

Abstract

Genotypspezifische Sequenzunterschiede spielen bei der antiviralen Immunantwort gegen HCV eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Studie wurde systematisch das Ausmaß der Kreuzreaktivität von HCV spezifischen T-Zellen zwischen verschiedenen Genotypen (GT) auf dem Epitopelevel analysiert. Um den Einfluss von genotyp-spezifischen Sequenzunterschieden auf die CD8+-T-Zellantwort zu bestimmen, untersuchten wir eine Gruppe von intravenös drogenabhängigen Patienten. In die Analyse wurden sowohl Patienten mit nicht nachweisbarer Virämie, als auch Patienten mit GT1 und GT3 HCV Infektionen untersucht. Mit Hilfe von überlappenden Peptiden, die eine lokale Konsensussequenz von HCV GT1b und 3a abdecken, wurde die Immunantwort jedes einzelnen Patienten analysiert. Die Stärke und Anzahl der ermittelten HCV-spezifischen T-Zellantwort war in der HCV-RNA negativen Gruppe höher als in den GT1 und GT3 infizierten Gruppen. In allen drei Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der T-Zellantwort gegen Genotyp 1 versus Genotyp 3 Peptide. Bei chronisch infizierten Patienten war interessanterweise die CD8 T Zellantwort vorzugsweise gegen den heterologen GT gerichtet. Diese Antworten können möglicherweise auf Gedächtnis CD8+-T-Zellen einer früheren ausgeheilten Infektion zurückgeführt werden.

In dieser Arbeit sollten kreuzreaktive Epitope identifiziert werden, die für die Entwicklung eines Impfstoffs hilfreich wären. 22% der 28 identifizierten Epitope waren kreuzreaktiv. Darin waren Epitope enthalten, bei denen die Zielsequenz in GT1 und GT3 identisch waren oder bei denen die Zielsequenz genotyp-spezifische Varianten aufzeigten. Obwohl die Mehrheit der individuellen CD8 T-Zellantworten nur eine begrenzte Kreuzreaktivität aufwies, konnten wir einige Patienten mit mehreren T-Zellantworten identifizieren, die gegen beide Genotypen wirksam waren. Interessanterweise wurden T-Zellen, die gegen beide Genotypen wirksam waren, hauptsächlich in HCV-negativen Patienten gefunden. Dies zeigt, dass CD8 Antworten gegen verschiedene HCV Genotypen in dem gleichen Patienten aktiviert werden können und dass diese Antworten unter Umständen mit einem Schutz vor chronischen Infektionen in Verbindung gebracht werden können. Angesichts der heterogenen Genotypverteilung in vielen Teilen der Welt hat dies beträchtliche Auswirkungen für die Impfstoffentwicklung.

Um die bestimmenden Faktoren einer erfolgreichen gegenüber einer erfolglosen CD8+ T-Zellantwort zu bestimmen, beschlossen wir phänotypische Studien an HCV-spezifischen CD8+ T-Gedächtniszellen durchzuführen. Wir untersuchten das Expressionslevel des Gedächtnismarkers CD127 und des proapoptotischen Markers Bim in Patienten mit verschiedenen klinischen Ausgängen, um die Bedeutung der peripherer Deletion von Peptid-spezifischen CD8+-T-Zellen für

den Mangel einer CD8+-T-Zellantwort in chronisch infizierten Patienten zu untersuchen. Während unserer Arbeit wurde klar, dass die autologe Sequenz des zirkulierenden Virus einen starken Einfluss auf den Phänotyp der spezifischen CD8+-T-Zellen hat. Nach spontaner Ausheilung einer Infektion weisen Virus-spezifische Zellen typischerweise einen Gedächtnisphänotyp auf. In Übereinstimmung hiermit zeigten Spezifische CD8+-T-Zellen von HCV-RNA negativen Patienten, die intravenös Drogen nehmen, eine hohe Expression von CD127. Interessanterweise zeigten auch Patienten mit einer autologen Sequenz, die sich von der Prototyp Epitopsequenz unterschied und daher nicht von den CD8+-T-Zellen erkannt werden konnte, hohe Expressionslevel von CD127. Wir erwarteten, dass bei chronische HCV-Infektion CD8+-T-Zellen kontinuierlich in der Leber aktiviert werden und es möglicherweise dadurch zu einer erhöhten Expression des proapoptotischen Moleküls Bim kommen würde. Dies nicht nur die qualitativen Unterschiede zwischen den HCV spezifischen CD8+ T-Zellen bei chronischer und nach ausgeheilter Infektion erklären sondern auch ein möglicher Mechanismus für die quantitativen Unterschiede in der HCV-spezifischen CD8+ T-Zellzahl darstellen. Leider konnten wir bei den unterschiedlichen analysierten Gruppen keine Unterschiede im Expressionsniveau von Bim feststellen. Die Expression unterschied sich auch dann nicht, wenn wir vorher die Anwesenheit des korrekten Antigens kontrolliert haben. Die Anzahl der bisher analysierten CD8-Antworten ist verhältnismäßig niedrig. Um eine endgültige Aussage treffen zu können muss eine größere Anzahl an Patienten untersucht werden.

Der letzte Teil dieser Arbeit war darauf fokussiert einen Assay zum Aktivieren naïver CD8+ T-Zellen mit immundominanten HCV Epitopen zu etablieren. Zu diesem Zweck wurden Monozyten aus gesunden Individuen zu dendritischen Zellen gereift und mit autologen mononukleären Zellen des peripheren Blutes in der Anwesenheit des immundominanten HCV-A2 Peptids 1073 kultiviert. Die spezifischen T-Zellen der polyklonalen Kultur wurden durch IFN- γ - und MHC-Klasse-I-Pentamer-Färbung identifiziert. Man geht davon aus, dass T-Zellen maßgebend daran beteiligt sind eine HCV-Infektion zu kontrollieren daher wäre eine funktionale Peptid-spezifische CD8+ T-Zelllinie ein interessantes Werkzeug, das zum adoptiven Immuntransfer, zum Beispiel nach einer Lebertransplantation zur Verhinderung einer Reinfektion des Transplantats, verwendet werden könnte.