

**Inhaltsverzeichnis**

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

# Inhaltsverzeichnis

---

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

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 Patientenseren	102
3.2.8.	Bestimmung der infektiösen Einheiten (IE)	105
3.2.9.	Bestimmung der Infektiositäts- /Neutralisationswerte	105
4.	<u>Ergebnisteil</u>	<u>108</u>
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

4.1.5.	Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse_____	119
4.2.	Zelltropismusstudie mit HCVpp und verschiedenen B-Suspensionszelllinien_____	120
4.3.	HCVpp-Neutralisationsstudien mit Patientenseren_____	124
4.3.1.	Testung der HCVpp mit anti-HCV negativen Kontrollseren_____	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 Patientenseren, 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 Patientenseren im Therapieverlauf mit unterschiedlichem Ausgang der Therapie („ <i>Responder</i> , <i>Non Responder</i> und <i>Relapse</i> “)_____	146
5.	<u>Diskussion</u> _____	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 „Responder, Non Responder und Relapse“_____	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