

Anne-Kristin Freyse

Dr. med.

Heterolog rekombinantes Hepatitis-C-Vacciniamodell zur Evaluierung von HCV-Impfstoffen

Geboren am 27.03.1979 in Karlsburg

Staatsexamen am 18.05.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Jens Encke

Bei 170 Millionen HCV-Infizierten weltweit ist es bis heute noch nicht gelungen einen schützenden Impfstoff zu generieren. Seit der Entdeckung des Hepatitis C Virus im Jahre 1989 werden die Gründe für die häufige Krankheitschronifizierung in der Infektionskinetik, in der Immunsuppression oder im Virusaufbau gesucht. Die wahrscheinlichste Begründung der Viruspersistenz wird jedoch in der hohen Mutationsrate des Virusgenoms gesehen. Das Virus ist befähigt, in diversen Genotypen, Subgenotypen und Quasispezies aufzutreten. Die häufigen Veränderungen im Virusgenom ermöglichen eine Immunflucht. Vieles weist darauf hin, dass eine erfolgreiche Viruseliminierung auf einer raschen spezifischen zellulären Immunantwort kurz nach Infektion beruht. Dabei scheinen die CTL eine entscheidende Rolle zu spielen.

Bisherige Immunisierungsstudien beschränkten sich in ihrem Umfang nur auf die Genotypen 1 und 2 und deren Subtypen a und b. Um hingegen definitive Aussagen zur Erfassbarkeit der heterogenen Infektion in der Immunantwort nach erfolgter Immunisierung machen zu können, wird ein geeignetes Surrogatmodell notwendig, das die Heterogenität einer HCV-Infektion berücksichtigt. Ziel dieser Arbeit war es somit, ein solches Modell zu schaffen und es experimentell zu evaluieren, um den Nutzen für zukünftige Immunisierungsstudien herauszustellen. Nur so können potentielle Vakzine hinreichend beurteilt werden.

Dazu wurden Antigensequenzen in Form des NS3 aus Patienten gewonnen und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Diese Sequenzen wurden über einige Zwischenschritte in Vacciniaviren transfiziert. Aggressiv replizierende Vacciniaviren haben sich dabei für die

Integration und Expression fremder Gensequenzen und als Infektionsmodellsystem bewährt. Die ausgeprägte Proteinexpression konnte experimentell sicher nachgewiesen werden. Im Prozess der Entwicklung rekombinanter Vacciniaviren wurde eine einfache Methodik etabliert, um eine unkomplizierte Generierung und Titrierung der Viren für Immunisierungsexperimente zu ermöglichen.

Ein ethisch vertretbares und experimentell etabliertes Ausweichmodell stellt in der Impfstoffforschung die für das humane MHC-Klassel-Molekül HLA-A2.1 transgene Maus dar. Vaccinaviren replizieren nachweislich in den Ovarien der Tiere. An diesen Mäusen soll die Potenz möglicher Vakzine untersucht werden, eine effiziente Immunantwort gegen eine heterogene Vaccinavirusinfektion zu induzieren. Erste Studien zur Funktionsprüfung des Mausmodells konnten mit einer Proteinimmunisierung zeigen, dass sich das Immunsystem mit den rekombinanten Vacciniaviren auseinandersetzt und eine spezifische Immunität aufbauen kann. Die Replikationsrate der Vacciniaviren ist dabei ein Maß für die protektive, gegen NS3 gerichtete Immunität, die durch Immunisierung erlangt sein sollte. Nach Immunisierung mit einem kommerziell hergestellten Genotyp 1b NS3-Protein und Sequenzierung der Proteinsequenzen können erste Aussagen zu Kreuzantigenität gemacht werden. So war die Viruselimination abhängig vom Genotyp, nicht aber von der Sequenzvariabilität innerhalb eines Genotyps. Eine Kreuzantigenität unter den Genotypen scheint also nicht zu bestehen.

Die Proteinvakzinierung als solche hat sich in den *in vivo* Experimenten als nicht sonderlich immunogen gezeigt. Hier wird man in Zukunft in replikationsdefizienten rekombinanten Viren als Immunisierungsmodell sicherlich wirksamere Vakzine finden.

Viele Fragen sollten noch in Zukunft mit Hilfe dieses Modells untersucht werden. Besonders interessant wird es nun sein, sich dem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Multigenotyp-Vakzinierungsansatz zu widmen. Dahinter steckt die Hoffnung, dass eine möglichst breite Antigen-Immunisierung eine schnelle, effiziente und spezifische Immunantwort zu erwirken und einer Immunflucht des Virus zuvorkommen sollte. Dieser Ansatz wurde bis heute noch nicht untersucht. Für zukünftige Untersuchungen sollte ein weiterer Fokus auf die Art und Stärke immunologischer Reaktionen auf die Immunisierung und auf die Infektion im einzelnen gelegt werden.

Mit dem Vaccinia-Infektionsmodell steht für die Beantwortung dieser Fragen ein einfach zu handhabendes Werkzeug zur Evaluierung diverser Vakzinansätze zur

Verfügung. Unter dem Fokus des Schutzes vor multigener Infektion lassen sich Immunisierungen einfach und reliabel auswerten. Dabei werden keine aufwendigen immunologischen Auswertungen notwendig. Das Modell lässt es zu, in Zukunft einfach und valide entscheidende Aussagen zum einen über die Reaktionen des Immunsystems auf heterogene HCV-Infektionen und zum anderen über die Immunogenität eines Vakzins machen zu können. Dies wird uns sicher entscheidende Schritte im Verständnis der Bedeutung und Tragweite bestimmter Vakzinansätze, insbesondere im Hinblick auf deren Heterogenität, voran bringen.