

**Inhaltsverzeichnis**

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>1</u>
1. <u>Einleitung</u>	<u>6</u>
2. <u>Literaturübersicht</u>	<u>10</u>
2.1. <u>Das Hepatitis C Virus</u>	<u>10</u>
2.1.1. <u>Epidemiologie</u>	<u>12</u>
2.1.2. <u>Übertragungswege</u>	<u>14</u>
2.2. <u>Struktureller Aufbau von HCV</u>	<u>17</u>
2.2.1. <u>Veterinärmedizinisch relevante Vertreter in der Familie der Flaviviridae</u>	<u>23</u>
2.2.2. <u>Humanmedizinisch relevante Vertreter in der Familie der Flaviviridae</u>	<u>26</u>
2.2.3. <u>Die HCV-Genotypen</u>	<u>28</u>
2.2.4. <u>HCV-Quasispezies</u>	<u>29</u>
2.3. <u>Der Replikationszyklus von HCV</u>	<u>32</u>
2.4. <u>Der Infektionsverlauf</u>	<u>34</u>
2.4.1. <u>HCV assoziierte Krankheiten</u>	<u>36</u>
2.5. <u>Immunantwort auf eine HCV-Infektion</u>	<u>37</u>
2.5.1. <u>Neutralisierende Antikörperantwort auf eine HCV-Infektion</u>	<u>41</u>
2.6. <u>Die Therapie einer HCV-Infektion</u>	<u>44</u>
2.7. <u>Die Erforschung von Hepatitis C</u>	<u>48</u>
2.7.1. <u>Was sind Pseudotypen oder Pseudopartikel?</u>	<u>53</u>
2.8. <u>Der Nachweis/Labordiagnostik der Virushepatitis C</u>	<u>56</u>

## Inhaltsverzeichnis

---

2.9.	<u>Zielsetzung der Arbeit</u>	59
3.	<u>Material und Methoden</u>	62
3.1.	<u>Material</u>	62
3.1.1.	<u>Chemikalien und Verbrauchsmaterial</u>	62
3.1.2.	<u>Verwendete Kits</u>	63
3.1.3.	<u>Verwendete Lösungen und Nährmedien zur Anzucht von Bakterien und in der Molekularbiologie</u>	63
3.1.4.	<u>Bakterien</u>	65
3.1.5.	<u>Plasmide und deren Herstellung</u>	66
3.1.6.	<u>Filtersysteme</u>	69
3.1.7.	<u>Zelllinien</u>	70
3.1.8.	<u>In der Zellkultur verwendete Nährmedien, Lösungen, Zusätze und Puffer</u>	71
3.1.9.	<u>Geräte</u>	73
3.1.10.	<u>Patientenserien</u>	74
3.1.10.1.	<u>Anti-HCV negative Kontrollseren</u>	76
3.1.10.2.	<u>Patientenmaterial zur Untersuchung der Kreuzneutralisation der HCVpp</u>	77
3.1.10.3.	<u>Untersuchung zur Kreuzneutralisation der HCVpp durch Seren von Patienten mit einer positiven Denguevirusserologie, mit zusätzlich bekanntem FSME Serostatus</u>	78
3.1.10.4.	<u>Untersuchung der HCVpp-Neutralisation mit Patientenmaterial von LTNP (<i>Long Time Non Progressors</i>) HIV-Infizierten</u>	78
3.1.10.5.	<u>Patientenmaterial mit schwach positiven Werten im anti-HCV Screening ELISA</u>	79
3.1.10.6.	<u>Seren der Patientengruppen mit unterschiedlichem Therapieausgang: „Responder, Non Responder und Relapse“</u>	80
3.2.	<u>Methoden</u>	82
3.2.1.	<u>Die Herstellung der Plasmide</u>	82

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2.	Zellkulturmethoden	86
3.2.3.	Transiente Ko-Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren	89
3.2.4.	Transiente Ko-Transfektion zur Herstellung HCV-Env und VSV-G pseudotypisierter lentiviraler Vektoren	93
3.2.5.	Transduktion von Zelllinien mit lentiviralen und retroviralen Überständen	95
3.2.6.	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	100
3.2.7.	Neutralisationsversuche der HCV-pseudotypisierten Viren mit Patientenserien	102
3.2.8.	Bestimmung der infektiösen Einheiten (IE)	105
3.2.9.	Bestimmung der Infektiositäts-/Neutralisationswerte	105
4.	<u>Ergebnisteil</u>	108
4.1.	Grundlagen zur Etablierung und Optimierung des Neutralisationstests	109
4.1.1.	Vergleich der onkoretroviralen mit den lentiviralen Vektoren bei der Produktion von infektiösen HCVpp	110
4.1.2.	Die Wirkung von Polybrene auf die Transduktionseffizienz der Pseudotypen	111
4.1.3.	Untersuchung zur Erhöhung der Transduktionseffizienz durch Konzentrierung des HCVpp-haltigen Zellkulturüberstandes	115
4.1.4.	Der Einfluss des Zellkulturmediums x-Vivo, mit und ohne Zusatz von fötalem Kälberserum, auf die Ergebnisse der Transfektion mit HCVpp, angegeben in infektiösen Partikelzahlen	117

## Inhaltsverzeichnis

---

4.1.5.	Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	119
4.2.	Zelltropismusstudie mit HCVpp und verschiedenen B-Suspensionszelllinien	120
4.3.	HCVpp-Neutralisationsstudien mit Patientenserien	124
4.3.1.	Testung der HCVpp mit anti-HCV negativen Kontrollserien	125
4.3.2.	Neutralisationsstudien mit HCVpp und Seren von Patienten die mit verschiedenen HCV-Genotypen infiziert sind	128
4.3.3.	Neutralisationsversuche der HCVpp mit Patientenserien, die serologisch als „anti-HCV-schwach positiv“ eingestuft wurden	135
4.3.4.	Neutralisationsversuche mit HCVpp und den Seren von Patienten, infiziert mit einem anderen Flavivirus (Dengue Virus)	140
4.3.5.	Neutralisationstest mit HCVpp und Seren von HIV/HCV koinfizierten Patienten	143
4.4.	HCVpp Neutralisationstest-Patientenstudien	146
4.4.1.	Neutralisationstestung von Patientenserien im Therapieverlauf mit unterschiedlichem Ausgang der Therapie („ <i>Responder</i> , <i>Non Responder</i> und <i>Relapse</i> “)	146
5.	Diskussion	158
5.1.	Die HCV-Infektion	158
5.1.2.	Methoden zur Erforschung von HCV	159

---

## Inhaltsverzeichnis

---

5.1.3.	Pseudopartikel	161
5.2.	Etablierung und Herstellung der HCVpp	163
5.3.	Zelltropismusstudien	166
5.4.	Messung neutralisierender Antikörper gegen HCVpp mittels FACS Analyse	168
5.5.	Klinische Neutralisationsstudie mit einem definierten Patientenkollektiv	178
5.5.1.	Versuche mit den Patientengruppen „ <i>Responder, Non Responder und Relapse</i> “	179
5.6.	Ausblick	182
6.	<u>Zusammenfassung</u>	186
7.	<u>Summary</u>	191
8.	<u>Literatur</u>	196
9.	<u>Abkürzungen</u>	211
10.	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	219
11.	<u>Tabellenverzeichnis</u>	222
12.	<u>Publikationsliste</u>	224
13.	<u>Danksagung</u>	225
14.	<u>Selbstständigkeitserklärung</u>	227