

Abschlussbericht Teilprojekt 10.2.1

Projekttitlel: Analyse der Immunantwort bei akuter Hepatitis B/C

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

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

Fax: +49 (0) 89 / 591-183

E-Mail: grpape@med.uni-muenchen.de

Berichtszeitraum: 01.02.2005 – 31.01.2007

I.

1. Aufgabenstellung

Übergeordnetes Ziel dieses Antrags war es, Beiträge für das Verständnis der spezifischen T Zell Regulation im natürlichen Verlauf einer Hepatitis C Virus (HCV) Infektion zu liefern, und damit die notwendigen theoretischen Voraussetzungen für neue therapeutische und prophylaktische Ansätze zur Bekämpfung der HCV Infektion zu schaffen.. 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. Lymphokinemuster/Zytotoxizität der T Zellen.
5. Identifikation von Mutationen und deren Einfluss auf die T Zellantwort.
6. Bedeutung der plasmazytoiden dendritischen Zellen für Klärung und Kontrolle des Virus bei akuter Hepatitis C.

2. Voraussetzungen

Zum Verständnis der Immunpathogenese der HCV Infektion und zur Entwicklung . neuer Therapieansätze ist die quantitative Analyse der T Zellen nicht ausreichend. Bisher war eine funktionelle Untersuchung der CD4+ T Zellen durch Proliferations- und Zytokinassays möglich. Der erstmalige Einsatz von HLA-Klasse-II-Tetrameren macht nunmehr die Charakterisierung dieser Zellpopulation unabhängig vom Phänotyp möglich. Um die Immunantwort möglichst breit zu erfassen wurden zudem zunächst neue CD4+ Epitope charakterisiert.

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 erfolgte 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 aufgetauten PBMC zu testen.

Bei der Behandlung der akuten Hepatitis C besteht zum heutigen Zeitpunkt noch 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.

Von allen Patienten wurden die klinischen, virologischen und immunologischen Daten erfasst und gespeichert

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Durch den Einsatz neuerer Methoden zur Charakterisierung von CD4+ T Lymphozyten (HLA-Klasse-II-Tetramere) konnten erstmals auch dysfunktionelle HCV spezifische CD4+ T Zellen nachgewiesen werden, welche mit den bisherigen Untersuchungstechniken meist nicht detektierbar waren. MHC-Klasse-II-Tetramere bieten die Möglichkeit gleichzeitig spezifische CD4+ T Zellen phänotypisch und funktionell zu charakterisieren. 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 Methode zur systematischen Untersuchung der Frequenz und Bedeutung von CD4+ 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 in einer Datenbank 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.

Bisher konnten wir bei sechs 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, welche mit einer verminderten Immunantwort assoziiert ist.

PBMC von 20 Patienten mit akuter HCV wurden mit 83 Peptiden (20mer, 10 AS überlappend), welche NS3 und NS4 abdecken, untersucht. Acht Peptide wurde von 40% der Patienten erkannt. CD4⁺ T Zell Klone konnten von sieben dieser Peptide und drei weiteren Peptiden, welche seltener erkannt wurden, gewonnen werden. Die getesteten Minimalsequenzen waren Epitope mit einer Länge von 8-13 AS. Zur optimalen T Zell Stimulierung waren 10-15´mer Peptide am besten geeignet. Einige der Epitope konnten über verschiedene HLA Moleküle präsentiert werden, andere jedoch nur über ein einziges HLA Molekül.

Zusammenfassend konnten wir mehrere neue HCV spezifische CD4⁺ T Zellepitope identifizieren, welche bei Patienten mit selbstlimitierter Infektion immundominant sind. Hierdurch wurde die Basis zur Synthese von HLA-Klasse-II-Tetrameren zur genauen Analyse der Immunantwort bei chronischer Infektion geschaffen. Erste Untersuchungen mit diesen HLA-Klasse-II-Tetrameren konnten spezifische CD4⁺ T Zellen in Abwesenheit einer signifikanten Proliferation nachweisen. Der Nachweis solcher nicht funktioneller CD4⁺ T Zellen ist hierbei mit einer fehlenden Viruskontrolle assoziiert.

Die Nachweisgrenze spezifischer CD4⁺ T Zellen für HLA-Klasse-II-Tetramere, bestimmt mittels Klonen und Verdünnungsreihen, lag bei ca. 10/10⁶ CD4⁺ Zellen. Bisher konnten bei sieben Patienten mit akuter Hepatitis C mit dieser neuen Methode spezifische CD4⁺ T Zellen nachgewiesen und charakterisiert werden.

In einer weiteren Untersuchung haben wir die Frequenz, den Phänotyp und die Funktion plasmazytoider dendritischer Zellen (pDC) bei 13 Patienten mit akuter, 32 Patienten mit chronischer HCV, 10 Normalpersonen, 33 Patienten mit therapieinduzierter ausgeheilter HCV, 14 Patienten mit akuter Hepatitis B und 33 Patienten mit nichtviralen Infektionen analysiert. Bei Patienten mit akuter HCV Infektion war die Anzahl der pDC im Vergleich zu Normalpersonen signifikant reduziert. Hierbei handelte es sich um sog. unreife pDC mit reduzierter HLA-DR und CCR7 Expression sowie geringer Produktion von α -IFN. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei Patienten mit akuter HBV und Patienten mit nichtviraler Infektion gefunden.

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 ca. 100 Patienten randomisiert.

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 in einer Datenbank dokumentiert. Die viruspezifische 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 bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis C Infektion mittels HLA-Klasse-II-Tetrameren dysfunktionelle HCV spezifische CD4⁺ T Zellen zu detektieren, welche im Proliferationsassay oder über die Produktion von γ -Interferon nicht nachweisbar waren. Des Weiteren konnten diese Tet⁺ Zellen bezüglich ihrer funktionellen und phänotypischen Eigenschaften weiter charakterisiert werden.*
- 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) *Identifikation eines immundominanten HLA DRB1*0101 restringierten HBV spezifischen Minimalepitopes als Voraussetzung zur Synthese eines HLA-Klasse-II-Tetramers.*
- e) *Nachweis der Spezifität des HLA DRB1*0101 restringierten HBV spezifischen HLA-Klasse-II-Tetramers mittels eines spezifischen CD4⁺ T Zellklones.*
- f) *Es gelang erstmals mit HLA-Klasse-II-Tetrameren HBV spezifische CD4⁺ T Zellen bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis B Infektion nachzuweisen und deren funktionelle und phänotypischen Eigenschaften zu charakterisieren.*

2. Voraussichtlicher Nutzen

Im Antragszeitraum konnten neue Techniken (HLA-Klasse-II-Tetramere, Detektion von funktionell veränderten CD4⁺ T Zellen) 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 dort ggf. randomisiert. Bisher sind ca. 100 Patienten randomisiert worden.

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 (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 erarbeitet, 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 Antragszeitraums 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

Gerlach JT, Ulsenheimer A, **Gruener NH**, Jung MC, Schraut W, Schirren CA, Heeg M, Scholz S, Witter K, Zahn R, et al. 2005. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins, *J Virol* 79, 12425-33.

Ulsenheimer A, Gerlach JT, Jung MC, **Gruener NH**, Wachtler M, Backmund M, Santantonio T, Schraut W, Heeg MH, Schirren CA, et al. 2005. Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection, *Hepatology* 41, 643-51.

Ulsenheimer A, Lucas M, Seth NP, Gerlach J, **Gruener NH**, Loughry A, Pape GR, Wucherpennig KW, Diepolder HM, Klenerman P, et al. 2006. Transient immunological control during acute hepatitis C virus infection: ex vivo analysis of helper T-cell responses, *J Viral Hepat* 13, 708-14.

Gruener NH, Gerlach TG, Ulsenheimer A, Diepolder HM, Wierenga E, Zachoval R, Heeg M, Pape GR and Jung MC. 2007. Characterization of sequence variations in immunodominant regions of the HBV-nucleocapsid protein as a prerequisite for the development of an epitope-based vaccine. *Vaccine*. 2007 Jun 21;25(26):4960-6. Epub 2006 Dec 22.

Lucas M, Ulsenheimer A, Pfafferot K, Heeg MHJ, Gaudieri S, et al (2007) Tracking Virus-Specific CD4+ T Cells during and after Acute Hepatitis

C Virus Infection. *PLoS ONE* 2(7): e649. doi:10.1371/journal.pone.0000649

Ulsenheimer A, Paranhos-Baccalà G, Diepolder HM, Heeg M, Raziorrouh B, Zachoval R, Pape GR, Berg T, Jung MC, **Gruener NH**. 2007. High variability with rapid selection of escape mutations within NS3 1406 epitope during early phase of acute hepatitis due to antiviral pressure by CD8+ T cells. Manuscript in preparation.

III.

1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen

Die Struktur des Netzwerkes hat erstmalig Studien ermöglicht, welche bisher in dieser Form nicht durchgeführt werden konnten. Insbesondere die Studien an Patienten mit sehr seltenen Erkrankungen wie der akuten Hepatitis C Infektion wurde durch die Zusammenarbeit zahlreicher Zentren, welche im Kompetenznetz zusammengeschlossen sind, ermöglicht. Zudem konnten durch den Zusammenschluss bei den immunologischen Testungen sehr teure Substanzen durch gemeinsame Anschaffung effizienter genutzt werden. Darüber hinaus wurden durch eine festgelegte Aufteilung der Analysen Überlappungen vermieden.

2. Wissenschaftlich technische Ergebnisse

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 viruspezifische 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 mit HLA-Klasse-II-Tetrameren HCV spezifische CD4⁺ T Zellen, welche nicht im Proliferationsassay oder über die Produktion von γ -Interferon detektierbar sind, bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis C Infektion nachzuweisen.

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) Identifikation eines immundominanten HLA DRB1*0101 restringierten HBV spezifischen Minimalepitopes als Voraussetzung zur Synthese eines HLA-Klasse-II-Tetramers.*

*e) Nachweis der Spezifität des HLA DRB1*0101 restringierten HBV spezifischen HLA Klasse-II-Tetramers mittels eines spezifischen CD4⁺ T Zellklones.*

f) Es gelang erstmals mit HLA-Klasse-II-Tetrameren HBV spezifische CD4⁺ T Zellen bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis B Infektion nachzuweisen und deren funktionelle und phänotypischen Eigenschaften zu charakterisieren.

(siehe auch II. 1.)

Verwertungsplan:

Im Antragszeitraum konnten neue Techniken (HLA-Klasse-II-Tetramere) erfolgreich zur Charakterisierung von CD4⁺ T Zellen eingesetzt werden. Insbesondere gelang es die mit einer spontanen Viruselimination verbundene Immunantwort besser zu charakterisieren. Diese gewonnenen Erkenntnisse sollen die Grundlage zur Entwicklung einer therapeutischen T Zell-Vakzine bilden, durch welche eine derartige Immunantwort beim chronischen Patienten stimuliert werden soll. 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. Bisher konnten ca. 100 Patienten rekrutiert werden. 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.

Arbeiten die zu keiner Lösung geführt haben:
Nicht zutreffend

Präsentationsmöglichkeiten:
Entfällt

Ausgaben und Zeitplanung:

Zusammenfassend wurden die Ziele des Antrages im Wesentlichen erfüllt (siehe wissenschaftlich technische Ergebnisse und Publikationen). In einem Punkt wurden unsere Erwartungen sogar übertroffen, da die Analyse der plasmazytoiden dendritischen Zellen erst im Verlauf der Antragsperiode hinzugekommen war.

IV. Berichtsblatt

anbei