigte sich bei der höchsten Komplementkonzentration eine geringe Zunahme der spezifischen Lyse. Eine spezifische Lyse konnte auch bei den beiden höheren Antikörperkonzentrationen (5µg/Well und 25µg/Well) nicht detektiert werden (Abb. 12a).

Auch bei den Anti-HCV-Helicase Antikörpern zeigte sich bei der höchsten Komplementkonzentration eine geringe spezifische Lyse. Diese war unabhängig von der Menge der eingesetzten Antikörper (Abb. 12b).

Der Einsatz der Anti-HCV-NS3 Antikörper führte bei der mittleren Antikörperkonzentration (5µg/Well) und auch nicht bei der höchsten Komplementkonzentration zu einer spezifischen Antikörper vermittelten Lyse (Abb. 12c).

Setzt man das Serum von HCV infizierten Patienten in diesem Zellkulturtestsystem ein, so kann man bei geringer Serummenge (1µl) und bei der höchsten Komplementkonzentration eine Zunahme der spezifischen Lyseaktivität detektieren. Bei den beiden höchsten Serumkonzentrationen konnte bei keiner der Komplementkonzentrationen eine spezifische Lyse festgestellt werden (Abb. 12d).

Abb. 12: Komplement vermittelte Lyse bei UHCV-11 Zellen durch Anti-HCV Antikörper



Zur Bestimmung der Komplement-vermittelten Lyse durch Anti-HCV Antikörper bei UHCV-11 Zellen wurden UHCV-11 Zellen eingesetzt, die entweder HCV-Proteine exprimieren oder HCV-Proteinfrei waren ( $1 \times 10^3$ /Test). Diese wurden mit radioaktivem Chrom  $^{51}\text{[Cr]}$  beladen und mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen und verschiedenen Mengen Komplement für 4h inkubiert.

Bei der Anti-HCV-Core Antikörperkonzentration von  $1 \mu\text{g/Well}$  zeigte sich bei der höchsten Komplementkonzentration eine geringe Zunahme der spezifischen Lyse. Eine spezifische Lyse konnte auch bei den beiden höheren Antikörperkonzentrationen ( $5 \mu\text{g/Well}$  und  $25 \mu\text{g/Well}$ ) nicht detektiert werden (Abb. 12a). Bei den Anti-HCV-Helicase Antikörpern zeigte sich bei der höchsten Komplementkonzentration eine geringe spezifische Lyse. Diese war unabhängig von der Menge der eingesetzten Antikörper (Abb. 12b). Der Einsatz der Anti-HCV-NS3 Antikörper führte bei keiner der Antikörper- und Komplementkonzentrationen zu einer spezifischen Antikörper vermittelten Lyse (Abb. 12c). Bei Einsatz des Serums von HCV infizierten Patienten zeigte sich bei geringer Serummenge ( $1 \mu\text{l}$ ) und bei höchster Komplementkonzentration eine Zunahme der spezifischen Lyseaktivität. Bei den beiden höchsten Serumkonzentrationen konnte bei keiner der Komplementkonzentrationen eine spezifischen Lyse festgestellt werden (Abb. 12d).

## Diskussion

Es gibt eine große Zahl von Hinweisen, daß HCV-spezifische T-Helferzellen die antivirale Immunantwort induzieren können durch virusspezifische Klasse I restringierte cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und außerdem können sie die Anti-HCV Antikörper produzierende B-Zellen regulieren. Diese B-Zellen können ebenfalls die antivirale Immunantwort über Zytokine durch Interaktion mit infizierten Hepatozyten modifizieren (Missale *et al.* 1996, Cacciarelli *et al.* 1996 und Koziel *et al.* 1995). Eine andere attraktive Hypothese zur Viruspersistenz fordert ein Ungleichgewicht in der TH1-TH2 Helferzellantwort als kritischen Faktor, der zur Viruspersistenz führt (Fan *et al.* 1998). Diese Daten werden in der Literatur sehr kontrovers diskutiert, was auf den Einsatz von verschiedenen Antigenpräparationen, verschiedene Techniken und nicht sehr gut charakterisierte Patientengruppen zurückzuführen ist (Lechmann *et al.* 1999, Rossol *et al.* 1997 und Tsai *et al.* 1997). In dieser Arbeit wurde die proliferative T-Helferzellantwort in einem Kollektiv von sehr gut charakterisierten Patienten mit unbehandelter chronischer Hepatitis C Infektion oder Patienten, die einer IFN- $\alpha$  Behandlung unterzogen wurden genauso wie in gesunden Kontrollen analysiert. Die Ergebnisse demonstrieren eine signifikant stärkere T-Zellantwort spezifisch für die Hepatitis C Antigene NS3 und Helicase in SCR verglichen mit den anderen Patientengruppen. Die Blockierung der proliferativen T-Zellantwort durch die Zugabe von Anti-HLA Klasse II Antikörpern charakterisierte diese Antwort als CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort. Diese Ergebnisse waren entsprechend zu einer vorangegangenen Verlaufsstudie, die eine Induktion von NS3, NS4 und Helicase spezifischen T-Zellantworten in IFN- $\alpha$  behandelten Patienten mit Viruselimination und bevorzugte Reaktivitäten auf die Antigene Core und NS5 in IFN- $\alpha$  behandelten Nonrespondern zeigte (Löhr *et al.* 1998). Ähnlich starke NS3 und NS4 Antigen spezifische zelluläre Immunantworten konnten in Patienten mit akuter, selbst limitierender HCV-Infektion und in einem geringeren Maße in Patienten, die eine chronische Hepatitis C entwickeln, festgestellt werden (Diepolder *et al.* 1995 und 1997, Ferrari *et al.* 1994). Deshalb erscheint es sehr wahrscheinlich, daß NS3 spezifische T-Helferzellen mit der Viruselimination assoziiert sind und dieses Antigen möglicherweise als Impfkandidat in zukünftigen präklinischen Studien eingesetzt werden kann.

Um die Hypothese vom Ungleichgewicht der TH1-TH2-Helferzellantwort, die möglicherweise eine Viruspersistenz fördert, zu bestätigen, wurden verschiedene TH1- und

TH2-Zytokine in den HCV-Antigen stimulierten PBMC-Überständen analysiert. Dabei konnten signifikant höhere Mengen des Zytokins IFN- $\gamma$  in den PBMC-Überständen von Patienten, die eine IFN- $\alpha$  Therapie erhalten hatten, nachgewiesen werden. Diese hohen IFN- $\gamma$  Spiegel waren unabhängig vom Ausgang der Therapie verglichen mit den unbehandelten chronischen HCV Patienten und den gesunden Kontrollen. Es ist bekannt, daß IFN- $\gamma$  als wichtigstes TH1-Zytokin Klasse I restringierte CTL aktivieren kann und deshalb die Lyse von infizierten Zellen fördert (Cacciarelli *et al.* 1996). Desweiteren ist von experimentellen Hepatitis-B-Infektionsmodellen bekannt, daß IFN- $\gamma$  möglicherweise in der Lage ist intrazelluläre Viren zu inaktivieren, bevor die infizierten Zellen lysiert werden (Guidotti *et al.* 1996 und 1999). Obwohl eine verringerte IFN- $\gamma$  Produktion bei HCV-stimulierten T-Zellen als Faktor für die virale Persistenz diskutiert wird, argumentieren die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse gegen diese Hypothese (Rossol *et al.* 1997 und Tsai *et al.* 1997). Auf der anderen Seite könnte ein verändertes Verhältnis von HCV-stimulierten TH1 zu TH2 Zellen von Bedeutung sein für die hohe Chronifizierungsrate in natürlichen HCV-Infektionen und für die hohe Rate von Therapie-Nichtansprechern nach einer IFN- $\alpha$  Therapie. Dennoch konnten nur geringfügig verringerte Mengen der Zytokine IL-4 und IL-10 in den PBMC Zellkulturüberständen bei IFN- $\alpha$  behandelten „Nonrespondern“ nach HCV-Antigen Stimulation festgestellt werden.

Der Einsatz der hochsensitiven Methode der intrazellulären Zytokinfärbung zeigte höhere Frequenzen IFN- $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit den HCV-Antigenen Core und NS3 in den SCR verglichen mit den NR, wobei die Frequenzen der IL-10 produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von SCR und NR dabei sehr ähnlich waren (Prussin *et al.* 1995 und Waldrop *et al.* 1997). Zusammen mit den Befunden einer starken NS3-spezifischen T-Helferzellantwort deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß IFN- $\gamma$  eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Viruselimination spielt. Zusätzlich wurde die Sekretion von IL-5 untersucht, einem dritten TH2 abhängigen Zytokin, daß die Immunglobulinsynthese bei den B-Zellen fördert (Swain *et al.* 1998). Auch hier konnten keine Unterschiede bei der IL-5 Sekretion zwischen den HCV-infizierten Patientengruppen und den gesunden Kontrollen festgestellt werden. Zum Schluß wurden die Konzentrationen des funktionellen IL-12 p70 Heterodimers in den Überständen der HCV-stimulierten PBMC analysiert. Es zeigten sich dabei aber keine Unterschiede in den IL-12 Spiegeln zwischen den Patienten, die das Virus unter der IFN- $\alpha$  Therapie eliminiert hatten und den Patienten mit chronischer Viruspersistenz. Deshalb erscheint es wahrscheinlich, daß eine unzureichende IL-12 Sekretion, hervorgerufen

durch antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen, einen möglichen Hauptfaktor darstellt für eine unzureichende TH1-Zell-Induktion (Rossol *et al.* 1997). Die gesamte Zytokinanalyse lieferte keine Anhaltspunkte für die Hypothese einer verstärkten TH2-Helferzellstimulation, die mit der viralen Persistenz in chronischen HCV-Infektionen oder dem Nichtansprechen auf eine IFN- $\alpha$  Behandlung korreliert.

Unabhängig vom Ausgang der Therapie bei akuter oder chronischer HCV-Infektion sind die meisten Patienten charakterisiert durch persistierende Anti-HCV-Antikörper im Serum. Dabei ist die pathogenetische Relevanz der humoralen Immunantwort noch unklar (Bled *et al.* 1999). In Übereinstimmung mit kürzlich veröffentlichten Studien zeigte sich eine Korrelation der Anti-HCV-Antikörpersynthese *in vitro* und im Serum mit der Viruspersistenz und dem Nichtansprechen auf eine IFN- $\alpha$  Therapie, denn es konnten signifikant geringere Anti-HCV Antikörperspiegel in den Seren von SCR nachgewiesen werden verglichen mit den Seren von UTR und NR (Löhr *et al.* 1994 und 1996). In experimentellen Modellen konnte gezeigt werden, daß die IgG Subklassenbildung durch verschiedene Zytokine reguliert wird. Dabei scheint es, daß beim Menschen die IgG1 Produktion IL-2 abhängig ist, während die IgG2 Antikörper durch das Zytokin IFN- $\gamma$  reguliert werden. Die Antikörpersubklassen IgG3 und IgG4 sind letztendlich abhängig von TH2 Zytokinen wie IL-4 und IL-5 (Kawano *et al.* 1994 und Kitani *et al.* 1993). Bisher hat nur eine Studie die HCV-spezifische zelluläre Immunantwort zusammen mit der humoralen Immunantwort charakterisiert (Lechmann *et al.* 1996). In dieser Studie konnte in den korrespondierenden Seren von allen Patientengruppen eine vorherrschende IgG1 Antikörpersynthese nachgewiesen werden, unabhängig vom Therapieausgang. Zusätzlich wurde eine Abnahme der absoluten Konzentration der Anti-HCV IgG1 Antikörper in den SCR festgestellt. Erneut geben diese Daten weitere Hinweise davon, daß es bei der zellulären Immunantwort keine TH2 zu TH1 Verschiebung gibt, die mit der Viruselimination in SCR assoziiert ist.

Wie im Vorfeld schon beschrieben, sind HCV-Infektionen gekennzeichnet durch Antikörper, die gegen verschiedene strukturelle und nicht strukturelle Virusantigene gerichtet sind. Diese Antikörper können möglicherweise neben der Funktion der Neutralisation auch Funktionen vermitteln wie Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) und Komplement-vermittelte Lyse. Für die Anti-HVR1 Antikörper konnten neutralisierende Eigenschaften gezeigt werden (Zibert *et al.* 1995 und 1997). Daß Virus-spezifische Antikörper auch in der



Lage sind eine Komplement-vermittelte Lyse vermitteln zu können, konnte *in vitro* schon bei Hepatitis B Infektionen gezeigt werden (Michalak *et al.* 1995). Auch die Vermittlung von ADCC durch spezifische Antikörper konnte in verschiedenen Fällen gezeigt werden (Alsmadi *et al.* 1998 und Ozaki *et al.* 1997). Ob nun vergleichbare Mechanismen bei der Hepatitis C Infektion möglich sind, wurde mit Anti-HCV-spezifischen Antikörpern untersucht.

Zur Überprüfung, ob die affinitätsgereinigten Antikörper überhaupt in der Lage sind an entsprechende Zielzellen zu binden und somit die Möglichkeit gegeben ist, Zellen als Ziele für entweder eine Komplement-vermittelte Lyse oder für eine zellvermittelte Lyse kenntlich zu machen, wurden die Bindungseigenschaften der HCV-Antikörper in Bindungsstudien näher untersucht. Das Vorkommen dieser Virus-spezifischen Antikörper im Serum macht man sich auch zunutze für die klinische Diagnostik einer Hepatitis C Infektion (Brillanti *et al.* 1991, Quiroga *et al.* 1992 und Löhr *et al.* 1996). Ein direkter Nachweis der Bindung der affinitätsgereinigten HCV-Antikörper an die HCV-Antigen tragenden Zielzellen konnte mittels der Durchflußzytometrie nicht geführt werden, da möglicherweise die Zielzellen nur sehr geringe Virusmengen auf der Zelloberfläche trugen und somit unter dem Detektionslimit dieser Meßmethode lagen. Für das Virushüllprotein E2 konnte dies zum Beispiel gezeigt werden (Rosa *et al.* 1996).

Die Bestimmung der Komplement-vermittelten Lyse zeigt in den *in vitro* Versuchen, daß diese nicht von den HCV-spezifischen Antikörpern vermittelt werden konnte, wie dies z.B. bei Antikörpern gegen das Hepatitis B Virus möglich ist (Michalak *et al.* 1995). Hier kann zum einen als eine Ursache eine geringe Bindung der Antikörper an die Zelloberflächenantigene gesehen werden und zum anderen das Vorherrschen der Immunglobulinsubklasse-1 aufgrund der IgG-Subklassenverteilung. In Mausmodellen konnte die IgG-Subklasse M als Hauptverantwortlicher für die Komplement-vermittelte Lyse ermittelt werden (Janeway *et al.* 1967). In wieweit dies auf den Menschen übertragbar ist, ist noch nicht genau bekannt. Ob jedoch diese autologen Antikörper unter *in vivo* Bedingungen möglicherweise eine Komplement-vermittelte Lyse von virusinfizierten Zellen bewirken können, muß weiterhin bestimmt werden. Aufgrund einer sehr aktiven Produktion von Komplementkomponenten in den Leberzellen läßt sich dies nicht ausschließen (Ramadori *et al.* 1984). Die Ergebnisse der Kontrollexperimente bestätigen die nicht detektierbaren zytotoxischen Effekte bedingt durch die HCV-spezifischen Antikörper. Diese

Kontrollexperimente umfaßten Zielzellen inkubiert mit vergleichbaren Verdünnungen der gleichen Antikörper in Anwesenheit von Hitze inaktiviertem Komplement, Komplement alleine oder mit relevanten oder irrelevanten humanen Antikörpern inkubierte Zielzellen. Die Gültigkeit der Befunde wird durch diese Ergebnisse unterstützt und sie schließen die Möglichkeit von nicht-spezifischen toxischen Effekten oder direkten zytotoxischen Aktionen ausgeübt durch die Antikörper oder das Komplement alleine aus.

Die Bestimmung der ADCC zeigte, daß die HCV-spezifischen Antikörper keine Lyse weder bei infizierten T-Zellen noch bei den HCV-Antigen exprimierenden Zellen vermitteln konnten. Dies kann unter Umständen daran liegen, daß die aufgereinigten Serumantikörper nicht mehr an antigene Strukturen auf der Zelloberfläche binden können bzw. wenn, dann nur in sehr geringem Umfang, der für eine spezifische Lysereaktion nicht ausreichend ist. Somit stehen zu wenige Antikörper zur Verfügung um ADCC vermitteln zu können. Im gleichen Maße ist denkbar, daß die IgG-Subklassenverteilung in den Patienten dergestalt ist, daß nur Immunglobulinsubklassen vorherrschen, die nicht an den Fc-Rezeptor der Zielzelle binden können (Ravetch *et al.* 1993 und Lanier *et al.* 1988). Somit ist die Möglichkeit von ADCC nicht mehr gegeben. *In vivo* kann das Fehlen von spezifischen NK-Zellen auch eine Ursache sein für eine nicht vorhandene ADCC (Corado *et al.* 1997 und Kaser *et al.* 1999). Das Fehlen einer *in vitro* Anti-HCV Antikörper induzierten zellulären Zytotoxizität trägt möglicherweise eine pathogenetische Relevanz zur klinischen Situation. Da die antivirale humorale Immunantwort stark limitiert ist auf mehr oder weniger einen IgG Isotyp, wie es der Fall zu sein scheint bei der chronischen Hepatitis C Infektion, ist auch nicht zu erwarten, daß sie effiziente Virusneutralisation und Beseitigungsmechanismen vermitteln (Malnick *et al.* 1997 und Chen *et al.* 1999).

Deshalb erscheint es wahrscheinlich, daß andere Faktoren an der Vermittlung der Viruselimination oder der Persistenz beteiligt sind, wie z.B. die Anwesenheit von verschiedenen Virusstämmen oder Genotypen, die Viruslast oder eine schlechte Antigenprozessierung und Präsentation (Schlaak *et al.* 1997 und Bell *et al.* 1997). Genetische Faktoren wie der HLA-Haplotyp oder Koinfektionen mit HBV oder HIV oder hoher Alkoholgenuß sind zusätzliche Faktoren, die den Ausgang der Infektion mit dem Hepatitis C Virus bestimmen (Mangia *et al.* 1999 und Alberti *et al.* 1999). Die herunterregulierte HCV-spezifische Antikörpersynthese in den SCR spricht gegen Neutralisation oder

virusinhibierende Kapazitäten der virus-spezifischen Antikörper wie es in anderen Arbeiten propagiert wurde (Rosa *et al.* 1996 und Zibert *et al.* 1995). Ob die Anti-HCV Antikörper ein Epiphänomen darstellen oder in die Pathogenese der HCV-Infektion eingebunden sind muß in weiteren Studien bewertet werden.

## Zusammenfassung

Patienten mit akuter, selbstlimitierender HCV-Infektion und solche mit IFN- $\alpha$  Therapieresponse (SCR) zeigten eine hochregulierte NS3-spezifische T-Helferzellantwort. Über die funktionelle Bedeutung der T-Helferzellantwort und der Antikörpersynthese besteht jedoch noch Unklarheit.

In dieser Studie wurde die proliferative Antwort der PBMC von Patienten mit anhaltender Therapieresponse (SCR; n=8), Non-Respondern (NR; n=13) und unbehandelten HCV-Patienten (UTR; n=10) sowie gesunden Kontrollen (HC; n=5) auf die rekombinanten HCV-Antigene Core, Helicase, NS3, NS4 und NS5-4 bestimmt und ihre Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10 und IL-12 analysiert. Die IFN- $\gamma$  und IL-10 sezernierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden durch intrazelluläre Zytokinfärbung quantifiziert. Zusätzlich wurden Anti-HCV Core und NS3 spezifische IgG-Subklassenantikörper in den korrespondierenden Seren bestimmt.

SCR zeigten dabei eine signifikant stärkere NS3 und Helicase spezifische zelluläre Immunantwort verglichen mit den NR, UTR und HC. Die Zytokinanalyse und die intrazelluläre Zytokinfärbung ergaben, daß HCV-stimulierte T-Zellen von SCR vorzugsweise IFN- $\gamma$  sezernierten (TH1). Jedoch waren die TH2 Zytokine IL-4 und IL-10 bei NR verringert und die IL-12 Sekretion in allen Gruppen vergleichbar. Eine signifikant geringere IFN- $\gamma$  unabhängige Anti-HCV Core und NS3 IgG1-Antikörpersynthese zeigten die SCR im Vergleich zu den UTR und den NR.

Desweiteren wurden funktionelle Eigenschaften von Anti-HCV Antikörpern untersucht. Hierzu wurden affinitätsgereinigte Anti-HCV Core, Helicase und NS3 Antikörper in *in vitro* Testsystemen auf ihre Fähigkeit getestet, Komplement vermittelte Lyse und ADCC zu vermitteln. Jedoch konnte bei keinem dieser Antikörper eine auf das Therapieansprechen korrelierte Funktion detektiert werden.

Höhere Frequenzen NS3-spezifischer IFN- $\gamma$  sezernierender T-Helferzellen vermitteln möglicherweise eine Viruselimination in IFN- $\alpha$  behandelten Patienten. Es gibt aber keine Hinweise für eine verstärkte TH2-ähnliche T-Zell-Aktivität, die mit dem Therapie Nichtansprechen korreliert. Auch die Analyse der funktionellen Eigenschaften der Virus-spezifischen Antikörper ergab keinen Hinweis auf ihre Bedeutung in der Immunantwort der chronischen Hepatitis C Infektion.

---

## Literatur

Aach, R. D., Stevens, C. E., Hollinger, F. B., Mosley, J. W., Peterson, D. A., Taylor, P. E., et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N. Engl. J. Med.* **1991**; 325: 1325-1329.

Agnello, V., Chung, R. T., Kaplan, LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* **1992**; 327: 1490-1495.

Alberti A, Chemello L, Benvegna L. Natural history of hepatitis C. *J. Hepatol.* **1999**; 31 Suppl 1: 17-24.

Alsmadi O, Tilley SA. Antibody-dependent cellular cytotoxicity directed against cells expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope of primary or laboratory-adapted strains by human and chimpanzee monoclonal antibodies of different epitope specificities. *J. of Virol.* **1998**; 72,1: 286-293.

Bartenschlager, R., Ahlbornelaake, L., Mous, J., Jacobsen, H. Nonstructural protein-3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J. Virol.* **1993**; 67: 3835-3844.

Bell H, Hellum K, Harthug S, Maeland A, Ritland S, Myrvang B, von der Lippe B, Raknerud N, Skaug K, Gutigard BG, Skjaerven R, Prescott LE, Simmonds P. Genotype, viral load and age as independent predictors of treatment outcome of interferon-alpha 2a treatment in patients with chronic hepatitis C. *Scand. J. Infect. Dis.* **1997**; 29, 1: 17-22.

Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. (Suppl.)* **1968**; 21: 78-89

Brillanti S, Masci C, Ricci P, Migliogli M, Barbara L. Significance of IgM antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **1992**; 15: 998-1001.

Bukh, J., Purcell, R. H., Miller, R. H. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**; 90: 8234-8238.

Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of Chronic Hepatitis C: Immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* **1999**; 30, 3: 595-601

Chen M, Sällberg M, Sönnernborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, Birkett A, Peterson D, Milich DR. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **1999**; 116: 135-143

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

De Castro, M., Sanchez, J., Herrera, J. F., Chaves, A., Duran, R., Garcia-Buey, L., et al (1993) Hepatitis C virus antibodies and liver disease in patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology* **17**: 551-557.

Del Prete G, Maggi E, Romagnani S. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Lab Invest* **1994**; 70: 299-306

De Mitri, M. S., Poussin, K., Baccarini, P., Pontisso, P., D'Errico, A., Simon, N., et al HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* **1995**; 345: 413-415.

Dienstag, J. L. Non-A, non-B hepatitis. I: recognition, epidemiology and clinical features. *Gastroenterology* **1983**; 85: 439-462.

Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung M-C, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* **1995**; 346: 1006-1007

Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung M-C, Wierenga EA, Scholz S, Santantonio T, Houghton M, Southwood S, Sette A, Pape GR. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virology* **1997**; 71, 8: 6011-6019

Corado J, Toro F, Rivera H, Bianco E, Deibis L, De Sanctis JB. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin. Exp. Immunol.* **1997**; 109: 451-457.

Fan XG, Liu WE, Li CZ, Wang ZC, Luo LX, Tan DM, Hu GL, Zhang Z. Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. *Mediators Inflamm.* **1998**; 7 (4): 295-297.

Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N, Purcell RH. Lack of Protective Immunity Against Reinfection with Hepatitis C Virus. *Science* **1992**; 258: 135-140

Farci P, London WT, Wong DC, Dawson GJ, Vallari DS, Engle R, Purcell RH. The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: Comparison of serologic responses measured with first- and second generation assays and relationship to HCV viraemia. *J. Infect. Dis.* **1992**; 165: 1006-1011

Ferrari C, Valli A, Galati L, Penna A, Scaccaglia P, Giuberti T, et al. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infection. *Hepatology* **1994**; 19: 286-295

Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., Rice, C. M. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase - determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J. Virol.* **1993**; 67:L 2832-2843.

Harms, V. Schätzen und Testen. S. 186-235. In: Harms, V. (Hrsg.) Biomathematik, Statistik und Dokumentation. 6., völlig neu bearb. Auflage. Harms Verlag Kiel **1992 a.**

Harms, V. Korrelation und Regression. S. 126-153. In: Harms, V. (Hrsg.) Biomathematik, Statistik und Dokumentation. 6., völlig neu bearb. Auflage. Harms Verlag Kiel **1992 b**.

Holmes, E. C. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J. Gen. Virol.* **1993**; 74: 661-668.

Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G., Choo, Q.-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* **1991**; 14: 381-388.

Ishii K, Rosa D, Watanabe Y, Katayama T, Harada H, Wyatt C, Kiyosawa K, Aizaki H, Matsuura Y, Houghton M, Abrignani S, Miyamura T. High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* **1998**; 28, 4: 1117-1120

Janeway CA, Rosen FS, Merler E, Alper CA. The gamma globulins. **1967**: 2. Edition, Boston (Little, Brown & Co).

Johnson, R. J., Gretch, D. R., Yamabe, H. Hart, J., Bacchi, C. E., Hartwell, P., et al Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **1993**; 328: 465-470.

Kaser A, Enrich B, Ludwiczek O, Vogel W, Tilg H. Interferon- alpha (IFN-a) enhances cytotoxicity in healthy volunteers and chronic hepatitis C infection mainly by the perforin pathway. *Clin Exp. Immunol.* **1999**; 118: 71-77.

Kiyosawa, K., Sodeyama, T., Tanaka, E., Gibo, Y., Yoshizawa, K, Nakano, Y., et al Interrelationship of blood-transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* **1990**; 12: 671-675.



Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., Miyamura, T., Dienstag, J. L., Alter, M. J., Stevens, C. E., Tegtmeier, G. E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W.-S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J.R., Overby, L. R., Bradley, D. W., Houghton, M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **1989**; 244: 359-362.

Lanier LL, Ruitenberg JJ, Phillips JH. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J. Immunol.* **1988**; 141: 3485-3487.

Laufs, R., Polywka, S., Feucht, H. H., Ebling, M., Iske, L., Friedrich, K., Oehler, G., Keitel, M., Nolte, H., Thiele, B. Was bedeutet der Befund „HCV-Antikörper positiv?“. *Dt. Ärzteblatt* **1994**; 91A: 285-287.

Lechmann M, Woitas RP, Langhans B, Kaiser R, Ihlenfeldt HG, Jung G, Sauerbruch T, Spengler U. Decreased frequency of HCV core-specific peripheral blood mononuclear cells with type 1 cytokine secretion in chronic hepatitis C. *J. Hepatology* **1999**; 31: 971-978

Leroux-Roels G, Esquivel CA, DeLeys R, Stuyver L, Elewaut A, Philippé J, Desombere I, Paradijs J, Maertens G. Lymphoproliferative responses to hepatitis C virus core, E1, E2, and NS3 in patients with chronic hepatitis C infection treated with interferon alpha. *Hepatology* **1996**; 23: 8-16

Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., McCourt, D. W., Rice, C. M. Processing in the hepatitis C virus E2-N2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J. Virol.* **1994**; 68: 5063-5073.

Lin, H. H., Kao, J. H., Hsu, H. Y., Ni, Y. H., Yeh, S. H., Hwang, L. H., et al Possible role of high-titer maternal viremia in perinatal transmission of hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* **1994**; 169: 638-641.

Liou, T. C., Chang, T. T., Young, K. C., Lin, X. Z., Lin, C. Y., Wu, H. L. Detection of HCV-RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J. Med. Virol.* **1991**; 41: 55-60.

Löhr HF, Nagel C, Simpson B, Michel G, Goergen B, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Significance of IgG and IgM anti-HCV antibody secretion in vitro in patients with chronic hepatitis C: Correlation to disease activity and response to interferon-alpha. *Hepatology* **1994**; 20: 1383-1389.

Löhr HF, Goergen G, Meyer-zum-Büschel KH, Gerken-G. HCV replication in mononuclear cells stimulates anti-HCV-secreting B cells and reflects nonresponsiveness to interferon-alpha. *J Med Virol.* **1995**; 46, 4: 314-20

Löhr HF, Schlaak JF, Kollmannsperger S, Dienes HP, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Liver-infiltrating and circulating CD4+ T cells in chronic hepatitis C: immunodominant epitopes, HLA-restriction and functional significance. *Liver* **1996**; 16: 174-182

Löhr HF, Elste C, Dienes HP, Michel G, Braun HB, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. The quantitative humoral immune response to the hepatitis C virus is correlated with disease activity and response to interferon- $\alpha$ . *J Hepatology* **1996**; 25: 292-300

Löhr HF, Gerken G, Roth M, Weyer S, Schlaak JF, Meyer zum Büschenfelde KH. The cellular immune responses induced in the follow-up of interferon- $\alpha$  treated patients with chronic hepatitis C may determine the therapy outcome. *J Hepatology* **1998**; 29: 524-532

Löhr HF, Schmitz D, Arenz M, Weyer S, Gerken G, Meyer zum Büschenfelde KH. The viral clearance in interferon-treated chronic hepatitis C is associated with increased cytotoxic T cell frequencies. *J Hepatology* **1999**; 31: 407-415

Malnick SD, Schmilovitz-Weiss H. Interferon therapy for chronic HCV hepatitis: trick or treat? *J. Clin Gastroenterol.* **1997**; 25(1): 310-313

Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, Margaglione M, Villani MR, Stella F, Modola G, Agostiano V, Gaudio C, Andriulli A. HLA class II favour clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *J. Hepatol.* **1999**; 30, 6: 984-989.

Marcellin P, Descamps V, Martinot-Peignoux, Larzul D, Xu L, Bach-Nga P, Crickx B, Guillemin L, Belaich S, Erlinger S, Benhamou J-P. Cryoglobulinemia with vasculitis associated with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **1993**; 104: 272-277.

McOmish, F., Yap, P. L., Dow, B. C., Follett, E. A., Seed, C., Keller, A. J., et al Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J. Clin. Microbiol.* **1994**; 32: 884-892.

Michalak TI, Lau JYN, McFarlane BM, Alexander GAM, Eddleston ALWF, Williams R. Antibody-directed complement-mediated cytotoxicity to hepatocytes from patients with chronic hepatitis B. *Clin. Exp. Immunol* **1995**; 100: 227-232.

Michel, G., Ritter, A., Gerken, G., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Decker, R., Manns, M. P. Anti-GOR and hepatitis C virus in autoimmune liver diseases. *Lancet* **1992**; 329: 267-269.

Minutello MA, Pileri P, Unumatz D, Censini S, Kuo G, Houghton M, Brunetto MR, Bonino F, Abrignani S. Compartmentalization of T lymphocytes to the side of disease: intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* **1993**; 178: 17-25

Misani R, Bellavita P, Fenili D, Vicari O, Marchesi D, Sironi PL, Zilio P, Vernocchi A, Massazza M, Vendramin G, Tanzi E, Zanetti A. Interferon alfa-2a therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus. *N. Engl. J. Med.* **1994**; 330: 751-756

Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J. Clin. Invest.* **1996**; 98, 3:706-714

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone; I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunology* **1986**; 136, 7: 2348-2357

Moradpour D, Kary P, Rice CM, Blum HE. Continuous human cell lines inducibly expressing Hepatitis C virus structural and nonstructural proteins. *Hepatology* **1998**; 28: 192-201

Miltenyi, S.; Müller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **1990**; 11: 231-238.

Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon therapy. *Science* **1998**; 282: 103-107

Nousbaum, J. B., Pol, S., Nalpas, B., Landais, P., Berthelot, P., Brechot, C. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. Collaborative Study Group. *Ann. Intern. Med.* **1995**; 122: 161-168.

Ohto, H., Terazawa, S., Sasaki, N., Sasaki, N., Hino, K., Ishiwata, C., et al Transmission of hepatitis C virus from mother to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Collaborative Study Group. *N. Engl. J. Med.* **1994**; 330: 744-750.

Quiroga JA, Campillo ML, Catillo J, Bartolome J, Pores JC, Carreno V. IgM antibody to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* **1991**; 14: 38-43.

Ozaki S, Kosaka M, Wakatsuki S, Abe M, Koishihara Y, Matsumoto T. Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, MH1.24. *Blood* **1997**; 90, 8: 3179-3186.

Ravetch JV, Kinet J. Fc receptors. *Ann. Rev. Immunol.* **1993**; 9: 457-492.

Rehermann B, Chang KM, McHutchison JG, Kokka R, Houghton M, Chisari FV. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* **1996**; 98, 6: 1432-1440

Reichard O, Norkrans G, Fryden A, Braconier JH, Sonnerborg A, Weiland O. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alpha-2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. The Swedish Study Group. *Lancet* **1998**; 351: 83-87

Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Ann Rev Immunol* **1994**; 12:227-257

Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L, Chin M, Dong C, Weiner AJ, Lau JYN, Choo QL, Chien D, Pileri P, Houghton M, Abrignani S. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: Cytofluorometric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**; 93: 1759-1763

Rossol S, Marions G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest.* **1997**; 99, 12: 3025-3033

Schlaak JF, Trippler M, Ernst I, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Chronic hepatitis C: the viral load per liver cell before treatment as a new marker to predict long-term response to IFN-alpha therapy. *J Hepatol* **1997**; Nov;27(5): 917-21

Semple, J. W.; Allen, D.; Chang, W.; Castaldi, P.; Freedman, J. Rapid separation of CD4+ and CD19+ lymphocyte populations from human peripheral blood by a magnetic activated cell sorter (MACS). *Cytometry* **1993**; 14: 955-960.

Shakil, A. O., Conry-Cantilena, C., Alter, H. J., Hayashi, P., Kleiner, D. E., Tedeschi, V., et al Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic, and histologic features. The Hepatitis C Study Group. *Ann. Intern. Med.* **1995**; 123: 330-337.

Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikatab M, Purcell RH, Yoshikura H. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci* **1992**; 89 (12): 5477-5481

Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A, Alter FU, Purcell RH, Yoshikura H. Neutralizing antibodies against Hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J. Med. Virol.* **1994**; 68:1494-1500.

Simmonds, P.; McOmish, F.; Yap, P. L.; Chan, S.-W.; Lin, C. K.; Dusheiko, G.; Saeed, A. A.; Yoshioka, K., Kakumu, S., Wakita, T., Ishikawa, T., Itoh, Y., Takayanagi, M., et al Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **1992**; 16: 293-299.

Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, T., Irvine, B.; et al Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.* **1993**; 74: 2391-2399.

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* **1994**; 19: 1321-1324

Simmonds, P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* **1995**; 21: 570-583.

Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., Defrancesco, R., Lamonica, N. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C polyprotein. *J. Virol.* **1993**; 67: 4017-4026.

Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of Type 2-Like T-Helper Cells in Hepatitis C Virus Infection: Implications for Hepatitis C Virus Chronicity. *Hepatology* **1997**; 25,2: 449-458

Wright, T. C., Lau, J. Y. N. Clinical aspects of hepatitis B virus infection. *Lancet* **1993**; 342: 1340-1344.

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

Zibert A, Dudziak P, Schreier E, Roggendorf M. Characterization of antibody response to hepatitis C virus protein E2 and significance of hypervariable region 1-specific antibodies in viral neutralization. *Arch Virol* **1997**; 142: 523-534

## Abkürzungen

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
APZ	Antigen präsentierende Zellen
BSA	Bovines Serumalbumin
CD4	Cluster of differentiation 4
Ci	Curie
Cpm	Counts per minute (Zerfälle pro Minute)
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
GOT	Glutamat-Oxylacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HC	Healthy control
HCV	Hepatitis C Virus bzw. Hepatitis C Virusinfektion
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HLA	Human leukocyte antigen
HUS	Humanserum
HVR-1	Hyper variable region 1
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin Gamma
IgM	Immunglobulin M



IL-4	Interleukin-4
MHC	Major histocompatibility complex
NR	Nonresponder Patienten
NS3 (4, 5-4)	Nichtstrukturelles Antigen Nr. 3 (4, 5-4)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PE	R-Phycoerythrin
RNA	Ribonucleic acid
SCR	Sustained complete responder
SI	Stimulationsindex
UTR	Untreated Patienten
$\gamma$ GT	Gamma-Glutamyl-transferase

## **Anhang**

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den 07.05.2001