

## **Abschlussbericht Teilprojekt 10.2.1**

**Projekttitel:** Analyse von Immunmechanismen bei Akuter Virushepatitis

**Projektleiter:** Prof. Dr. med. G. R. Pape, Prof. Dr. Med. M.-C. Jung,  
Dr. med. N. Grüner  
Klinikum Großhadern der Ludwig Maximilian Universität  
Medizinische Universitätsklinik II  
Marchioninstr. 15  
81377 München

**Telefon:** +49(0) 89-7095 3020

**Fax:** +49(0) 89-591183

**E-Mail:** [grpape@med.uni-muenchen.de](mailto:grpape@med.uni-muenchen.de)

**Berichtszeitraum:** 01.02.2002 – 31.01.2005

## I.

### 1. Aufgabenstellung:

Übergeordnetes Ziel dieses Antrags war es Beiträge zu liefern für das Verständnis der Regulation und der Mechanismen der spezifischen T Zell Antwort, die bei akuter Hepatitis C (und akuter Hepatitis B) mit der Viruselimination bzw. Kontrolle verbunden ist und damit die notwendigen theoretischen Voraussetzungen für neue therapeutische und prophylaktische Ansätze zur Bekämpfung der HCV (HBV) Infektion zu liefern. Hierzu sollte die antivirale T Zell Antwort bei Patienten mit gut dokumentierter symptomatischer akuter Hepatitis C analysiert werden. Die Hälfte dieser Patienten eliminiert das Virus spontan, die andere Hälfte zeigt Viruspersistenz und chronischen Verlauf der Erkrankung. Für diese Untersuchung sollten PBMC und Serumproben aufgearbeitet und gesammelt werden. Gleichzeitig sollte eine systematische Erfassung des klinischen Verlaufes dieser Patienten, die bisher noch ein sehr wenig untersuchtes Patientengut darstellten, erfolgen. Der Einsatz von in jüngster Zeit etablierten Methoden (Elispot assay, Tetramere) zur systematischen Analyse der virusspezifischen CD4+ und CD8+ T Zellen war geplant. Hierzu war beabsichtigt die CD8+ T Zell Antwort mit Hilfe von HLA Klasse I Tetrameren und ELISpot im Verlauf zu analysieren. Parallel dazu sollte die CD4+ T Zellantwort im Proliferationsassay und ebenfalls im ELISpot gemessen werden. Die funktionelle Analyse beider Zellpopulationen nach spezifischer Stimulation mit Peptiden in der Durchflusszytometrie (z.B.: intrazelluläre Zytokine, Aktivierungsmarker) oder im <sup>51</sup>Cr Freisetzungstest für CD8+ T Zellen war geplant. Sobald verfügbar sollte ebenfalls die Charakterisierung der CD4+ T Zellen mit HLA Klasse II Tetrameren erfolgen. Darüber hinaus war geplant immundominante Epitope zu sequenzieren und den Einfluss von Mutationen auf die Immunantwort zu untersuchen. Von allen Patienten sollten die klinischen, virologischen und immunologischen Daten erfasst und gespeichert werden. Anschließend sollten die Patienten nach klinischem Verlauf verschiedenen Gruppen zugeordnet werden. Durch die Korrelation der verschiedenen Gruppen mit den immunologischen und virologischen Daten sollten folgende Punkte geklärt werden: 1. Bedeutung der CD4+ und CD8+ T Zellantwort für Klärung und Kontrolle des Virus bei akuter Hepatitis C. 2. Identifikation neuer Epitope, Definition von Immundominanz bzw. Hierarchie der erkannten Epitope. 3. Stärke der Immunreaktion (Precursorfrequenz). 4. Funktion, d.h. z.B. Lymphokinmuster/Zytotoxizität der T Zellen. 5. Identifikation von Mutationen und

deren Einfluss auf die T Zellantwort. (Es war vorgesehen, entsprechende Analysen auch im Verlauf der akuten Hepatitis B durchzuführen).

## **2. Voraussetzungen:**

Zum Verständnis der Immunpathogenese der HCV Infektion und zur Entwicklung neuer Therapieansätze ist die alleinige Analyse der CD4+ Zellen der T Zellantwort nicht ausreichend, so dass in seinerzeit veröffentlichten Arbeiten auch die CD8+ T Zell Antwort näher charakterisiert wurde. Untersuchungen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C hatten ergeben, daß trotz fortbestehender Hepatitis C Virusinfektion eine polyklonale multispezifische CD8+ zytolytische T Zellantwort nachweisbar ist, die gegen alle Proteine des Virus gerichtet sein kann. Um die Stärke der HCV-spezifischen CTL Antwort zu beurteilen, hatten einige Untersucher diese Reaktion mit der Memory Reaktion gegenüber einer früher durchgemachten Infektion mit Influenzavirus bei den entsprechenden Patienten verglichen und festgestellt, daß die HCV spezifische CTL Antwort trotz bestehender HCV Infektion nicht stärker ist als die einer Memory Antwort bei früher stattgehabter Influenza Infektion. Bisherige Untersuchungen zur Funktion der CD8+ T Zellen hatten sich vornehmlich auf die Bestimmung der Zytotoxizität im sog. 51 Chromium Freisetzungstest konzentriert.

## **3. Planung und Ablauf:**

Im Rahmen des geplanten Projektes sollte die Immunantwort des natürlichen Verlaufes von Patienten mit gut dokumentierter akuter Hepatitis C analysiert werden. Hierzu wurden PBMC und Serumproben von diesem seltenen Patientenkollektiv aufgearbeitet und gesammelt. Gleichzeitig erfolgte eine systematische Erfassung des klinischen Verlaufes dieser Patienten. Neu etablierte Methoden (Elispot assay, Tetramere) zur systematischen Analyse der virusspezifischen CD4+ und CD8+ T Zellen wurden eingesetzt. Hierzu wurde die CD8+ T Zellantwort mit Hilfe von HLA Klasse I Tetrameren und ELISpot im Verlauf analysiert. Parallel dazu wurde die CD4+ T Zellantwort im Proliferationsassay und mit neu etablierten HLA Klasse II Tetrameren gemessen. Die funktionelle Analyse beider Zellpopulationen erfolgt nach spezifischer Stimulation mit Peptiden in der Durchflusszytometrie (z.B.: intrazelluläre Zytokine, Aktivierungsmarker). Es wurde begonnen bei ausgewählten Patienten immundominante Epitope zu sequenzieren und bei Auffinden von Mutationen die Immunreaktion gegen die mutierten Epitope aus aufgetautem PBMC zu testen.

Bisher konnten wir bei 6 Patienten mit akuter Hepatitis C wichtige immundominante CD4 und CD8 Epitope im Verlauf sequenzieren. Bei einem Patienten wurde eine Mutation in einem bekannten immundominanten CD8+ Epitope gefunden. Die Analyse der potentiellen Bedeutung dieser Mutation ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Zusätzlich wurde begonnen, sogenannte plasmazytoide dendritische Zellen bei Patienten mit akuter Hepatitis C zu analysieren (siehe neue Vorhabensziele).

Bei der Behandlung der akuten Hepatitis C besteht ausserdem Unklarheit über die optimale Therapie. Die betrifft sowohl die einzusetzenden Substanzen, das Therapieschema als auch insbesondere die Frage, ob überhaupt eine Behandlungsnotwendigkeit für alle Patienten mit akuter Hepatitis C besteht. Zur Klärung dieser Fragen haben wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von M. Manns/ H. Wedemeyer, Hannover, eine klinische Studie im Rahmen des Hep-Net aufgelegt. Die Koordination und Leitung dieser Studie erfolgt vom Zentrum Hannover und vom Zentrum München im Hep-Net. Studienbeginn war im April 2004.

Im abgelaufenen Zeitraum wurden auch Patienten mit akuter Hepatitis B analysiert. Dabei

gelang es, einen Patienten zu identifizieren, bei dem sich auf eine chronische Hepatitis C Virus Infektion eine akuten Hepatitis B aufgepflanzt hatte. Dieser Patient eliminierte spontan sowohl HBV als auch HCV. Erstmals gelang es bei diesem sehr seltenen Spontanverlauf, die T Zellantwort im Verlauf zu charakterisieren. Hierbei zeigte sich, dass möglicherweise eine Kontrolle einer HCV Infektion durch eine nicht HCV spezifische Immunantwort möglich ist.

Von allen Patienten wurden die klinischen, virologischen und immunologischen Daten erfasst und gespeichert. Anschließend wurden die Patienten nach klinischem Verlauf verschiedenen Gruppen zugeordnet. Durch die Korrelation der verschiedenen Gruppen mit den immunologischen und virologischen Daten konnten folgende Punkte analysiert werden:

1. Bedeutung der CD4+ und CD8+ T Zellantwort für Klärung und Kontrolle des Virus bei akuter Hepatitis C.
2. Stärke der Immunreaktion (Precursorfrequenz).
3. Phänotypisierung der T Zellen.
4. Identifikation von Mutationen.
5. Charakterisierung der pDC HCV.

#### **4. Wissenschaftlicher und technischer Stand:**

Durch den Einsatz neuerer Methoden zur Charakterisierung von CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten (HLA Klasse I Tetramere, ELISPOT) konnte für andere Infektionserkrankungen (HIV, LCMV, EBV, Influenza) gezeigt werden, daß die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T Zellen mit der bisherigen Standardmethode des 51Cr Freisetzungstest unterschätzt wurde und nur eine Subpopulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen detektiert werden konnte. Dies schien sich auch auf die Hepatitis C Infektion übertragen zu lassen, wie veröffentlichte Daten belegten. Wegen der sehr interessanten Ergebnisse bei verschiedenen viralen Infektionen, so auch bei der Hepatitis C, wurde diskutiert, ob diese neuen Techniken in Zukunft die bisherige Methode des 51 Cr Freisetzungstest als Goldstandard zur Detektion von CD8<sup>+</sup> T Zellen ablösen könnten. MHC Klasse I Tetramere bieten zudem die Möglichkeit spezifische CD8<sup>+</sup> T Zellen zu sorten (FACS) und anschließend zu klonieren. Weiterhin ist diese Methode als read-out System zum Monitoring von z.B. Vakzinierungsstudien geeignet. Sowohl dieses Monitoring als auch die Klonierung spezifischer Zellen war bisher nur unter erheblichem größerem Material- und Zeitaufwand möglich. Der Einsatz dieser neuen Methoden zur systematischen Untersuchung der Frequenz und Bedeutung von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und reproduzierbaren Quantifizierung schien für das Verständnis der Pathogenese der HCV-Infektion daher dringend notwendig.

#### **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen:**

Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von M.Manns/H. Wedemeyer. Gemeinsame Nutzung von sehr kostenintensiven Substanzen, z.B. HLA Klasse I Tetramere. Klinische Studie bei Patienten mit akuter Hepatitis C.

## II.

### 1. Erzielte Ergebnisse:

Im bisherigen Förderungszeitraum wurden neue Patienten mit akuter Hepatitis C identifiziert. Die klinischen und virologischen Befunde dieser Patienten wurden entsprechend erfasst und dokumentiert. Die CD4+ und CD8+ T Zellantwort wurde im Verlauf bestimmt. Es wurde bei ausgewählten Patienten immundominante Epitope sequenziert und bei Auffinden von Mutationen die Immunreaktion gegen die mutierten Epitope aus aufgetautem PBMC getestet.

Zusätzlich wurden sogenannte plasmazytoide dendritische Zellen bei Patienten mit akuter Hepatitis C analysiert.

Bei der Behandlung der akuten Hepatitis C besteht Unklarheit über die optimale Therapie. Dies betrifft sowohl die einzusetzenden Substanzen, das Therapieschema als auch insbesondere die Frage, ob überhaupt eine Behandlungsnotwendigkeit für alle Patienten mit akuter Hepatitis C besteht. Zur Klärung dieser Fragen haben wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von M. Manns/ H. Wedemeyer, Hannover, eine klinische Studie im Rahmen des Hep-Net aufgelegt. Die Koordination und Leitung dieser Studie wird vom Zentrum Hannover und vom Zentrum München im Hep-Net erfolgen. Seit dem Beginn der Studie im April 2004 wurden 25 Patienten randomisiert.

Im abgelaufenen Zeitraum wurden auch Patienten mit akuter Hepatitis B analysiert. Dabei

gelang es, einen Patienten zu identifizieren, bei dem sich auf eine chronische Hepatitis C Virus Infektion eine akuten Hepatitis B aufgepflanzt hatte. Dieser Patient eliminierte spontan sowohl das HBV als auch das HCV. Erstmals gelang es bei diesem sehr seltenen Spontanverlauf, die T Zellantwort im Verlauf zu charakterisieren. Hierbei zeigte sich, dass möglicherweise eine Kontrolle einer HCV Infektion durch eine nicht HCV spezifische Immunantwort möglich ist.

Folgende Ziele des Antrages wurden im zurückliegenden Antragszeitraum erreicht:

a) Neue Patienten mit akuter Hepatitis C Virusinfektion wurden identifiziert. Klinische, virologische und immunologische Daten dieser Patienten wurden gesammelt und dokumentiert. Die virusspezifische CD4+ und CD8+ T Zellantwort sowie die Frequenz und Eigenschaft der plasmazytoiden dendritischen Zellen wurde im Verlauf

bei diesen Patienten analysiert. Verschiedene immundominante Epitope wurden im Hinblick auf Mutationen sequenziert.

*b) Es gelang HCV spezifische CD4+ T Zellen, welche nicht im Proliferationsassay oder über die Produktion von g-Interferon detektierbar sind, bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Infektion nachzuweisen. Dies gelang durch Expressionsnachweis des Aktivierungsmarkers CD 25 nach spezifischer Stimulation.*

*c) Es konnte gezeigt werden, dass plasmazytoide dendritische Zellen sowohl in der Anzahl als auch in ihrer Funktion im Verlauf einer akuten Hepatitis C Infektion eingeschränkt sind. Diese Veränderungen sind jedoch nicht spezifisch für eine Hepatitis C sondern möglicherweise Ausdruck einer Umverteilung an den Ort der Entzündung.*

*d) Mutationen der Wildtypsequenzen, welche während einer akuten Hepatitis B Infektion vorkommen wurden im Hinblick auf ihre Fähigkeit spezifische T Zellen bzw. T Zellklone zu stimulieren untersucht. Es wurden 5 Mutationen gefunden, welche im Gegensatz zu den Wildtypsequenzen keine stimulatorische Aktivität mehr aufzeigten.*

*e) Es gelang die T Zellantwort im Verlauf einer Hepatitis B Superinfektion bei einem Patienten mit chronischer Hepatitis C und spontaner Elimination beider Viren zu analysieren. Hierbei konnte eine Hepatitis B spezifische zelluläre Immunantwort nicht jedoch eine Hepatitis C spezifische Immunantwort nachgewiesen werden. Das Verschwinden der HCV-RNA wurde somit möglicherweise durch eine Art Bystander Reaktion erreicht.*

## **2. Voraussichtlicher Nutzen:**

Im Antragszeitraum konnten neue Techniken (HLA Klasse II Tetramere, Detektion von funktionell veränderten CD4+ T Zellen via CD25 Expression) erfolgreich etabliert werden. Insbesondere gelang es die mit einer spontanen Viruselimination verbundene Immunantwort besser zu charakterisieren. Diese gewonnenen Erkenntnisse sollen die Grundlage zur Entwicklung einer T Zell-Vakzine bilden, durch welche eine derartige Immunantwort beim chronischen Patienten stimuliert werden soll. Die Zusammenarbeit mit verschiedenen Zentren ist wegen der Seltenheit von Patienten mit einer spontanen Viruselimination unabdingbar, um statistisch

signifikante Unterschiede zu erfassen. Die hierbei entstehenden Datenbanken dieser Patienten sowie Materialbanken (Serum, PBMC) können über den Förderzeitraum hinaus genutzt werden.

Während der ersten Förderperiode wurden im Rahmen des Hep-net eine klinische Studie zur Behandlung einer akuten Hepatitis C begonnen, die von der Arbeitsgruppe Manns/Wedemeyer sowie unserer Arbeitsgruppe koordiniert wird. Aktuell werden Patienten mit akuter Hepatitis C aus allen Bundesländern den Studienzentren in Hannover und München gemeldet und randomisiert. Der Einschluss von etwa 150 Patienten ist bis Ende 2006 geplant.

Die Ergebnisse unserer Arbeit sind sowohl für klinisch tätige Ärzte (Verbesserung der Behandlungsstrategie bei akuter Hepatitis C durch eine randomisierte, kontrollierte nationale klinische Studie: Vergleich zweier Therapiestrategien und breite Einführung der überlegenen Strategie in die Krankenversorgung sind hierbei angestrebt: Soforttherapie vs. verzögerte Therapie der akuten Hepatitis C Virusinfektion) als auch für Immunologen und Vakzinologen (Entwicklung einer T Zellvakzine) von Bedeutung. Die Veröffentlichung der neu gewonnenen Erkenntnisse ist bei Workshops, Vorträgen und Publikationen geplant, bzw. erfolgt.

### **3. Fortschritt bei anderen Stellen:**

Während der Antragsperiode wurden Fortschritte bekannt, welche sich unmittelbar auf unsere Vorgehensweise auswirkten. Von herausragender Bedeutung war hierbei die erstmalige Herstellung HCV spezifischer Klasse II Tetramere der Arbeitsgruppe um P. Klenerman aus Oxford. In einer Kooperation konnten wir die Spezifität und somit die Funktionsfähigkeit dieser neuen Tetramere anhand von spezifischen Klonen nachweisen. Hierdurch wurde die Grundlage geschaffen CD4+ T Zellen erstmalig direkt ex vivo mittels HLA Klasse II Tetrameren nachzuweisen.

Ein weiterer Fortschritt wurde bei der Charakterisierung sogenannter plasmazytoider dendritischer Zellen erzielt. Während des Antragszeitraum erschienen mehrere Publikationen, welche diese Zellpopulation bei Patienten mit chronischer Hepatitis C analysierten. Hierbei wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen ein funktioneller Defekt der pDC beschrieben. U.a. aufgrund dieser Veröffentlichungen haben wir diese Zellpopulation bei Patienten mit akuter Hepatitis C untersucht und verglichen mit Patienten mit chronischer Hepatitis B oder C bzw. akuter Hepatitis B.



#### **4. Veröffentlichungen:**

Norbert H. Gruener, Maria-Christina Jung, Axel Ulsenheimer, Tilman J. Gerlach, Helmut M. Diepolder, Carl A. Schirren, Robert Hoffmann, Martin Wächtler, Markus Backmund, Gerd R. Pape: Hepatitis C virus eradication associated with hepatitis B virus superinfection and development of a hepatitis B virus specific T cell response. **Journal of Hepatology** **37 (2002) 866-869.**

Axel Ulsenheimer, Tilman J. Gerlach, Norbert H. Gruener, Maria-Christina Jung, Carl A. Schirren, Winfried Schraut, Reinhart Zachoval, Gerd R. Pape, Helmut M. Diepolder: Detection of functionally altered hepatitis C virus specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. **Hepatology**, **2003 May, 37 (5) 1189-98.**

Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut W, Schirren CA, Waechtler M, Backmund M, Pape GR: Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. **Gastroenterology**. **2003 Jul; 125 (1): 253-6**

Norbert H. Gruener, , Tilman J Gerlach, A. Ulsenheimer, Helmut M. Diepolder, Eddy Wierenga, Reinhart Zachoval, Albrecht C. Schirren, Gerd R. Pape, Maria-Christina Jung: Naturally occurring HBV variants within the nucleocapsid protein create null ligand peptides unable to activate HBV-specific CD4+ T lymphocytes. **Hepatology**, **Vol. 38, No. 4, Suppl.1, Oct 2003; 252 A.**

Ulsenheimer, Norbert H. Gruener, Maria-Christina Jung, Tilman J Gerlach, Reinhart Zachoval, Winfried Schraut, Albrecht C. Schirren, Gerd R. Pape, Helmut M. Diepolder: Reduced Interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in acute viral hepatitis B and C. **Hepatology**, **Vol. 38, No. 4, Suppl.1, Oct 2003; 362 A.**

Norbert Hubert Gruener, Maria-Christina Jung, Axel Ulsenheimer, Joern Tilman Gerlach, Reinhart Zachoval, Helmut M. Diepolder, Gustavo Baretton, Rolf Schauer,

Gerd Rudolf Pape, and Albrecht Carl Albrecht Schirren: Analysis of a successful HCV-specific CD8+ T cell response in patients with recurrent HCV-Infection after orthotopic liver transplantation. **Liver Transplantation 2004; 10: 1487-1496.**