

Abschlussbericht Teilprojekt 15.1

Projekttitel: In vitro und in vivo Regulation von CD81 durch Interferon alpha bei Patienten mit chronischer Hepatitis C: Rolle der angeborenen und erworbenen Immunantwort und Korrelation mit dem virologischen Ansprechen auf eine antivirale Therapie und Mutationen innerhalb der HCV-E2 CD81 Bindungsregionen

Projektleiter: PD Dr. med. C. Sarrazin
Medizinische Universitätskliniken des Saarlandes
Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
Kirrberger Straße
66421 Homburg/S.

Telefon: +49(0) 6841-1623233

Fax: +49(0) 6841-1623264

E-Mail: incsar@uniklinik-saarland.de

Berichtszeitraum: 01.02.2002 – 31.12.2004

Antragsteller:

PD Dr. C. Sarrazin (Homburg), PD Dr. H. Wedemeyer (Hannover)

Mitarbeiter: Dr. Bernd Kronenberg (Homburg), Ayse Ciner, Dr. A. Potthoff (Hannover)

I. Kurze Darstellung

1, Aufgabenstellung

Untersuchung der Interferon-alpha abhängigen CD81 Expression auf virusspezifischen CD4(+), CD8(+) T-Lymphozyten, CD19(+) B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen und Zusammenhang mit dem virologischen Ansprechen.

2, Voraussetzungen

Das Projekt verlief als Kooperation zwischen der Abteilung für Innere Medizin II der Universitätsklinik des Saarlandes und der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

3, Planung und Ablauf des Vorhabens

durchflusszytometrische Messung der CD81 Expression auf CD4(+), CD8(+) T-Lymphozyten, CD19(+) B-Lymphozyten, natürlichen Killer-Zellen und dendritischen Zellen von Patienten mit chronischer Hepatitis C und gesunden Kontrollpersonen.

funktionelle Charakterisierung der Proliferationsantwort der isolierten peripheren Blutlymphozyten der Patienten mit chronischer Hepatitis C gegenüber immunogenen HCV Epitopen aus dem Hüllprotein E1, NS3, NS4 und Core Protein.

Sequenzierung der putativen CD81 Bindungsregionen im Hüllprotein E2 der Patienten mit chronischer Hepatitis C.

Berechnung der Viruskinetikparameter (Effizienz der Blockade der Virusproduktion, der Virusdegradationsrate, der Abbaurate infizierter Zellen vor und unter antiviraler Therapie) und Korrelation mit der CD81 Expression auf den Lymphozytensubtypen.

4, wissenschaftlicher und technischer Stand

Bekannte Konstruktionen, Verfahren, und Schutzrechte, die für die Durchführung des Projektes benutzt wurden

Die zellkultur-, immunologischen und molekularbiologischen Techniken sind in den wissenschaftlichen Laboren der Inneren Medizin II der Universitätsklinik des Saarlandes und der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der medizinischen Hochschule Hannover etabliert. Die notwendigen Substanzen (Antikörper, Peptide, Tetramere, molekularbiologische Reagenzien) wurden kommerziell erworben. Schutzrechte bestehen nicht.

Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Literatursuche wurde mittels Medline durchgeführt. Bei der verwendeten Fachliteratur handelte es sich um Zeitschriften der Universitätsbibliotheken der Universität des Saarlandes und der Medizinischen Hochschule Hannover.

5, Zusammenarbeit mit anderen Stellen

entfällt.

II. Eingehende Darstellung

1, des erzielten Ergebnisses

CD81 ist ein auf Lymphozyten exprimierter Korezeptor des Hepatitis C Virus, der durch das antivirale Zytokin Interferon alpha reguliert wird. Neben der Rolle als Korezeptor spielt CD81 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Lymphozyten. Um die Bedeutung der CD81 Regulation unter antiviraler Kombinationstherapie zu untersuchen, führten wir eine Charakterisierung der CD81 Expression vor, unter und nach antiviraler Therapie auf CD4(+), CD8(+) T Lymphozyten, CD19(+) B Lymphozyten und CD56(+) natürlichen Killerzellen (NK) Zellen im Zusammenhang mit den virologischen Therapieansprechen durch.

Die Untersuchung wurde an 20 Patienten mit chronischer Hepatitis C (10 Männer, durchschnittliches Alter 44 ± 13 Jahre) mit einer durchschnittlichen HCV RNA Konzentration (\pm SD) von $2,8 \pm 3,0 \times 10^6$ IU/ml und einer durchschnittlichen GPT

Konzentration von 47 ± 30 U/L durchgeführt. Elf Patienten erzielten ein dauerhaftes virologisches Ansprechen, 5 Patienten zeigten ein Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende und 5 Patienten sprachen virologisch nicht auf die Therapie an. Die CD81 Expression vor Therapiebeginn war auf den untersuchten Lymphozyten Subtypen (CD4, CD8, CD19, CD56) im Vergleich gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht ($p < 0,01$).

CD81 Expression auf CD4(+) T Lymphozyten

Auf CD4(+) T Lymphozyten betrug die durchschnittliche CD81 Expression $418,7 \pm 125,5$ RFU zu Therapiebeginn, $407,3 \pm 120,0$ RFU und jeweils $414,8 \pm 11,5$ RFU, $385,2 \pm 138,6$ RFU, $357,2 \pm 77,0$ RFU 4, 12, 24 und 48 Wochen nach Beginn einer antiviralen Kombinationstherapie. Dabei war die Reduktion der CD81 Expression im Vergleich zum Therapiebeginn nur nach 48 Wochen antiviraler Kombinationstherapie signifikant ($p = 0,008$) nicht aber nach 4, 12, and 24 Wochen antiviraler Therapie ($p = 0,272$, $p = 0,586$, und $p = 0,136$).

Die Reduktion der CD81 Expression auf CD4(+) T Lymphozyten zeigte nach 48 Wochen antiviraler Therapie einen signifikanten Zusammenhang mit dem langanhaltenden Therapieansprechen ($p = 0,753$, $p = 0,314$, $p = 0,068$ und $p = 0,012$ nach 4, 12, 24 und 48 Wochen). Patienten mit fehlendem Therapieansprechen und Patienten mit einem Wiederauftreten der Hepatitis C RNA nach Therapieende zeigten dagegen keine signifikanten Änderungen der CD81 Expression unter antiviraler Therapie ($p = 0,263$, $p = 0,953$, $p = 0,401$ nach 4, 12, und 24 Wochen antiviraler Therapie).

Am Ende der Nachbeobachtung 24 Wochen nach Therapieende hatten Patienten mit einem langanhaltenden Therapieansprechen eine niedrigere, wenn auch nicht signifikante Reduktion der CD81 Expression im Vergleich zu Therapiebeginn ($363,3 \pm 97,4$ RFU vs. $435,8 \pm 80,4$ RFU, $p = 0,176$). Bei Patienten mit fehlendem Therapieansprechen oder Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende fand sich dagegen kein Unterschied der CD81 Expression 24 Wochen nach Therapieende im Vergleich zum Therapiebeginn ($435,8 \pm 80,4$ RFU vs. $443,1 \pm 159,3$ RFU, $p = 0,345$).

CD81 Expression auf CD8(+) T Lymphozyten

Die CD81 Expression auf CD8(+) T Lymphozyten betrug $482 \pm 194,8$ RFU zu Therapiebeginn, $420,4 \pm 101,9$ RFU, $408 \pm 138,2$ RFU, $356,8 \pm 106,1$ RFU und

292,6±62,5 RFU 4, 12, 24 und 48 nach Beginn einer antiviralen Kombinationstherapie. Die mittlere CD81 Expression war nach 4, 24, and 48 Therapiewochen im Vergleich zum Therapiebeginn reduziert ($p=0,022$, $p=0,071$, $p=0,019$ und $p=0,013$). Dabei zeigte die Reduktion der CD81 Expression auf CD8(+) T Lymphozyten nach 12 und 48 Therapiewochen im Vergleich zu Therapiebeginn einen Zusammenhang mit dem langanhaltenden Therapieansprechen ($p=0,075$, $p=0,038$, $p=0,068$, $p=0,012$ nach 4, 12, 24, und 48 Therapiewochen). Kein Zusammenhang zeigte sich dagegen bei Patienten mit fehlendem Therapieansprechen oder Patienten mit einem Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende ($p=0,161$, $p=0,594$, $p=0,069$ nach 4, 12, und 24 Wochen antiviraler Kombinationstherapie).

Die mittlere CD81 Expression 24 Wochen nach Therapieende war auf CD8(+) T Lymphozyten von Patienten mit einem langanhaltenden Therapieansprechen vermindert im Vergleich zu Therapiebeginn (402,1±90,1 RFU vs. 440,5±144,6 RFU). Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,179$). Kein Unterschied in der mittleren CD81 Expression auf CD8(+) T Lymphozyten 24 Wochen nach Therapieende im Vergleich zu Therapiebeginn fand sich dagegen bei Patienten mit fehlendem Therapieansprechen oder einem Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende (569,5±155,2 RFU vs. 533,3±242,1 RFU, $p=0,917$).

CD81 Expression auf CD19(+) B Lymphozyten

Auf CD19(+) B Lymphozyten betrug die mittlere CD81 Expression 528,0±225,8 RFU zu Therapiebeginn und 540,5±138,9 RFU, 617,1±217,0 RFU, 488,5±88,6 RFU und 535±148,6 RFU 4, 12, 24 und 48 Wochen nach Therapiebeginn. Dabei war die CD81 Expression im Vergleich zu Therapiebeginn nach 12 Wochen antiviraler Kombinationstherapie signifikant erhöht ($p=0,005$) während keine Unterschiede zu den Therapiewochen 4, 24 und 48 im Vergleich zu Therapiebeginn gefunden wurden ($p=0,300$, $p=0,386$ und $p=0,386$).

Der signifikante Anstieg der CD81 Expression nach 12 Therapiewochen im Vergleich zu Therapiebeginn war nur bei Patienten ohne Therapieansprechen und Patienten mit Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende nachweisbar ($p=0,484$, $p=0,008$, $p=0,398$ nach 4, 12, 24 Therapiewochen) während keine signifikanten Unterschiede der CD81 Expression auf CD19(+) B Lymphozyten von Patienten mit dauerhaften Therapieansprechen gefunden wurden ($p=0,600$, $p=0,441$, $p=1$, $p=0,889$).

nach 4, 12, 24 und 48 Therapiewochen).

Am Ende der Nachbeobachtung 24 Wochen nach Therapieende konnten keine Unterschiede der CD81 Expression auf CD19(+) B Lymphozyten nachgewiesen werden ($p=0,363$) weder bei CD19(+) B Lymphozyten von Patienten mit dauerhaftem virologischen Ansprechen ($p=0,352$) noch von Patienten mit fehlendem Therapieansprechen oder Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende ($p=0,753$).

CD81 Expression auf CD56(+) natürlichen Killerzellen

Die mittlere CD81 Expression auf CD56(+) natürlichen Killerzellen (NK) war $427,9 \pm 114,4$ RFU bei Therapiebeginn und jeweils $303,0 \pm 86,4$ RFU, $258,2 \pm 71,3$ RFU, $234,7 \pm 40,9$ RFU und $278,7 \pm 129,8$ RFU nach 4, 12, 24 und 48 Therapiewochen. Die CD81 Expression war unter antiviraler Therapie im Vergleich zu Therapiebeginn zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant erniedrigt ($p=0,001$, $p<0,001$, $p=0,002$, $p=0,015$ nach 4, 12, 24 und 48 Therapiewochen).

Die Reduktion der CD81 Expression unter antiviraler Kombinationstherapie im Vergleich zu Therapiebeginn trat sowohl bei Patienten mit einem lang anhaltenden Therapieansprechen ($p=0,028$, $p=0,008$, $p=0,068$, $p=0,028$ nach 4, 12, 24 und 48 Therapiewochen) als auch bei Patienten mit fehlendem Therapieansprechen und einem Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende auf ($p=0,012$, $p=0,011$, $p=0,012$ nach 4, 12, und 24 Therapiewochen).

Am Ende der Nachbeobachtung 24 Wochen nach Therapieende war die CD81 Expression auf CD56(+) NK Zellen signifikant im Vergleich zu Therapiebeginn reduziert ($339,4 \pm 99,0$ RFU vs. $427,9 \pm 114,4$ RFU; $p=0,001$) sowohl bei auf CD56(+) NK Zellen von Patienten mit einem langanhaltenden Therapieansprechen ($p=0,018$) als auch bei Patienten mit fehlendem Therapieansprechen oder einem Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende ($p=0,028$).

Kinetik

Bei 17 der 20 Patienten wurde eine Analyse der Viruskinetik unter antiviraler Therapie durchgeführt und die Kinetikparameter Effizienz der Virusblockade (\square), Abbau infizierter Zellen vor (\square) und unter antiviraler Therapie (\square) mit der CD81 Expression korreliert.

Die Effizienz der Virusblockade \square spielt vor allem in der frühen Phase der antiviralen

Therapie eine Rolle und spiegelt die Aktivität des Interferonsystems wider. Es zeigte sich eine negative Korrelation von \square mit der CD81 Expression auf CD4(+) und CD8(+) T-Lymphozyten zu Woche 4 ($r=-0.582$, 2seitiges $p=0.06$ und $r=-0.745$, 2seitiges $p=0.008$). Dies zeigt, dass auf CD4(+) und CD8(+) T-Lymphozyten die Herunterregulation der CD81 Expression in Zusammenhang mit der Aktivierung des Interferonsystems steht und in Abhängigkeit viraler Resistenzmechanismen erfolgt.

CD19(+) B-Lymphozyten zeigten eine signifikante Korrelation der CD81 Expression mit der Abbaurrate infizierter Zellen unter antiviraler Therapie $m\square$ zu Therapiebeginn ($r=0.515$, 2seitiges $p=0.035$), nach 4 Wochen ($r=0.709$, 2seitiges $p=0.03$) und nach 12 Therapiewochen ($r=0.606$, 2seitiges $p=0.026$). Da B-Zellen als potentielles Target für das Hepatitis C Virus gelten, könnte die Korrelation der CD81 Expression mit der Abbaurrate infizierter Zellen unter Therapie auf eine Elimination HCV-infizierter B-Zellen hinweisen.

Bei CD56(+) NK-Zellen zeigte sich keine Korrelation mit Parametern der Viruskinetik. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der CD81 Expression unabhängig von viralen Resistenzmechanismen erfolgt.

Zusammenfassend deuten die unterschiedlichen Korrelationen der CD81 Expression mit Viruskinetikparametern auf unterschiedliche Regulationsmechanismen der CD81 Expression auf T-, B- und NK-Zellen hin.

Tetramere

Die CD81 Expression wurde auf HCV-spezifischen CD8(+) T-Lymphozyten von 9 HLA-A2 positiven Patienten untersucht. Die HCV-spezifischen CD8(+) T-Lymphozyten wurden mittels HLA-A2 Tetrameren gegenüber Epitopen des Hepatitis C Virus markiert und durchflußzytometrisch bestimmt. Die durchschnittliche CD81 Expression auf HCV-spezifischen CD8(+) T-Lymphozyten betrug $281,7\pm 406,9$ RFU zu Therapiebeginn, $171,6\pm 76,3$ RFU, $164,3\pm 139,6$ RFU und $168,4\pm 106,4$ RFU 4, 12 und 24 Therapiewochen und $146,0\pm 144,1$ RFU am Ende der Nachbeobachtungszeit 24 Wochen nach Therapieende. Die Reduktion der CD81 Expression auf HCV-spezifischen CD8(+) T-Lymphozyten erreichte vermutlich aufgrund der kleinen Patientenzahl keine statistische Signifikanz ($p=0,86$, $p=0,74$, $p=0,61$, $p=0,75$ nach 4, 12, 24 Therapiewochen und 24 Wochen nach Therapieende).

Proliferationsassays

Von den 9 HLA A2 positiven Patienten wurden zusätzlich Proliferationsassays nach Stimulation mit E1, NS3, NS4 und Core Peptiden. Die Untersuchungen sind abgeschlossen, die Auswertung steht noch aus.

CD81 Sequenzen

Bei 35 Patienten wurden die putativen CD81 Bindungsregionen auf dem Hepatitis C Virus E2 Protein zwischen aa 468 und 562 sequenziert. Dabei wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem eine RNA Isolation von isolierten Lymphozyten möglich war. Die Sequenzierung der CD81 Bindungsstellen auf dem HCV E2 Protein erfolgte von zellulär gebundener RNA und aus dem Serum. Die Sequenzierung ist abgeschlossen. Eine abschließende Analyse der Sequenzunterschiede zwischen zellulär gebundener RNA und RNA aus Serum steht noch aus.

Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich die Regulation der CD81 Expression unter antiviraler Therapie auf den untersuchten Lymphozytensubpopulationen unterscheidet. Auf CD4(+) und CD8(+) T Lymphozyten ist die CD81 Expression abhängig vom virologischen Ansprechen. Patienten mit einem langanhaltenden virologischen Ansprechen zeigen eine signifikante Reduktion der CD81 Expression. Dabei findet die Reduktion der CD81 Expression auf CD8(+) T Lymphozyten früher als bei CD4(+) T Lymphozyten statt. Ein anderes Muster findet sich bei CD19(+) B Lymphozyten. Bei CD19(+) B Lymphozyten lässt sich ein transienter Anstieg der CD81 Expression nach 12 Therapiewochen im Vergleich zu Therapiebeginn bei Patienten mit fehlendem Therapieansprechen und Patienten mit einem Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende nachweisen. CD56(+) NK Zellen zeigen einen sehr starken und frühen Abfall der CD81 Expression im Vergleich zu Therapiebeginn. Die Reduktion der CD81 Expression bei NK Zellen ist im Gegensatz zu T- und B-Lymphozyten unabhängig vom Therapieansprechen.

2, des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes

Die Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der CD81 Expression auf

Lymphozytensubtypen bei den verschiedenen Phasen der antiviralen Therapie hin. Der CD81 Oberflächenrezeptor ist somit interessant als potentielles therapeutisches Target. In weiterführenden Untersuchungen sollen Anti-CD81 Antikörper, verschiedene HCV-E2 Proteine, Zytokine und kleine molekulare Substanzen, die durch Strukturmodellierung identifiziert werden sollen, auf die Aktivierung von Lymphozyten und der potentielle Einsatz in der Hepatitis C Virus Therapie geprüft werden.

3, des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Es wurden Hepatitis C Virus Pseudotypen entwickelt, deren Hülle dem Hepatitis C Virus entspricht und die eine genaue Untersuchung der Infektion durch Hepatitis C Viren ermöglichen. Die Untersuchungen mit Hepatitis C Virus Pseudotypen konnte CD81 als essentiellen jedoch nicht alleinigen Rezeptor identifizieren. Mit HCV-Pseudotypen kann der Tropismus und die Auswirkung von verschiedenartigen Milieu Bedingungen (z.B. pH-Wert) sowie der Mutationen in den Hüllproteinen auf Infektion und Aktivierung von Zellen untersucht werden.

Weiterhin wurde gezeigt, dass intrazelluläres CD81 in Exosomen auch an dem Zusammenbau und Exozytose von Hepatitis C Viren beteiligt ist.

4, der erfolgten und geplanten Veröffentlichung des Ergebnisses

Manuskript in Vorbereitung

IV. Kurzfassung

Das kooperative Projekt hat gezeigt, dass sich die Regulation der CD81 Expression unter antiviraler Therapie auf den untersuchten Lymphozytensubpopulationen unterscheidet. Auf CD4(+) und CD8(+) T Lymphozyten ist die CD81 Expression abhängig vom virologischen Ansprechen. Patienten mit einem langanhaltenden virologischen Ansprechen zeigen eine signifikante Reduktion der CD81 Expression. Dabei findet die Reduktion der CD81 Expression auf CD8(+) T Lymphozyten früher als bei CD4(+) T Lymphozyten statt. Ein anderes Muster findet sich bei CD19(+) B Lymphozyten. Bei CD19(+) B Lymphozyten lässt sich ein transients Anstieg der

CD81 Expression nach 12 Therapiewochen im Vergleich zu Therapiebeginn bei Patienten mit fehlendem Therapieansprechen und Patienten mit einem Wiederauftreten der HCV RNA nach Therapieende nachweisen. CD56(+) NK Zellen zeigen einen sehr starken und frühen Abfall der CD81 Expression im Vergleich zu Therapiebeginn. Die Reduktion der CD81 Expression bei NK Zellen ist im Gegensatz zu T- und B-Lymphozyten unabhängig vom Therapieansprechen.