

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Virologie

Einfluss der flankierenden Sequenzen
von Hepatitis-C-Virus-Epitopen
auf die Antigenpräsentation

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät der
Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Verena Auth, geb. Lüger
aus Oldenburg (Oldb)
2019

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/73263

URN: urn:nbn:de:hbz:464-20201208-090236-4

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. J. Verheyen

2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Ch. M. Lange

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Hepatitis-C-Virus	5
1.1.1	Aufbau und Replikation	5
1.1.2	Epidemiologie	6
1.1.3	Klinik.....	7
1.1.4	Therapie.....	8
1.2	Immunabwehr und Hepatitis-C-Virus.....	8
1.2.1	Angeborene Immunabwehr	9
1.2.2	Adaptive Immunabwehr	9
1.2.3	Verlauf einer Hepatitis-C-Virus-Infektion	13
1.3	Immundominanz.....	14
1.4	Immundominante Epitope weiterer Viren.....	15
1.4.1	Influenzavirus: Matrixprotein M1	15
1.4.2	Cytomegalievirus: Proteinkinase pp65.....	15
1.5	Ziele dieser Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Kommerzielle Kits	18
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.4	Chemikalien	19
2.1.5	Sequenzen.....	21
2.1.6	Pro- und Eukaryotische Zellen.....	22
2.1.7	Dienstleister, PC-Programme, Internet	23
2.1.8	Rezepte für Eigenansätze	23
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	27

2.2.3	Biochemische/immunologische Methoden	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Die flankierenden Sequenzen von HCV-Epitopen haben Einfluss auf deren Prozessierung zu MHC-1 Peptiden.....	30
3.2	Differenzierte Betrachtung des Einflusses der N- und C-terminalen flankierenden Sequenz	34
3.3	Veränderlichkeit der T-Zell-Antwort auf das NS5B-Epitop	36
3.4	Antigenprozessierung als Einflussfaktor auf die Immunantwort im Vergleich zur Avidität 37	
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	40
4	Diskussion	41
4.1	Die flankierenden Sequenzen immundominanter HCV-Epitope beeinflussen die Prozessierung	42
4.2	Eingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf NS5B aufgrund von Unterschieden in der Immundominanz der Epitope	45
4.3	Studienergebnisse im Hinblick auf die Entwicklung einer Vakzine gegen HCV	46
4.4	Ausblick	47
5	Zusammenfassung.....	49
6	Literaturverzeichnis.....	50
7	Anhang	58
7.1	Zusätzliche Abbildungen.....	58
7.2	Abkürzungsverzeichnis	59
7.3	Abbildungsverzeichnis	61
7.4	Tabellenverzeichnis.....	62
8	Danksagung.....	63
9	Lebenslauf	64

1 Einleitung

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist beim Menschen ein häufiger Erreger der infektiösen Hepatitis, welche bei chronischem Verlauf zu Leberzirrhose, Hepatozellulärem Karzinom (HCC) und Tod des Patienten führen kann. Trotz großer Fortschritte in der Therapie ist die Zahl der Neuinfektionen anhaltend hoch, die dringend benötigte Impfung weiterhin nicht verfügbar. Auf Grund der mit HCV assoziierten Krankheitslast zählt das Virus auch heute noch zu den Erregern mit höchster Bedeutung für das deutsche Gesundheitssystem.

1.1 Hepatitis-C-Virus

1.1.1 Aufbau und Replikation

Das Hepatitis-C-Virus ist ein Hepacivirus aus der Familie der Flaviviridae. Derzeit sind sieben verschiedene Genotypen mit zahlreichen Subtypen bekannt, welche regional unterschiedlich gehäuft auftreten und sich z.T. stark voneinander unterscheiden. Diese Varianz von > 30 % macht es derzeit so schwierig, eine Impfung gegen HCV zu entwickeln (Simmonds et al., 2005; Smith et al., 2014).

Die positiv gerichtete Einzelstrang-RNA (ss+ RNA) liegt umgeben vom Nukleokapsid (Core-Protein) und den Oberflächenglykoproteinen Envelope (E) 1 und E2 vor und das Virion hat einen Durchmesser von ca. 40-50nm.

Um seinen Wirt zu infizieren, dringt das HCV nach hämatogener Übertragung über Endozytose in die Zelle ein. Hierzu kann das Virus CD81, Scavenger Rezeptor (SR – BI), Claudin und Occludin binden (Perrault et al., 2009). Dies geschieht bevorzugt in Hepatozyten, wodurch sich die leberspezifische Klinik erklärt. Eine erste Prozessierung der Strukturproteine wird durch zelluläre Peptidasen vorgenommen, wodurch das Virion freigelegt wird. Auf der Virus-RNA befindet sich ein offener Leserahmen, in welchem für ein ca. 3000 Aminosäuren langes Polypeptid kodiert wird. Bereits während der Translation am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) wird dieses Peptid von zellulären Peptidasen und Proteasen zu diversen Proteinen prozessiert:

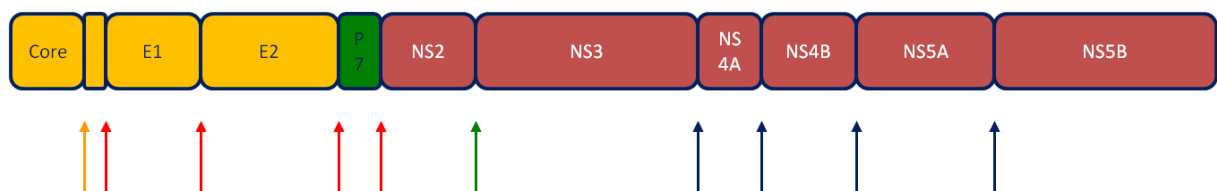


Abbildung 1.1: Virales Polyprotein mit Schnittstellen der Prozessierung

Abgebildet sind die Virusproteine von HCV: Strukturproteine (gelb), Viroporin (grün) und Nichtstrukturproteine (rot). Zusätzlich sind die Schnittstellen der Enzyme angegeben, welche an der Prozessierung beteiligt sind: Signalpeptidpeptidase (gelb), Signalpeptidase (rot), NS2-Protease (grün) und NS3-Protease (blau). (nach Doerr et al., 2010, Abb. 39.2)

Das Core-Protein bildet das Viruskapsid und verankert das Virion mit der Virushülle (Boulant et al., 2005), E1 und E2 sind Hüllproteine und für die Rezeptorbindung am Wirt zuständig (Fraser et al., 2011). P7 induziert als Viroporin die Freisetzung von Viruspartikeln aus infizierten Zellen und koordiniert zusammen mit NS2 die intrazelluläre Virusmontage (Popescu et al., 2011). NS3 ist durch eine RNA – Helikase – Funktion ein wichtiger Bestandteil der Replikation und wird als Serinprotease für die Hemmung der Interferon (IFN)-Induktion beim Wirt verantwortlich gemacht (P. S. Pang et al., 2002; Tomei et al., 1993), NS4A wirkt zusätzlich als Cofaktor für NS3 (Koch et al., 1996). NS4B ordnet den viralen Replikationskomplex in membranöse Vesikel (Egger et al., 2002). NS5A koordiniert die RNA-Replikation und unterstützt sowohl NS2 bei der Virusmontage als auch NS3 bei der Hemmung der IFN-Induktion (Elazar et al., 2003; Polyak et al., 2001; Popescu et al., 2011). NS5B bildet die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Behrens et al., 1996).

Die Replikation und die Prozessierung von Hepatitis-C-Virus findet überwiegend in membranösen Vesikeln (den „viral factories“) statt, die Assemblierung (das Zusammensetzen) der Viren findet am Golgi-Apparat in hydrophoben Zellorganellen, in sogenannten Lipid Droplets, statt, welche zur Membranbildung und Speicherung von Cholesterol und Signalmolekülen dienen (Miyazari et al., 2007) (siehe auch Abb.1.2: Lebenszyklus und Prozessierung von HCV).

1.1.2 Epidemiologie

Obwohl die Hepatitis C namentlich meldepflichtig ist, sind Daten zur Inzidenz weiterhin unzureichend, da zum einen 75% der Neuinfektionen asymptomatisch verlaufen und zum anderen von der positiven Testung auf Antikörper nicht zuverlässig auf den genauen Zeitpunkt der Infektion rückgeschlossen werden kann. Im Jahr 2011 wurde HCV durch das Robert Koch Institut (RKI) unter 127 infektiösen Erregern bzgl. Krankheitslast und Bedeutung für die medizinische Überwachung zu den Erregern mit der höchsten Priorität eingeordnet. Ein direkter Vergleich von HCV mit dem gesellschaftlich präzentieren Humanen Immundefizienz Virus (HIV) verdeutlicht, wie das RKI zu dieser Einschätzung kommt: Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass im Jahre 2017 weltweit ca. 71 Mio. Menschen chronisch mit HCV infiziert sind. Zur gleichen Zeit waren nur ca. 36,7 Mio. Menschen am Humanen Immundefizienz Virus (HIV) infiziert. Jedes Jahr infizieren sich ca. 1,75 Mio. Menschen neu mit HCV (HIV: 1,8 Mio.) und bis zu 400 000 Menschen versterben jährlich an den Folgen einer HCV-Infektion (HIV: 1 Mio.) (WHO, 2017a, 2017b). In Deutschland sind die Folgen einer HCV-Erkrankung der häufigste Grund für eine Lebertransplantation. (RKI, 2014a)

Die Übertragung der HCV-Infektion erfolgt parenteral über den Blutweg. Am häufigsten lassen sich kausale Zusammenhänge einer Ansteckung beim Teilen von Spritzbesteck unter intravenösen Drogenkonsumenten (IDUs, 80%) sowie bei verletzungsträchtigen Sexualpraktiken, insbesondere bei Männern, die Sex mit Männern haben (MSM, 7,5%), feststellen. Weitere mögliche

Infektionswege sind die Dialyse (0,6%) sowie Nadelstichverletzungen im Gesundheitswesen und Tätowierungen/Piercings unter mangelhaften hygienischen Bedingungen. (RKI, 2014a, 2019)

Die Inzidenz von HCV in Deutschland ist durch die Änderung der Falldefinition im Jahre 2015 nur eingeschränkt beurteilbar. Jedoch konnte nach lange rückläufiger Inzidenz zuletzt wieder ein leichter Anstieg der Neuinfektionsraten verzeichnet werden (2004 noch 9044 Erstdiagnosen, 2016 nur 4429 Erstdiagnosen, 2018 dagegen 5198 Erstdiagnosen)(RKI, 2019). Daher spielt HCV nicht nur weltweit, sondern auch speziell in Deutschland weiterhin eine bedeutende Rolle in der medizinischen Versorgung von leberinsuffizienten Patienten.

1.1.3 Klinik

Obwohl das Hepatitis-C-Virus auch in anderen Geweben als der Leber (lateinisch: hepar) nachgewiesen werden konnte, tritt es als überwiegend hepatotropes Virus in Erscheinung (Fletcher et al., 2012).

Eine akute Hepatitis-C manifestiert sich zwei bis sechs Wochen nach der Infektion, z. T. auch erheblich später. In bis zu 80% der Fälle verläuft diese akute Infektion asymptomatisch oder zeigt sich mit einer milden, unspezifischen Klinik, die an eine leichte Grippe erinnern kann: Leistungsminderung, Müdigkeit, Übelkeit, Appetitlosigkeit. Nur in 15-20% steigen die Transaminasen und Bilirubinkonzentration derart stark an, dass sich ein Ikterus manifestiert (RKI, 2014b). Daher wird eine akute Hepatitis-C nur selten erkannt.

In bis zu 80% der Infektionen kommt es im Verlauf zu einer chronischen Hepatitis, welche definitionsgemäß länger als sechs Monate besteht. (RKI, 2014b) Auch hier bleiben die Symptome lange Zeit unspezifisch: zu den Symptomen einer akuten HCV-Infektion wie Leistungsminderung und Appetitlosigkeit kommen häufig zusätzlich auch Muskel- und Gelenkschmerzen. Erst wenn sich im Verlauf eine fortgeschrittene Leberzirrhose manifestiert (bis zu 30% innerhalb von 20 Jahren (RKI, 2014a)), deutet auch die Klinik zunehmend auf eine Pathologie der Leber hin: wird die Synthesefunktion der Leber eingeschränkt, kann es zu Blutungsneigung (Mangel der Gerinnungsfaktoren), Aszites oder auch peripheren Ödemen (Albuminmangel) kommen. Auftretende Leberhautzeichen sind Zeichen von portaler Hypertension und mangelnder Entgiftungsfunktion der Leber (Herold, 2015).

2-4% der chronisch Infizierten entwickeln pro Jahr ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) (RKI, 2014a), welches mit zunehmendem Leberversagen, der Gefahr der lymphogenen, pulmonalen oder auch osteogenen Metastasierung, sowie typischen paraneoplastischen Symptomen einhergeht. Für die Entwicklung eines HCCs haben sich das männliche Geschlecht, Alkoholabusus, ein bestehender Diabetes mellitus sowie Co-Infektionen mit HIV oder Hepatitis-B-Virus (HBV) als negativ-prädiktive Faktoren erwiesen. (Herold, 2015)

Der Schweregrad der Erkrankung wird mittels des MELD-Scores ermittelt, für welchen im Serum Billirubin, Kreatinin und die Blutgerinnung über INR (International Normalized Ratio) beurteilt werden (Dultz et al., 2013).

1.1.4 Therapie

Die Therapie einer Hepatitis-C-Infektion unterlag in den letzten Jahren einem starken Wandel durch die Einführung von direkt wirksamen antiviralen Substanzen. Eine Impfung zur Primärprophylaxe einer HCV-Infektion liegt derzeit noch nicht vor.

Für die Therapie der **chronischen Hepatitis-C** war für lange Zeit pegIFN- α der Goldstandard. Eine auf pegIFN basierende Therapie ist jedoch belastend für den Patienten und von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) geprägt. Hierzu gehören Depressionen bis zur Suizidalität, grippale Allgemeinsymptome und u. U. behandlungsbedürftige Zytopenien (Herold, 2015, pp. 24-25).

Seit 2014 stehen diverse direkt antivirale Substanzen (direct acting antiviral, DAA) zur Verfügung, welche in den aktuell geltenden Leitlinien der DGVS (Deutsche Gesellschaft der Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) zur Therapie empfohlen werden. (Sarrazin et al., 2018). In der Substanzklasse der DAA ist aktuell eine Vielzahl an Medikamenten verfügbar. Hierzu zählen NS3-Protease-Inhibitoren (Glecaprevir, Grazoprevir, Voxilaprevir), NS5A-Inhibitoren (Elbasvir, Ledipasvir, Velpatasvir, Pibrentasvir), Nicht-nukleosidische NS5B-Inhibitoren (Dasabuvir – mittlerweile vom Markt genommen) und Nukleosidische NS5B-Inhibitoren (Sofosbuvir) (Sarrazin et al., 2018). Die Auswahl der optimalen Kombinationstherapie erfolgt anhand Kriterien wie des vorliegenden Genotyps sowie ggf. dem Therapieansprechen vorhergegangener Therapien. Bevorzugt wird eine Kombinationstherapie aus Ledipasvir + Sofosbuvir (Harvoni®) oder Velpatasvir + Sofosbuvir (Epclusa®) empfohlen. Derzeit für alle Genotypen zugelassen sind Kombinationstherapien aus Glecaprevir + Pibrentasvir (Maviret®, Zulassung für alle Stadien der Nierenfunktionseinschränkung) und Velpatasvir + Sofosbuvir + Voxilaprevir (Vosevi®). Mit diesen neuen Therapiekombinationen kann bei nahezu allen HCV-Infektionen innerhalb von 8-12 Wochen eine anhaltende Therapieantwort erreicht werden, definiert als fehlenden Virusnachweis 12 Wochen nach Therapieende.

Bei einer **akuten Hepatitis C** besteht nach aktuellen Empfehlungen keine generelle Indikation zu einer Therapie.

1.2 Immunabwehr und Hepatitis-C-Virus

Das Hepatitis-C-Virus ist in der Lage trotz eines intakten Immunsystems in der Leber zu persistieren und eine chronische Infektion auszulösen. Es wurden Fälle beschrieben, bei denen Patienten ohne kompetentes Immunsystem (Hypoglobulinämie, welche in einem Mangel an

neutralisierenden Antikörpern resultiert), die HCV-Infektion durch eine Therapie mit IFN- α ausheilen können. (Semmo et al., 2006). Die Interaktionen zwischen Virus und Mensch sind sehr komplex und bis heute noch nicht im Detail verstanden. Es herrscht ein ständiger Wettbewerb zwischen der menschlichen Immunabwehr und dem Virus, mit dem Ziel der Immunabwehr, das Pathogen zu eliminieren und dem Ziel des Virus, sich dem Immunsystem zu entziehen und die Wirtszelle für die eigene Replikation zu nutzen. Hierdurch kommt es zu zahlreichen Interaktionen zwischen dem Hepatitis -C-Virus und dem menschlichen Organismus. Im folgenden Kapitel sollen grundsätzliche Vorgänge der viralen Immunabwehr und Charakteristika im Verlauf einer HCV-Infektion aufgezeigt werden.

1.2.1 Angeborene Immunabwehr

Die angeborene Immunabwehr zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass die Reaktion einheitlich und kurzfristig abläuft, ohne dass zuvor ein Antigenkontakt oder ein Priming der beteiligten Zellen hätte stattfinden müssen. Wichtige Protagonisten sind Dendritische Zellen (DZ), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und Makrophagen.

Für die vorliegende Arbeit sind sie im Einzelnen nicht relevant, da der Fokus auf die Verbesserung der adaptiven Immunabwehr gelegt werden soll. Daher wird an dieser Stelle nicht weiter auf die angeborene Immunabwehr eingegangen.

1.2.2 Adaptive Immunabwehr

Kennzeichnend für das adaptive Immunsystem sind die Antikörper-produzierenden B-Zellen sowie T-Zellen, welche zusammen die zelluläre Immunantwort repräsentieren.

B-Zellen

Wird eine B-Zelle durch Bindung an ein Antigen (Ag) aktiviert, differenziert sie zu einer Plasmazelle und ist in der Lage Ag-spezifische Antikörper (Ak) zu bilden, welche das Komplementsystem aktivieren. Des Weiteren werden Antigene internalisiert, prozessiert und über Haupthistokompatibilitätskomplex II (Major Histocompatibility Complex, MHC) den sogenannten CD4⁺ T-Zellen (Zellen, positiv für den Cluster of Differentiation 4) präsentiert (Murphy et al., 2018).

T-Zellen

T-Zellen erkennen ein Antigen, das im Komplex mit einem MHC-Molekül präsentiert wird. In dem MHC-Komplex befinden sich spezifische Epitope, die als kurzes Peptid aus dem Polyprotein eines Pathogens prozessiert und präsentiert werden und über T-Zellrezeptoren (TZR) auf T-Zellen gebunden werden. Um für die Vielzahl verschiedener Pathogene die Verfügbarkeit entsprechender Antigen-Rezeptoren sicherzustellen, ist eine enorme Diversität der TZR nötig, die durch Rekombination der genetischen Elemente des Rezeptors entsteht. Ein TZR besteht aus

verschiedenen Untereinheiten (α , β , γ , δ , ϵ), wobei jeweils α und β für die Bindung zu Antigenen verantwortlich sind. Die Untereinheiten weisen jeweils verschiedene Abschnitte auf, welche als V, (D) und J bezeichnet werden. Für jede dieser Untereinheiten liegen genomisch mehrere Varianten vor. Welche Variante von der entsprechenden Untereinheit im Rezeptor Verwendung findet, entscheidet sich zufällig (Rekombination). Anschließend werden diese Konstrukte enzymatisch (ebenfalls zufällig) geschnitten, verkürzt oder es werden einzelne Nukleotide eingefügt (junktionale Diversifizierung / somatische Hypermutation). Dieser Prozess der Entstehung der TZR wird somatische Rekombination (auch: V(D)J-Rekombination) genannt (Murphy et al., 2018). Die hierdurch entstehende Diversität ermöglicht es den T-Zellen an zahllose unterschiedliche Antigene zu binden. Die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Sequenzfolge entsteht, bezeichnet man als Vorläufersequenz. Diese ist ein entscheidender Aspekt in der Ausbildung von Immundominanz (s. Kap. 1.3).

Man unterscheidet CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Murphy et al., 2018).

CD4⁺ Zellen binden an durch MHC-II präsentierte Antigenfragmente und werden auch T-Helferzellen (Th) genannt. Insbesondere die Th₁-Zellen spielen eine wichtige Funktion in der viralen Abwehr, da sie IFN- γ und TNF- α produzieren. Hierdurch induzieren sie zum einen in B-Zellen eine vermehrte MHC-Produktion, zum anderen werden Makrophagen zur Phagozytose von infizierten Zellen angeregt. In Abhängigkeit von jeweils charakteristischen Transkriptionsfaktoren bei der Zelldifferenzierung und dem ausgeschütteten Zytokinprofil werden unterschiedliche CD4⁺ T Zellpopulationen unterschieden, einschließlich regulatorischer CD4 T-Zellen mit einer eher immunsuppressiven Wirkung.

Schließlich gibt es noch die **CD8⁺** oder auch **zytotoxischen T-Zellen** (Cytotoxic T-Lymphocyte, **CTL**). Sie werden durch Bindung an den MHC-I-Komplex aktiviert. Auch sie produzieren IFN- γ und TNF- α , ihre Besonderheit in der Immunantwort ist jedoch die zytotoxische Wirkung: Ähnlich den NK-Zellen schütten auch sie Perforin und Granzym aus, um eine infizierte Zelle zu zerstören. Außerdem können CD8⁺ T-Zellen bei Bindung über Fas-Liganden (FasL, CD154, CD95L) an Zielzellen über Induktion von Caspasen eine Apoptose einleiten (Murphy et al., 2018).

Der für die zytotoxischen T-Zellen benötigte MHC-I-Komplex wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), insbesondere von DZ präsentiert. Hierzu werden Antigene aus dem Zytosol prozessiert. Für die Antigenprozessierung werden Proteine zunächst im Zytosol durch das Proteasom in 2 – 32 Aminosäuren-große Fragmente zerlegt. Gegebenenfalls folgt eine weitere Kürzung der Fragmente durch Endopeptidasen und Aminopeptidasen. Anschließend werden alle Fragmente, die mindestens 8 Aminosäuren lang sind über den TAP (transporter, associated with antigen-processing) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Hier erfolgt eine weitere Kürzung der Antigenfragmente durch ERAP-1 und -2 (ER-resident aminopeptidasen).

Diese Reste der viralen Antigene entsprechen den exakten Epitop-Sequenzen. Flankierende Regionen werden gänzlich entfernt und enzymatisch zerkleinert. Die Epitope werden nun auf MHC-I-Moleküle geladen und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Dort werden sie gezielt den CD8+ Zellen präsentiert (Kloetzel, 2001) (s. a. Abb. 1.2: Lebenszyklus und Prozessierung von HCV).

Immunoproteasom

Im Verlauf einer Infektion können unter Einfluss von IFN- γ die Untereinheiten β -1, β -2 und β -5 des Proteasoms gegen LMP2;7 (low molecular mass protein) und MECL-1 (multicatalytic endopeptidase complex like) ausgetauscht werden, wodurch sich die Produktivität des Proteasoms noch steigern lässt (Basler et al., 2013). Die IFN- γ -Ausschüttung in Folge einer HCV-Infektion bildet hierbei keine Ausnahme (Shin et al., 2006). Die Fähigkeit unseres Organismus ein solches Immunoproteasom zu bilden unterstreicht sowohl die Bedeutung von IFN- γ in der viralen Abwehr, als auch die Bedeutung der Prozessierung an sich im komplexen Zusammenspiel der adaptiven Abwehr. (Khu et al., 2004; Nasheri et al., 2015). Zudem gibt es bereits Hinweise darauf, dass sich der protektive Charakter von Merkmalen wie dem HLA-B*27 Allel bei HCV-Infektionen auf einen deutlich gesteigerten Abbau viraler Ag zurückführen lässt (Schmidt et al., 2012).

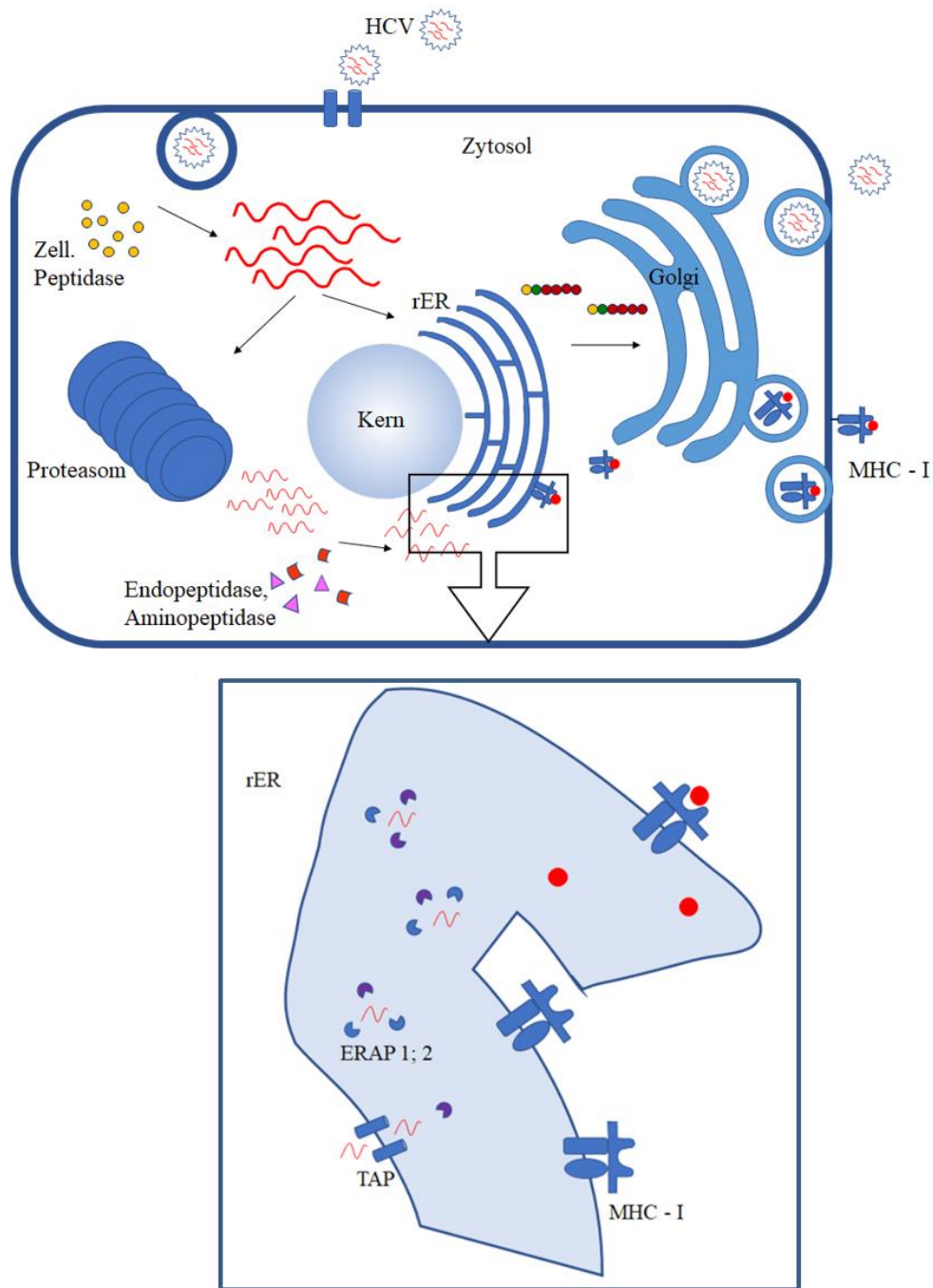


Abbildung 1.2: Lebenszyklus und Prozessierung von HCV

Das HC-Virus dringt über Endozytose in die Zelle ein und das Virion wird durch zelluläre Peptidasen freigelegt. Im Verlauf einer Infektion erfolgt die Translation und Prozessierung zu Struktur- und Nicht-Strukturproteinen im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER). Die anschließende Assemblierung geschieht im Golgi-Apparat, wonach neue HCV-Partikel aus der Zelle freigesetzt werden können.

Im Rahmen der adaptiven Immunreaktion dagegen werden virale Proteine im Proteasom in 2 – 32 Aminosäuren große Partikel zerteilt. Anschließend werden diese noch zusätzlich über zelluläre Endopeptidasen und Aminopeptidasen gekürzt. Alle Virusfragmente, die nun noch mindestens 8 Aminosäuren lang sind, werden über TAP (transporter, associated with antigen – processing) in das rER transportiert. Hier werden die Peptide auf die MHC-I Moleküle geladen und ggf. überstehende Aminosäuren durch ER-ständige Aminopeptidasen (ERAP, ER – resident aminopeptidasen) verdaut, bis nur noch exakt passende Epitopsequenzen verbleiben. Diese werden dann über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Hier können durch den MHC-I-Komplex, CD8+ zytotoxische T-Zellen aktiviert werden.

1.2.3 Verlauf einer Hepatitis-C-Virus-Infektion

Im Verlauf einer akuten Infektion mit dem HC-Virus kommt es zunächst im Rahmen der angeborenen Immunantwort sehr schnell zum Anstieg der Typ I und III Interferone, jedoch ohne den weiteren Verlauf der Infektion zu verhindern (Thimme et al., 2002). Erst nach sechs bis acht Wochen beginnt der Anstieg der T-Zellen und IFN- γ als Zeichen, dass die adaptive Immunabwehr in die Infektion eingreift. Die Viruslast beginnt zu sinken. Hier gilt es festzuhalten, dass eine frühe Bildung von neutralisierenden Antikörpern als Prädiktor gilt, dass die Infektion spontan ausheilt (Pestka et al., 2007), während ein spätes Auftreten eher für eine Chronifizierung spricht.

Gleichzeitig weist das Hepatitis-C-Virus Methoden auf, sich dem Immunsystem erfolgreich zu entziehen. Beispielsweise wird die IFN- β Ausschüttung verringert, wenn Phagosomen (Makrophagen oder Dendritische Zellen) HCV internalisiert haben und hierüber die angeborene Immunantwort abgeschwächt (Ke et al., 2011). Des Weiteren inhibieren NS3 und NS4A die Induktion von TLR3 und Rig-1 (Toll-like-receptor 3 und retinoic acid inducible gene I) (Foy et al., 2003), NS5A hemmt die PKR- sowie die ISG-Expression (Protein kinase R und Interferon-stimulated Genes) (Pflugheber et al., 2002) und Core unterbindet die IFN-Typ I-Produktion über die Blockade des JAK/STAT-Pfades (Janus kinases / Signal Transducer and Activator of Transcription proteins) (Lin et al., 2005), was im Weiteren in einer verminderten Aktivierung des Proteasomes resultiert (Stevenson et al., 2013).

Zusätzlich ist HCV ein hochreproduktives Virus, wodurch es zu zahlreichen Mutationen im Replikationszyklus kommt. Hierdurch liegt das Virus in verschiedensten Varianten im Organismus vor. Im Rahmen einer akuten Infektion kommt es unter dem Selektionsdruck des adaptiven Immunsystems zu einer Selektion von Mutationen, die zu einer Immunevasion führen (Timm et al., 2004). Der Erfolg dieser Immunevasion hat maßgeblichen Einfluss auf den weiteren Verlauf der Infektion (Erickson et al., 2001). Üblicherweise sind diese sogenannten „Escape“-Mutationen in den Zielepitopen der Immunantwort lokalisiert und verhindern so die Interaktion zwischen Peptide, MHC-Molekül und TZR. Es gibt aber in HCV und auch bei anderen Viren Beispiele, dass in den flankierenden Regionen eines Epitops „Escape“-Mutationen selektiert werden, die die Antigenprozessierung beeinträchtigen und damit zu einer Immunevasion führen (Seifert et al., 2004; Walker et al., 2016). Jede Mutation kann die Funktionalität der betroffenen Proteine beeinträchtigen und damit die virale Fitness herabsetzen (sogen. Fitnesskosten), so dass es unter Abnahme des Selektionsdruckes zu einer Reversion kommt (Timm et al., 2004). Dementsprechend gibt es die Annahme, dass die erfolgreichsten T-Zellantworten gegen hochkonservierte, eher stabile Epitope (z.B. in Core, NS3, NS5B) (Simmonds et al., 2005) gerichtet sind, welche aufgrund zu hoher Fitnesskosten keinen oder nur sehr geringen Sequenzänderungen unterliegen.

Zusammenfassend sind die adaptive Immunantwort mit CD8+ T-Zellen und die Ausschüttung von IFN- γ die Schlüsselkomponenten bei der Abwehr von HCV. Seitens HCV sind die Proteine Core, NS3, NS4B und NS5B wichtige Gegenspieler des Immunsystems. Zusätzlich sind Sequenzvariationen im Genom ein wichtiger Schlüssel zur Virusevasion.

1.3 Immundominanz

Durch eine Infektion werden dem Organismus unzählige Antigene präsentiert. Gleichzeitig können durch die enorme T-Zelldiversität theoretisch eine große Vielzahl unterschiedlicher T-Zell-Rezeptoren (TZR) auf die Antigene reagieren. Tatsächlich ist dies jedoch nicht der Fall. Stattdessen werden bestimmte Antigene überproportional häufig erkannt. Diesen Umstand bezeichnet man als Immundominanz dieser Antigene (Sercarz et al., 1993). Die genauen Hintergründe, die zur Immundominanz führen, konnten bis heute nicht endgültig geklärt werden, es werden jedoch zahlreiche Faktoren diskutiert.

Ein maßgeblicher Einflussfaktor auf die Entstehung von Immundominanz ist die Häufigkeit in der ein bestimmter TZR vorkommt, die sogenannte Vorläufersequenz. Bereits durch die Sequenzen naiver T-Vorläuferzellen liegt eine gewisse Prädisposition vor, wie häufig bestimmte Antigene erkannt werden. Es gibt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Vorläufersequenz und immundominanten Epitopen (Obar et al., 2008; Schmidt et al., 2011). Zusätzlich hat jedoch auch die Avidität des TZR selbst einen Einfluss darauf, wie stark ein Ag eine Immunantwort induziert: hier gilt es, die strukturelle Avidität (Stärke der Bindung zwischen TZR und dem Peptid-MHC-I-Komplex) und die funktionelle Avidität (relative Menge an Antigen, die benötigt wird, um eine T-Zelle zu aktivieren) zu unterscheiden. Die TZR-Avidität hat einen ebenso ernstzunehmenden Einfluss auf Immundominanz wie die Vorläufersequenz (Cukalac et al., 2014). Des Weiteren beeinflusst die TZR-Avidität maßgeblich die Spontanausheilung einer akuten HCV-Infektion (Neveu et al., 2008; Yerly et al., 2008).

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Immundominanz liegt in der Prozessierung eines Antigens, da diese die Basis jeder Epitop-Erkennung durch TZR bildet. Jede Veränderung der in Kap. 1.2 *Adaptive Immunabwehr* beschriebenen Abläufe der Prozessierung wirkt sich demzufolge auf die weitere Erkennung durch TZR aus und beeinflusst hierdurch schließlich auch die Immundominanz (Tenzer et al., 2009). Insbesondere das Immunoproteasom (s. Kap. 1.2.2) ist hierbei ein deutliches Beispiel für eine Veränderung der Immundominanz (K. C. Pang et al., 2006).

Im Falle von Hepatitis-C gelten vor allem die Proteine Core, NS3 und NS5B als immundominant, ihre Epitope provozieren als Antigene häufig starke T-Zellantworten (Li et al., 2008; Li et al., 2006; Simmonds et al., 2005). Daher stehen besonders diese Proteine im Fokus der Entwicklung

einer protektiven Vakzine (Liang, 2013), sie können das Potential für eine starke und breit aufgestellte T-Zellantwort bergen, welche für eine Spontanausheilung von HCV nötig ist.

1.4 Immundominante Epitope weiterer Viren

Um den Einfluss flankierender Sequenzen möglichst unabhängig vom Virus selbst untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit Epitope verschiedener Viren betrachtet. Diese sollen hier vorgestellt werden.

1.4.1 Influenzavirus: Matrixprotein M1

Das Matrixprotein M1 aus dem Influenzavirus Typ A umhüllt die Virus-RNA und verleiht dem Virion als Kapsid seine mechanische Stabilität. Zudem tritt das M1-Protein mit der Membran der Wirtszelle in Wechselwirkung, um die replizierten Virione aus dem Zytoplasma freizusetzen. Aufgrund dieser wichtigen Eigenschaften im Lebenszyklus des Virus wird das M1-Protein mittlerweile auch als Bestandteil neuerer Influenza-Impfungen genutzt (Atsmon et al., 2012; Lillie et al., 2012). In den hier vorliegenden Studien wurde das HLA-A*2 restringierte Epitop GILGFVFTL verwendet.

1.4.2 Cytomegalievirus: Proteinkinase pp65

Die CMV-spezifische Proteinkinase pp65 ist vor allem für die Virusevasion verantwortlich. Es tritt bereits sehr früh zu Beginn einer CMV-Infektion auf und wird klinisch zum Nachweis einer akuten CMV-Infektion genutzt (CMV-Antigenämietest) (Mhiri et al., 2007). Zum einen phosphoryliert es die immediate-early (IE) Proteine, welche die Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen blockieren (Gilbert et al., 1996). Zum anderen interagieren die IE mit NKp30-aktivierenden Rezeptoren, wodurch sie einen Angriff durch NK-Zellen abwehren können (Arnon et al., 2005). Zusätzlich vermindert pp65 die IFN-Antwort des infizierten Organismus (Abate et al., 2004). In den hier vorliegenden Studien wurde das HLA-A*2 restringierte Epitop NLVPMVATV verwendet.

1.5 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Bedeutung der Antigenprozessierung, da jede weitere Reaktion einer T-Zelle auf den Ergebnissen einer optimalen Prozessierung und Antigenpräsentation basiert.

Bei einer HIV-Infektion übt die Sequenz der Regionen, welche die Zielepitope umgeben, einen Einfluss auf die Qualität und Quantität der prozessierten Epitope aus (Jallow et al., 2015). In dieser Arbeit wird untersucht, ob dieses analog für HCV gilt und sich über Veränderungen dieser Epitop-flankierenden Sequenzen die Immunantwort steigern lässt.

Ziel ist es, die flankierenden Sequenzen der Epitope Core, NS3 und NS5B isoliert und unabhängig von den Epitopen selbst betrachten zu können. Hierzu werden artifiziell erzeugte Epitope in verschiedenen genomischen Kontexten erzeugt und die dadurch erzeugte Immunantwort durch die Messung von IFN- γ quantifiziert und analysiert.

Mit dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass die Epitop-flankierenden Sequenzen von HCV einen bedeutenden Einfluss auf die Effektivität der Prozessierung haben (Kap. 3.1). In Kap. 3.2 sollen einflussnehmende Sequenzen in der Epitop-Umgebung näher untersucht und eingegrenzt werden. Wenn die flankierenden Regionen um ein Epitop einen Einfluss darauf haben, wie intensiv die zytotoxische T-Zellantwort darauf ausfällt, stellt sich die Frage, ob und inwieweit dieser Einfluss auch funktionell genutzt werden kann. Kann die Immunantwort auf ein Epitop, auf welches bislang vergleichsweise schwach reagiert wurde, durch Veränderung der flankierenden Sequenzen verbessert werden? In Kapitel 3.3 wird untersucht, ob sich die Immunantwort auf einzelne HCV-Epitope durch Sequenzänderungen in den flankierenden Regionen gezielt steigern lässt. Abschließend wird die Antigenprozessierung als Einflussfaktor für Immundominanz in Konkurrenz zu anderen Faktoren wie der Avidität betrachtet (Kap. 3.4).

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die im Folgenden aufgeführten Materialien, Geräte und Substanzen wurden genutzt, um die beschriebenen Versuche durchzuführen.

2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektroporator	Nucleofector II	Lonza Group Ltd.
Durchflusszytometer	FacsCalibur	Becton Dickinson GmbH
	BD FACS Aria I&II	Becton Dickinson GmbH
	Navios Flow Cytometer	Beckman Coulter GmbH
Kühler	Nalgene Cryo 1 °C Freezing	Thermo Fisher Scientific Inc, Nalgene
Mikroskope	Primo Vert	Carl Zeiss AG
	Nikon TMS	Nikon GmbH
	Leica DMIL LED	Leica Microsystems GmbH
PCR-Cycler	MJ Mini	Bio Rad Laboratories GmbH
Pipetten	Pipetman (10; 200; 1000 µl)	Gilson, Inc.
	Eppendorf research plus (10; 20; 200; 1000 µl)	Eppendorf AG
	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
	Handy Step	Brand GmbH & Co. KG
Rüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
	Voatex genie II	Scientific Industries, Inc.
	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
	Thermoshake	C. Gerhardt GmbH & Co. KG
	GFL 3020	Peter Oehmen GmbH
Sicherheitswerkbank	Hera Safe KS12	Heraeus Holding GmbH
	Hera Safe HS12	Heraeus Holding GmbH
Spektralphotometer	Gene Quant pro	GE Healthcare (Amersham Biosciences Europe GmbH)
	Nano Drop1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.

UV-Geräte	FLX-20M	Eurofins MWG GmbH
	Gene Genius, Bio Imaging System	Synoptics Ltd.
Vakuumpumpe	Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold	Promega Corporation
Wasserbad	Inkubations-/Inaktivierungsbad 1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf AG
	Micro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
	Heraeus Megafuge 4R Centrifuge	Thermo Scientific
	Heraeus Megafuge 1.0 R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc
	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter GmbH

Tab. 2.1 Geräte

2.1.2 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
Amaya Human T Cell Nucleofactor Kit	Lonza Group Ltd.
HiSpeed Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen N. V.
Nucleospin Gel and PCR Clean Up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit	Life Technologies Corporation, Invitrogen
Pure Yield Plasmid Maxiprep System	Promega Corporation
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen N. V.
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen N. V.

Tab. 2.2 Kommerzielle Kits

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Bezeichnung	Hersteller
Einfrierröhrchen	Cryo.S (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Filter	Faltenfilter 595½ (Ø270; Ø125 mm)	Whatman GmbH
Kulturflaschen	Cellstar Cell Culture Flasks (50; 250 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Küvetten	Elektroporationsküvetten	Lonza Group Ltd.
Mikroreaktionsgefäße	Reaktionsgefäße (0,2; 1,5; 2 ml)	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	TipOne Spitzen (10; 200; 1000 µl)	StarLab GmbH
	Cellstar serological pipette (5; 10; 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH
	Pipette Tip (200 µl)	Gilson, Inc.

Polystyrol Gefäße	Cellstar Tubes (15; 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH
	Round Bottom Tube (5; 14 ml)	Becton Dickinson GmbH
	Leucosep (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Bioscience
Zellkulturplatten	Cellstar Culture Dishes, 94 x 16 mm	Greiner Bio-One GmbH
	Microtest Tissue Culture Plate, 96 Well	Becton Dickinson GmbH

Tab. 2.3 Verbrauchsmaterialien

2.1.4 Chemikalien

Puffer

Bezeichnung	Hersteller
BSA	New England BioLabs Inc.
Buffer for T4 Ligase	New England BioLabs Inc.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Life Technologies Corporation, Gibco
Green GoTaq Flexi Buffer	Promega Corporation
HEPES-Buffer Solution (1M)	PAA Laboratories GmbH
NEB 2; 3; 4	New England BioLabs Inc.
Opti Mem-1	Life Technologies Corporation, Gibco
Phusion HF-Buffer	New England BioLabs Inc.
Ultra Pure 10x TBE-Buffer	Life Technologies Corporation, Gibco

Tab. 2.4 Puffer

Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Bac I	New England BioLabs Inc.
Bam HI	New England BioLabs Inc.
Bsp HI	New England BioLabs Inc.
DNase 1	Roche Diagnostics GmbH
Dpn I	New England BioLabs Inc.
GoTaq Polymerase	Promega Corporation
Hind III	New England BioLabs Inc.
Kas I	New England BioLabs Inc.
Lipofectamin	Life Technologies Corporation, Invitrogen
Mlu I	New England BioLabs Inc.
Nco I	New England BioLabs Inc.
Phusion DNA-Polymerase	New England BioLabs Inc.

Pvu II	New England BioLabs Inc.
T4 DNA Ligase M0202S	New England BioLabs Inc.
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH
Xba I	New England BioLabs Inc.

Tab. 2.5 Enzyme

Antikörper

Bezeichnung	Flouochrome	Hersteller
CD8	PE	Becton-Dickinson GmbH
Fixable Viability Dye eFluor 780	APC	eBioscience, Inc.
IFN- γ	APC	Becton-Dickinson GmbH

Tab. 2.6 Antikörper

Sonstige Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose	Eurogentec Deutschland GmbH
Ampicillin	Roche Deutschland Holding GmbH
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH
6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH
dNTPs	New England Laboratories
Ethanol absolute anhydrous	Carlo Erba Reagents
Ethidiumbromidlösung, 0,025%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Fast Imune CD28 / CD49d	Becton-Dickinson GmbH
FACS-Clean	Becton Dickinson GmbH
FACS-Flow	Becton Dickinson GmbH
FACS-Rinse	Becton Dickinson GmbH
FBS Superior	Biochrome AG
Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH
Glyco Blue	Life Technologies Corporation, Ambion
Human interleucin-2 (IL-2)	Roche Diagnostics GmbH
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
LB-Medium (Luria-Bertani broth)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pancoll Human	PAN Biotech GmbH
Penicillin / Streptomycin (100 %)	PAA Laboratories GmbH
Perm Wash	Becton Dickinson GmbH
RPMI 1646	PAA Laboratories GmbH

3M Sodium Acetate (pH 5,5)	Life Technologies Corporation, Ambion
----------------------------	---------------------------------------

Tab. 2.7 Sonstige Chemikalien

2.1.5 Sequenzen

Primer

Alle Primer wurden von der Firma Biomers.net GmbH synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Flankierende Region	Epitop
(+)-Core-DLMGYIPLV-to Flu	-cct gag aag ctt cca cca tgg ata ccc tta cgt gcg gct tcg ccg gta tct tgg gat ttg tat tta cac tgg gcg ccc ctc ttg gag gcg ctg cgt cga cgg ggg gag gcg gta cg-	Core	M1
(+)-NS3-KLVALGINAV-to Flu	-cct gag aag ctt cca cca tga aga agt gcg acg agc tcg ccg cgg cgg gta tct tgg gat tat tta cac tgg cct act acc gcg gtc ttg acg tgt cga cgg ggg gag gcg gta cg-	NS3	M1
(+)-NS5B-ALYDVVTKL-to Flu	-cct gag aag ctt cca cca tgg gcg tgc gcg tgt gcg aga aga tgg gta tct tgg gat ttg tat tta cac tgc ccc tgg ccg tga tgg gaa gct cgt cga cgg ggg gag gcg gta cg-	NS5B	M1
(+)-Flu-GILGFVFTL-to Flu	-cct gag aag ctt cca cca tgc cca tcc tga gcc ccc tga cca agg gca tcc tgg gct tcg tgt tca ccc tga ccg tgc cca gcg agc ggg gcc tgt cga cgg ggg gag gcg gta cg-	M1	M1
(+)-Core-DLMGYIPLV-to CMV	-ctt gag aag ctt cca cca tgg ata ccc tta cgt gcg gct tcg cca acc tgg tgc cca tgg tgg cca ccg tgg gcg ccc ctc-	Core	pp65
(+)-NS3-KLVALGINAV-to CMV	-ctt gag aag ctt cca cca tga aga agt gcg acg agc tcg ccg cga acc tgg tgc cca tgg tgg cca ccg tgg cct act acc gcg gt-	NS3	pp65
(+)-NS5B-ALYDVVTKL-to CMV	-ctt gag aag ctt cca cca tgg gcg tac gcg tgt gcg aga aga tga acc tgg tgc cca tgg tgg cca ccg tgg cct act acc gcg gt-	NS5B	pp65
(+)-Flu-GILGFVFTL-to CMV	-ctt gag aag ctt cca cca tgc cca tcc tga gcc ccc tga cca aga acc tgg tgc cca tgg tgg cca ccg tgg	M1	pp65

	cct act acc gcg gt-		
(+)-Core-DLMGYIPLV-to NS5B	-ctt gag aag ctt cca cca tgg ata ccc tta cgt gcg gct tcg ccg ccc tgt acg acg tgg tta gca agc tcg gcg ccc ctc ttg g-	Core	NS5B
(+)-NS5B-ALYDVVTKL-to CMV	-ctt gag aag ctt cca cca tgg gcg tgc gcg tgt gcg aga aga tgg ccc tgt acg acg tgg tta gca agc tcc ccc tgg ccg tga tg-	NS5B	NS5B
(-)-SV40 PolyA-Primer	-cgc aaa tgg gcg gta ggc gtg-		

Tab. 2.8 Primer

Peptide

Die hier aufgeführten Peptide wurden von dem Unternehmen Peptides & Elephants GmbH mit einer Konzentration von 20 µg/µl in DMSO (Reinheit >70%) hergestellt. Sie sind jeweils spezifisch für HLA-A02.

Interne Peptid-Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
P11	NS3	KLVALGINAV
P47	NS5B	ALYDVVTKL
P115	pp65 (CMV)	NLVPMVATV
P260	M1 (Flu)	GILGFVFTL
P296	NS5B	ALYDVVSKL
P300	Core	DLMGYIPLV

Tab. 2.9 Peptide

2.1.6 Pro- und Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Zellart	Hersteller / Herkunft
293T	Human embryological kidney cells	LGC Standards GmbH, ATCC
Huh-Cells	Hepatozelluläre Karzinomzellen	LGC Standards GmbH, ATCC
PBMC (HCV-)	Peripheral blood mononuclear cells	Institut für Transfusionsmedizin, UK Essen
PBMC (IDU, HCV+)	Peripheral blood mononuclear cells	LVR-Klinikum Essen

Top10-Cells	E. Coli	Life Technologies Corporation, Invitrogen
-------------	---------	--

Tab. 2.10 Pro- und Eukaryotische Zellen

2.1.7 Dienstleister, PC-Programme, Internet

Bezeichnung	Anbieter
euHCVdb	The European hepatitis C virus database
Flow Jo7.6.5	Tree Star, Inc.
HCV Sequence Database	http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html
Microsoft Office 2007 und 2010	Microsoft Corporation
NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Peptidsynthese	peptides&elephants GmbH EMC microcollections GmbH
Primersynthese	Biomers.net GmbH
Prism5.01	GraphPad Software, Inc.
Sequenzierung	GATC-Biotech LGC Genomics GmbH
Microsoft Windows XP; 7 und 10	Microsoft Corporation

Tab. 2.11 Dienstleister, PC-Programme, Internet

2.1.8 Rezepte für Eigenansätze

Ansatz für:	Zusammensetzung
Agar-Platten	25 g LB-Medium 15 g Agar-Agar 1 ml Antibiotikum (Ampicillin, Kanamycin) 1 l Milipore-Wasser
Antibiotika 50 mg/ml	2,5 g Ampicillin oder Kanamycin 50 ml H ₂ O
Facs-Buffer	1 l DPBS 0,02 % Na-azide 0,5 % FBS
Freezing-Medium	90 % FBS 10 % DMSO
R10-Medium	500 ml RPMI 1646 10 % FBS 1% Penicillin/Streptomycin 1% HEPES-Puffer

Tab. 2.12 Rezepte für Eigenansätze

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction dient dazu, DNA-Fragmente zu amplifizieren. Hierzu wird zunächst das benötigte DNA-Fragment (Template) durch Erhitzen auf 98 °C denaturiert, woraufhin sich bei anschließender Abkühlung auf 52 °C die Primer an die einsträngige DNA anlagern (Annealing). Mittels erneutem Erhitzen auf 72 °C synthetisiert die Polymerase hieraus erneut doppelsträngige DNA-Fragmente (Extension). Durch mehrfache Wiederholung des Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Extension kann eine große Anzahl an DNA-Fragmenten gewonnen werden.

Ansatz	Zusammensetzung	Menge
<u>Taq-Polymease</u>	Template (+)-Primer [10pmol/ µl] (-)-Primer [10pmol/ µl] Go Taq-Polymerase 5x Green Go Taq Flexi Buffer dNTP's [20 mM] H ₂ O	0,5 µl 1 µl 1 µl 0,5 µl 10 µl 1 µl 36 µl
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Template H ₂ O (+)-Primer (-)-Primer Phusion DNA-Polymerase HF-Buffer dNTP's H ₂ O	1µl 32,5µl 2,5µl 2,5µl 0,5µl 10µl 1µl 32,5µl

Tab. 2.13 Zusammensetzung der PCR Ansätze

Phase	Dauer	Temperatur	Wiederholung
Initiale Denaturierung	30 sec.	98 °C	
Denaturierung	10 sec.	98 °C	
Annealing	30 sec.	52 °C	
Extension	60 sec.	72 °C Taq-Polymerase	25 Zyklen
	30 sec.	72 °C Phusion-Polymerase	30 Zyklen
Finale Extension	5 min.	72 °C	

Tab. 2.14 PCR-Programm

PCR-Mutagenese

Bei der Mutagenese geht es darum, DNA-Sequenzen gezielt zu ändern und gleichzeitig zu amplifizieren. Hierbei werden das Template und die Primer so gewählt, dass die Primer entweder in Leserichtung am 5'-Ende gelegen sind und somit die gewünschte Zielsequenz einschließen, oder entsprechend die zu deletierende Sequenz am 3'-Ende flankieren und somit aussparen.

Die übrigen Schritte gleichen denen einer PRC (Erläuterung s. o.) und dienen der Erzeugung und Amplifizierung der gewünschten DNA-Sequenz.

Sequenzen der verwendeten Primer siehe im Anhang.

Gelelektrophorese, Gelextraktion

Agarose-Gelelektrophorese Die Gelelektrophorese wurde mit 0,9 % igen Agarose-Gelen bei einer angelegten Spannung von 120 V für ca. 45Min durchgeführt. Aufgrund der negativ geladenen DNA - Seitenketten beginnen die aufgetragenen DNA-Fragmente sich von der Kathode zur Anode zu bewegen. Durch die relative Dichte des Gels und damit einhergehenden Geschwindigkeitsunterschieden in der Wanderung der Fragmente, werden die einzelnen DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. Somit werden entweder die enthaltenen Fragmente optisch der Größe nach beurteilt und identifiziert, oder auch ein gezieltes Fragment isoliert.

Agarose-Gelextraktion Um die durch Elektrophorese erhaltene DNA aus dem Gel zu extrahieren, wurde das *Nucleospin Gel and PCR Clean Up Kit* der Firma Macherey-Nagel nach deren Protokoll verwendet. Hierbei wird das Gel zunächst in NT1-Puffer gelöst und die DNA durch Zentrifugation auf eine Silica-Membran gebunden. Anschließend wird die Membran mit NT3-Puffer zweifach gewaschen und durch Zentrifugieren von Ethanol-Rückständen aus den Puffern befreit. Schließlich wird die DNA nach Einwirken des NE-Puffers in ein Reaktionsgefäß eluiert werden.

Klonierung von PCR-Produkten

Bei der Klonierung wird ein DNA-Fragment in einen Vektor eingebracht und über diesen die DNA z. B. in Zellen transfiziert. Die hier verwendeten Plasmide entstehen durch die pTOPO-Klonierung. Bakterien amplifizieren anschließend die transformierten Fragmente. Der Erfolg der Klonierung wird durch eine Kontrollsequenzierung überprüft.

TOPO-Reaktion Mittels der TOPO-Reaktion wird ein PCR-Fragment in ein Plasmid eingebracht. Hierzu ist dem Vektor pcDNA3.1TOPO bereits die Vaccinaivirus DNA der Topoisomerase angelagert, welche reversibel die Doppelhelix der Plasmid-DNA aufschneidet und ein Einbringen der fremden DNA des PCR-Fragmentes ermöglicht. Hierzu sind 30 Min. Inkubation bei Raumtemperatur nötig. Gemäß den Herstellerangaben wird noch eine Salzlösung

hinzugegeben, um die Topoisomerase in Lösung zu halten und so die Klonierung effektiver zu gestalten.

Ansatz	Zusammensetzung	Menge
Ansatz einer TOPO-Reaktion:	PCR-Produkt Saltsolution Vektor pcDNA3.1TOPO	4 µl 1 µl 1 µl

Tab. 2.15 Ansatz einer TOPO-Reaktion

Transformation von Plasmiden in E. coli Bakterien

Zunächst werden die bei -80 °C gelagerten E. coli Bakterien (Top 10) auf Eis aufgetaut. Nun werden 25 µl Bakterien je 1 µl Maxi-DNA oder 2,5 µl Ligations-DNA hinzugefügt. Während der folgenden 10 Min. Inkubation auf Eis kann sich die DNA an die Zelloberfläche der Bakterien anlagern. Hierauf folgt ein 60 Sek. Hitzeschock bei 42 °C, durch welchen sich Poren in der Zellmembran öffnen und die DNA von E. coli aufgenommen wird. Bei der anschließenden Inkubation auf Eis für 5 Min schließen sich die Poren wieder. Nun wird 120 µl LB-Medium hinzugefügt, um das CaCl₂, mit welchem die Bakterien chemisch kompetent gemacht wurden, hinreichend zu verdünnen (Kompetenz von Bakterien = Die Fähigkeit von Bakterien, DNA aufzunehmen). Dieser Ansatz inkubiert nun 60 Min. bei 37 °C und leichtem Rütteln (700 rpm), damit die Zellen sich erholen können und die auf der DNA enthaltene Resistenz ausreichend exprimiert werden kann.

Abschließend plattiert man die Bakterien auf einer vorgewärmten Agar-Platte aus und inkubiert sie über Nacht bei 37 °C. Die Agar-Platte ist mit entsprechendem Antibiotikum versehen, damit ausschließlich erfolgreich transformierte Bakterien, welche entsprechende Resistenzgene exprimieren, Kolonien ausbilden.

Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA wird ausschließlich nach den Protokollen spezieller Kits verfahren. Kleine DNA-Präparationen wurden mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit (250)* von Qiagen präpariert, während für größere Präparationen Maxi-DNA Kits der Firmen Promega oder Qiagen verwendet werden. Alle Kits funktionieren nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, bei welchem zunächst die Bakterien durch eine starke Base lysiert und Proteine sowie chromosomale DNA mittels SDS (sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) ausgefällt werden.

Anschließend wird die Plasmid-DNA durch Ethanol ausgefällt und auf eine entsprechende Membran gebunden. Nach einem Waschvorgang werden die Plasmide schließlich wieder von der Membran gelöst und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

Aufkonzentrierung von DNA

Sollte nach der Präparation der Plasmid-DNA die Konzentration geringer als 0,6 µg/µl sein, muss die DNA aufkonzentriert werden. Hierfür wurden zu 500 µl der Plasmid-Lösung 60 µl 3M Natrium-Acetate (pH 5,5) sowie 1 µl Glyco Blue hinzugegeben und alles mit Ethanol absolut auf 2 ml aufgefüllt. Über Nacht wird dies bei -20 °C gelagert, damit die DNA aus der Lösung ausfällt.

Am Folgetag wird alles für 30 Min bei 4 °C und mit 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgetragen und das DNA-Pellet zweimal mit je 600 µl Ethanol (70 %) gewaschen und für 20 Min. bei 4 °C mit 13000 rpm abzentrifugiert. Abschließend wird bei 50 °C das Ethanol verdampft. Die reine DNA wird in 100 µl H₂O resuspendiert.

Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der verwendeten DNA erfolgt durch die Firmen LGC und GATC-Biotech.

Ansatz	Zusammensetzung	Menge
Sequenzierungsansatz	Plasmid-DNA Sequenzierungsprimer H ₂ O	1,5 µg 25 pmol (i.d.R. 2,5 µl) ad 10 µl

Tab. 2.16 Sequenzanalyse

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Leukozytenextraktion (Isolation von PBMCs aus peripherem Vollblut)

Die PBMCs werden aus peripherem Vollblut gewonnen, welches von gesunden Blutspendern oder HCV-Patienten zur Verfügung gestellt wird. Hierzu wird die Blutprobe durch einen mit Biocoll gefüllten Ficoll-Falcon abzentrifugiert (2200 rpm, 7 Min), wodurch der Buffy-Coat (Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten aus Vollblut, auch Leukozytenfilm) über der Filtermembran isoliert wird. Dieser Überstand wird zweimal mit PBS gewaschen. Abschließend wird das Pellet in 4,5 ml FBS resuspendiert und mit 4,5 ml 20 % DMSO-Lösung aufgefüllt. Das DMSO diffundiert in das Zytosol, lässt das Wasser ausströmen und dadurch die Zelle schrumpfen. Hierdurch wird während des Gefriervorganges eine intrazelluläre Kristallbildung verhindert und die Zellstruktur geschützt. Nach Hinzufügen des DMSO werden je 0,5 ml der Lösung in ein Kryo-Röhrchen gegeben und in Nalgene Cryo 1 °C Freezing über Nacht auf -80 °C herabgekühlt. Am nächsten Tag können die PBMCs bei -180 °C im Stickstofftank dauerhaft kryokonserviert werden.

Auftauen von Zellen

Die bei -180 °C gelagerten Zellen werden im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und mit 1 ml FCS in einen 15 ml Falcon mit 20 µl DNase überführt. Die DNase vermindert dabei ein mögliches verklumpen der Zellen. Anschließend wird zügig mit DPBS auf 10 ml aufgefüllt und abzentrifugiert (1800 rpm, 7 Min). Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit 10 ml DPBS können die Zellen in 5 ml R10-Medium (1,5-2 Mio Zellen pro 1 ml Medium) resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt werden.

Transfektion

Bei einer Transfektion wird fremde DNA oder RNA in Zellen eingebracht. In dieser Arbeit wird GFP exprimierende Plasmide in Buffy-Zellen transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wird nach 24 Std. anhand der grünfluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie beurteilt.

Transfektion mittels Lipofectamin

Für die Lipofectamin-Transfektion werden zunächst 0,8 µg Plasmid-DNA mit Opti-Mem-Puffer auf eine 50 µl Lösung aufgefüllt, sowie 2 µl Lipofectamin ebenfalls mit 48 µl Opti-Mem gemischt. Beide Lösungen werden 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die DNA- und die Lipofectamin-Lösung vermischt und für 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bildet sich ein Komplex aus Lipofectamin und DNA. Anschließend wird der Lipofectamin-Komplex zu einer definierten Zahl an Zellen (hier 6×10^5 Zellen) hinzugefügt. Nun transferiert der lipophile Komplex die Plasmide durch die Zellmembran hindurch. Es folgen die 24 Std. Inkubationszeit bei 37 °C im Inkubator.

Transfektion mittels Elektroporation

Für die Elektroporation wird das *Amaxa Human T Cell Nucleofactor Kit* der Firma Lonza verwendet. In diesem werden je Ansatz 6×10^7 Zellen für max. 15 Min mit der N-Solution (je 82 µl Solution, 18 µl Supplement) sowie 7,5 µg des zu transfizierenden Plasmids bei Raumtemperatur inkubiert und in Elektroporationsküvetten überführt. Anschließend folgt der Elektroschock durch das Elektroporationsgerät *Nucleofactor II*, ebenfalls von der Firma Lonza (Programm V - 024). Daraufhin werden die Zellen zügig in 10 ml vorgewärmtes R 10-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert. Es folgen nach 30 Min sowie nach 6 Std. je ein 50 %iger Mediumwechsel, bevor nach 24 Std. Inkubation schließlich der Transfektionserfolg beurteilt wird.

2.2.3 Biochemische/immunologische Methoden

Intrazelluläre Zytokinfärbung

Bei der ICS (Intrazelluläre Zytokinfärbung) werden Intra- und Extrazelluläre Zellmerkmale mittels Antikörpern markiert und angefärbt, um diese im Durchflusszytometer zu beurteilen. Es wird extrazellulär CD8 und intrazellulär IFN- γ gefärbt, z. T. wird extrazellulär als Kontrolle eine zusätzliche Lebend-Tot-Färbung hinzugefügt. Hierbei werden sich Defekte in der Zellmembran von nicht lebensfähigen Zellen zu Nutze gemacht. Der Antikörper *Fixable Viability Dye eFlour 780* durchdringt dabei die Zellmembran, lagert sich an die DNA an und färbt diese ein.

Zur Durchführung einer intrazellulären Zytokinfärbung werden die zu untersuchenden PBMCs (Effektoren) 10 Tage lang in Kultur mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ eines entsprechenden Peptids (z. B. M1, pp65 oder NS5B) stimuliert. Am Tag der Messung werden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, dann erneut mit 100ml Peptid (0,1 $\mu\text{g/ml}$) oder einer vorgesehenen Anzahl antigenpräsentierender Zellen (Targets) stimuliert. Hierbei werden 100 μl Brefeldin A (BFA) (1:100 000 verdünnt) hinzugefügt, welche den Transport des intrazellulär produzierten IFN- γ vom rER zum Golgi-Apparat unterbindet und so zu einer Akkumulation von IFN- γ in der Zelle führt. Dieser Ansatz inkubiert 4 - 5 Std. bei 37 $^{\circ}\text{C}$. Anschließend werden die Zellen zweifach mit einer 1 %igen PBS/FCS-Mischung gewaschen. Nun werden je 0,25 μl des CD8-PE oder 0,1 μl CD8-perCPCy5-Antikörpers in 100 μl PBS auf die Zellen gegeben, welche die Zelloberflächen der CD8+ T-Zellen markieren. Nachdem diese Antikörper 30 Min bei 4 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert haben, wird erneut zweifach mit PBS/FCS gewaschen. Anschließend werden alle Reaktionen in der Zelle durch 20 Min. Inkubation bei 4 $^{\circ}\text{C}$ mit Fixationspuffer beendet.

Nachdem dieser Puffer zweifach mit Perm-Lösung ausgewaschen wurde, folgt ein letzter Färbeschritt, bei welchem durch Inkubation (30 Min, 4 $^{\circ}\text{C}$) mit einem weiteren Antikörper (APC IFN- γ) intrazellulär das gebildete IFN- γ markiert wird. Abschließend wird auch dieser Antikörper zweifach mit der Perm-Lösung ausgewaschen. Nun können die Zellen in 200 μl PBS resuspendiert und die Ergebnisse per Durchflusszytometrie (z.B. *Facs Calibur*) analysiert werden.

Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden fixierte Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und zuvor durch Antikörper gefärbten Merkmale beurteilt und graphisch dargestellt. So erfolgt eine detailliertere Analyse der vorhandenen Zellpopulation. Die Geräte *Facs Aria I & II* sind zusätzlich in der Lage, ausgewählte Zellpopulationen aus Proben zu isolieren und diese somit zu sortieren.

3 Ergebnisse

Für eine suffiziente Abwehr einer HCV-Infektion ist eine gute initiale Antwort der CD8+ T-Zellen unerlässlich (Gruner et al., 2000; Shin et al., 2006; Wedemeyer et al., 2002). Grundvoraussetzung hierfür ist unter anderem, dass HCV-Epitope effizient prozessiert und an der Zelloberfläche präsentiert werden. Im Folgenden wird dargestellt, inwieweit die flankierenden Sequenzen von HCV-Epitopen einen Einfluss darauf haben. Exemplarisch wurden hierfür die immundominanten HLA-A*02-restringierten Epitope Core, NS3 und NS5B zur Untersuchung ausgewählt. Des Weiteren wird hinterfragt, welcher Anteil der flankierenden Regionen hierbei Einfluss nimmt und wie sich der Einfluss in Konkurrenz zu anderen Faktoren verhält.

3.1 Die flankierenden Sequenzen von HCV-Epitopen haben Einfluss auf deren Prozessierung zu MHC-1 Peptiden

Um ausschließlich den Einfluss der flankierenden Regionen von HCV-Epitopen auf die Prozessierung zu untersuchen, war es zunächst wichtig, die flankierenden Sequenzen losgelöst von ihrem ursprünglichen genomischen Kontext zu betrachten. Dazu wurden Konstrukte hergestellt, in welchen das HLA-A*02 restringierte Epitop GILGFVTL aus dem Matrixprotein M1 des Influenza A Virus von den jeweiligen flankierenden Sequenzen der HCV-Epitope umgeben ist. Das M1-Epitop wurde ausgewählt, da sehr viele Blutspender eine T-Zellantwort gegen M1 aufweisen.

Bezeichnung	Sequenz
Core- Flu- Core	DTLTCGFA <i>GILGFVFTL</i> GAPLGGAA
NS3- Flu- NS3	KKCDELAA <i>GILGFVFTL</i> AYYRGLDV
NS5B- Flu- NS5B	GVRVCEKM <i>GILGFVFTL</i> PLAVMGSS
Flu- Flu- Flu	PILSPLTK <i>GILGFVFTL</i> TVPSERGL

Tab. 3.1 Klonierte Modellkonstrukte mit dem HLA-A*02 Epitop aus dem Matrixprotein M1
Die M1 Konstrukte sind in kursiv dargestellt.

Die verschiedenen in Tab. 3.1.1 aufgeführten HCV/M1-Sequenzen wurden mittels PCR-Mutagenese an das grün-fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt um sowohl die Transfektionseffizienz zu überprüfen, als auch die Möglichkeit zu haben, erfolgreich transfizierte Zellen mittels eines Zellsorters zu isolieren (s. Abb. 3.1). Die PCRs wurden anschließend per TOPO-Reaktion in den pcDNA3.1V5/His-Topo Vektor kloniert (siehe Abb. 5.1 im Anhang).

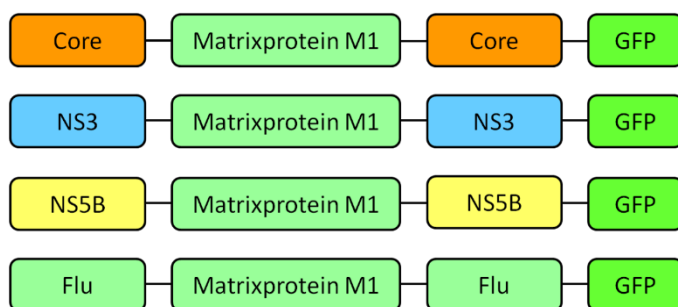


Abbildung 3.1: Schema der klonierten HCV/M1-Konstrukte

Schematisch abgebildet sind die Konstrukte, welche in einem pcDNA3.1V5/His-Topo Vektor in PBMCs transfiziert wurden. Es handelt sich jeweils um das das HLA-A*02 restringierte Epitop GILGFVTL aus dem Matrixprotein M1, umgeben von unterschiedlichen flankierenden Sequenzen von immundominanten Epitopen des Hepatitis-C-Virus: Core, NS3 und NS5B. Zusätzlich wurden die Konstrukte an ein GFP gekoppelt, welches für die spätere Detektion mittels Durchflusszytometrie genutzt wurde.

Im Folgenden wurde der Einfluss dieser flankierenden Sequenzen auf die Prozessierung des Modellepitops untersucht. Hierzu wurden die Vektoren mittels Elektroporation in HLA-A*02 positive PBMCs transfiziert. Nach 24 Std. wurde die Transfektionseffizienz anhand des im Zytosol exprimierten GFPs sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch über Durchflusszytometrie nachgewiesen.

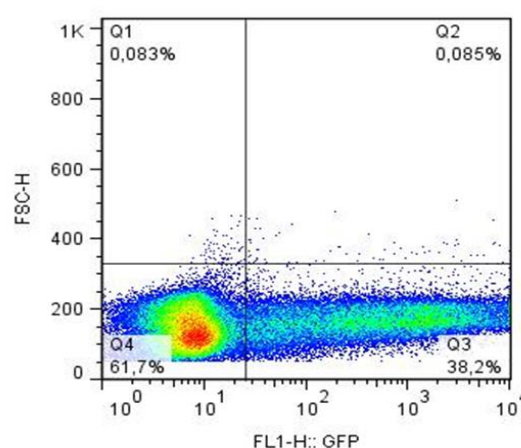
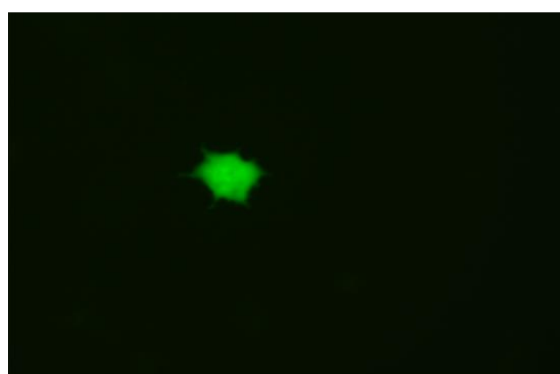


Abbildung 3.2: Leukozyten nach Transfektion

Mittels Elektroporation wurden die in Tab. 3.1 gezeigten Plasmide in Leukozyten transfiziert. Diese Plasmide beinhalten je das Influenza Epitop M1, welches von den verschiedenen flankierenden Sequenzen eines HCV-Epitopes, oder als Kontrolle von den ursprünglichen M1-Sequenzen umgeben ist. Zusätzlich enthält das Fragment GFP, welches von den Leukozyten nach 24 Std. im Zytosol produziert wird. Links: Erfolgreich transfizierte Zellen werden durch GFP unter fluoreszierendem Licht eindeutig identifizierbar. Rechts: Anhand des GFP-Signals kann auch in der Durchflusszytometrie der Transfektionserfolg überprüft und quantifiziert werden. Ebenfalls können anhand des GFP-Signals die transfizierten Zellen per Durchflusszytometer sortiert werden.

Nun wurden die transfizierten PBMCs anhand ihrer grünen Fluoreszenz im Durchflusszytometer *Facs Aria II* sortiert und von den übrigen Zellen isoliert. Anschließend wurden diese Zellen zur Stimulation von M1-spezifischen CD8⁺ Zellen (= Effektoren) genutzt. Die Aktivierung dieser Effektoren kann anhand der gebildeten Menge an IFN- γ gemessen werden. Dabei wird

angenommen, dass die Menge an IFN- γ proportional zur Menge an prozessiertem Antigen auf der Zelloberfläche ist.

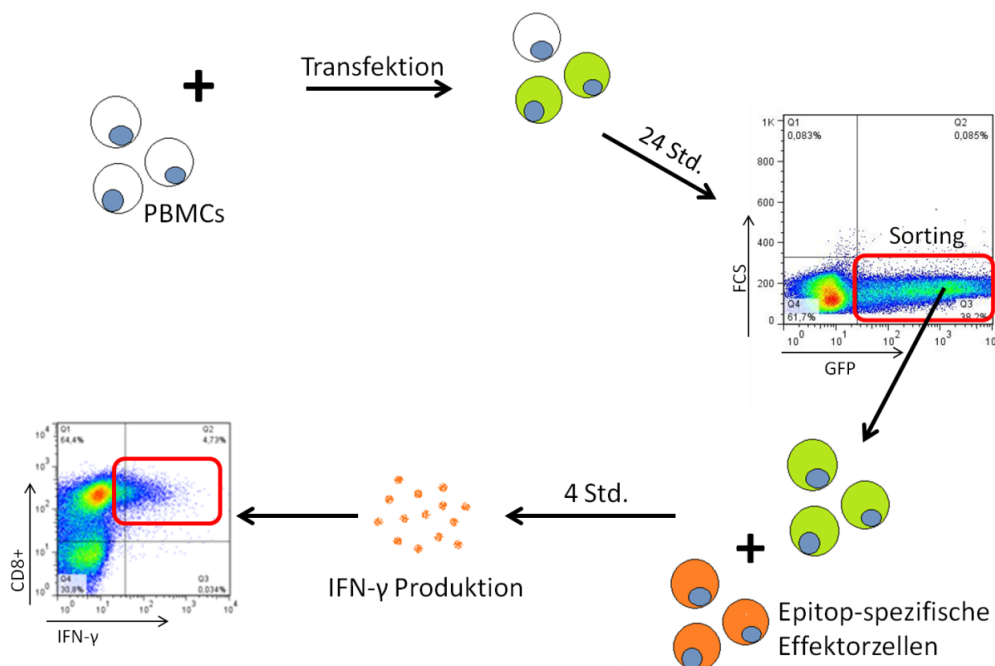


Abbildung 3.3: Vom Plasmid zum endogen prozessierten Epitop

Durch PCR-Mutagenese und Transfektion erzeugte, GFP-haltige Plasmide (s. Kap. 2.2.1) werden in PBMCs per Elektroporation transfiziert. Nach 24 Std. produzieren die PBMCs das GFP-Protein im Zytosol und präsentieren nach endogener Prozessierung das M1-Epitop an der Zelloberfläche. Anhand des GFP-Signals werden diese Leukozyten im Durchflusszytometer durch Sortieren isoliert. Diese Epitop-präsentierenden Zellen dienen Epitop-spezifischen PBMCs über vier Stunden als Target. Die resultierende IFN- γ Produktion wird im Durchflusszytometer quantifiziert.

Durch die Kontrolle der durchschnittlichen GFP-Fluoreszenz (MFI) der jeweiligen transfizierten Targets (s. Abb. 3.4) wird sichergestellt, dass eine gleichmäßige Transfektionseffizienz erreicht wird.

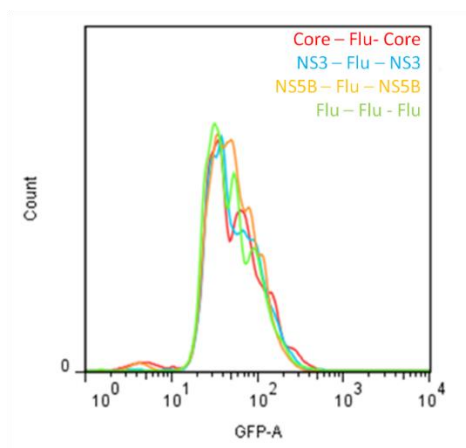


Abbildung 3.4: Vergleich der MFI

Für eine valide Beurteilung der später durch Effektorzellen produzierte Menge an IFN- γ ist eine gleichmäßige Plasmidverteilung nach der Transfektion Voraussetzung. Nur wenn jede PBMC gleich viel Plasmid erhält und dieses unter gleichen Voraussetzungen prozessieren kann, kann das produzierte IFN- γ der verschiedenen Ansätze verglichen werden. Anhand der MFI (Mean fluorescence intensity) kann die Menge des transfizierten Plasmids beurteilt werden. In dieser Grafik ist die Menge an Fluoreszenzfarbstoff (GFP-A) pro Effektorzelle (Count) dargestellt.

Bei Durchführung des Versuches vermochte Core-Flu-Core die Effektorzellen zu einer IFN- γ Produktion von 4,73% zu stimulieren, bei NS3-Flu-NS3 waren es 2,37% und bei NS5B lediglich 0,55% (s. Abb. 3.5). Bei Wiederholung der Versuche ($n = 3$) zeigte sich im Median bei Core-Flu-Core eine IFN- γ Produktion von 3,59 % (4,73 – 2,44 %), bei NS3-Flu-NS3 war dies 2,32 % (1,86 – 2,38 %) und bei NS5B-Flu-NS5B war es 0,4 % (0,32 – 0,57 %). Normiert man diese Daten auf die Kontrolle (hier: Flu-Flu-Flu) ergibt dies eine durchschnittliche IFN- γ Produktion bei Core-Flu-Core von 59,3%, bei NS3-Flu-NS3 von 44,5% und bei NS5B von 10,6%. Des Weiteren fällt bei der Wiederholung der Versuche eine reproduzierbare Hierarchie der resultierenden IFN- γ Produktion auf: Core-Flu-Core aktiviert die CD8+ T-Zellen am stärksten, NS5B-Flu-NS5B ist dazu am wenigsten in der Lage. Im Median ist die IFN- γ Produktion der von Core-flankierten Fragmente mit 59,3 % mehr als fünffach so stark ausgeprägt wie die IFN- γ Produktion der NS5B-flankierten Fragmente mit lediglich 10,62 % (s. Abb. 3.6). Dieser Unterschied ist signifikant ($P = 0.0012$) und reproduzierbar. Die Ergebnisse in Abb. 3.6 werden auf die Postitivkontrolle (Flu-Flu-Flu) normiert dargestellt.

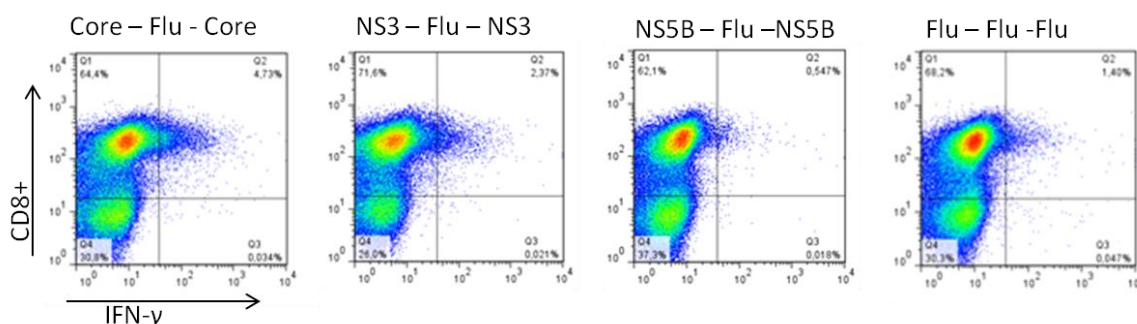


Abbildung 3.5: Vergleich der IFN- γ -Produktion

Obwohl jedem PBMC die gleiche Menge an Plasmid transfiziert wurde (s. Abb. 3.4 Vergleich der MFI) und jeweils das gleiche Flu-Epitop prozessiert und den Effektorzellen präsentiert wurde, unterscheidet sich die resultierende IFN- γ Produktion zwischen den flankierenden Regionen. Das transfizierte Plasmid mit dem Core-Flu-Core-Fragment provoziert hierbei jeweils die stärkste IFN- γ Produktion, während NS5B-Flu-NS5B dies am wenigsten vermag. Abgebildet ist ein einzelner Versuchslauf mit den absoluten, nicht normierten IFN- γ -Werten.

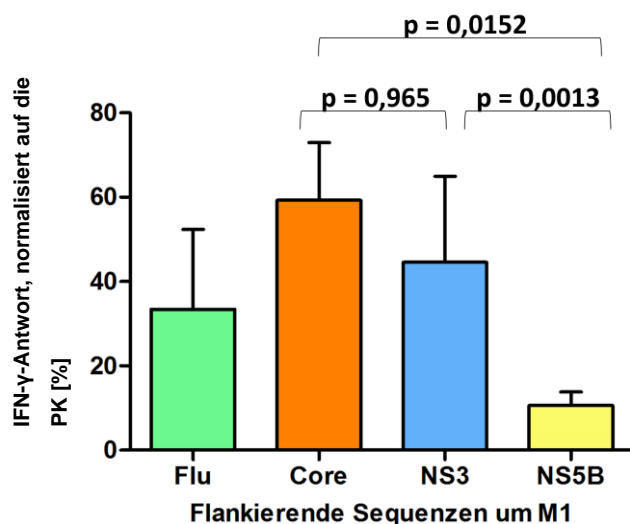


Abbildung 3.6: IFN- γ -Produktion nach Prozessierung des Flu-Peptids

Gezeigt ist die IFN- γ -Produktion der Effektorzellen, nachdem sie mit dem identischen, endogen prozessierten Influenza-Epitop stimuliert wurden, jeweils differenziert nach der beigefügten flankierenden Sequenz. Die IFN- γ -Antwort wird in % und normiert auf die Positivkontrolle (PK) dargestellt, bei welcher die Effektoren lediglich mit freiem Influenza-Peptid stimuliert werden. Es zeigt sich, dass das Core-Flu-Core-Peptid reproduzierbar die Effektorzellen zu einer deutlich erhöhten IFN- γ -Produktion stimuliert, als dies beispielsweise NS5B-Flu-NS5B vermag.

3.2 Differenzierte Betrachtung des Einflusses der N- und C-terminalen flankierenden Sequenz

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die flankierenden Sequenzen einen Einfluss auf die Antigenprozessierung und die Effektivität der resultierenden CD8+ T-Zellantwort haben, soll die Lokalisierung der einflussnehmenden Sequenz nun näher untersucht werden.

Hierzu wurden wie in Kap. 3.1 beschrieben erneut Konstrukte generiert, welche das Influenza-Epitop M1 enthalten, nun jedoch umgeben von jeweils einer Core- und einer NS5B-flankierenden Sequenz. Diese wurden im Vergleich zu einheitlichen Core- oder NS5B-flankierenden Sequenzen (Vergleich Kapitel 3.1) untersucht.

Bezeichnung	Sequenz
Core-Flu-Core	DTLTCGFA <i>GILGFVFTL</i> GAPLGGAA
NS5B-Flu-NS5B	GVRVCEKM <i>GILGFVFTL</i> PLAVMGSS
Core-Flu-NS5B	DTLTCGFA <i>GILGFVFTL</i> PLAVMGSS
NS5B-Flu-Core	GVRVCEKM <i>GILGFVFTL</i> GAPLGGAA

Tab. 3.2 Austausch der flankierenden Regionen

Die M1 Konstrukte sind in kursiv dargestellt.

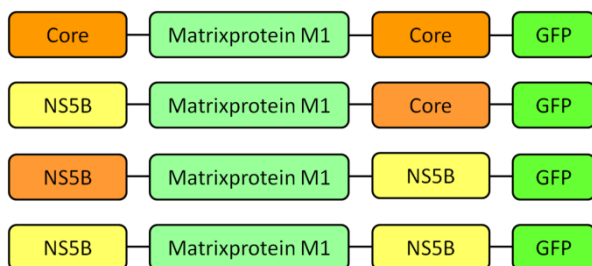


Abbildung 3.7: Klonierte HCV/M1 Konstrukte mit flankierenden HCV-Sequenzen

Erneut wurden die flankierenden Sequenzen der HCV-Epitope Core und NS5B um das Matrixprotein M1 kloniert und an ein GFP gekoppelt. Im Gegensatz zu den Versuchen in Kapitel 3.1 und 3.3 wurden hier C- und N-terminal Sequenzen unterschiedlicher HCV-Epitop-Umgebungen verwendet.

Die Versuche wurden dreifach wiederholt und es ließ sich erneut eine konstante Hierarchie zwischen den verwendeten Plasmiden nachweisen. Normiert auf die PK konnten die homogenen Umgebungssequenzen von Core um das Epitop des Matrixproteines eine INF- γ -Antwort von 57,0 %, die flankierenden Sequenzen von NS5B dagegen nur Antwort von 10,4 % induzieren. Liegt dagegen die NS5B-flankierende Sequenz N-terminal und die Core-Umgebung C-terminal des Influenza-Epitopes (NS5B-Flu-Core), ist die resultierende INF- γ - Produktion mit 43,3 % im Mittel um 27,9 % höher als in umgekehrter Anordnung der flankierenden Sequenzen (15,4 %, Core-Flu-NS5B). Es ist also festzustellen, dass lediglich durch die Änderung der C-terminal flankierenden Sequenz (z. B. von NS5B-Flu-NS5B zu NS5B-Flu-Core) die resultierende T-Zellstimulation auf das Vierfache (von 10,4 % auf 43,3 %) gesteigert werden kann. Die Änderung der N-terminalen Flanke (von NS5B-Flu-NS5B zu Core-Flu-NS5B) wirkt sich dagegen deutlich schwächer aus (von 10,4% auf 15,4%).

Die jeweils C-terminal liegende Sequenz scheint einen deutlich stärkeren Einfluss auf die letztlich resultierende INF- γ -Produktion auszuüben, als die N-terminale Sequenz.

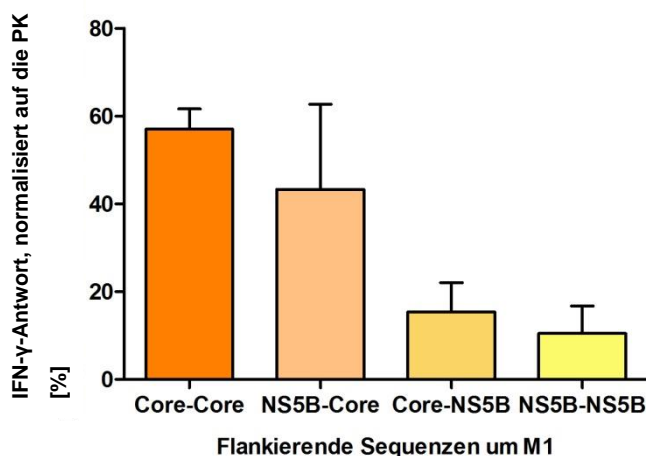


Abbildung 3.8: IFN- γ Produktion nach Prozessierung des Influenza-Peptids

Gezeigt ist die IFN- γ Produktion der Effektorzellen, nachdem sie mit dem identischen, endogen prozessierten Influenza-Epitop M1 stimuliert wurden, jeweils differenziert nach den beigefügten flankierenden Sequenzen. Das IFN- γ wird in % und normiert auf die PK dargestellt, bei welcher die Effektoren lediglich mit freiem M1 - Peptid stimuliert wurden.

3.3 Veränderlichkeit der T-Zell-Antwort auf das NS5B-Epitop

Im Folgenden wurde versucht, die IFN- γ -Antwort der CD8⁺ T-Zellen auf das subdominante NS5B-Epitop gezielt zu steigern. Dieses Epitop gilt zwar als sehr stabil, vermag aber während einer akuten Infektion nur eine geringe Menge an IFN- γ zu produzieren (Lechner et al., 2000).

Um zu untersuchen, ob sich die Antigenität des NS5B Epitops steigern lässt, wurden Plasmide generiert, welche das NS5B Epitop entweder im natürlichen Kontext, oder mit den Core flankierenden Sequenzen enthielten. Anschließend wurden diese Plasmide analog zu den Versuchen in Kapitel 3.1 in HLA-A*2 positive PBMCs transfiziert und in den Prozessierungsassay wie in Kapitel 3.1 beschrieben eingesetzt.

Die NS5B spezifischen T Zellen wurden aus einem IDU mit HCV - Infektion generiert. Die Antwort, im Sinne der IFN- γ -Produktion wurde auf die Peptid Kontrolle normiert.

Bezeichnung	Sequenz
Core- NS5B- Core	DTLT CGFA <i>ALYDVVTKL</i> GAPLGGAA
NS5B- NS5B- NS5B	GVRV CEKM <i>ALYDVVTKL</i> PLAVMGSS

Tab. 3.3 Klonierte Konstrukte mit NS5B

Die NS5B Konstrukte sind in kursiv dargestellt.

Nach vierfacher Wiederholung der Versuche lässt sich im Median die IFN- γ -Produktion von 90,3 % auf 106,5 % in Relation zur Peptidkontrolle durch den Austausch der flankierenden Sequenzen nachweisen. Die Immunantwort auf das NS5B-Epitop ließ sich also wie erwartet steigern, diese Steigerung ist jedoch statistisch nicht signifikant ($P = 0,38$).

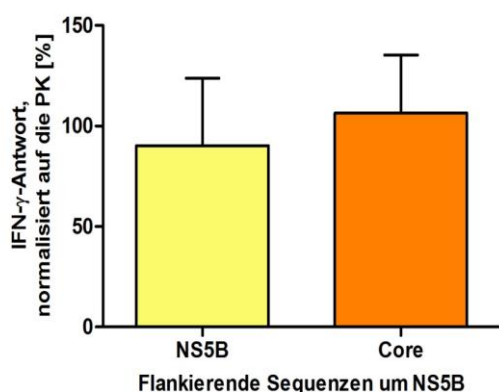


Abbildung 3.9: IFN- γ -Produktion nach Prozessierung des NS5B-Peptids

Gezeigt ist die IFN- γ -Produktion der Effektorzellen, nachdem sie mit dem identischen, endogen prozessierten NS5B-Epitop stimuliert wurden, jeweils differenziert nach der beigefügten flankierenden Sequenz. Die IFN- γ -Produktion wird in % und normiert auf die PK dargestellt, bei welcher die Effektoren lediglich mit freiem NS5B-Peptid stimuliert wurden. Auch hier kann das Epitop, welches vor der Prozessierung von der Core-flankierenden Sequenz umgeben wurde, wiederholt eine höhere Stimulation der Effektorzellen erreichen.

3.4 Antigenprozessierung als Einflussfaktor auf die Immunantwort im Vergleich zur Avidität

In den Kapiteln 3.1 bis 3.3 konnte gezeigt werden, dass die flankierenden Sequenzen von Epitopen einen deutlichen Einfluss auf die resultierende Aktivierung der CTL im Sinne einer INF- γ -Produktion haben. Dieser Einfluss ließ sich jedoch nicht signifikant auf hochavide T-Zellen gegen das Epitop NS5B übertragen. Im Kapitel 1.3 wurde bereits beschrieben, dass nicht nur die Prozessierung, sondern auch die Vorläuferfrequenz von TZR und deren Avidität zu den Epitopen bedeutend für die Immundominanz ist. Wir postulierten daher, dass eine hohe Avidität ein möglicher Störfaktor für den Einfluss der Epitop-flankierenden Sequenzen sein könnte. Daher sollte nun untersucht werden, wie stark sich der Einfluss der Prozessierung in Konkurrenz mit der Avidität auswirkt.

Hierzu sollten die Versuche aus Kap. 3.1 mit einem hochaviden Epitop wiederholt werden. Dafür wurde das CMV-Epitop pp65 ausgewählt. Es wird von der zellulären Abwehr sowohl immundominant (Wills et al., 1996) als auch funktionell hochavide erkannt. In diesem Punkt unterscheidet sich pp65 deutlich von dem bislang untersuchten M1-Epitop, welches zwar ebenfalls immundominant, jedoch mit einer sehr geringen Avidität erkannt wird (Vitiello et al., 1996).

Um diese Unterschiede in der Avidität von den verwendeten Epitopen besser quantifizieren zu können, wird zunächst eine Verdünnungstitration durchgeführt. Hierbei wurden die Effektorzellen mit sinkenden Peptidkonzentrationen von M1 (Influenza), pp65 (CMV) und NS5B (HCV) stimuliert und die IFN- γ -Antworten gegeneinander abgegrenzt.

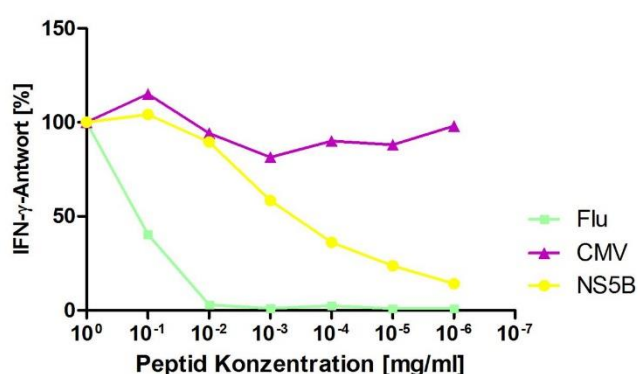


Abbildung 3.10: Verdünnungstitration der Peptide

Dargestellt sind die IFN- γ -Antworten auf Stimulation durch sinkende Peptidkonzentrationen von M1 (Flu), pp65 (CMV) und NS5B (HCV). Hierbei wird deutlich, dass es sich um Peptide mit unterschiedlichster Avidität handelt: pp65 und NS5B werden relativ hoch avide erkannt, M1 dagegen nur sehr gering.

Während das Matrixprotein M1 bereits ab einer Peptidverdünnung von 10⁻²mg/ml keine messbare IFN- γ -Antwort auszulösen vermag, wurden die pp65-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auch noch bei einer Stimulation durch 10⁻⁶mg/ml gleichbleibend hoch stimuliert. Hierdurch wird die erheblich

höhere Avidität von pp65 deutlich. NS5B liegt hierbei genau zwischen M1 und pp65. Bei geringen Verdünnungen vermag NS5B noch ähnlich stark zu stimulieren wie pp65, mit sinkender Konzentration nimmt die IFN- γ -Antwort jedoch ab.

Anschließend sollte untersucht werden, ob eine optimierte Prozessierung durch Veränderung der flankierenden Sequenzen auch zu einer verbesserten Stimulation der Effektorzellen von hochaviden Epitopen führen kann. Hierzu wurden, in den Konstrukten aus Kap. 3.1 das Influenza-Matrixprotein M1 Epitop durch das CMV Epitop ausgetauscht. Anschließend wurden die Konstrukte wieder in HLA-A*2 positive PBMC transfiziert und die GFP positive Zellen heraus sortiert. Diese wurden dann zur Stimulation von pp65-spezifischen Effektorzellen genutzt. Die resultierende IFN- γ -Produktion wurde gemessen und die Ergebnisse zwischen den Konstrukten der unterschiedlich flankierenden Sequenzen verglichen.

Bezeichnung	Sequenz
Core-CMV-Core	DTLTCGFA <i>NLVPMVATV</i> GAPLGGAA
NS3-CMV-NS3	KKCDELAA <i>NLVPMVATV</i> AYYRGLDV
NS5B-CMV-NS5B	GVRVCEKM <i>NLVPMVATV</i> PLAVMGSS
Flu-CMV-Flu	PILSPLTK <i>NLVPMVATV</i> TVPSERGL

Tab. 3.4 pp65-Konstrukte

Das pp65 - Konstrukt ist in kursiv dargestellt.

Es zeigt sich, dass mit Nutzung des CMV-Epitops pp65 weder Unterschiede in der IFN- γ -Produktion, noch eine einheitliche Hierarchie zwischen den Konstrukten erzeugt werden können. Vielmehr zeigt sich über die Versuche hinweg (n=3) eine einheitlich hohe CD8+ T-Zellstimulation, deren IFN- γ -Antwort von 45 % (flankierende Flu-Sequenzen) bis 61 % (flankierende NS5B-Sequenz) variiert. Die Unterschiede sind weder statistisch signifikant (P = 0,7), noch zeigten sich erkennbare Hierarchien.

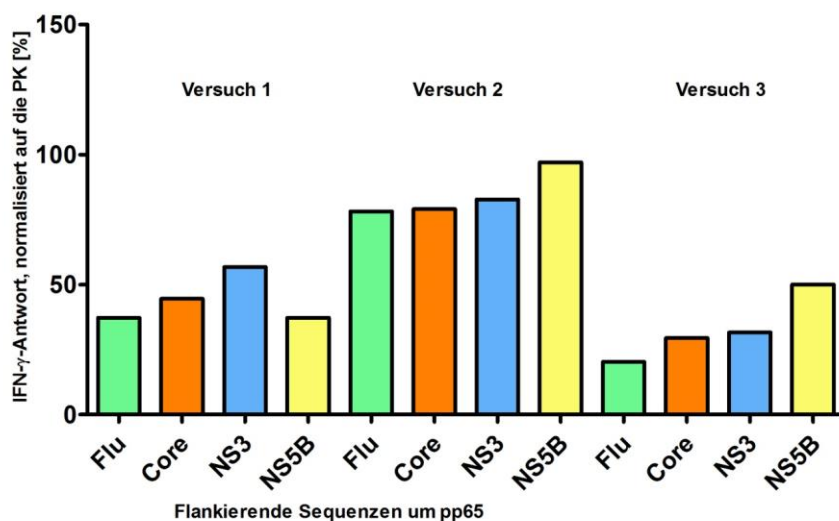


Abbildung 3.11: Fehlende Hierarchie in der IFN- γ -Antwort auf das CMV-Epitop

Gezeigt ist die IFN- γ -Produktion der Effektorzellen einzelner Versuchsabläufe, nachdem sie mit dem identischen, endogen prozessierten CMV-pp65-Epitop stimuliert wurden, jeweils differenziert nach der beigefügten flankierenden Sequenz. Die IFN- γ -Antwort wird in % und normiert auf die PK dargestellt, bei welcher die Effektoren lediglich mit freiem pp65-Peptid stimuliert wurden. Es lassen sich keine reproduzierbaren Unterschiede in der IFN- γ -Antwort oder eine Hierarchie der erzeugten IFN- γ -Menge zwischen den unterschiedlichen Peptiden feststellen.

Um zu untersuchen, ob sich der Effekt hohen Avidität durch eine Reduktion des Effektor-Target-Verhältnisses ausgleichen lässt, wurden die Versuche mit Reduktion der Targets wiederholt. Unter einer Erhöhung des Effektor-Target-Verhältnisses um den Faktor 10 reduziert sich die quantitativ ausgeschüttete Menge des IFN- γ , jedoch lassen sich weiterhin keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen den T-Zell-Antworten der einzelnen flankierenden Sequenzen aufzeigen (Abb. 3.12).

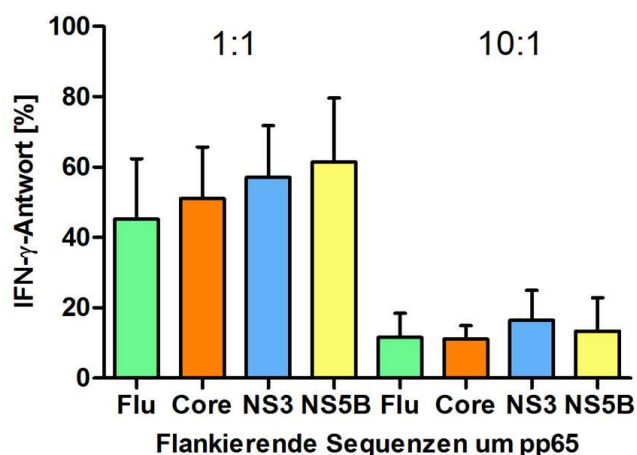


Abbildung 3.12: Verringerung des Effektor-Target-Verhältnisses

Auch durch Erhöhung des Effektor-Target-Verhältnisses ließen sich keine reproduzierbaren Unterschiede zeigen: Gezeigt ist die IFN- γ Produktion der Effektorzellen, nachdem sie mit dem identischen, endogen prozessierten CMV-Epitop stimuliert wurden, jeweils differenziert nach der beigefügten flankierenden Sequenz und Verdünnung des Effektor-Target-Verhältnisses. Die IFN- γ -Antwort wird in % und normiert auf die PK dargestellt, bei welcher die Effektoren lediglich mit freiem pp65-Peptid stimuliert wurden. Durch die relative Verringerung der Targetanzahl konnte zwar die resultierende Antwort der Effektorzellen vermindert werden, jedoch blieb auch hier eine reproduzierbare Hierarchie aus.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie wurde untersucht, inwieweit die flankierenden Sequenzen von HCV-Epitopen (Core, NS3 und NS5B) einen Einfluss auf die Antigenerkennung im Sinne einer IFN- γ -Produktion ausüben können. Um die flankierenden Regionen unabhängig von ihren Epitopen untersuchen zu können, wurden artifiziell verschiedene Konstrukte erzeugt, welche via Elektroporation in PBMCs eingebracht wurden und dort endogen prozessiert wurden. Schließlich wurden diese PBMCs dann jeweils Epitop-spezifischen Effektorzellen präsentiert und die resultierende IFN- γ -Produktion gemessen.

Zunächst konnte in Kap. 3.1 nachgewiesen werden, dass sich die resultierende IFN- γ -Produktion unter den verschiedenen flankierenden Regionen signifikant unterscheidet. Mit Core-flankiertes Influenza-spezifisches Epitop GILGFVFTL (M1) stimuliert spezifische Effektor-Zellen am stärksten, mit NS5B-flankierte Epitope vermögen dies am wenigsten. In Kap. 3.2 wurde des Weiteren gezeigt, dass der entscheidende Einfluss dabei vor allem von der C-Terminalen flankierenden Region auszugehen zu scheint.

In Kap. 3.3 sollten die bisher gezeigten Ergebnisse auf das eher schwach immunogene HCV-Epitop ALYDVVTKL (NS5B) übertragen werden. Hier zeigte sich zwar eine gleichbleibende Hierarchie unter der Immunogenität der flankierenden Regionen, die resultierende IFN- γ -Produktion unterschied sich jedoch nicht signifikant. Als mögliche Ursache hierfür sehen wir mögliche Unterschiede in der Avidität der verwendeten Epitope.

In Kap. 3.4 zeigten wir, dass sich der signifikante Einfluss der flankierenden Sequenzen auf ein niedrigavides Epitop wie M1 nicht reproduzieren lässt, wenn es sich stattdessen um ein hochavides Epitop wie das CMV-spezifische Epitop NLVPMVATV (pp65) handelt. Das bereits untersuchte Epitop NS5B zeigte sich in unseren Untersuchungen in den ersten Verdünnungstitrationen ähnlich hochavide wie pp65, was die fehlende Signifikanz in den Ergebnissen aus Kap. 3.3 erklären könnte.

4 Diskussion

Infektionen mit dem Hepatitis-C-Virus stellen auch heute noch in Deutschland wie auch weltweit ein gesundheitliches Problem dar. Geschätzte 71 Millionen Menschen leiden derzeit an den Folgen der Infektion (WHO, 2017a). Trotz wirksamer Therapie besteht weiterhin ein großer Bedarf an einer Impfung gegen HCV. Gleichzeitig liegt diese, trotz intensiver Forschung, noch nicht vor.

In Fachkreisen besteht Einigkeit darüber, dass eine breite und starke Antwort der CD8⁺ T-Zellen entscheidend für eine Ausheilung einer HCV-Infektion ist. Hierzu muss zuvor eine erfolgreiche Prozessierung der Antigene erfolgen. Unter IFN- γ -Einfluss ist das Proteasom in der Lage, Untereinheiten zu ändern, um somit die Produktivität der Prozessierung zu erhöhen und so auch das HC-Virus effektiver abwehren zu können (Basler et al., 2013; Shin et al., 2006). Es gibt eine Vielzahl an Studien, die einen markanten Zusammenhang zwischen der CD8⁺ T-Zellantwort mittels IFN- γ und dem Verlauf der HCV-Infektion aufzeigen: Zum einen ist eine gute IFN- γ -Antwort mit der Ausheilung einer HCV-Infektion assoziiert (Gruner et al., 2000; Shin et al., 2006), zum anderen weiß man, dass die Erschöpfung der CD8⁺ T-Zellen bzgl. Proliferation und Zytokinausschüttung mit einer Chronifizierung einhergeht (Gruner et al., 2000; Wedemeyer et al., 2002). Auch Studien mit Schimpansen zeigen, dass eine Inhibition von CTL zur Persistenz von HCV im Organismus führt. Bei wiederhergestellter CTL-Funktion sinkt die Viruslast sofort deutlich (Shoukry et al., 2003).

Grundsätzlich unterstützt eine starke und breit ausgelegte T-Zellantwort gegen diverse Epitope unterschiedlicher Proteine des HC-Virus die erfolgreiche Elimination von HCV (Cooper et al., 1999; Yerly et al., 2008). Hierbei stehen insbesondere die Proteine Core, NS3, NS4 und NS5B im Fokus der protektiven Immunantwort, da diese als besonders hoch konserviert und immundominant gelten (Ferrari et al., 1994; Missale et al., 1996).

Die hier vorliegende Studie befasst sich mit der Frage, wie T-Zell-Antwort während einer Infektion mit HCV gesteigert werden kann. Als zu untersuchende Zielstruktur wurden die flankierenden Sequenzen jener hoch konservierten und immundominanten HLA-*A2-Epitope (Core, NS3, NS5B) gewählt. Im komplexen Prozess der Aktivierung der CTL's treten die flankierenden Sequenzen der Epitope nur während der Prozessierung in Erscheinung, da sie bei Antigenpräsentation nicht mehr als solche existent sind. Durch die Untersuchung der flankierenden Sequenzen war es uns möglich zu untersuchen, den Prozess der Prozessierung der Epitope losgelöst der Antigenpräsentation zu untersuchen. Durch die Konzentration auf stabile und immundominante Epitope besteht perspektivisch die Hoffnung, unsere Forschungsergebnisse in die Entwicklung einer Vakzine gegen HCV einfließen zu lassen.

4.1 Die flankierenden Sequenzen immundominanter HCV-Epitope beeinflussen die Prozessierung

In Studien zu HIV konnte bereits gezeigt werden, dass die flankierenden Sequenzen von Epitopen einen Einfluss auf die T-Zell-Antwort haben (Le Gall et al., 2007; Pacheco et al., 2011). Auch für Studien zu HCV konnten wir und andere bereits zeigen, dass eine einzige Mutation in flankierenden Sequenzen von Epitopen zu einer veränderten Prozessierung und verminderten IFN- γ -Ausschüttung führen können (Seifert et al., 2004; Walker et al., 2016). Steers et al. designte bereits HIV- und CMV-Epitope, welche von gänzlich artifiziellen flankierenden Sequenzen umgeben waren, um eine möglichst hohe Aktivierung von T-Zellen zu erreichen (Steers et al., 2014).

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurden zunächst artifizielle Konstrukte mit je einem gemeinsamen Virusepitop (zunächst M1 des Influenza-Virus), umgeben von je den flankierenden Sequenzen ausgewählter HCV-Epitope (Core, NS3 und NS5B) erzeugt. Diese wurden in PBMCs transfiziert und endogen prozessiert. Anschließend wurden hiermit humane PBMCs stimuliert und die resultierende T-Zellantwort in Sinne der IFN- γ -Produktion gemessen. Besonders an diesem Studiendesign war hierbei, dass die Epitop-flankierenden Regionen unabhängig von ihren zugehörigen Epitopen untersucht und miteinander verglichen wurden. Außerdem wurde ab der Transfektion nicht mehr manipulativ in die Prozessierung, die Antigenpräsentation und die Stimulierung der CTL eingegriffen, womit die Prozesse der humanen Immunabwehr (in-vitro) möglichst gut abgebildet werden sollten.

Die Experimente, in welchen das M1 Epitop umgeben von flankierenden Sequenzen der HCV-Epitope untersucht wurde, zeigen anschaulich, dass die flankierenden Sequenzen von immundominanten HCV-Epitopen einen entscheidenden Einfluss auf die resultierende IFN- γ -Produktion haben. Hierbei zeigt sich, dass es unter den flankierenden Sequenzen von Core, NS3 und NS5B sogar eine fest bestehende Hierarchie herrscht: die genomische Umgebung des Core-Epitops kann die Prozessierung des Influenza-M1-Epitops reproduzierbar positiv beeinflussen, während sich die flankierenden Sequenzen von NS5B die Prozessierung eher kontraproduktiv auswirken. Die resultierende IFN- γ -Produktion unterschied sich dabei zwischen Core-Flu-Core und NS5B-Flu-NS5B um mehr als den Faktor fünf. Die Prozessierung von NS3-Flu-NS3 lieferte stets IFN- γ -Werte, welche sich zwischen denen der flankierenden Regionen von Core und NS5B befinden. Würde lediglich die Sequenz des Influenza-Epitops die Prozessierung und Antigenpräsentation beeinflussen, wären bei diesem Versuch identische Ergebnisse in der IFN- γ -Antwort der CTL zu erwarten gewesen. Durch die nicht nur z. T. sehr unterschiedlichen IFN- γ -Antworten, sondern die auch stets gleiche Ausprägung in Relation untereinander, muss davon ausgegangen werden, dass auch die flankierenden Regionen der Peptide darüber entscheiden, wie effizient ein Antigen den CTL präsentiert wird. Die stets ähnliche Ausprägung der IFN- γ -Antwort

und die identische Hierarchie in der Stimulation der T-Zellen gibt dabei einen Hinweis darauf, dass der Einfluss der flankierenden Region stabil auch in andere Kontexte übertragbar und reproduzierbar sein könnte.

Unklar ist bislang, wodurch genau sich der Einfluss der Core-flankierenden Sequenzen erklärt. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine eingeschränkte Prozessierung konsekutiv zu einer reduzierten Aktivierung der CTLs führt (Schatz et al., 2008; Zhang et al., 2012). Auch wurde versucht zu beurteilen, welche Aminosäuren bevorzugt aufgespalten werden und damit zu einer Optimierung der Immunantwort führen können. Hier unterscheiden sich jedoch die Studienergebnisse. Während Zhang et al. beispielsweise beschrieben, dass bei HIV-Infektionen neben Leucin, Lysin und Methionin auch Phenylalanin bevorzugt im Proteasom aufgespalten werden (Zhang et al., 2012), deuteten Seifert et al. eine Mutation im HCV-Epitop NS3 von Thyrosin zu Phenylalanin als Escape-Mutation, da es hierdurch zu einer verminderten Prozessierung kam (Seifert et al., 2004). Eine viel untersuchte Aminosäure ist in diesem Kontext auch Prolin. Boulant et al. postulierten, dass eine Mutation im Core Protein von Prolin zu Alanin verminderter Virusreplikation führt (Boulant et al., 2007). Walker et al. beobachteten dagegen eine Mutation von Serin zu Prolin im Kontext von verminderter Prozessierung und einer damit einhergehenden Escape-Mutation (Walker et al., 2016). Schatz et al. differenzierten bereits 2008 die verwandten Aminosäuren nach dem Ort der Prozessierung: Prolin wird beispielsweise bevorzugt im Zytosol geschnitten, jedoch nicht im endoplasmatischen Retikulum (Schatz et al., 2008). Hierdurch gewinnt die Position der entsprechenden Aminosäure der flankierenden Sequenz in Bezug zum Epitop an Bedeutung. Zunächst werden die Antigene im Zytosol durch Peptidasen und das Proteasom stark verkürzt. Erst anschließend werden die Fragmente durch TAP in das ER transportiert und dort weiter geschnitten. Wenn beispielsweise Prolin in größerer Entfernung zum Epitop gelegen ist, wird es frühzeitig und bevorzugt im Zytosol entfernt. In direkter Lage zum Epitop dagegen ist zu erwarten, dass eine Prozessierung erst im ER erfolgt und dies, bei dem Beispiel von Prolin, sich nachteilig auf die Prozessierungseffizienz auswirkt. Auch bei den durch uns untersuchten flankierenden Sequenzen befindet sich sowohl in den Regionen um das Core-, als auch um das NS5B-Epitop die Aminosäure Prolin. Bei NS5B ist Prolin jedoch näher an der eigentlichen Epitop-Region gelegen (+1) als bei Core (+3). Die Tatsache, dass Epitope, die von Core-typischen Sequenzen flankiert werden, die Effektor-Zellen stärker stimulieren, als dies die NS5B-spezifischen Sequenzen vermögen, könnte also durch eine bevorzugte Prozessierung von Prolin im Zytosol (Core) und einer eingeschränkten Prozessierung im ER (NS5B) verursacht sein. Es ist jedoch davon auszugehen, dass nicht nur eine einzelne Aminosäure und deren exakte Position zum Epitop den entscheidenden Ausschlag zur erfolgreichen Prozessierung gibt.

Daher wurden in Kap. 3.2 wurden die einflussnehmenden Strukturen der flankierenden Sequenzen selbst näher untersucht. Wir konnten zeigen, dass nicht die flankierenden Sequenzen in ihrer

Gesamtheit wirken, sondern man die N- von der C-terminalen Sequenz differenzieren muss. Wir vertauschten die N- und C-terminalen Sequenzen von Core und NS5B um das einheitliche Influenza-spezifische Epitop M1. Die gezeigten Daten (siehe Kap. 3.2) veranschaulichen, dass es in der resultierenden IFN- γ -Produktion einen Unterschied macht, ob ein Epitop N- oder C-terminale Sequenzen flankieren. Dieser Unterschied beträgt durchschnittlich 27,9% der IFN- γ -Produktion, normiert auf die PK. Hierbei ist auffällig, dass jeweils die C-terminale Sequenz den Ausschlag für die insgesamt resultierende Effizienz der Prozessierung zu geben scheint. Liegt die flankierende Sequenz des Core-Epitops C-terminal, so ähnelt auch die resultierende IFN- γ -Produktion der des homogen mit Core-Sequenzen umgebenen M1-Epitops (NS5B-Flu-Core ähnelt Core-Flu-Core). Umgekehrt ähnelt auch die Reaktion auf das Konstrukt, welches C-terminal die NS5B-Sequenz trägt, auch stark dem einheitlich flankiertem NS5B-Konstrukt (Core-Flu-NS5B ähnelt NS5B-Flu-NS5B).

Der Einfluss der C-terminalen Flanke auf die Prozessierung steht in Einklang mit Studien von z. B. Shastri et al., welche in Experimenten mit Influenza Nukleoprotein nachweisen konnten, dass die flankierenden Regionen C-terminal einen deutlich größeren Einfluss haben, als die N-terminal gelegenen Sequenzen (Shastri et al., 1995). Auch Lindenstrøm et al. konnten diese Beobachtung im Tiermodell bei Infektionen mit *M. tuberculosis* bestätigen (Lindenstrom et al., 2014). Hierbei ist besonders interessant, dass hier ein in-vivo Modell verwendet wurde. Damit konnten externe Störfaktoren auf die Prozessierung minimiert werden und darf annehmen, dass auch unsere Ergebnisse von in-vitro-Studien im Wesentlichen auf ein natürliches Immunsystem übertragbar wären. Zum anderen wies Lindenstrøm den Einfluss der flankierenden Sequenzen anhand von einzelnen Punktmutationen nach, was wiederum in Einklang mit den Daten von Seifert, Schatz und Walker steht. Höchstwahrscheinlich ist der Unterschied von N- zu C-terminaler Flankierung auch auf Aminosäuren-Ebene zu suchen, hier sind jedoch noch weitergehende Studien nötig, um dies weiter einzugrenzen.

Insgesamt konnten wir nachweisen, dass auch bei HCV die flankierenden Sequenzen einen maßgeblichen Einfluss auf die resultierende Stimulation des adaptiven Immunsystems haben. Hierbei hat insbesondere der C-terminale Anteil der flankierenden Sequenz des Core-Proteins einen positiven, d.h. steigernden Einfluss auf die entstehende IFN- γ -Produktion. Dieses ist am ehesten auf eine optimierte Prozessierung des entsprechenden Epitopes zurückzuführen, stimuliert durch die umgebende flankierende Sequenz.

4.2 Eingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf NS5B aufgrund von Unterschieden in der Immundominanz der Epitope

Nach dem Nachweis, dass die Epitop-flankierenden Sequenzen einen Einfluss auf die Effizienz des Prozessierung und nachfolgende Antigenpräsentation haben, sollte untersucht werden, ob durch Veränderung / Austausch der flankierenden Sequenzen auch ein HCV-spezifisches Epitop verbessert erkannt wird. Hierfür wählten wir NS5B und seine dazugehörigen flankierenden Sequenzen, sowie als Vergleich die flankierenden Sequenzen des Core-Epitops (siehe Kap. 3.3), da sich hier in den Versuchen mit dem M1-Epitop die größten Unterschiede nachweisen ließen.

Interessanterweise unterschieden sich die Konstrukte des NS5B-Epitop, im natürlichen Kontext bzw. umgeben von Core-flankierenden Sequenzen, nur geringfügig in ihrer Aktivität. Beide erreichten eine IFN- γ -Ausschüttung 96% (NS5B-NS5B-NS5B) bzw. 106% (Core-NS5B-Core) der Positivkontrolle. Zwar waren die Core flankierenden Sequenzen etwas stärker und die Hierarchie war konstant reproduzierbar, jedoch wurde nach den vorangegangenen Versuchen eine deutlich stärkere Steigerung erwartet. Darüber hinaus fiel auf, dass beide Konstrukte bereits eine sehr hohe Aktivierung erreichten, welche ähnlich zur Positivkontrolle ausfiel. Man muss also davon ausgehen, dass eine maximale Stimulation der IFN- γ -Ausschüttung unabhängig vom Einfluss der flankierenden Regionen erfolgt. Eine maximale Aktivierung von CD8 T-Zellen trotz verminderter Antigenpräsentation könnte durch eine hohe funktionelle Avidität der CD8 T-Zellen erklärt werden, indem kleinste Antigenmengen bereits für eine vollständige T-Zellaktivierung ausreichen.

Um dies näher zu untersuchen, wurden weitergehende Experimente durchgeführt. Nun wurden Konstrukte erstellt, welche das hochavide, CMV-spezifische Epitop pp65 im Kontext der bisher verwendeten flankierenden Regionen von Core, NS3 sowie NS5B enthielten und wir verglichen nach endogener Prozessierung erneut die resultierende IFN- γ -Antwort (siehe Kap. 3.4). Es wurde deutlich, dass bei einer sehr hohen Avidität, wie z.B. dem verwendeten CMV-Epitop pp65, bereits kleinste Mengen an präsentiertem Antigen ausreichen, um eine maximale Aktivierung der CD8+ T-Zellen zu erreichen. Unterschiede durch eine verbesserte Prozessierung, wie sie in unseren bisherigen Experimenten dargestellt wurden, konnten nun nicht mehr dargestellt werden. Der Einfluss der hohen Avidität schien hier die Veränderungen in der Prozessierung zu überwiegen. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass der in den Kap. 3.1 bis Kap. 3.3 dargestellte Einfluss der flankierenden Regionen auf Prozessierung und Präsentation dagegen gut bei niedrig-aviden Epitopen greift. Die steht in Einklang mit den Experimenten, in welchen wir die flankierende Sequenz von Core mit der homologen Sequenz des NS5B-Epitopes verglichen. Hier konnte zwar durch Änderung der Epitopumgebung eine reproduzierbare Steigerung der IFN- γ -Ausschüttung erreicht werden, jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte die vergleichsweise hohe Avidität von NS5B sein, wie in Abbildung 3.10 gezeigt. Die Avidität scheint

nicht, wie bei pp65, den Einfluss der veränderten Prozessierung komplett zu überwiegen, ist aber dennoch wahrscheinlich ein limitierender Faktor.

4.3 Studienergebnisse im Hinblick auf die Entwicklung einer Vakzine gegen HCV

Immundominante Antigene wie Core, NS3 und NS5B sind essentiell für eine gute T-Zellantwort im Rahmen einer Infektion mit HCV (Li et al., 2006). Forschungsarbeiten zur Entwicklung einer Vakzine konzentrieren sich derzeit u. a. darauf, wie man Escape-Mutationen minimieren und die T-Zellantworten auf diese zugleich hochkonservierte Genregionen (Core, NS3, NS5B) verlängern und intensivieren kann (Liang, 2013). Gleichzeitig beeinflussen weitere Faktoren wie die Vorläufersequenz der TZR, die Avidität der T-Zellen zu den Epitopen sowie die Antigenprozessierung die Immundominanz.

Schmidt et al konnten zeigen, dass die Vorläufersequenz für das Epitop NS3 deutlich häufiger aufzufinden ist, als die Vorläufersequenzen anderer Epitope. Dazu passend wird auch das NS3-Epitop bei einer Infektion bevorzugt erkannt, was sich in Versuchen mit Mäusen bestätigen ließ (Schmidt et al., 2011). Jedoch ist die Vorläufersequenz durch ihr präterminiertes Wesen nur schwer artifiziell zu verändern/verbessern. Anders ist es hier mit der Prozessierung. In den hier vorliegenden Studien wurde gezeigt, wie durch Veränderung der flankierenden Sequenzen der Epitope die Effektivität der Prozessierung verbessert und die resultierende IFN- γ -Produktion gesteigert werden kann. Interessant wäre an dieser Stelle, ob die Aktivierung der häufig auftretenden NS3-spezifischen CD8+ T-Zellen durch einen Austausch der flankierenden Sequenzen durch z.B. den C-terminalen Anteil der Core-flankierenden Sequenzen gesteigert werden könnte. Auch wäre interessant, ob durch eine optimierte Prozessierung der vermeintliche Nachteil von eher selten angelegten TZR ausgeglichen werden könnte.

Ein weiterer wichtiger Ansatz zur Einflussnahme auf die Immundominanz ist die Avidität der TZR zu den Antigenen. Hierzu wurde bereits gezeigt, dass hochavide TZR eng mit einer spontanen Ausheilung einer HCV-Infektion korrelieren (Neveu et al., 2008; Yerly et al., 2008). Unsere Daten zeigen anschaulich, dass der Einfluss von Epitop-flankierenden Sequenzen auf Prozessierung und Antigenpräsentation dem Einfluss der Immundominanz unterlegen ist. Da die Immundominanz jedoch noch nicht beeinflussbar ist und die Verwendung hochavider Epitope noch zu keinem zufriedenstellenden Erfolg bei der Entwicklung einer Vakzine gegen HCV geführt hat, wäre die Kombination aus hochaviden Epitopen sowie niedrig-aviden Epitopen, welche in ihrer Immunogenität gesteigert wurden mit den gezielten Einsatz von entsprechenden flankierenden Sequenzen, ein möglicher Ansatz zur weiteren Entwicklung einer Impfung gegen HCV.

4.4 Ausblick

Mit der Einführung der DAAs im Jahre 2014 konnte ein großer Fortschritt in der Therapie der HCV-Infektion erreicht werden. Das Hauptproblem der Therapie von HCV liegt heute nicht mehr in einer mangelnden Wirksamkeit der Medikamente, in möglichen UAWs oder Kontraindikationen für die Therapie, sondern in der Schwierigkeit, alle infizierten Personen zu diagnostizieren und einer Therapie zuzuführen. So konnten bisher nur 13% der infizierten Patienten eine wirksame antivirale Therapie erhalten (WHO, 2017a). Zudem stellen die Kosten für die neuen, noch patentgeschützten DAAs eine enorme Belastung für die Gesundheitssysteme dar. Außerdem ist eine konsequente Therapie unter Hochrisikogruppen wie z. B. Drogenkonsumenten sowie in Entwicklungsländern auch zukünftig als schwierig anzusehen. Ein wichtiges Augenmerk gilt somit weiterhin den Allgemeinmaßnahmen zur Prophylaxe der Infektion (RKI, 2014b; WHO, 2017a), welche sich ebenfalls im Kreis der IDU nur schwer umsetzen lassen.

Des Weiteren gilt es abzuwarten, wie sich die Neuinfektionsraten von HCV mit zunehmendem Therapieerfolg verhalten werden. Als Vergleich seien hier die Neuinfektionsraten von HIV angeführt. Trotz intensiven Maßnahmen zur Infektionsprophylaxe ist die Neuinfektionsrate von HIV in Europa steigend (Europa, 2018). Auch in Deutschland sind zwar die Neuinfektionsraten bei MSM rückläufig, die Zahl der Neuinfektionen mit HIV unter heterosexuellen Patienten hat sich dagegen zwischen 2010 und 2015 verdoppelt. (RKI, 2017). Dies lässt sich zum Teil mit einer verbesserten Meldequalität und auch Migration aus Hochrisikoländern erklären. Allerdings muss man bei verbesserten Therapiemöglichkeiten auch mit einem wieder ansteigenden Risikoverhalten der Menschen rechnen. Daher besteht auch weiterhin ein großer Bedarf an einem wirkungsvollen Impfstoff gegen HCV, welcher jedoch bislang noch nicht verfügbar ist. Dies liegt zum einen an der für HCV typischen hohen genomischen Varianz, sowie dessen Plastizität, mit welcher sich HCV dem Immunsystem entzieht (Timm et al., 2015).

Durch die hier vorliegenden Studienergebnisse wird nachgewiesen, dass die Epitop-flankierenden Sequenzen von HCV die Prozessierung relevant beeinflussen und eine Veränderung dieser flankierenden Regionen zu einer Beeinflussung der menschlichen Immunabwehr führt. Trotz der Verwendung von humanen Immunzellen für die Versuche, wurde ein artifizielles System *in vitro* verwendet, eine Abweichung der Ergebnisse in *in vivo* Studien kann nicht ausgeschlossen werden.

Vor *in vivo* angelegten Studien sollten die Einfluss-nehmenden Sequenzen der Epitop-umgebenden Regionen noch eingehender untersucht werden. Zum Beispiel geht aus den Untersuchungen der N- / C-terminalen flankierenden Regionen noch nicht eindeutig hervor, ob letztlich die C-terminale Lage der flankierenden Sequenz hierbei für die Ausprägung verantwortlich ist oder die Sequenzfolge der Aminosäuren selbst, unabhängig von der Lokalisation. Hierzu wären weitere Nachforschungen interessant. Beispielsweise könnten neue Konstrukte generiert werden, welche die ursprünglich N-terminale Sequenz in C-terminaler Position enthalten. Zusätzlich könnte durch

weitere Variationen der Konstrukte versucht werden, die einflussnehmenden Strukturen in den flankierenden Sequenzen auf die Basis einzelner Aminosäuren und deren Position herunter zu brechen.

Es gibt Hinweise darauf, dass in virusinfizierten Patienten (HIV, CMV, EBV und Influenza) die polyfunktionell angelegten T-Zellantworten für die Kontrolle einer Infektion verantwortlich sind. Diese Immunantwort scheint überwiegend durch HLA-B-Allele getriggert zu werden und wird insbesondere über niedrigavide TRZ gesteuert. HLA-A-Allele aktivieren dagegen eher eine isolierte zytotoxische IFN- γ -Ausschüttung, welche allein zur Kontrolle einer Infektion nicht ausreicht (Harari et al., 2007). Gleichzeitig weiß man, dass eine gute CTL-Antwort im Sinne einer IFN- γ -Produktion unerlässlich zur Ausheilung einer HCV-Infektion ist (Basler et al., 2013; Shin et al., 2006). Wäre es nun also möglich, z. B. über eine Modifikation der flankierenden Sequenzen, eine verbesserte Reaktion der CTLs auf niedrig avide Epitope zu erreichen, könnte dies ein weiterer Schritt zur Entwicklung einer suffizienten Impfung gegen HCV sein. Die hier dargestellten Studienergebnisse legen nahe, dass dies durch eine Modifikation der Epitop-flankierenden Sequenzen insbesondere bei niedrig aviden Epitopen möglich ist. Ein effizientes Zusammenspiel aus aviden Epitopen und einer optimalen Prozessierung, sowie eine breite und starke Immunantwort auf hoch- wie auch niedrig avide Epitope könnten eine Prophylaxe gegen HCV ermöglichen.

5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Studie wurde untersucht, inwieweit die flankierenden Sequenzen der immundominanten Hepatitis-C-Virus-Epitope Core, NS3 und NS5B einen Einfluss auf die Prozessierung eines Epitopes haben und ob sich dieser im Sinne einer effektiveren Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CTL) verbessern lässt.

Hierzu wurden artifizielle Konstrukte erstellt, welche ein fremdes Epitop (M1 des Influenza-Virus und pp65 des Cytomegalie-Virus) in der genomischen Umgebung der HCV Epitope Core, NS3 oder NS5B beinhalteten. Diese wurden per Elektroporation in humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) transfiziert und endogen durch diese prozessiert. Anschließend wurde die Reaktion von humanen CTLs auf die antigenpräsentierenden PBMCs in Form der Interferon-gamma-Ausschüttung (IFN- γ) gemessen. Durch den Vergleich der flankierenden Sequenzen von HCV-Epitopen bei identischem Epitop konnte isoliert der Einfluss der Epitopumgebung analysiert werden.

Es zeigt sich, dass es auf das niedrig averse Epitop M1 signifikante Unterschiede in der IFN- γ -Produktion zwischen den Konstrukten gibt und diese reproduzierbar eine feste Hierarchie untereinander ausbilden. Hierbei scheint nicht nur die Sequenzfolge selbst, sondern auch deren Position zum Epitop ausschlaggebend zu sein. Die C-terminale Region präsentiert sich hierbei als die Region mit dem gewichtigeren Einfluss auf die Aktivierung der CTL. Die Modifikation der flankierenden Region um NS5B zeigte, dass auch bei einem höheraviden HCV-Epitop (im Vergleich zu M1) eine verbesserte IFN- γ -Produktion erreicht werden kann.

Des Weiteren wurde der Einfluss der optimierten Prozessierung dem von hochaviden T-Zellrezeptoren gegenübergestellt, in dem das untersuchte Epitop durch pp65 des Cytomegalie-Virus ausgetauscht wurde. Hier, bei einem hochaviden Epitop, ließen sich die Unterschiede durch verbesserte Prozessierung nicht mehr darstellen, der Einfluss der Avidität scheint also hier in Bezug auf Immundominanz zu überwiegen.

Die Erkenntnis, dass es möglich ist, durch eine Modifikation der genomischen Umgebung von HCV-Epitopen die IFN- γ -Antwort zu verbessern, könnte ein wichtiger Baustein zur Entwicklung einer Impfung gegen HCV sein. Durch die verbesserte Immunantwort auf niedrigaverse Epitope könnte das Spektrum der effektiv nutzbaren Antigene einer Vakzine relevant erweitert werden. Vielleicht wäre es so möglich, sich dem durch die Weltgesundheitsorganisation und dem Robert Koch Institut erhofften Ziel einer effektiven Prophylaxe gegen HCV einen Schritt zu nähern.

6 Literaturverzeichnis

1. Abate, D. A., Watanabe, S., Mocarski, E. S. (2004). Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* 78, 10995-11006.

2. Arnon, T. I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D. G., Mandelboim, O. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6, 515-523.

3. Atsmon, J., Kate-Ilovitz, E., Shaikevich, D., Singer, Y., Volokhov, I., Haim, K. Y., Ben-Yedidia, T. (2012). Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine. *J Clin Immunol* 32, 595-603.

4. Basler, M., Kirk, C. J., Groettrup, M. (2013). The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr Opin Immunol* 25, 74-80.

5. Behrens, S. E., Tomei, L., De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 15, 12-22.

6. Boulant, S., Targett-Adams, P., McLauchlan, J. (2007). Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* 88, 2204-2213.

7. Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F., Lavergne, J. P. (2005). Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* 79, 11353-11365.

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

9. Cukalac, T., Chadderton, J., Zeng, W., Cullen, J. G., Kan, W. T., Doherty, P. C., Jackson, D. C., Turner, S. J., La Gruta, N. L. (2014). The influenza virus-specific CTL immunodominance hierarchy in mice is determined by the relative frequency of high-avidity T cells. *J Immunol* 192, 4061-4068.

10. Dultz, G., Seelhof, M., Herrmann, E., Welker, M. W., Friedrich-Rust, M., Teuber, G., Kronenberger, B., von Wagner, M., Vermehren, J., Sarrazin, C., Zeuzem, S., Hofmann, W. P. (2013). Baseline MELD score predicts hepatic decompensation during antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C and advanced cirrhosis. *PLoS One* 8, e71262.

11. Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76, 5974-5984.
12. Elazar, M., Cheong, K. H., Liu, P., Greenberg, H. B., Rice, C. M., Glenn, J. S. (2003). Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 77, 6055-6061.
13. Erickson, A. L., Kimura, Y., Igarashi, S., Eichelberger, J., Houghton, M., Sidney, J., McKinney, D., Sette, A., Hughes, A. L., Walker, C. M. (2001). The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 15, 883-895.
14. Europa, W. R. f. (2018, 23.07.2018). Grundsatzdialog der Minister über HIV und damit verbundene Begleiterkrankungen in den Ländern Osteuropas und Zentralasiens. Retrieved 03.10.2018, Online-Publikation; <http://www.euro.who.int/de/media-centre/events/events/2018/07/ministerial-policy-dialogue-on-hiv-and-related-comorbidities-in-eastern-europe-and-central-asia>
15. Ferrari, C., Valli, A., Galati, L., Penna, A., Scaccaglia, P., Giuberti, T., Schianchi, C., Missale, G., Marin, M. G., Fiaccadori, F. (1994). T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology* 19, 286-295.
16. Fletcher, N. F., Wilson, G. K., Murray, J., Hu, K., Lewis, A., Reynolds, G. M., Stamatakis, Z., Meredith, L. W., Rowe, I. A., Luo, G., Lopez-Ramirez, M. A., Baumert, T. F., Weksler, B., Couraud, P. O., Kim, K. S., Romero, I. A., Jopling, C., Morgello, S., Balfe, P., McKeating, J. A. (2012). Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology* 142, 634-643 e636.
17. Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S. M., Gale, M., Jr. (2003). Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300, 1145-1148.
18. Fraser, J., Boo, I., Pountourios, P., Drummer, H. E. (2011). Hepatitis C virus (HCV) envelope glycoproteins E1 and E2 contain reduced cysteine residues essential for virus entry. *J Biol Chem* 286, 31984-31992.
19. Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Plachter, B., Greenberg, P. D. (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383, 720-722.
20. Gruner, N. H., Gerlach, T. J., Jung, M. C., Diepolder, H. M., Schirren, C. A., Schraut, W. W., Hoffmann, R., Zachoval, R., Santantonio, T., Cucchiari, M., Cerny, A., Pape, G. R. (2000). Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 181, 1528-1536.

21. Harari, A., Cellera, C., Bellutti Enders, F., Kostler, J., Codarri, L., Tapia, G., Boyman, O., Castro, E., Gaudieri, S., James, I., John, M., Wagner, R., Mallal, S., Pantaleo, G. (2007). Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16233-16238.
22. Herold, G. (2015): *Innere Medizin*. Köln.
23. Jallow, S., Leligdowicz, A., Kramer, H. B., Onyango, C., Cotten, M., Wright, C., Whittle, H. C., McMichael, A., Dong, T., Kessler, B. M., Rowland-Jones, S. L. (2015). The presence of prolines in the flanking region of an immunodominant HIV-2 gag epitope influences the quality and quantity of the epitope generated. *Eur J Immunol*
24. Ke, P. Y., Chen, S. S. (2011). Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest* 121, 37-56.
25. Khu, Y. L., Tan, Y. J., Lim, S. G., Hong, W., Goh, P. Y. (2004). Hepatitis C virus non-structural protein NS3 interacts with LMP7, a component of the immunoproteasome, and affects its proteasome activity. *Biochem J* 384, 401-409.
26. Kloetzel, P. M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 179-187.
27. Koch, J. O., Lohmann, V., Herian, U., Bartenschlager, R. (1996). In vitro studies on the activation of the hepatitis C virus NS3 proteinase by the NS4A cofactor. *Virology* 221, 54-66.
28. Le Gall, S., Stamegna, P., Walker, B. D. (2007). Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. *J Clin Invest* 117, 3563-3575.
29. Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., Walker, B. D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191, 1499-1512.
30. Li, W., Krishnadas, D. K., Kumar, R., Tyrrell, D. L., Agrawal, B. (2008). Priming and stimulation of hepatitis C virus-specific CD4+ and CD8+ T cells against HCV antigens NS4, NS5a or NS5b from HCV-naive individuals: implications for prophylactic vaccine. *Int Immunol* 20, 89-104.
31. Li, W., Krishnadas, D. K., Li, J., Tyrrell, D. L., Agrawal, B. (2006). Induction of primary human T cell responses against hepatitis C virus-derived antigens NS3 or core by autologous dendritic cells expressing hepatitis C virus antigens: potential for vaccine and immunotherapy. *J Immunol* 176, 6065-6075.
32. Liang, T. J. (2013). Current progress in development of hepatitis C virus vaccines. *Nat Med* 19, 869-878.

33. Lillie, P. J., Berthoud, T. K., Powell, T. J., Lambe, T., Mullarkey, C., Spencer, A. J., Hamill, M., Peng, Y., Blais, M. E., Duncan, C. J., Sheehy, S. H., Havelock, T., Faust, S. N., Williams, R. L., Gilbert, A., Oxford, J., Dong, T., Hill, A. V., Gilbert, S. C. (2012). Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans. *Clin Infect Dis* 55, 19-25.
34. Lin, W., Choe, W. H., Hiasa, Y., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Schmidt, E. V., Chung, R. T. (2005). Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* 128, 1034-1041.
35. Lindenstrom, T., Aagaard, C., Christensen, D., Agger, E. M., Andersen, P. (2014). High-frequency vaccine-induced CD8(+) T cells specific for an epitope naturally processed during infection with *Mycobacterium tuberculosis* do not confer protection. *Eur J Immunol* 44, 1699-1709.
36. Mhiri, L., Kaabi, B., Houimel, M., Arrouji, Z., Slim, A. (2007). Comparison of pp65 antigenemia, quantitative PCR and DNA hybrid capture for detection of cytomegalovirus in transplant recipients and AIDS patients. *J Virol Methods* 143, 23-28.
37. Missale, G., Bertoni, R., Lamonaca, V., Valli, A., Massari, M., Mori, C., Rumi, M. G., Houghton, M., Fiaccadori, F., Ferrari, C. (1996). 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* 98, 706-714.
38. Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9, 1089-1097.
39. Murphy, K. P., Weaver, C. (2018): *Janeway Immunologie* (L. Seidler, Trans. 9. Aufl.). : Springer Spektrum.
40. Nasheri, N., Ning, Z., Figeys, D., Yao, S., Goto, N. K., Pezacki, J. P. (2015). Activity-based profiling of the proteasome pathway during hepatitis C virus infection. *Proteomics*
41. Neveu, B., Debeauvais, E., Echasserieau, K., le Moullac-Vaidye, B., Gassin, M., Jegou, L., Decalf, J., Albert, M., Ferry, N., Gournay, J., Houssaint, E., Bonneville, M., Saulquin, X. (2008). Selection of high-avidity CD8 T cells correlates with control of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 48, 713-722.
42. Obar, J. J., Khanna, K. M., Lefrancois, L. (2008). Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28, 859-869.
43. Pacheco, Y., Allavena, C., Guilloux, Y., Mueller-Schmucker, S. M., Hueckelhoven, A. G., Andre-Garnier, E., Cleon, F., Ferre, V., Rodallec, A., Billaud, E., Harrer, T., Raffi, F., McIlroy, D. (2011). The immune response to the RT181-189 epitope in HIV-1-infected patients is

- associated with viral sequence polymorphism flanking the epitope. *J Clin Immunol* **31**, 681-689.
44. Pang, K. C., Sanders, M. T., Monaco, J. J., Doherty, P. C., Turner, S. J., Chen, W. (2006). Immunoproteasome subunit deficiencies impact differentially on two immunodominant influenza virus-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* **177**, 7680-7688.
 45. Pang, P. S., Jankowsky, E., Planet, P. J., Pyle, A. M. (2002). The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J* **21**, 1168-1176.
 46. Perrault, M., Pecheur, E. I. (2009). The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem J* **423**, 303-314.
 47. Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F. L., Patel, A. H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., Rispeter, K., Blum, H. E., Roggendorf, M., Baumert, T. F. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6025-6030.
 48. Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R., Jr., Wang, C., Ware, F., Sodora, D. L., Gale, M., Jr. (2002). Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4650-4655.
 49. Polyak, S. J., Khabar, K. S., Paschal, D. M., Ezelle, H. J., Duverlie, G., Barber, G. N., Levy, D. E., Mukaida, N., Gretch, D. R. (2001). Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* **75**, 6095-6106.
 50. Popescu, C. I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Heliot, L., Rouille, Y., Dubuisson, J. (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1001278.
 51. RKI. (2014a). *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 31. Nr.31. Retrieved 09.April, 2015, Online-Publikation;
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2014/Ausgaben/31_14.pdf?_blob=publicationFile
 52. RKI. (2014b, 03.04.2014). *Hepatitis C, RKI Ratgeber für Ärzte*. Retrieved 09. April, 2015, Online-Publikation;
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisC.html
 53. RKI. (2017, 23.11.2017). *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 47. Retrieved 03.10.2018, Online-Publikation;
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2017/Ausgaben/47_17.pdf?_blob=publicationFile

54. RKI. (2019). Epidemiologisches Bulletin Nr. 30. Retrieved 16.12.2019, Online-Publikation; https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/30_19.html
55. Sarrazin, C., Zimmermann, T., Berg, T., Neumann, U. P., Schirmacher, P., Schmidt, H., Spengler, U., Timm, J., Wedemeyer, H., Wirth, S., Zeuzem, S., Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, V.-u. S., Deutsche Gesellschaft für Pathologie e, V., Deutsche, L., Gesellschaft für Virologie e, V., Gesellschaft für Padiatrische Gastroenterologie und, E., Österreichische Gesellschaft für Gastroenterologie und, H., Schweizerische Gesellschaft für, G., Deutsche Transplantationsgesellschaft e, V., Deutsche Leberhilfe e, V., Deutsche Gesellschaft für Infektiologie e, V., Deutsche Gesellschaft für Suchtmedizin e, V., Deutsche, A.-G. e. V., Deutsche Arbeitsgemeinschaft niedergelassener Ärzte für die Versorgung, H. I. V. I., Robert, K.-I. (2018). [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis-C-virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection - AWMF-Register-No.: 021/012]. *Z Gastroenterol* 56, 756-838.
56. Schatz, M. M., Peters, B., Akkad, N., Ullrich, N., Martinez, A. N., Carroll, O., Bulik, S., Rammensee, H. G., van Endert, P., Holzhutter, H. G., Tenzer, S., Schild, H. (2008). Characterizing the N-terminal processing motif of MHC class I ligands. *J Immunol* 180, 3210-3217.
57. Schmidt, J., Iversen, A. K., Tenzer, S., Gostick, E., Price, D. A., Lohmann, V., Distler, U., Bowness, P., Schild, H., Blum, H. E., Klenerman, P., Neumann-Haefelin, C., Thimme, R. (2012). Rapid antigen processing and presentation of a protective and immunodominant HLA-B*27-restricted hepatitis C virus-specific CD8+ T-cell epitope. *PLoS Pathog* 8, e1003042.
58. Schmidt, J., Neumann-Haefelin, C., Altay, T., Gostick, E., Price, D. A., Lohmann, V., Blum, H. E., Thimme, R. (2011). Immunodominance of HLA-A2-restricted hepatitis C virus-specific CD8+ T cell responses is linked to naive-precursor frequency. *J Virol* 85, 5232-5236.
59. Seifert, U., Liermann, H., Racanelli, V., Halenius, A., Wiese, M., Wedemeyer, H., Ruppert, T., Rispeter, K., Henklein, P., Sijts, A., Hengel, H., Kloetzel, P. M., Rehmann, B. (2004). Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* 114, 250-259.
60. Semmo, N., Lucas, M., Krashias, G., Lauer, G., Chapel, H., Klenerman, P. (2006). Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy. *Blood* 107, 4570-4571.
61. Sercarz, E. E., Lehmann, P. V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A., Moudgil, K. (1993). Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 11, 729-766.
62. Shastri, N., Serwold, T., Gonzalez, F. (1995). Presentation of endogenous peptide/MHC class I complexes is profoundly influenced by specific C-terminal flanking residues. *J Immunol* 155, 4339-4346.

63. Shin, E. C., Seifert, U., Kato, T., Rice, C. M., Feinstone, S. M., Kloetzel, P. M., Rehermann, B. (2006). Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J Clin Invest* 116, 3006-3014.
64. Shoukry, N. H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D. Y., Ghrayeb, J., Reimann, K. A., Walker, C. M. (2003). Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 197, 1645-1655.
65. Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J., Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.
66. Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T., Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59, 318-327.
67. Steers, N. J., Currier, J. R., Jobe, O., Tovanabutra, S., Ratto-Kim, S., Marovich, M. A., Kim, J. H., Michael, N. L., Alving, C. R., Rao, M. (2014). Designing the epitope flanking regions for optimal generation of CTL epitopes. *Vaccine* 32, 3509-3516.
68. Stevenson, N. J., Bourke, N. M., Ryan, E. J., Binder, M., Fanning, L., Johnston, J. A., Hegarty, J. E., Long, A., O'Farrelly, C. (2013). Hepatitis C virus targets the interferon-alpha JAK/STAT pathway by promoting proteasomal degradation in immune cells and hepatocytes. *FEBS Lett* 587, 1571-1578.
69. Tenzer, S., Wee, E., Burgevin, A., Stewart-Jones, G., Friis, L., Lamberth, K., Chang, C. H., Harndahl, M., Weimershaus, M., Gerstoft, J., Akkad, N., Klenerman, P., Fugger, L., Jones, E. Y., McMichael, A. J., Buus, S., Schild, H., van Endert, P., Iversen, A. K. (2009). Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat Immunol* 10, 636-646.
70. Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H., Chisari, F. V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15661-15668.
71. Timm, J., Lauer, G. M., Kavanagh, D. G., Sheridan, I., Kim, A. Y., Lucas, M., Pillay, T., Ouchi, K., Reyor, L. L., Schulze zur Wiesch, J., Gandhi, R. T., Chung, R. T., Bhardwaj, N., Klenerman, P., Walker, B. D., Allen, T. M. (2004). CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 200, 1593-1604.
72. Timm, J., Walker, C. M. (2015). Mutational escape of CD8+ T cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infections. *Med Microbiol Immunol* 204, 29-38.

73. Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R., La Monica, N. (1993). NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* 67, 4017-4026.
74. Vitiello, A., Yuan, L., Chesnut, R. W., Sidney, J., Southwood, S., Farness, P., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Sette, A. (1996). Immunodominance analysis of CTL responses to influenza PR8 virus reveals two new dominant and subdominant Kb-restricted epitopes. *J Immunol* 157, 5555-5562.
75. Walker, A., Skibbe, K., Steinmann, E., Pfaender, S., Kuntzen, T., Megger, D. A., Groten, S., Sitek, B., Lauer, G. M., Kim, A. Y., Pietschmann, T., Allen, T. M., Timm, J. (2016). Distinct Escape Pathway by Hepatitis C Virus Genotype 1a from a Dominant CD8+ T Cell Response by Selection of Altered Epitope Processing. *J Virol* 90, 33-42.
76. Wedemeyer, H., He, X. S., Nascimbeni, M., Davis, A. R., Greenberg, H. B., Hoofnagle, J. H., Liang, T. J., Alter, H., Rehermann, B. (2002). Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 169, 3447-3458.
77. WHO. (2017a). Fact Sheet No. 164 Hepatitis C. Retrieved 29.11.2017, 2017, Online-Publikation; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
78. WHO. (2017b). Fact Sheet No. 360 HIV. Retrieved 29.11.2017, 2017, Online-Publikation; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>
79. Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B., Sissons, J. G. (1996). The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 70, 7569-7579.
80. Yerly, D., Heckerman, D., Allen, T. M., Chisholm, J. V., 3rd, Faircloth, K., Linde, C. H., Frahm, N., Timm, J., Pichler, W. J., Cerny, A., Brander, C. (2008). Increased cytotoxic T-lymphocyte epitope variant cross-recognition and functional avidity are associated with hepatitis C virus clearance. *J Virol* 82, 3147-3153.
81. Zhang, S. C., Martin, E., Shimada, M., Godfrey, S. B., Fricke, J., Locastro, S., Lai, N. Y., Liebesny, P., Carlson, J. M., Brumme, C. J., Ogbechie, O. A., Chen, H., Walker, B. D., Brumme, Z. L., Kavanagh, D. G., Le Gall, S. (2012). Aminopeptidase substrate preference affects HIV epitope presentation and predicts immune escape patterns in HIV-infected individuals. *J Immunol* 188, 5924-5934.

7 Anhang

7.1 Zusätzliche Abbildungen

PCR-Mutagenese

a) (+)-HCV-Core to NS5B:

Template pcDNA3.1

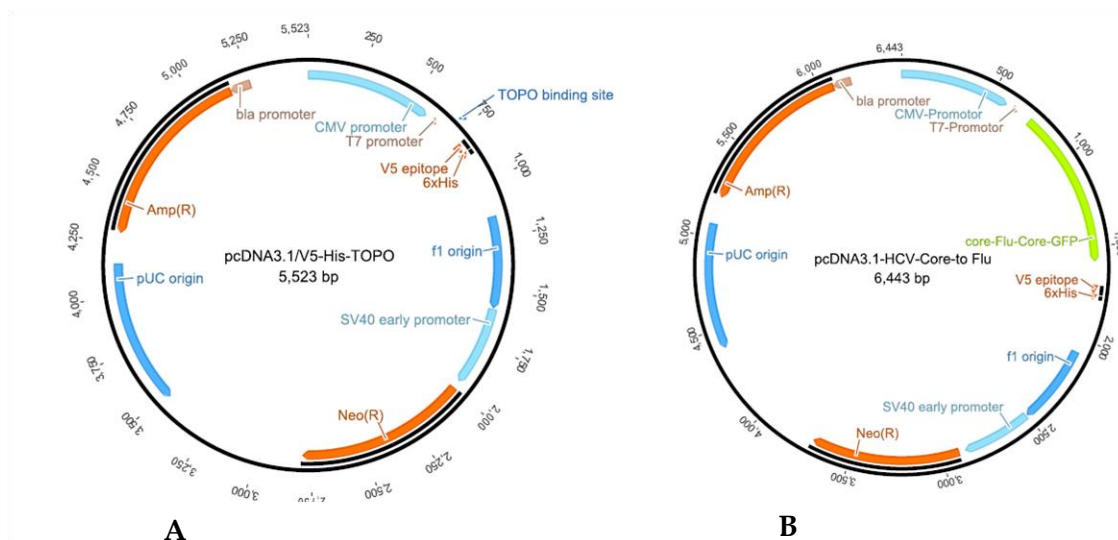
(+)-Primer: CTTGAGAAGCTTCCACCATGGATAACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGCC
CTGTACGACGTGGTTAGCAAGCTCGGCGCCCCTCTTGG

b) (+)-HCV-NS5B to NS5B:

Template pcDNA3.1

(+)-Primer: CTTGAGAAGCTTCCACCATGGGCGTGCGCGTGTGCGAGAAGATGG
CCCTGTACGACGTGGTTAGCAAGCTCCCCCTGGCCGTGATG

Vektor für Transfektion und fertiges Plasmid



Vektor für Transfektion und fertiges Plasmid

A: der ursprüngliche Vektor pcDNA3.1V5/His-Topo mit einem Ampicillin-Resistenzgen. Mit dem *Amaya Human T Cell Nucleofactor Kit* der Firma Lonza wurden verschiedene, an GFP gekoppelte Fragmente in das Plasmid transfiziert. **B:** das Plasmid nach Transfektion mit eingefügtem Core-Flu-Core-Fragment und GFP. Durch die Ampicillin-Resistenz konnten die erfolgreich transfizierten E. Coli-Zellen auf Ampicillin-angereicherten Nährböden von untransfizierten E. Coli selektiert werden. Das beigefügte GFP an das Core-Flu-Core-Fragment wurde für die spätere Detektion mittels Durchflusszytometrie genutzt.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
CaCl	Calcium-Chlorid
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalie Virus
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DAA	Direct Antiviral Agens
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
EBV	Epstein-Barr-Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales bovines (Rinder-) Serum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GT	Genotyp(-en)
H ₂ O	Diwasserstoffmonoxid; Wasser
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Puffersubstanz
HIV	Humanes-Immundefizienz-Virus
ICS	Intrazelluläre Zytokinfärbung
IDU	Patienten mit intravenösem Drogenabusus
IFN	Interferon
JAK	Janus-Kinase
Kap	Kapitel
LB-Medium	Luria-Bertani broth, Bakterienkulturmedium
LDL	Low density Lipoprotein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MSM	Man having sex with man
NaCl	Natrium-Chlorid
NE	Elution Buffer (Macherey Nagel)
NT1	Binding Buffer (Macherey Nagel)
NT3	Wash Buffer (Macherey Nagel)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
STAT	STAT-Proteine, signaltransduzierende Transkriptionsaktivatoren
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TAE	Tris-Acetate-EDTA

TAP	Transporter associated with antigen processing
TBE	Tris-Borate-EDT
u. a.	unter anderem
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung(-en)
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
WHO	World Health Organisation

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Virales Polyprotein mit Schnittstellen der Prozessierung	5
Abbildung 1.2: Lebenszyklus und Prozessierung von HCV	12
Abbildung 3.1: Schema der klonierten HCV/M1-Konstrukte.....	31
Abbildung 3.2: Leukozyten nach Transfektion.....	31
Abbildung 3.3: Vom Plasmid zum endogenen prozessierten Epitop.....	32
Abbildung 3.4: Vergleich der MFI.....	32
Abbildung 3.5: Vergleich der IFN- γ -Produktion	33
Abbildung 3.6: IFN- γ -Produktion nach Prozessierung des Flu-Peptids	34
Abbildung 3.7: Klonierte HCV/M1 Konstrukte mit flankierenden HCV-Sequenzen.....	35
Abbildung 3.8: IFN- γ Produktion nach Prozessierung des Influenza-Peptids	35
Abbildung 3.9: IFN- γ -Produktion nach Prozessierung des NS5B-Peptids	36
Abbildung 3.10: Verdünnungstitration der Peptide	37
Abbildung 3.11: Fehlende Hierarchie in der IFN- γ -Antwort auf das CMV-Epitop	39
Abbildung 3.12: Verringerung des Effektor-Target-Verhältnisses	39

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Geräte	18
Tab. 2.2 Kommerzielle Kits	18
Tab. 2.3 Verbrauchsmaterialien	19
Tab. 2.4 Puffer.....	19
Tab. 2.5 Enzyme	20
Tab. 2.6 Antikörper	20
Tab. 2.7 Sonstige Chemikalien	21
Tab. 2.8 Primer.....	22
Tab. 2.9 Peptide.....	22
Tab. 2.10 Pro- und Eukaryotische Zellen.....	23
Tab. 2.11 Dienstleister, PC-Programme, Internet	23
Tab. 2.12 Rezepte für Eigenansätze	23
Tab. 2.13 Zusammensetzung der PCR Ansätze	24
Tab. 2.14 PCR-Programm.....	24
Tab. 2.15 Ansatz einer TOPO-Reaktion	26
Tab. 2.16 Sequenzanalyse	27
Tab. 3.1 Klonierte Modellkonstrukte mit dem HLA-A*02 Epitop aus dem Matrixprotein M1	30
Tab. 3.2 Austausch der flankierenden Regionen.....	34
Tab. 3.3 Klonierte Konstrukte mit NS5B.....	36
Tab. 3.4 pp65-Konstrukte.....	38

8 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Dittmer für die Möglichkeit, die experimentellen Studien für die hier vorliegende Arbeit in den Laboren des Instituts für Virologie an der Uniklinik Essen durchführen zu dürfen.

Große Dankbarkeit möchte ich an Professor Dr. Jörg Timm richten. Zum einen dafür, dass er mir das Vertrauen entgegen gebracht hat, mich mit dieser anspruchsvollen und interessanten Fragestellung auseinanderzusetzen. Zum anderen danke ich ihm dafür, dass seine Ohren und Türen stets für mich geöffnet waren. Und egal für wieviel Durcheinander ich in der Zusammenarbeit gesorgt habe, konnte ich doch jederzeit auf seine Unterstützung hoffen. Vielen Dank dafür!

Meinen besonderen Dank möchte ich auch PD Dr. Jens Verheyen aussprechen. Meine Dissertation als Doktorvater zu übernehmen und zu betreuen war keine Selbstverständlichkeit.

Nicht genug danken kann ich darüber hinaus Dr. Andreas Walker. Mit einer schier endlosen Geduld führte er mich in alle denkbaren Aspekte des wissenschaftlichen Arbeitens ein und wurde es nicht müde, mich im Schriftlichen auf dem schmalen Grad zwischen „zu kompliziert“ und „Umgangssprache“ zu halten. Danke für die Geduld und Ausdauer!

Bei Geduld und Ausdauer komme ich direkt zu Svenja Groten. Sie hat mir alles beigebracht, was ich im Labor brauchte und war immer an meiner Seite. Ohne sie wäre ich verloren gewesen. Meinen herzlichsten Dank!

Auch Raya Rausch möchte ich danken für das freundliche zur Verfügung stellen der Daten ihrer Masterarbeit.

Im Institut herrschte stets eine herzliche Grundstimmung und nie ein Mangel fachlicher Hilfe, Aufmunterung und positivem Miteinander. Und es fehlte nie an Schokolade, auch das will lobend erwähnt sein. Dafür, dass ich immer gern ins Labor gegangen bin, danke ich Leyla Timmer, Svenja Groten, Sina Luppus, Susanne Ziegler, Kathrin Skibbe, Christine Thöns, Maren Lipskoch, Inga Möller und Phillip Garthe!

Großen Dank möchte ich auch Eduard Exler und Lars Auth aussprechen für all den technischen Support und die Mühe beim Korrektur lesen.

Meinen größten Dank möchte ich aber meiner Familie aussprechen, Lars und Emil Auth. Sie haben gewissermaßen diese Dissertation mit mir geschrieben. Haben immer eng an allen Höhen und Tiefen teilgehabt, mussten so manches mal zurücktreten und standen doch jederzeit hinter mir und haben mich in einer Weise unterstützt, wie es sonst niemand gekonnt hätte. Danke.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.