

**Durchflusszytometrische Analyse  
der antigenspezifischen Zytokinantwort von Monozyten  
bei verschiedenen Verläufen der Hepatitis C Virusinfektion**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Uwe Petersen  
aus: Eschwege

2006

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Spengler
2. Gutachter: Prof. Dr. Ch. Kurts

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2006

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor Professor Dr. med. T.Sauerbruch

## Inhaltverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	7
<b>1 Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Hepatitis C</b>	<b>9</b>
1.1.1 Das Hepatitis C Virus	9
1.1.2 Struktur des Hepatitis C Virus	9
1.1.3 HCV-Genotypen	11
1.1.4 Epidemiologie und Übertragung des Hepatitis C Virus	12
1.1.5 Immunbiologie und Pathogenese der Hepatitis C	13
1.1.6 Diagnose der Hepatitis C	14
1.1.7 Klinischer Verlauf	15
<b>1.2 Aufgaben des Immunsystems</b>	<b>16</b>
1.2.1 Monozyten	17
1.2.2 B-Lymphozyten	18
1.2.3 T-Lymphozyten	19
1.2.4 T-Helferzell-Subpopulationen	20
<b>1.3. Zytokine</b>	<b>22</b>
1.3.1 Interleukin-1	23
1.3.2 Interleukin-6	24
1.3.3 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	24
1.3.4 Interleukin-10	25
1.3.5 Interleukin-12	26

<b>1.4 Aufgabenstellung der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>28</b>
<b>2.1.1 Chemikalien</b>	<b>28</b>
2.1.2 Lösungen	29
2.1.3 Proteine	29
2.1.4 Antikörper	30
2.1.4.2 Antikörper für den intrazellulären Nachweis von Zytokinen	30
2.1.5 Labormaterialien	31
2.1.6 Laborgeräte	32
<b>2.2 Methoden</b>	<b>33</b>
<b>2.2.1 Patienten</b>	<b>33</b>
<b>2.3. HCV-spezifische Immunanalyse</b>	<b>35</b>
2.3.1 Nachweis der anti-HCV-Antikörper	35
2.3.2 Nachweis der HCV-RNA	35
2.3.4 Bestimmung des HCV-Genotyps	35
<b>2.4 Allgemeine Grundlagen der Durchflusszytometrie</b>	<b>36</b>
2.4.1 Physikalische Grundlagen der Durchflusszytometrie	36
2.4.2 Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome)	37
2.4.3 Prinzip der Durchflusszytometrie	38
2.4.4 Darstellung der Messergebnisse	40
<b>2.5 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen</b>	<b>41</b>
2.6 Vitalitätsbestimmung	43

<b>2.7 Monozytenseparation</b>	<b>43</b>
2.7.1 Separation von Monozyten mit Percoll	43
2.7.2 Separation von Monozyten mit Fetalen Kälberserum (FKS) beschichteter Plastikoberflächen	44
2.7.3 Monozytenseparation mit MACS (magnetic cell sorting)	45
<b>2.8 Phänotypisierung der Zellen</b>	<b>47</b>
2.9 Stimulation und Kultur	47
<b>2.10 Darstellung intrazellulärer Zytokine</b>	<b>48</b>
2.11 Spezifitätprüfung der direkt farbmarkierten Antikörper	50
2.12 Isotypkontrolle	51
<b>2.13 FACS-Auswertung</b>	<b>51</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<hr/>	
3.1 Zelladhäsion	53
<b>3.2 Optimierung des intrazytoplasmatischen Zytokinnachweises</b>	<b>53</b>
3.2.1 Ermittlung der Inkubationszeit	54
3.2.2 Spezifitätprüfung der direktmarkierten Antikörper	55
3.2.3 Monensintoxizität	56
3.2.4 Einfluss von Monensin auf den Nachweis von IL-1 $\beta$	57
3.2.5 Induktion der IL-12 Synthese	58
3.2.6 Medium- und Pufferkontrollen	58
<b>3.3 Monozytenseparation</b>	<b>59</b>
3.3.1 Monozytenseparation mittels Dichtegradientenzentrifugation	59
3.3.2 Monozytenseparation mittels Adhäsion	60
3.3.3 Monozytenseparation mittels Immunomagnetischer Methoden	60

3.3.4 Vergleich der Zytokinexpression bei isolierten und nicht isolierten Monozyten	61
3.4 Spontane monozytäre Zytokinexpression bei unterschiedlichem Verlauf der Hepatitis C Virus Infektion	62
<b>3.5 Vergleich der HCV-Virusantigen induzierten monozytären Zytokinexpression bei unterschiedlichem Verlauf der Hepatitis C Virus Infektion</b>	<b>64</b>
3.5.1 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre Interleukin-1 $\beta$ Expression	64
3.5.2 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre Interleukin-6 Expression	65
3.5.3 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre Interleukin-10 Expression	66
3.5.4 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre Interleukin-12 Expression	67
3.5.5 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre TNF- $\alpha$ Expression	68
3.6 LPS induzierte monozytäre Zytokinexpression bei unterschiedlichem Verlauf der Hepatitis C Virus Infektion	71
<b><u>4 Diskussion</u></b>	<b><u>72</u></b>
<b><u>5 Zusammenfassung</u></b>	<b><u>79</u></b>
Anmerkung	81
<b><u>6 Literaturverzeichnis</u></b>	<b><u>82</u></b>
Danksagung	97
Lebenslauf	98

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zellen
As.	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. copy DNA
CTL	Zytotoxische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E	engl. Envelope, für Hülle
ELISA	engl. Enzyme Linked Immuno Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-aktivierter-Zell-Sortierer
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
FKS	Fetales Kälberserum
gp	Glycoprotein
HBV	Hepatitis B Virus
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Human Immuno Deficiency Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HVR	Hypervariable Region
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	Intravenös
kd	Kilo Dalton
m	männlich
m Ak	Monoklonaler Antikörper
Med	Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

min	Minute
n.g.	nicht getestet
NC	Nicht kodierende Region
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NS	Nicht Struktur
OD	Optische Dichte
p	Statistische Wahrscheinlichkeit
PE	Phycoerythrin
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PMA	Phorbol Myrestat Acetat
PMNC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PTH	Posttransfusionshepatitis
RFLP	Restiktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit nachfolgender Polymerase Ketten Reaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Fehler des Mittelwertes
SI	Stimulationsindex
SSC	engl. Sightward-Scatter, für Seitwärtslichtstreuung
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helferzellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
w	weiblich

## **1 Einleitung**

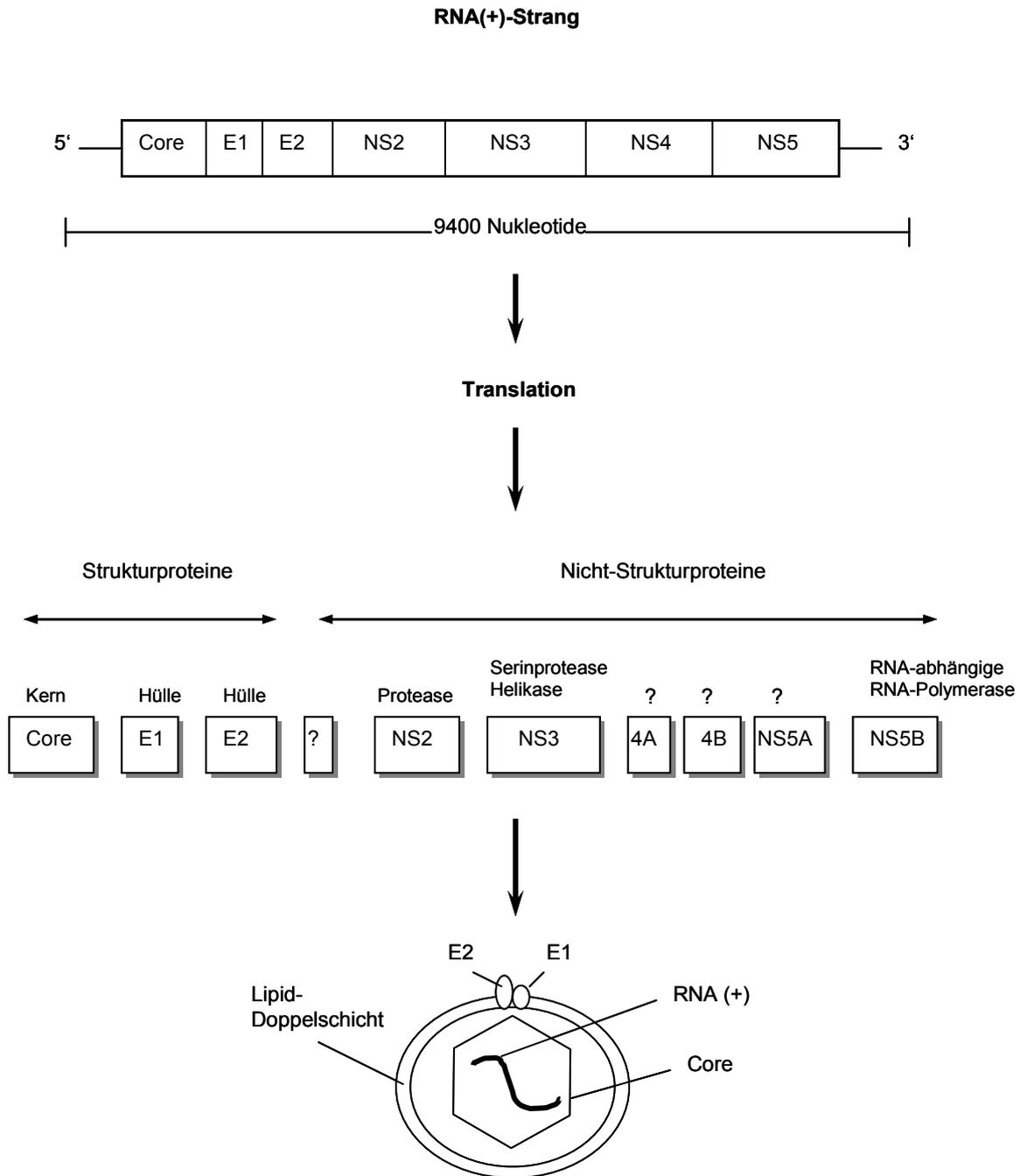
### **1.1 Hepatitis C**

#### **1.1.1 Das Hepatitis C Virus**

Mitte der siebziger Jahre wurde eine Form der Hepatitis beobachtet, die insbesondere nach Bluttransfusionen auftrat. Mit Hilfe der gängigen serologischen Tests konnte die Ursache weder den A- oder B- Hepatitiden, noch den anderen bekannten hepatotropen Viren zugeordnet werden (Feinstone et al., 1975; Knodell et al., 1975; Prince et al., 1974). Bereits vor der Identifizierung des infektiösen Agens der Non-A-, Non-B-Hepatitis hatte sich gezeigt, dass diese Form der Leberentzündung einen oft chronischen Verlauf nahm und häufig zu einer Leberzirrhose führte (Dienstag et al., 1986). Mitte der achtziger Jahre ließen Tierversuche mit Faktor VIII Präparaten vermuten, dass ein umhülltes RNA-Virus der Erreger der Non-A-, Non-B-Hepatitis sein könnte (Bradley et al., 1985). 1989 schließlich gelang Choo und Mitarbeitern erstmalig die Isolierung eines viralen Genoms mit molekularbiologischen Techniken, das sie dem Hepatitis C Virus zuordneten (Choo et al., 1989). Dies bereitete den Weg für die Entwicklung der ersten Generation eines Enzymimmunoassays zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus (Kuo et al., 1989).

#### **1.1.2 Struktur des Hepatitis C Virus**

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist ein 30-60 nm großes RNA Virus (He et al., 1987), das mit einem Mantel aus Hüllproteinen (Envelope) umgeben ist. Es wird als eigene Gattung innerhalb der Flaviviridae angesehen (Murphy et al., 1995; Choo et al., 1991). Das Nukleokapsid enthält das Genom, welches aus einem einfachen positiven RNA-Strang mit einer Länge von ca. 9500 Nukleotiden besteht. Das Genom besitzt einen offenen Leserahmen und kodiert für ein großes Vorläuferprotein von etwa 3010-3033 Aminosäuren. In Analogie zu der Familie der Flaviviridae wird dieses Polyprotein während und nach der Translation durch virale und zelleigene Proteasen in Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten (Choo et al., 1991) (Abb.1).



**Abb.1:** Vermuteter genomischer Aufbau und Prozessierung des Vorläuferproteins sowie hypothetische Struktur des Hepatitis C Virus (nach Poel et al., 1994).

Ausgehend vom 5' Ende des Genoms findet sich eine hoch konservierte Region (Bukh et al., 1995). Sie ist wahrscheinlich von Bedeutung für die Bindung der HCV-RNA an die zellulären Ribosomen und für die Einleitung der Translation (Tsukiyoma-Kohara et al., 1992).

Es folgen die Abschnitte des Genoms, die für die Strukturproteine, d.h. für die Virusbauteile kodieren. Hierzu gehören das Nukleokapsid (Core), welches das virale Genom umhüllt und die

Hüllproteine E1 und E2, welche die posttranslational glykosilierten Proteine in der Lipidhülle (Envelope) des Virus bilden (Dubuisson et al., 1994; Spaete et al., 1992). Die Region p7, die sich anschließt, kodiert für ein Peptid mit einer bisher unbekanntem Funktion (Lin et al., 1994). Nun folgen die Basen, die in die Nichtstrukturproteine (NS) 2-5b übersetzt werden und das 3' Ende, welches nicht übersetzt wird. Die Nichtstrukturproteine sind nicht am Aufbau des Virus beteiligt. Mehreren dieser Abschnitte konnten Funktionen bezüglich der viralen Proteinspaltung und RNA Replikation zugeordnet werden. Das NS2 Protein und das Amino-Ende von NS3 bilden zusammen eine Proteinase, die im Polyprotein zwischen NS2 und NS3 schneidet (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993). NS3 bildet zusammen mit NS4 als Kofaktor eine Serin-Proteinase, die zwischen den NS-Regionen spaltet (Tomei et al., 1993; Bartenschläger et al., 1993; Faila et al., 1995). Zusätzlich weist NS3 am Carboxyende eine Nukleosid-Triphosphatase und eine Helikase Aktivität auf (Suzich et al., 1993; Kim et al., 1995). NS5b ist eine RNA abhängige RNA-Polymerase (Lohmann et al., 1997). Diese Polymerase vollzieht die Transkription der RNA mit einer niedrigen Genauigkeit, was eine hohe Variabilität des HCV-Genoms zur Folge hat, so dass sich Quasispezies entwickeln können (Martell et al., 1992). Insbesondere im Bereich der hypervariablen Region E2 findet sich eine große Variabilität (Okamoto et al., 1992).

### **1.1.3 HCV-Genotypen**

Vergleiche der Nukleotidsequenz des HCV-Genoms führten zur Unterscheidung von mehreren HCV-Genotypen. International einigte man sich auf ein von Simmonds vorgeschlagenes Nomenklatorsystem, das die HCV-Genotypen mit arabischen Zahlen und die Subtypen mit Buchstaben kennzeichnet (Simmonds et al., 1994).

Der Vergleich von HCV-Isolaten führte zur Unterscheidung von bislang 6 HCV-Genotypen. Die Nukleotidsequenzunterschiede sind ungleichmäßig über das Genom verteilt, finden jedoch eine Konzentration auf bestimmte Bereiche.

Die höchste Variabilität zeigen die Hüllproteine mit Sequenzunterschieden von mehr als 30%. Das Core-Protein hingegen besitzt mit 10% Sequenzunterschieden eine sehr konservierte Nukleotidsequenz. Einige der Genotypen können in weitere Subtypen (a, b, c) untergliedert werden, die Nukleotidsequenzunterschiede von 10-20% bieten (Bukh et al., 1992; Chan et al., 1992; Simmonds et al., 1993a).

Die Genomvariabilität innerhalb eines Isolates wird als Quasispezies bezeichnet. Die Mutationsrate des Hepatitis C Virus liegt mit  $2 \times 10^{-3}$  Mutationen pro Jahr in der Größenordnung anderer RNA-Viren (Ogata et al., 1991).

Die Verteilung der Genotypen zeigt geographische Unterschiede. Weltweit sind die Genotypen 1, 2, 3 vertreten. Die Genotypen 4, 5, 6 finden sich hingegen hauptsächlich in Südafrika, Ägypten und Hongkong (Davidson et al., 1995; McOmish et al., 1994). In Deutschland liegt die Prävalenz des Genotyps 1 bei ca. 70% (Subtyp 1b 80%, Subtyp 1a 20%), des Genotyps 2 bei 4% und des Genotyps 3 bei 26% (ausschließlich Subtyp 3a) (Berg et al., 1997; Hencore 1998).

Das Ansprechen einer antiviralen Therapie wird durch den Genotyp des Virus beeinflusst. Hepatitis C Patienten mit Genotyp 1 erreichen unter einer Therapie seltener eine Remission als Patienten mit Genotyp 2 oder 3 (Hopf et al., 1996; Pozzato et al., 1991; Zein et al., 1996).

Unklar ist der Einfluss des Genotyps auf den Verlauf der Hepatitis C (Benvegnù et al., 1997; Kobayashi et al., 1996, Mondelli und Sileni 1999; Purchell 1997).

#### **1.1.4 Epidemiologie und Übertragung des Hepatitis C Virus**

Die Inzidenz für das Auftreten der Hepatitis C Virus Infektion wird in Europa auf 1% geschätzt. Es bestehen geographische Unterschiede der Verteilung mit 2% in den Mittelmeerländern und 0,5% in den nördlichen Ländern (Trepo und Padet, 1999).

Untersuchungen an Blutspendern in Deutschland ergaben eine Prävalenz der Hepatitis C Virus Infektion von 0,7% (Caspari et al., 1991; Kühnl et al., 1989).

Das Hepatitis C Virus wird klassischerweise parenteral übertragen. Drogenmißbrauch („needle sharing“) sowie die Verabreichung von Blutkonserven und Plasmaprodukten (Gerinnungsfaktoren, Immunglobuline) sind die häufigsten Übertragungswege (Zeuzem et al., 1996). Dementsprechend findet sich bei Drogenabhängigen eine deutlich höhere Prävalenz mit 50-90%. Weitere Risikogruppen sind Patienten mit Hämophilie (70-90%), Patienten mit einer Posttransfusionshepatitis (60-80%) und chronische Dialysepatienten (5-30%) (Choo et al., 1990). Anfang der neunziger Jahre kam es durch die Einführung von Screening-Tests zu einem fast vollständigen Rückgang der Transmission über Blutprodukte. Das Risiko einer HCV-Infektion über Bluttransfusionen wird derzeit auf 0,01–0,001% geschätzt. Eine sexuelle Transmission ist Gegenstand kontroverser Diskussionen und spielt eine eher geringe Rolle (Alter et al., 1997; Consensus Statement EASL, 1999). Von den parenteral erworbenen Hepatitis C Infektionen sind die auf unbekanntem Transmissionsweg erworbenen HCV-Infektionen abzugrenzen. Diese

so genannten „community aquired“ Hepatitiden sind in etwa 45% der Fälle anzunehmen (Bortolotti et al., 1991).

Die Inzidenz symptomatischer HCV-Infektionen liegt ca. bei 1-3 Fällen/100.000 Personen. Wahrscheinlich muss man von einer deutlich höheren Inzidenz der Neuinfektionen ausgehen, da die Mehrzahl der Fälle asymptomatisch verläuft (Consensus Statement EASL, 1999).

### **1.1.5 Immunbiologie und Pathogenese der Hepatitis C**

Die Mechanismen der Hepatitis C Virus Persistenz im Wirtsorganismus konnten bisher noch nicht ausreichend geklärt werden. Diskutiert werden angesichts der hohen Chronifizierungsrate des Virus sowohl virale, als auch wirtsspezifische Faktoren.

Einen Erklärungsansatz bietet die hohe Mutationsrate des Virus, die zu sogenannten „Quasispezies“ führt, die den Aufbau einer effektiven Immunantwort unterlaufen können (Ogata et al., 1991). Die Mutationen finden sich häufig in hypervariablen Abschnitten (HVR1) der E2-Region des viralen Genoms, die als Vorläufer der viralen Hüllproteine angesehen werden (Okamoto et al., 1992; Brechot und Kremsdorf 1993). Antikörper gegen die HVR1 weisen möglicherweise eine neutralisierende Wirkung auf und bewirken eine Immunselektion des Hepatitis C Virus, mit der Folge eines genetischen Drifts der HVR1 (Mondelli, 1996; Weiner et al., 1992). Die Mutationen in der E2-Region können zum Verlust wichtiger B-Zellepitope auf der Virusoberfläche führen (Weiner et al., 1992).

Die neutralisierende Wirkung der HVR1-Antikörper wird kontrovers diskutiert. HCV infizierte Schimpansen bilden zum Beispiel keinen immunologischen Schutz gegen Reinfektionen mit demselben oder einem genetisch identischen Isolat aus (Farci et al., 1992).

Eine wesentliche Rolle für die Viruselimination und Pathogenese der Leberzellschädigung spielen zelluläre Abwehrmechanismen. Untersuchungen der zellulären Immunantwort bei Hepatitis C Virusinfektionen zeigten, dass MHC-Klasse I assoziierte zytotoxische T-Zellen von Patienten mit chronischer Hepatitis C Epitope verschiedener Proteine erkennen können (Battegay et al., 1995; Koziel et al., 1992; Koziel et al. 1993). Diese T-Zellen führen zu einer Begrenzung der viralen Replikation, scheinen aber gleichzeitig auch an der zellvermittelten Leberzellschädigung beteiligt zu sein (Koziel, 1997; Reherman et al., 1996).

Studien an Patienten mit akuter Hepatitis C zeigten, dass die Entwicklung einer starken T-Helferzellantwort gegen virale Antigene ein entscheidender Faktor in Hinblick auf den Krankheitsverlauf und die Viruselimination ist (Diepolder et al., 1995; Missale et al., 1996). CD4-positive T-Helferzellen proliferieren antigenspezifisch häufiger bei Patienten, die eine Hepatitis C Infektion überwinden konnten (Botarelli et al., 1993; Ferrari et al., 1994).

Patienten mit chronischer Hepatitis C wiesen in Untersuchungen eine niedrige Produktion von antiviralen Typ 1 Zytokinen und einem möglichen Überwiegen der Zytokine der Typ 2 T-Helferzellantwort auf (Lechmann et al., 1999, Tsai et al., 1997). Möglicherweise trägt die Unausgewogenheit des antigenspezifischen Zytokinmusters zu einer Chronifizierung der Infektion bei.

Bisher ist nicht geklärt, ob die Verschiebung des Zytokinmusters durch eine direkte Alteration der T-Zell Funktion oder aber durch eine modifizierte monozytäre Zytokinantwort mit konsekutiv veränderter T-Zell Antwort hervorgerufen wird.

Monozyten/Makrophagen haben eine wesentliche Funktion in der Immunregulation der T-Zellantwort durch die Sekretion von Zytokinen und durch die Präsentation von Antigenen. Abhängig vom sezernierten Zytokinprofil wird eher eine Typ 1-Helferzellantwort mit einer starken T-Zellantwort oder eine Typ 2-Helferzellantwort mit einer dominierenden B-Zellantwort gefördert. Möglicherweise führen Alterationen auf der Ebene der Monozytenfunktion zu einer veränderten T-Zellantwort. Hinweise auf eine gestörte Funktion der Monozyten fanden Pasi und Mitarbeiter mit Hilfe von Proliferationsassays bei Patienten mit einer Hepatitis C Virusinfektion (Pasi et al., 1995).

### **1.1.6 Diagnose der Hepatitis C**

Die Diagnose einer Hepatitis C Virus Infektion kann durch Nachweis HCV-spezifischer Antikörper im Enzymimmunoassay (EIA) gestellt werden. Die Antikörper sind nach 4 bis 6 Wochen im Serum nachweisbar. Die Enzymimmunoassays verwenden eine Kombination von rekombinanten Virusproteinen, die aus dem Bereich des Core Proteins (C-22) und aus Teilen der Nichtstrukturproteine NS2 (C-33c) und NS3/4 (C-200) stammen. Der Enzymimmunoassay der 3. Generation wurde durch Proteine der NS5 Region erweitert. Rekombinante Immunoblot Assays (RIBA) mit membrangebunden HCV-Antigenen dienen der Bestätigung von Ergebnissen im Enzymimmunoassay. Eine Konstellation der Antikörper, die eine Aussage über den Verlauf der Infektion zuließe, konnte bislang nicht identifiziert werden (Chien et al., 1993).

Der direkte Nachweis von HCV-RNA und eine Quantifizierung der Viruslast erfolgt mittels reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Die RT-PCR ermöglicht bereits innerhalb der ersten Woche nach Infektion einen Nachweis (Shindo et al., 1992), wobei die HCV-RNA zum Teil schon Wochen vor dem Anstieg der Leberenzyme im Serum nachweisbar ist.

Häufig sind bei einer Hepatitis C nur mäßig erhöhte Leberenzyme zu finden. Fluktuierende Transaminasenerhöhungen um weniger als das Zweifache der Norm sind ein charakteristischer laborchemischer Befund (Alter et al., 1992; Alter 1997; Dienstag und Alter, 1986). Normale Serumspiegel der Aminotransferasen erlauben keinen Ausschluss einer chronischen Hepatitis C (Shakil, 1995). Allerdings kann die Höhe der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum eine Aussage über die Entzündungsaktivität in der Leber ermöglichen (Conry-Catilena et al., 1992). Mit Hilfe einer Leberbiopsie kann schließlich das Ausmaß der entzündlichen und fibrotischen Veränderungen der Leber geklärt werden.

### **1.1.7 Klinischer Verlauf**

Die Inkubationszeit der Hepatitis C Virusinfektion erstreckt sich über 5 bis 12 Wochen, wobei auch Inkubationszeiten von 2 bis zu 26 Wochen gefunden wurden (Dienstag, 1983). Die akute Phase der Erkrankung verläuft oft mild oder inapparent. Nur 20-30% der Patienten weisen Symptome auf. Ein Ikterus ist nur in etwa der Hälfte dieser Fälle zu sehen (Koretz et al., 1993). Extrem selten ist ein fulminanter Verlauf der Erkrankung zu beobachten (Wright et al., 1991; Yanagi et al., 1991).

In bis zu 85% der Fälle entwickelt sich eine chronische Erkrankung (Alter et al., 1997; Hoofnagle, 1997; Seef, 1997). Der chronische Verlauf kann von unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Leistungsminderung, Oberbauchschmerzen und von einer Hepatomegalie begleitet sein (Tong et al., 1995). Laborchemisch weisen zwei Drittel der Patienten erhöhte Aminotransferasenwerte im Serum auf, mit einer Fluktuation um weniger als das Zweifache der Norm (Dienstag und Alter, 1986; Alter 1997). 20%-30% der Patienten mit einem chronischen Krankheitsverlauf entwickeln im Mittel nach 20 Jahren eine Leberzirrhose und nach einem Zeitraum von ca. 30 Jahren muss in etwa bei 20% dieser Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom gerechnet werden (Kiyosawa et al., 1990; Shakil et al., 1995; Tong et al., 1995).

Ein selbstlimitierter Verlauf der Hepatitis C Virusinfektion findet sich bei ca. 15% der Patienten. Diese Patienten weisen im Serum anti-HCV-Antikörper auf, ohne dass der Nachweis von HCV-RNA möglich ist.

## **1.2 Aufgaben des Immunsystems**

Eine Immunantwort umfasst das Erkennen des pathogenen oder fremden „Materials“ und den Aufbau einer Reaktion mit dem Ziel einer Elimination des in den Organismus eingedrungenen Materials.

Unterschieden wird die unspezifische (angeborene) Abwehrreaktion von der spezifischen (erworbenen) Abwehrreaktion. Im Rahmen der unspezifischen Abwehrreaktion werden die Fremdorganismen in der Regel über die Phagozytose aufgenommen und unschädlich gemacht. Diese Funktion wird unter anderen von den Monozyten vermittelt. Durch die Möglichkeit zur Phagozytose und der anschließenden Präsentation von Teilen des Fremdmaterials auf der Membranoberfläche bilden die Monozyten ein Bindeglied zwischen der unspezifischen und spezifischen Abwehrreaktion.

Die spezifische oder erworbene Abwehrreaktion entsteht erst im Verlauf der Entwicklung. Sie untergliedert sich in die humorale und die zelluläre Immunantwort und wird im wesentlichen von B- und T-Lymphozyten getragen. Sie zeichnet sich durch eine Art „Gedächtnisfunktion“ aus, die zu einer ausgeprägteren Abwehrreaktion bei Zweitkontakt mit dem Fremdmaterial führt.

### 1.2.1 Monozyten

Monozyten sind mit einem Durchmesser von 12-20 µm die größten Blutzellen des menschlichen Organismus. Ihr Zellkern ist annähernd nierenförmig. Das Zytoplasma ist reich an Lysosomen, die dem intrazellulären Abbau aufgenommener Mikroorganismen dienen. Monozyten/Makrophagen bilden in der Haut, im Darm und in den Lungen eine erste „Verteidigungslinie“ gegen mikrobielle und parasitäre Infektionen. Diese mononukleären Phagozyten weisen vielfältige Funktionen auf, die von der Phagozytose und Digestion von Mikroorganismen und Geweberesten über die Präsentation von Antigenen bis zur Sekretion von Mediatoren (Zytokine) reichen (Williams, et al. 2001).

Monozyten werden im Knochenmark von Stammzellen gebildet und halten sich etwa 8 bis 72 Stunden im Blutstrom auf. Durch chemotaktische Stimuli angezogen, können Monozyten im Rahmen einer Entzündung aktiv die Gefäßwand mit Hilfe ihrer amöboiden Beweglichkeit durchwandern („Diapedese“) und siedeln sich am Ort der Entzündung an.

Monozyten bilden auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren aus, über die sie Mikroorganismen binden. Der CD14 Rezeptor erlaubt das Ankoppeln von Lipopolysacchariden, die in der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien verankert sind.

Es lassen sich 3 verschiedene Fc-Rezeptoren (CD64, CD32, CD16) nachweisen, die eine unterschiedlich hohe Affinität gegenüber den Immunglobulinen der Klasse IgG aufweisen. CD64 bindet monomeres IgG. Er ermöglicht die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Komplexen aus IgG und Antigen. CD32 ist weit verbreitet auf Monozyten, B-Zellen, T-Zellen, Neutrophilen und Thrombozyten. In-vitro Experimente zeigen eine gesteigerte Phagozytose von IgG besetzten Partikeln über CD32. CD16 vermittelt vornehmlich die Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC).

Eine weitere Gruppe von Rezeptoren bilden die Mannosyl-Fukosyl Rezeptoren. Diese erkennen und binden Mikroorganismen anhand von Glukoseketten auf der Monozytenoberfläche.

Monozyten bilden auch Rezeptoren für die Komplementfaktoren C3b, C3bi, C3a und C5a aus. Die Bindung der Komplementfaktoren an Fremdorganismen fördert die Phagozytose und Destruktion der Organismen in den Phagosomen der Monozyten.

Monozyten nehmen Mikroorganismen mit Hilfe der Phagozytose oder Pinozytose in das Zellinnere auf. In den Phagosomen werden die Mikroorganismen einem sauren pH-Wert von 4,5 und einem Gemisch von Lysolipiden, Enzymen, Proteinen und Oxidantien ausgesetzt. Nach der Destruktion können Peptidfragmente der Mikroorganismen auf der Monozytenoberfläche

präsentiert werden. Dies geschieht in Assoziation mit speziellen MHC-Molekülen (Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex; major histocompatibility complex).

Der Komplex aus Peptid und MHC-Molekül kann von T-Zellen mittels T-Zellrezeptor erkannt werden und ist die Voraussetzung für eine Aktivierung der T-Zellantwort.

Die Ausbildung einer optimalen Primärantwort durch Antikörper sezernierende B-Zellen benötigt die Interaktion mit aktivierten T-Helfer Zellen, die wiederum von der Antigenpräsentation und Sekretion von Zytokinen der Makrophagen abhängig sind.

Somit haben Monozyten/Makrophagen über die Antigenpräsentation und Ausschüttung von Zytokinen eine zentrale Rolle in der Immunregulation der T- und B-Zellfunktion.

Monozyten sezernieren eine Reihe verschiedener Zytokine (Glykoproteine), welche die Immunantwort modulieren. Dies sind vor allem die Interleukine-1, -6, -10 und -12 und der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

### **1.2.2 B-Lymphozyten**

Die spezifische humorale Immunantwort wird von den B-Lymphozyten vermittelt. An der Zelloberfläche weisen B-Lymphozyten membranständige Antikörper auf, die als Rezeptoren für lösliche Antigene dienen. Bindet ein Antigen an den Oberflächenrezeptor, erfolgt unter Mitwirkung von Helfer-T-Lymphozyten eine Aktivierung, klonale Selektion und Vermehrung des B-Lymphozyten. Dieser differenziert sich über Lymphoblasten zu Plasmazellen und zu B-Gedächtniszellen. Die Plasmazellen produzieren große Mengen an löslichen Antikörpern, entsprechend der Spezifität des B-Zellrezeptors. Bei Kontakt der Antikörper mit Antigenen können die Antikörper-vermittelten Abwehrmechanismen der humoralen Immunreaktion in Gang gesetzt werden, wie zum Beispiel die Aktivierung des Komplementsystems, eine Steigerung der Phagozytose durch Monozyten/Makrophagen sowie die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC).

Die B-Gedächtniszellen sind zunächst ruhende Zellen, die bei erneutem Kontakt mit dem Antigen zu einer rascheren und stärkeren Immunantwort führen.

### 1.2.3 T-Lymphozyten

Die spezifische zelluläre Immunität wird durch die T-Lymphozyten vermittelt. Die T-Lymphozyten stammen von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. Im Verlauf der Entwicklung erhalten die T-Lymphozyten im Thymus eine weitere Differenzierung und siedeln sich schließlich in den peripheren lymphatischen Organen an.

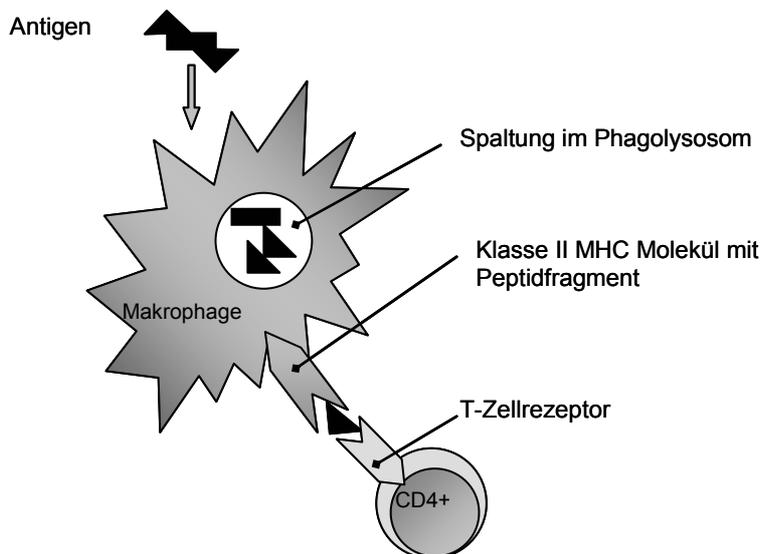
Anhand von Oberflächenmolekülen/-Rezeptoren und der sezernierten Zytokine ist eine Differenzierung der T-Lymphozyten in CD4+ Helfer-T-Lymphozyten und CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten möglich.

T-Lymphozyten erkennen Antigene über ihren membranständigen T-Zellrezeptor in Form von Peptiden. Die Peptide müssen in Assoziation mit MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche erscheinen, um vom T-Zellrezeptor erkannt zu werden (MHC-restringierte T-Zellerkennung).

CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten erkennen Peptide in Assoziation mit MHC-I-Molekülen, die auf kernhaltigen Zellen exprimiert werden können.

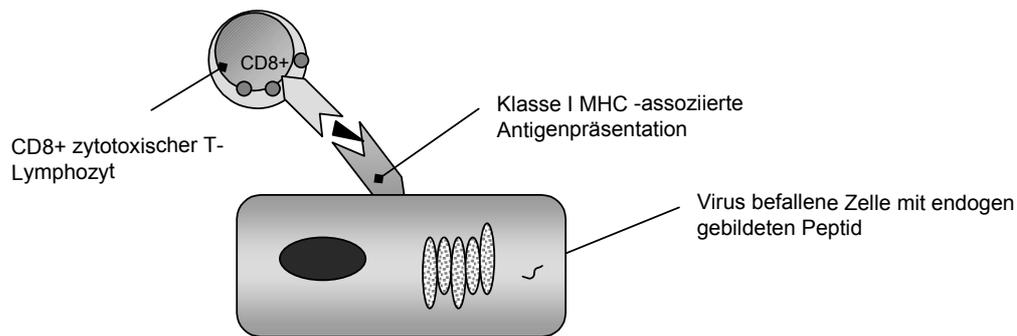
CD4+ Helfer-T-Lymphozyten erkennen Proteinantigene die an MHC-II-Molekülen gebunden sind und auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Endothelzellen dargeboten werden.

Über den T-Zell Rezeptor führt der Komplex aus Antigen und MHC-Molekül zur Aktivierung und Proliferation der T-Helfer-Lymphozyten. Die aktivierten T-Helferzellen fördern die Differenzierung von B-Lymphozyten oder aktivieren Makrophagen über die Sekretion von Zytokinen (Abb.2).



**Abb.2:** Antigene werden durch Monozyten/Makrophagen aufgenommen und in spezialisierten intrazellulären Kompartimenten durch proteolytische Enzyme „zerkleinert“. Lineare Peptide des Antigens werden in Assoziation mit Klasse II MHC Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert, und können dort von CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten mittels T-Zellrezeptor erkannt werden (nach Roitt et al., 1993).

CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten wirken als zytotoxische Zellen. Sie erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor Peptidantigene, die in Assoziation mit einem Klasse I MHC-Molekül auf der Oberfläche von Zellen dargeboten werden. Klasse I MHC-Moleküle finden sich auf fast allen kernhaltigen Zellen. CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten sind wichtige Effektorzellen bei intrazellulären Infektionen. Sie führen zur Lyse von virusinfizierten Zellen (Abb.3).



**Abb.3:** Virales Protein einer befallenen Zelle wird im Zytosol zu kleinen Peptiden abgebaut und im Verlauf der Exozytose in Assoziation mit Klasse I MHC Molekülen auf der Zelloberfläche angeordnet. CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten erkennen die Peptidantigene in Verbindung mit den Klasse I MHC Molekülen und leiten die Lyse der befallenen Zelle ein.

### 1.2.4 T-Helferzell-Subpopulationen

Die regulatorische Funktion der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen bestimmt wesentlich die Effizienz einer Immunantwort. Ihre Effektorfunktion üben die T-Helferzellen hauptsächlich über die Sekretion von Zytokinen aus.

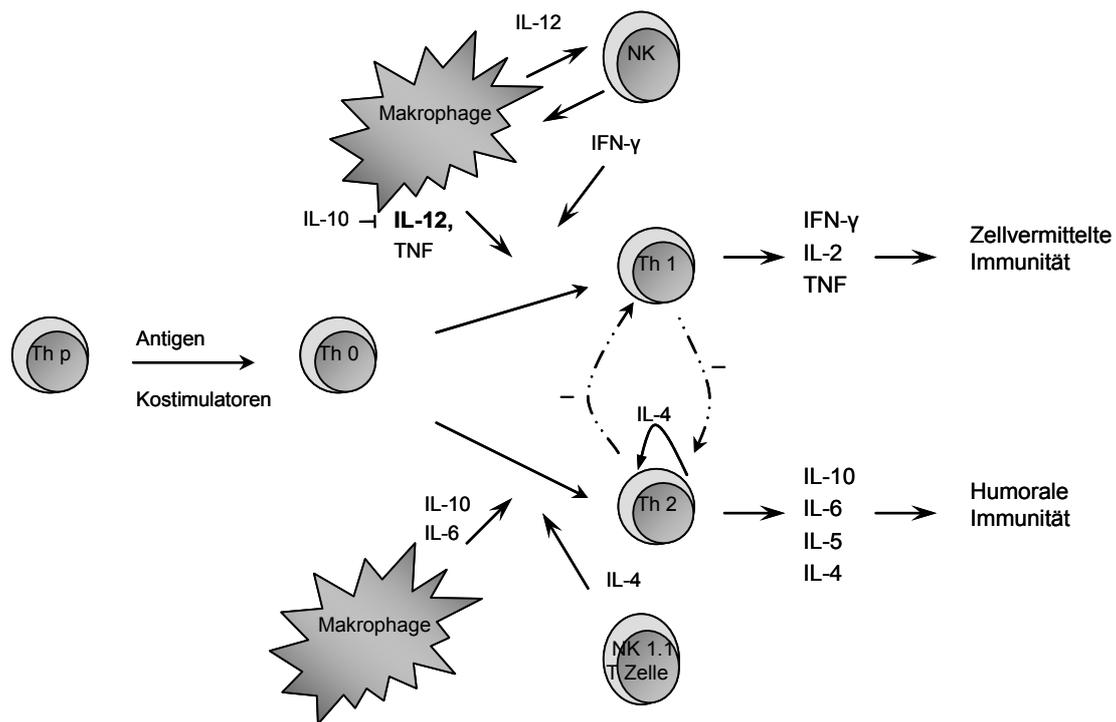
Untersuchungen von Mosmann am Mausmodell zeigten, dass CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten anhand ihrer sezernierten Zytokine in mindestens zwei Subpopulationen unterteilt werden können. CD4<sup>+</sup> positive T-Lymphozyten, welche Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$  sezernieren, werden als T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) bezeichnet. T-Helferzellen vom Typ 2 werden anhand der Interleukine-4, -5, -10 und -13 identifiziert (Mosmann et al., 1986).

Helferzellen vom Typ 1 regulieren die zellulär vermittelte Immunantwort insbesondere gegenüber viralen Infektionen. Sie induzieren so auch die Entwicklung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Ferner induzieren sie Überempfindlichkeitsreaktionen des verzögerten Typs (Typ-IV-Reaktion) (Fong und Mosmann, 1989; Mosmann und Coffman, 1989).

Helferzellen vom Typ 2 beeinflussen durch ihre Zytokinsekretion eher die humorale Immunantwort. Sie fördern eine spezifische Antikörperbildung durch eine gesteigerte B-Zellproliferation und Differenzierung zu Plasmazellen (Coffman et al., 1988). Zytokine der Helferzellen vom Typ 2 werden in Verbindung mit starken Antikörper- und allergischen Reaktionen gefunden, vor allem bei IgE-vermittelten Entzündungsreaktionen (Coffman und Carty, 1986).

Typ 1 und Typ 2 T-Helferzellen differenzieren sich aus denselben naiven Typ 0 T-Helferzellen. Das vorherrschende Zytokinmilieu während des Antigenkontaktes bestimmt, in welche Richtung sich die Zellen differenzieren. Interleukin-12, das in erster Linie von monozytären Zellen stammt, fördert eine Differenzierung zu Typ 1 T-Helferzellen, wohingegen Interleukin-4 und -10 eine Differenzierung von Typ 2 T-Helferzellen propagieren (Abb.4).

Die T-Helferzell-Subpopulationen können sich gegenseitig durch die sezernierten Zytokine in ihrer Differenzierung und Effektorfunktion hemmen. Das Interleukin-10 der Typ 2 T-Zellen wirkt inhibierend auf die antivirale Aktivität der Typ 1 T-Zellen, wohingegen das Interferon- $\gamma$  der Typ 1 T-Helferzellen hemmend auf die Typ 2 T-Helferzellen wirkt (Fernandez-Botran et al., 1988; Fiorentino et al., 1989; Gajewski und Fitch, 1988).



**Abb.4:** Differenzierung naiver T-Helferzellen (Th p) in TH 1- oder TH 2 -Zellen unter dem Einfluss der Zytokine von Monozyten/Makrophagen (nach M.Rincon et al., 1997).

### 1.3. Zytokine

Zytokine werden von Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen sezerniert und wirken als potente Mediatoren. Sie wurden ursprünglich nach ihrem zellulären Ursprung als Lymphokine, Interleukine oder Monokine bezeichnet. Diese Nomenklatur wurde jedoch mit der Zeit wieder verlassen, da dieselben Zytokine von verschiedenen Zelltypen gebildet werden können.

Zytokine werden in der Effektorphase der Immunantwort gebildet. Es handelt es sich bei den Zytokinen um Polypeptide mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 20 KD. Zumeist erfolgt eine de novo Synthese über eine kurzlebige m-RNA.

Wesentliche Funktionen der Zytokine sind die direkte Kommunikation der Zellen untereinander und die Förderung der Hämatopoese. Sie sind beteiligt an der Zellaktivierung und Differenzierung im Rahmen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort und an Entzündungsreaktionen.

Die Zytokinwirkung erfolgt über Oberflächenrezeptoren auf den Zielzellen und führt zu einer zellulären Antwort in Form einer Änderung der RNA- und Proteinsynthese. Die Zytokine können auf die produzierende Zelle selbst (autokrin), auf eine nebenstehende Zelle (parakrin) oder auf eine weit entfernt liegende Zelle (endokrin) wirken.

Zytokine treten im Verlauf ihrer kaskadenartigen Ausschüttung in vielseitige Wechselwirkungen zueinander. Sie können ihre Synthese gegenseitig fördern oder hemmen. Ihre Wirkung auf die Zielzellen kann synergistisch und auch antagonistisch sein.

### **1.3.1 Interleukin-1**

Interleukin-1 (IL-1) wurde 1972 erstmalig als Lymphozyten aktivierender Faktor beschrieben (Gery und Waksman, 1972).

Es wird in zwei strukturell verschiedenen Formen als IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gebildet. Beide Formen wirken über denselben Membranrezeptor und führen zu gleichen biologischen Wirkungen. IL-1 wird in einer Vielzahl von Zellen gebildet. Monozyten gelten als wichtigste Produzenten von IL-1. Im Entzündungsgeschehen bewirkt IL-1 die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und die Ausschüttung von Chemokinen, die die zielgerichtete Wanderung von Zellen zum Entzündungsort hervorrufen. In höheren Konzentrationen verursacht IL-1 Fieber und induziert in der Leber die Synthese von Akutphasen-Proteinen.

Interleukin-1 wirkt auf die Zellen der spezifischen Immunantwort. Nach Art einer Kaskade werden T-Zellen durch die Interleukin-1 Wirkung zur Produktion weiterer Zytokine (IL-2, IL-4) angeregt, die das T-Zellwachstum und die Differenzierung nach Antigenkontakt steuern.

Interleukin-1 induziert in Verbindung mit IL-6 die Differenzierung aktivierter B-Zellen und fördert zusammen mit IL-4 die Proliferation und Antikörperbildung der B-Zellen (Falkhoff et al., 1983; Koyama et al., 1988; Paul und Ohara, 1987).

Monozyten bilden einen kompetitiven Inhibitor für IL-1, der strukturell dem IL-1 entspricht, aber biologisch inaktiv ist. Durch seine Bindung an den Rezeptor wird die Wirkung von IL-1 gehemmt. Er wird als IL-1-RA (IL-1 Rezeptorantagonist) bezeichnet (Dinarelo, 1998).

### 1.3.2 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) konnte in mononukleären Phagozyten, Endothelzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden. Seine Sekretion wird durch IL-1 und TNF- $\alpha$  gefördert und durch IL-10 gehemmt. IL-6 wirkt auf Hepatozyten und ruft die Synthese von Akutphasen-Proteinen hervor. Im Knochenmark fördert IL-6 als Kofaktor zusammen mit anderen Zytokinen die Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen (Gauldie et al., 1987).

IL-6 wirkt im Rahmen der T-Zell-Aktivierung als stimulierender Faktor (Houssiau et al., 1988).

Naive CD4-positive T-Helfer-Lymphozyten differenzieren sich unter dem Einfluss von IL-6 zu TH2 Effektorzellen. Die Differenzierung wird durch IL-4 vermittelt, dessen Expression wiederum durch IL-6 induziert wird (Diehl et al., 2000, Rincón et al., 1997).

Andererseits wird durch IL-6 unabhängig von der IL-4 Wirkung die Entwicklung der CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten zu TH1 Zellen inhibiert (Diehl et al., 2000).

IL-6 entfaltet seine Wirkung auch auf B-Zellen. Während der Differenzierung von aktivierten B-Zellen hat es dort die Funktion eines Wachstumsfaktors (Muraguchi et al., 1988).

### 1.3.3 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wird in aktivierten T-Zellen und Natürlichen Killer (NK) Zellen exprimiert. Die mononukleären Phagozyten sind die wichtigsten Produzenten von TNF- $\alpha$ .

Über zwei unterschiedliche Rezeptoren, die auf der Membranoberfläche einer Vielzahl von Zelltypen zu finden sind, entfaltet das Zytokin seine Wirkungen. Aktivierte Zellen können darüber hinaus lösliche TNF- $\alpha$  Rezeptoren sezernieren, die als kompetitive Hemmer der gebundenen Rezeptoren wirken.

Virus-befallene Zellen exprimieren unter der Wirkung des Zytokins auf ihrer Oberfläche vermehrt Klasse I MHC-Moleküle, welche die Lyse der befallenen Zellen durch zytotoxische T-Zellen verstärken (Abbas et al., 1994).

TNF- $\alpha$  übt seine Wirkungen in Abhängigkeit von der Konzentration aus. In höheren Konzentrationen wirkt es systemisch und bewirkt als endogenes Pyrogen einen Anstieg der Körpertemperatur und die Ausschüttung von Akutphasen-Proteinen der Leber. Im septischen Schockgeschehen vermindert TNF- $\alpha$  die Gewebepfusion, aktiviert das Gerinnungssystem und führt zu metabolischen Störungen.

Endothelzellen bilden unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$  vermehrt Adhäsionsmoleküle aus. Dies führt zur Rekrutierung von Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten am Ort der Entzündung. Aktivierte T-Lymphozyten werden durch TNF- $\alpha$  zur Proliferation angeregt und Monozyten/Makrophagen werden durch TNF- $\alpha$  stimuliert vermehrt IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  zu produzieren (Shalaby et al., 1988; Yokata et al., 1988).

#### **1.3.4 Interleukin-10**

Interleukin-10 (IL-10) wird von mononukleären Phagozyten, B-Zellen, T-Helfer-Zellen, Keratinozyten und Mastzellen synthetisiert. IL-10 ist ein „Schlüssel“-Zytokin, das in aktivierten Monozyten die Zytokinproduktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-12 hemmt (de Waal Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991; Foey et al., 1998; Parry et al., 1997).

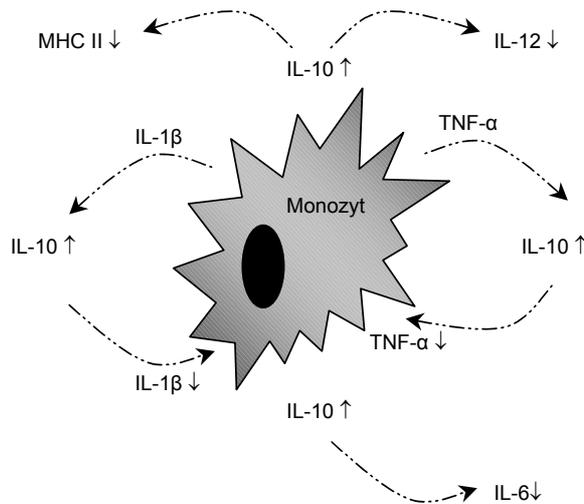
IL-10 stimuliert die monozytäre Expression des IL-1 Rezeptor Antagonisten und des löslichen TNF Rezeptors, die natürliche Inhibitoren von IL-1 $\beta$  bzw. von TNF- $\alpha$  darstellen (Parry et al., 1997). Umgekehrt wird die monozytäre IL-10 Produktion unter der Einwirkung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  verstärkt, d.h. zwischen den monozytären Zytokinen besteht eine regulatorische Wechselbeziehung im Sinne einer Rückkopplung (Parry et al., 1997) (Abb.5).

Eine weitere Verstärkung erfährt die monozytäre IL-10 Produktion durch den direkten Zellkontakt mit stimulierten T-Lymphozyten (Parry et al., 1997).

Unter dem Einfluss von IL-10 exprimieren Monozyten weniger Klasse II MHC-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, so dass die T-Zell Proliferation vermindert wird (de Waal Malefyt et al., 1991a).

Insbesondere im Rahmen der akzessorischen Zellfunktion der Makrophagen wird durch Interleukin-10 die Zytokinsekretion der T-Helferzellen vom Typ 1 teilweise blockiert, da IL-10 die Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  inhibiert (D'Andrea et al., 1993; Fiorentino et al., 1991).

Aktivierte B-Zellen werden durch IL-10 in ihrer Differenzierung, Proliferation und der Fähigkeit zur Antikörpersekretion verstärkt (Rousset et al., 1992). Die ruhenden B-Zellen bilden unter der Wirkung von IL-10 vermehrt Klasse II MHC-Rezeptoren (Go et al., 1990).



**Abb.5:** Bedeutung der monozytären IL-10 Expression. Abnahme der Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-12 unter der Wirkung von IL-10 und geringere Ausbildung von MHC-Molekülen der Klasse II auf der Oberfläche Antigen präsentierender Zellen.

### 1.3.5 Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) ist ein Heterodimer, das aus einer 35 KD und einer 40 KD schweren Kette zusammengesetzt ist. Die 35 KD Untereinheit wird von einer großen Zahl von Zellen gebildet, zu ihnen gehören T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen. Das biologisch aktive Zytokin besteht aus beiden Untereinheiten und wird hauptsächlich von aktivierten mononukleären Phagozyten, NK-Zellen und B-Zellen produziert. IL-12 wirkt regulatorisch in der zellvermittelten Immunantwort auf aktivierte T-Lymphozyten und NK-Zellen.

Naive CD4-positive T-Helferzellen differenzieren sich unter dem Einfluss von IL-12 zur TH1 Subpopulation. Das Überwiegen einer TH1- oder TH2- T-Helferzellantwort wird durch das relative Verhältnis von IL-12 und IFN- $\gamma$  auf der einen Seite, und von IL-4 und IL-10 auf der anderen Seite kontrolliert, wobei IL-4 und IL-10 die TH2-Differenzierung fördern.

CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten werden durch IL-12 zur Reifung und zur Differenzierung in funktionell aktive zytotoxische T-Lymphozyten angeregt (Bhardway et al., 1996; Mehrotra et al., 1993). Das zytotoxische Potential dieser Zellen wird unter dem Einfluss von IL-12 erhöht (Mehrotra et al., 1993), ebenso wie die Proliferation und die Zytotoxizität von NK-Zellen (Chehimi et al., 1992).

#### **1.4 Aufgabenstellung der Arbeit**

Die Hepatitis C Virus Infektion chronifiziert in der Mehrzahl der Fälle (Alter et al., 1997; Hoofnagle, 1997; Seef, 1997). Wenngleich die zelluläre Immunantwort gegenüber der HCV-Infektion noch unzureichend charakterisiert ist, so ist doch klar, dass der chronische Krankheitsverlauf durch eine unzureichende Typ 1 Zytokinantwort begünstigt wird.

Unklar ist hingegen, ob die unzureichende antivirale Typ 1 Zytokinantwort und das potentielle Überwiegen einer Typ 2 Zytokinantwort Folge einer veränderten Monozyten/Makrophagen Reaktion gegenüber HCV-spezifischen Antigenen ist oder Folge einer primären T-Zellfunktionsstörung ist. Vorstellbar wäre eine Alteration der monozytären Zytokinproduktion durch die Hepatitis C Virusinfektion.

Ziel der Dissertation war zu klären, ob eine Hepatitis C Virus Infektion Änderungen im Muster der monozytären Zytokinexpression hervorruft und ob diese antigenspezifisch sind.

Daher sollten bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Virus Infektion und bei Patienten mit einem selbstlimitierten Verlauf der Hepatitis C Virus Infektion in-vitro Untersuchungen durchgeführt werden, die diesen Sachverhalt klären sollten. Für diesen Zweck sollten Kurzzeitkulturen von peripheren mononukleären Blutzellen unter antigenspezifischer Stimulation durchgeführt werden und die monozytäre Zytokinantwort auf Einzelzellniveau mittels Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Dieses Konzept hat den Vorteil, dass die physiologischen Wechselwirkungen der Zellen untereinander erhalten bleiben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Ampuva</b> steriles pyrogenfreies Aqua ad injectabilia	<b>Fresenius AG, Bad Homburg</b>
<b>Bovines Serumalbumin,</b> Rinderalbumin, Fraktion V, pH 7,0 lyophil	<b>Boehringer Mannheim, Mannheim</b>
<b>Ethyldiamintetraessigsäure, EDTA</b>	<b>Serva, Heidelberg</b>
<b>Fetales Kälberserum</b>	<b>Boehringer Mannheim, Mannheim</b>
<b>Ficoll-Trennlösung</b> isoton, Dichte: 1,077 g/cm <sup>3</sup>	<b>Biochrom KG, Berlin</b>
<b>Monensin</b>	<b>Sigma, Deisenhofen</b>
<b>Lipopolysaccharid von E.coli (Escherichia coli),</b> Serotyp 026:B6	<b>Sigma, Deisenhofen</b>
<b>PBS, (steril)</b> 8g NaCl; 0,276 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 2,864g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O ad 1000,0 ml Aqua dest.	<b>Apotheke der Universität Bonn</b>
<b>Penicillin/Streptomycin</b> 10000IE/ml 10000µg/ml	<b>Biochrom KG, Berlin</b>
<b>RPMI 1640-Medium</b> + L-Glutamin, + 25 mM HEPES Puffer	<b>Biochrom KG, Berlin</b>
<b>Trypanblau</b>	<b>Serva, Heidelberg</b>

### 2.1.2 Lösungen

Kulturmedien für PMNC

- RPMI 1640
- 2mM L-Glutamin
- 100 E/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 10% autologes Serum

PBS-Waschlösung:

8g NaCl, 0,276g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O; 2,864g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O  
ad 1000,0 ml Aqua dest.

### 2.1.3 Proteine

Die in-vitro-Untersuchungen der Monozyten sollten nach antigener Stimulation mit den rekombinant synthetisierten Hepatitis C Virus Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b erfolgen.

Die rekombinanten HCV-Proteine Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b wurden von der Firma Mikrogen Inc. München bezogen. Die Proteine wurden in *Escherichia coli* exprimiert. Als Ausgang für die verwendete klonierte cDNA diente ein Strang des Genotyps 1a (Klassifikation nach Simmonds et al., 1994a). Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte über Ionenaustauschchromatographie mit nachfolgender präparativer Natriumdodecylsulfat-Gel-Elektrophorese. Die Untersuchung auf eine Kontamination mit *E.coli* Proteinen wurde durch Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen Kaninchen anti-*E.coli* Serum (DAKO; Dänemark) durchgeführt. Die Verunreinigung mit bakteriellem Lipopolysaccharid wurde mit dem Limulus-Test bestimmt; sie betrug nach Angaben des Herstellers: 7,5 pg Endotoxin/µg Core-Protein, 19 pg Endotoxin/µg NS3-Protein, 27 pg Endotoxin/µg NS4-Protein. Für Zellkulturexperimente gilt eine Verunreinigung von < 50 pg Endotoxin/ml als unbedenklich (Hoffmann et al., 1995).

Die aufgereinigten Core-, NS3-, NS4-, NS5a-, NS5b-Proteine wurden in einem Tris-Glycin-Puffer mit 0,1% Natriumlaurylsulfat gelagert.

Die rekombinanten Proteine entsprechen den folgenden Regionen des HCV-Polyproteins: r-Core: aa 1-115, r-NS3: aa 1007-1534, r-NS4: aa 1616-1862, r-NS5a: aa 2007-2268, rNS5b: aa 2622-2868.

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Antikörper für die Zellcharakterisierung

Spezifität	Klon/Isotyp	Konjugat	Firma
CD 3	SK 7/Maus IgG1	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 14	MΦ P9/Maus IgG2b	FITC/PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 56	NCAM 16,2/Maus IgG2b	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotypkontrolle	X40 / Maus IgG1 X75.3 / Maus IgG2b	FITC / PE FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 68			Dako, Hamburg

### 2.1.4.2 Antikörper für den intrazellulären Nachweis von Zytokinen

Spezifität	Klon / Isotyp	Konjugat	Firma
IL-1β	Maus IgG1	FITC	Hölzel, Köln
IL-6	MQ2-6A3 / Ratte IgG2a	PE	PharMingen, Hamburg
IL-10	JES3-9D7 / Ratte IgG2a	PE	PharMingen, Hamburg
IL-12	C11.5 / Maus IgG1	PE	PharMingen, Hamburg
TNF-α	Mab11 /Maus IgG1	PE	PharMingen, Hamburg
Isotypkontrolle	MOPC-21 / Maus IgG1	PE	PharMingen, Hamburg
Isotypkontrolle	R35-95 / Ratte IgG2a	PE	PharMingen, Hamburg

### 2.1.5 Labormaterialien

Labormaterialien	Hersteller
Auslaufpipetten 1 ml, wattiert, steril verpackt	Sarstedt, Nümbrecht
Auslaufpipetten 5 ml, wattiert, steril verpackt	Sarstedt, Nümbrecht
Auslaufpipetten 10 ml, wattiert, steril verpackt	Sarstedt, Nümbrecht
Biopur-Kombitips 0,5 ml, steril	Eppendorf, Hamburg
Biopur-Kombitips 1,25 ml, steril	Eppendorf, Hamburg
Biopur-Kombitips 2,5 ml, steril	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipetten, gelb, 10-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf-Pipetten, blau, 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Kryo-Röhrchen (Polypropylen)	Greiner, Frickenhausen
Microtiter-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Monovette, EDTA, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Monovette, Serum Gel, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Monovette, NH <sub>4</sub> -Heparin, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteur-Pipetten für Einmalgebrauch Länge 150 mm	Brand, Wertheim
Polypropylen-Röhrchen, konisch 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen, konisch 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Polystyren-Rundboden-Röhrchen, 6 ml	Becton Dickenson, Heidelberg
VS <sup>+</sup> Separationssäulen für VarioMACS	Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach
MS Separationssäulen für MiniMACS	Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach
Zellkulturflaschen, 260 ml, mit Schräghals	Nunc, Wiesbaden

### 2.1.6 Laborgeräte

Geräte	Hersteller/Vertriebsfirma
Brenner, Fireboy eco	Integra Bioscience, Fernwald
Magnetrührer, IKA-Combimag RCH	Janke und Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen
Membranpumpe, Typ ME 2C	Vacubrand, Wertheim
Plattenschüttler, Typ MTS 2	Janke und Kunkel ITA-Labortechnik, Staufen
Vortexer, Typ Vibrofix VF 2	Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen
Sterilbank, Typ HB Safe 2448	Holten LaminAir, Dänemark
Invers-Lichtmikroskop, Typ DMIL	Leitz, Köln
Feinwaage, Typ BP 61	Sartorius, Göttingen
Kühlzentrifuge, Spinchron KR	Beckmann, München
GFL-Schüttelbad, Typ 1083	GFL, Burgwedel
Inkubator, Typ 3111	Forma Sientific, Marietta USA
pH-Meter $\Phi$ 32	Beckmann, München
Pipetierhilfe, pipetus-standard	Eich GmbH, Bonn
Multipette, Typ 4780	Eppendorf, München
Pipetten, Finnpipette 0,5-10 $\mu$ l, 5-40 $\mu$ l, 40-200 $\mu$ l, 200-1000 $\mu$ l	Labsystems, Frankfurt am Main
VarioMACS magnetisches Zellseparationssystem	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Vertikalautoklav einwandig, Modell CDS 500E	Concept GmbH
Durchflusszytometer, FACSort Argonlaser, 488nm, luftgekühlt	Becton Dickinson, Heidelberg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Patienten

Es wurden drei Patientengruppen untersucht.

Gruppe 1 setzte sich aus 22 ambulanten Patienten (18 männlich, 4 weiblich) mit chronischer Hepatitis C Virus Infektion zusammen, die sich in unserem Medizinischen Zentrum von Oktober 1997 bis Juni 1998 vorstellten und therapienaiv waren. Alle Patienten wiesen erhöhte Aminotransferasen (GPT [ALT] im Mittel 33 U/l [15-78 U/l]) und eine nachweisbare Hepatitis C Virämie auf (Tabelle 1). Die mittlere Viruslast betrug  $6,3 \times 10^6$  Kopien/ml ( $2,6 \times 10^6$  –  $8,3 \times 10^6$  Kopien/ml). Das mittlere Alter der Patienten betrug 37 Jahre (22-62 Jahre).

Die HCV-Subtypisierung erfolgte mit Hilfe des INNO-LIPA-Tests (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgien). Der HCV-Genotyp 1a ließ sich bei 8 Patienten nachweisen, Genotyp 1b bei 9 Patienten, Genotyp 2b und 3b bei jeweils einem Patienten und gemischte Genotypen (1a/2b; 2a/2c; 4c/4d) bei je einem Patienten.

Gruppe 2 setzte sich aus 14 Patienten (12 männlich, 2 weiblich) mit einem selbstlimitierten Verlauf der HCV-Infektion zusammen. Das mittlere Alter betrug 32 Jahre (18-64 Jahre). Die Rekrutierung dieser Patienten erfolgte über die Blutspendezentrale der Universitätsklinik Bonn sowie über die Hämophilieambulanz des Institutes für experimentelle Bluttransfusion. Diese Patienten waren anti-HCV-Antikörper positiv, aber für einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren in wiederholten Messungen ohne Nachweis von viraler RNA. Darüber hinaus wiesen sie kontinuierlich normale Transaminasen auf.

Zwischen den beiden anti-HCV positiven Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Immunglobulin Gesamtkonzentrationen. Keiner der Patienten wies Kryoglobuline oder Autoantikörper auf. Personen mit Hepatitis B Virus- oder einer Ko-Infektion mit Humanem Immundefizienz Virus (HIV) wurden nicht in die Untersuchung eingeschlossen.

Gruppe 3 bestand aus 11 Probanden (6 männlich, 5 weiblich), die anti-HCV negativ waren und keiner „Risikogruppe“ angehörten. Das mittlere Alter dieser Gruppe betrug 31 Jahre (22-63 Jahre). Diese Gruppe diente zur Überprüfung der Spezifität der HCV-induzierten Immunantwort.

**Tab.1:** Patientencharakteristika der Studiengruppen

<b>Patienten</b>	<b>chronische Hepatitis C</b>	<b>selbstlimitierter Verlauf</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
<b>Anzahl (n)</b>	22	14	11
<b>Alter</b>			
Mittel	37	32	31
Spannweite	22-62	18-64	22-63
<b>Geschlecht</b>			
männlich	18	11	6
weiblich	4	3	5
<b>ALT (U/l)</b>			
Mittel	33	13	12
Spannweite	15-78	6-22	5-19
<b>Viruslast (Kopien/ml)</b>			
Mittel	6,3x10 <sup>6</sup>	Keine HCV- Antigene	Keine HCV- Antigene
Spannweite	2,6-8,3x10 <sup>6</sup>		
<b>HCV-Genotyp</b>			
1a	8	10	
1b	9		
2b	1		
3a	1		
4		1	
1b/2b	1		
2a/2c	1		
4c/4d	1		
unbekannt		3	

## **2.3. HCV-spezifische Immunanalyse**

### **2.3.1 Nachweis der anti-HCV-Antikörper**

Die HCV-Antikörper im Patientenserum wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA der 2. Generation (Abbott, Wiesbaden) im Institut für Klinische Mikrobiologie und Immunologie bestimmt. Alle Patienten wurden mit einem Matrix-ELISA desselben Herstellers getestet, um die HCV-Antikörper in Abhängigkeit ihrer Spezifität für die HCV-Proteine Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b zu bestimmen.

### **2.3.2 Nachweis der HCV-RNA**

Der Nachweis der HCV-RNA erfolgte ebenfalls im Institut für Klinische Mikrobiologie und Immunologie durch Reverse-Transkription und "nested PCR".

Die HCV-RNA wurde aus 150 µl Serum extrahiert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Anschließend wurde die RNA mit einem Nukleinsäure-Kit (Viral Kit Qiagen, Hilden) durch reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach einer Methode von Imberti et al. (Imberti et al., 1991) amplifiziert: in Gegenwart des Antisense Primers (5'-GATGCACGGTCTACGAGACCTC-3') wurde aus der RNA eine cDNA synthetisiert (Reverse Transkriptase; Boehringer Mannheim). Die cDNA wurde anschließend durch die thermostabile DNA-Polymerase (Expand High Fidelity, Firma Boehringer, Mannheim) amplifiziert. Alle Primersets wurden aus der 5'-nichtkodierenden Region des HCV-Genoms ausgewählt.

### **2.3.4 Bestimmung des HCV-Genotyps**

Die Bestimmung des HCV-Genotyps wurde mit dem INNO-Lipa HCV II Test (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgien) durchgeführt. Bei Patienten ohne Nachweis von HCV-RNA (Gruppe 2) wurde die HCV-Typisierung durch Antikörper gegen subtypenspezifische Abschnitte der NS4-Region durchgeführt (Murex, Abbott, Wiesbaden) (Simmonds et al., 1993).

## 2.4 Allgemeine Grundlagen der Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ist ein Meßsystem, das aus einer Lichtquelle und optischen Detektionssystemen aufgebaut ist. Als Lichtquelle wird zumeist ein Argonlaser verwendet, dessen Emission bei 488nm liegt. Gemessen werden das Streulicht, das durch die Größe und Granularität der Zellen bestimmt wird, und die Fluoreszenzsignale, die durch die Aktivierung der Fluoreszenzfarbstoffe erzeugt werden. Das Besondere dieser Technik ist eine gleichzeitige Analyse der Licht- und Fluoreszenzsignale jeder einzelnen Zelle und nicht nur der Durchschnittswerte einer Population.

### 2.4.1 Physikalische Grundlagen der Durchflusszytometrie

Ein Lichtstrahl führt bei Kontakt mit einer Zelle zur Entstehung von optischen Signalen unterschiedlicher Qualität. Die Messung der Lichtstreuung und der Fluoreszenz ermöglicht im Rahmen der lasergestützten Durchflusszytometrie die Differenzierung verschiedener zellulärer Parameter.

#### Streulicht

Licht, das auf eine Zelle trifft, wird mit unterschiedlicher Quantität und Qualität gestreut. Die Lichtstreuung wird durch die physikalischen Eigenschaften der Zelle bestimmt. Zu nennen sind hier die Querschnittsfläche, der Refraktionsindex, die Struktur der Membran insbesondere Faltungen und die intrazellulären Bestandteile wie Granula und Vakuolen. Die Streuung ist nicht gleichmäßig, sondern am größten im Kleinwinkelbereich ( $0-10^\circ$ ) dem sogenannten Vorwärtsstreulicht (Forward Angle Light Scatter, [FSC]). Das Vorwärtsstreulicht läßt eine Aussage über die Zellgröße zu. Seitwärts im  $90^\circ$  Bereich wird nur ein geringerer Teil des Lichts gestreut (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter, [SSC]). Das Seitwärtsstreulicht liefert Informationen über die Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zellen. Die Streulichtparameter ermöglichen eine Unterscheidung der wichtigsten weißen Blutzellen in Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten, sowie die Ausgrenzung toter Zellen, die ein geringeres Vorwärtsstreulicht aufweisen

#### Fluoreszenz

Die Fluoreszenz beschreibt eine rasch abklingende Lichtemission von Molekülen, die nach Absorption von energiereicher Strahlung entsteht.

Fluoreszierende Verbindungen, sogenannte Fluorochrome, absorbieren Licht über einen für sie spezifischen Wellenlängenbereich (spezifisches Anregungsspektrum). Dabei werden Elektronen aus einem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird vom Elektron ein Photon emittiert. Ein Teil der Energie geht bei diesem Vorgang verloren, so dass das emittierte Licht (die Fluoreszenz) von geringerer Energie und folglich von größerer Wellenlänge ist. Das anregende und das emittierte Licht weisen dadurch unterschiedliche Wellenlängen auf.

Jedes Fluorochrom emittiert Licht über einem spezifischen Wellenlängenbereich. Der Einsatz von optischen Filtersystemen und Spiegeln ermöglicht die simultane Verwendung mehrerer Fluorochrome zur gleichzeitigen Messung verschiedener Parameter.

#### **2.4.2 Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome)**

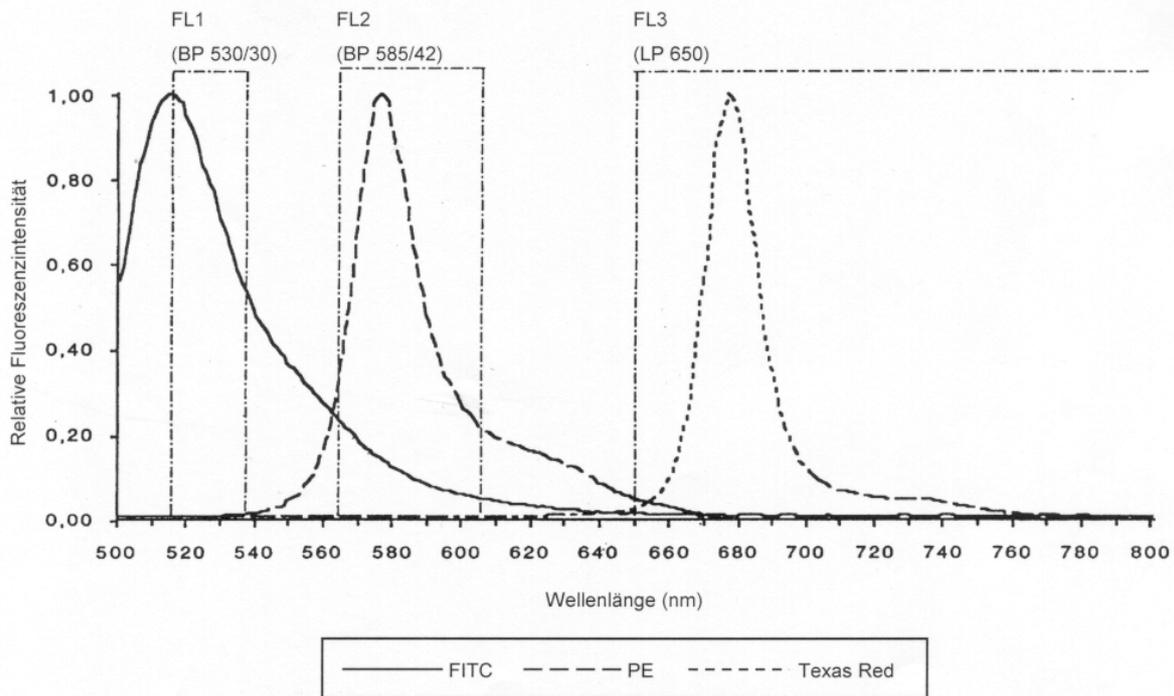
Biologische Pigmente, die mit den Photosynthesystemen von Pflanzen und Mikroorganismen assoziiert sind, finden in der Durchflusszytometrie als Fluorochrome eine Anwendung.

Phycoerythrine (PE) aus dem Photosyntheseapparat der Rot- und Blaualgen wandeln Lichtenergie in Chlorophyll. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 488 nm. Das Emissionsmaximum für das fluoreszierte Licht liegt bei 578 nm (Abb.6).

Ein weiterer Farbstoff ist das Fluorescein (FITC), dessen Absorptionsmaximum bei 495 nm zu finden ist und ein Emissionsmaximum im Bereich des grünen Lichts bei 525 nm hat.

Ein dritter Farbstoff sind die Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplexe, z.B. Texas-Red, mit einem Absorptionsmaximum bei 470 nm und einem Emissionsmaximum bei 680 nm .

Der Abstand zwischen der Wellenlänge mit maximaler Lichtenergieabsorption und dem Emissionsmaximum in einem langwelligeren Bereich wird als "Stokes'scher Shift" bezeichnet. Die Besonderheit der ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffe liegt darin, dass sie alle bei derselben Wellenlänge angeregt werden, aber anschließend eine Unterscheidung anhand der ausgesendeten verschiedenen Fluoreszenzfarben möglich ist. D.h. die Farbstoffe weisen einen unterschiedlichen Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge auf. Der Abstand der Wellenlängen ermöglicht die Verwendung von mehreren Farbstoffen zur gleichzeitigen Messung und Korrelation verschiedener Parameter bei Einsatz nur eines Lasers.



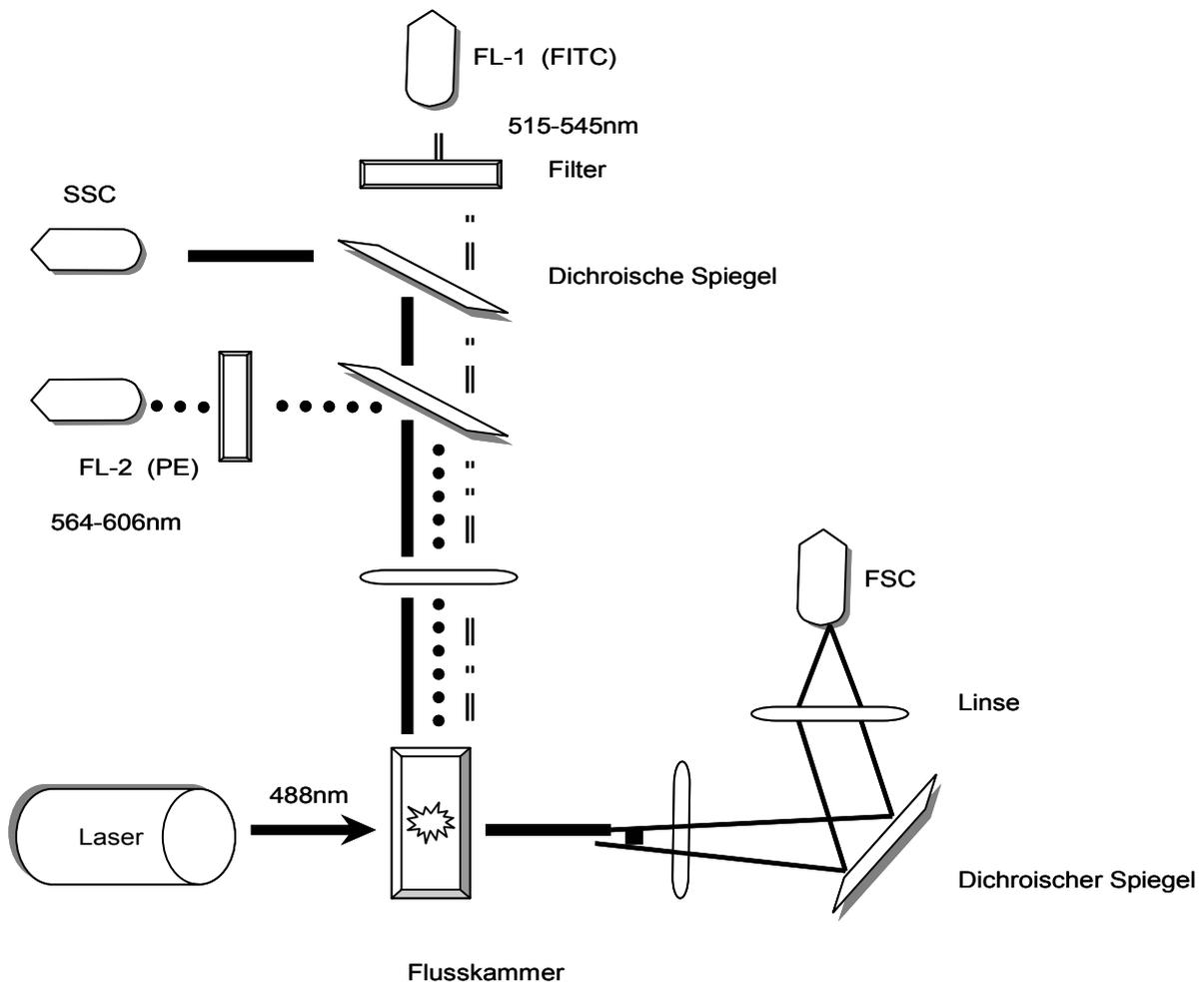
**Abb.6:** Emissionspektren der verwendeten Fluochrome FITC, PE und Texas Red mit teilweiser Überlappung der Spektren, die im Rahmen der Geräteeinstellung kompensiert werden müssen.

### 2.4.3 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Zellen werden im Flüssigkeitsstrom aus vorbereiteten Probenröhrchen in die Messkammer des Durchflusszytometers transportiert. Während der Passage des Laserstrahles entsteht dort das Streu- und Fluoreszenzlicht, welches durch zwischengeschaltete Spiegel und Filter zu Photodetektoren geleitet wird. Die Photodetektoren wandeln Photonen-Impulse des Lichtes in elektronische Signale um. Die Photodetektoren werden unterteilt in die Photodioden für das intensivere Streulicht und in die Photoröhren (photomultiplier tube PMT) für das schwächere Fluoreszenzlicht. Die Photoröhren verstärken zunächst das auftreffende Fluoreszenzsignal vielfach und wandeln es dann in elektronische Signale um (Abb.7).

Ein System von Spiegeln und Filtern ermöglicht die Auftrennung des Gemisches aus Streulicht und Fluoreszenzlicht in die verschiedenen Wellenlängen. Dichroische Spiegel werden im 45° Winkel zum Strahlengang platziert. Durch die verschiedenen Spiegel werden die Wellenlängen getrennt und zu den entsprechenden Detektoren weitergeleitet. 500nm Shortpass dichroische Filter im Strahlengang reflektieren Licht mit einer Wellenlänge, die kleiner als 500nm ist, z.B. das

Laserstreulicht mit einer Wellenlänge von 488nm zu dem Seitwärtsstreulicht Detektor. Ein Longpass dichroischer Filter reflektiert Licht mit einer Wellenlänge die größer als 560nm ist zu dem PE Fluoreszenz Detektor und lässt kürzere Wellenlängen zu dem FITC Fluoreszenz Detektor passieren. Vor den Detektoren sind jeweils Bandpassfilter installiert, die nur einen begrenzten Wellenlängenbereich passieren lassen. Schließlich verbleiben noch die Überlappungen in den Emissionsspektren der Fluorochrome, die bei der Signalprozessierung elektronisch durch Kompensation vermindert werden müssen.



**Abb.7:** Das Prinzip der Durchflusszytometrie. Eine Zelle wandert in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl. Dabei wird für jede Zelle gemessen wieviel Licht absorbiert wird (im Forward Scatter Messung der relativen Grösse), wieviel Licht reflektiert wird (im Side Scatter Messung der relativen optischen Dichte), sowie welche Fluoreszenzen emittiert werden. Die Detektion ist abhängig von den Detektoren und von der Wellenlänge des Anregungslichtes. Filter und Linsen regulieren den Lichtfluss. (Nach einer Arbeitsvorlage von Becton Dickson)

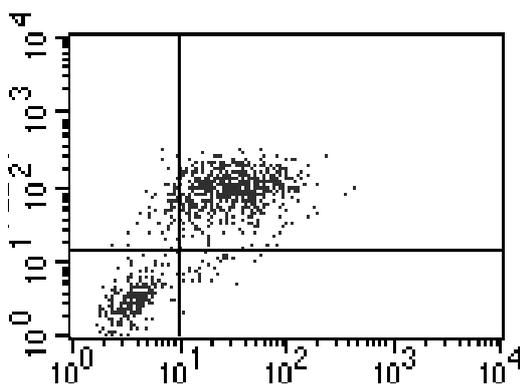
### Fluoreszenzkompensation

Der Einsatz mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe führt zu Überlagerungen der Fluoreszenzspektren, die nicht durch Lichtfilter vermieden werden können. Die Verwendung des Fluorochroms FITC führt zum Beispiel nicht nur zur Emission von grünem Licht, sondern auch zur Emission von rotem Licht, welches zu einer Störung der Messung am Detektor für diesen Frequenzbereich führt (Abb.6). Die Überlappung der Emissionsspektren wird durch eine spezielle Kompensationselektronik während der Signalverarbeitung korrigiert. Durch die Kompensation kann der Fluoreszenzanteil, der durch spektrale Überlappung entsteht, von jedem Signalpuls subtrahiert werden.

#### **2.4.4 Darstellung der Messergebnisse**

Die gebräuchlichsten Formen der Darstellung von Messdaten sind das Frequenzhistogramm und das Zytogramm. Beide Formen ermöglichen eine lineare oder logarithmisch verstärkte Darstellung der Signale (Abb.8).

Das Frequenzhistogramm ist eine einfache Darstellung der Messdaten anhand der Häufigkeitsverteilung. Die Anzahl der Zellen wird auf der Ordinate gegen die Fluoreszenzintensitäten auf der Abszisse aufgetragen. Dadurch kann die Verteilung eines Messparameters (Zelleigenschaft) in einer Population beschrieben werden.



**Abb.8:** Zytogramm Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung. Im linken unteren Quadranten sind die Zellen mit einer unspezifischen Antikörperbindung dargestellt. Im rechten oberen Quadranten sind die Zellen abgebildet, die positiv für zwei ausgewählte Messeigenschaften waren.

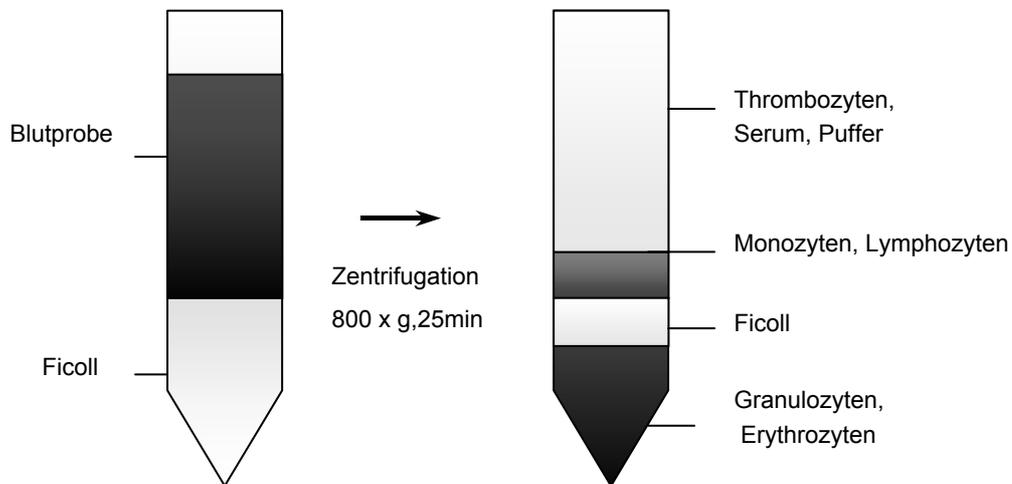
Das Zytogramm ist eine korrelierte Zweiparameterdarstellung, bei der jede Zelle als Punkt abgebildet wird. Es zeigt die Relation zweier Eigenschaften einer Zelle zueinander, zum Beispiel Streulichteigenschaften und Grünfluoreszenz.

Die Daten können in der Echtzeitanalyse sofort in Histogramme oder Zytogramme verarbeitet oder als Listendatei gespeichert werden. Dabei werden die gemessenen Ereignisse als Werteliste in der Reihenfolge gespeichert, in der die Zellen die Analysepunkte passieren. Die gleichzeitige Erfassung mehrerer verschiedener Zelleigenschaften (Vorwärts-, Seitwärts-streulicht, Fluoreszenz) ermöglicht eine nachträgliche Auswertung der Daten nach unterschiedlichen Gesichtspunkten. Als Software zur Datenverarbeitung wurde das CellQuest<sup>TM</sup>-Programm von Becton Dickinson (Heidelberg) verwendet.

## **2.5 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen**

Die Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (Lymphozyten, Monozyten) (PMNC) aus humanen Vollblut erfolgte mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation nach einer Methode von Böyum (Böyum 1968). Das Blut wurde in Monovetten mit EDTA als Antikoagulant abgenommen. Die anschließende Aufarbeitung des Blutes erfolgte bei 4°C. Diese Vorgehensweise verringerte die Adhäsion der Monozyten und den damit verbundenen Zellverlust (Lundahl et al., 1995). Als Separationsmedium wurde Ficoll mit einer spezifischen Dichte von 1,077 verwendet.

Ficoll ist ein synthetisches hochmolekulares Polymer aus Zucker und Epichlorohydrin mit geringer Viskosität und einem minimalen osmotischen Druck. Die Separation der verschiedenen Blutzellen erfolgt durch die unterschiedlichen Sedimentationsraten der Zellen, die von der Zellgröße und zu einem geringeren Teil von der Zelldichte abhängt. Gefördert wird sie durch die Aggregation der Zellen. Ficoll führt zur Aggregation von Erythrozyten und separiert sie von den anderen Blutbestandteilen. Die Granulozyten werden durch ihre Größe, der Tendenz sich aneinander zu lagern und ihrer höheren Dichte von den anderen Blutbestandteilen getrennt. Lymphozyten und Monozyten, die eine geringere Dichte als Ficoll haben, bleiben hingegen oberhalb des Separationsmediums und sammeln sich dort zu einer weißlichen Interphase. Nach der Zentrifugation bilden sich vier Schichten (Abb.9): im oberen Bereich befinden sich 1) Thrombozyten in PBS und Plasma, dann folgen 2) die Lymphozyten und Monozyten als weißliche Schicht, darunter 3) Ficoll und als unterste Schicht 4) Erythrozyten und Granulozyten.



**Abb.9:** Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll. Darstellung der einzelnen Schichten vor und nach einer 30 min Zentrifugation.

**Tab.2:** Versuchsablauf der Dichtegradientenzentrifugation

Aufbau des Dichtegradienten	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. je 20 ml Ficoll-Trennlösung in sterile 50 ml Falcon-Röhrchen füllen</li> <li>2. EDTA Vollblut 1:2 mit PBS verdünnen</li> <li>3. das verdünnte Vollblut vorsichtig über die Ficoll-Trennlösung schichten</li> </ol>
Dichtegradienten-Zentrifugation	<ol style="list-style-type: none"> <li>4. zentrifugieren mit 2400 rpm, 30 min bei 4°C</li> </ol>
Aufnahme der Interphase	<ol style="list-style-type: none"> <li>5. die Interphase aus den Lympho- und Monozyten mit einer Pasteur-Pipette abnehmen, in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführen und mit 25 ml PBS auffüllen</li> </ol>
Waschen	<ol style="list-style-type: none"> <li>6. zentrifugieren mit 1800 rpm, 10 min bei 4°C</li> <li>7. Überstand absaugen</li> <li>8. Zellpellet mit 20 ml PBS resuspendieren</li> <li>9. zentrifugieren mit 1500 rpm, 10 min bei 4°C</li> <li>10. Zellen in 5 ml RPMI 1640 aufnehmen</li> </ol>

## 2.6 Vitalitätsbestimmung

Der Anteil vitaler mononukleärer Zellen wurde durch Anfärbung mit Trypanblau vor der Kultivierung bestimmt. Die Farbstoffaufnahme erfolgt nur bei toten Zellen durch Poren in der Zellmembran.

**Tab.3:** Pipettierschritte bei der Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau

Vitalitätsbestimmung	1. 20 µl Zellsuspension abnehmen und 20 µl Trypanblau (0,25%) zugeben
	2. Testansatz vorsichtig durchmischen und nach ca. 2 min nicht gefärbte Zellen in einer Neubauer-Zählkammer auszählen

## 2.7 Monozytenseparation

Da Monozyten eine starke Neigung zur Aggregation und Anhaftung an Kultur- und Reaktionsgefäßen haben, wurde versucht, eine möglichst physiologische und effektive Methode zur Monozytenisolation zu erarbeiten, um die Ergebnisse, die aus PMNC Kurzzeitkulturen gewonnen wurden, mit denen von isolierten Monozyten vergleichen zu können. Nachfolgend sind die verschiedenen ausgetesteten Methoden beschrieben.

### 2.7.1 Separation von Monozyten mit Percoll

Percoll ist ein Separationsmedium für die Dichtegradientenzentrifugation aus 15-30 nm großen Silica Partikeln, die mit Polyvenilpyrrolidon beschichtet sind. Es hat eine Dichte von 1,130 g/ml und kann mit NaCl- oder Saccharose Lösungen auf eine geringere Dichte eingestellt werden. Zur Monozytenisolation mittels Percoll wurden verschiedene Versuchsprotokolle untersucht.

Nach einer Vorschrift von Ulmer und Flad (Ulmer und Flad 1979) zur Isolation von Monozyten wurden Percoll-Lösungen mit Dichten von 1.062 bis 1.070 g/ml hergestellt und behutsam in einem 50ml Röhrchen übereinander geschichtet. Die PMNC wurden über einer Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll gewonnen und hinzugefügt. Anschließend erfolgte die

Zentrifugation der Zellen bei 1400 rpm ohne eine Bremsfunktion am Ende der Zentrifugenlaufzeit.

Denholm und Wolber (Denholm und Wolber, 1991) beschreiben eine Monozytenseparation mit einem kontinuierlichen Percoll Dichtegradienten, der sich während der Zentrifugation einstellt. Für die Separation wurden 10ml Percoll mit 1,65ml 10xHanks' Lösung vermischt und mit 0,1N HCL-Lösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die so erstellte Percoll-Lösung mit einer Dichte von 1,088 g/ml wurde mit den PMNC vermischt, die über einer Ficoll Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden. Die Zellen wurden mit 1500rpm für 25 min zentrifugiert, wobei die Zentrifuge ungebremst auslief.

### **2.7.2 Separation von Monozyten mit Fetalen Kälberserum (FKS) beschichteter Plastikoberflächen**

Kumagai und Mitarbeiter (Kumagai et al., 1979) nutzen in ihrer Separationsmethode die starke Adhärenz der Monozyten an Oberflächen, um eine Isolation der Zellen zu erreichen.

Für die Separationsversuche wurden periphere mononukleäre Zellen (PMNC) eingesetzt, die nach der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll gemäß dem oben aufgeführten Schema gewonnen wurden.

Zur Vorbereitung wurden Zellkulturflaschen über Nacht bei 4°C mit fetalem Kälberserum (FKS) beschichtet. Nach dem Entfernen des überschüssigen Kälberserums wurden die Zellkulturflaschen mit  $15 \times 10^6$  PMNC beschickt und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert, um eine Adhärenz der Monozyten zu ermöglichen. Die nicht adhärenen Zellen wurden anschließend durch mehrere Spülschritte mit eiskalter RPMI-Lösung entfernt. Das Ablösen der Monozyten erfolgte bei 4°C mit einer 0,2% EDTA- und 5% FKS Lösung. Eine detaillierte Übersicht über den Ablauf der Monozyten Separation gibt Tabelle 4.

**Tab.4:** Separation von Monozyten mittels Adhäsion

Beschichtung der Zellkulturflasche	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Den Boden einer 250 ml Zellkulturflasche mit 15 ml hitzeinaktivierten FKS bedecken und bei 4°C über Nacht lagern.</li> <li>2. Am folgenden Tag das überschüssige FKS entfernen und Flasche dreimal mit 10 ml PBS spülen.</li> </ol>
Zelladhäsion	<ol style="list-style-type: none"> <li>3. Zugabe von <math>1,5 \times 10^7</math> PMNC in 15 ml RPMI 1640 je Zellkulturflasche</li> <li>4. Inkubation für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% rel. Feuchte zur Adhärenz der Monozyten.</li> </ol>
Entfernung nicht adhärenter Zellen	<ol style="list-style-type: none"> <li>5. Absaugen des Zellüberstandes.</li> <li>6. Spülen der Zellkulturflasche mit 7 ml 4°C kaltem RPMI 1640 unter Verwendung eines Plattenschüttlers bei 400 rpm.</li> <li>7. Spülvorgang viermal wiederholen</li> </ol>
Ablösung der Monozyten	<ol style="list-style-type: none"> <li>8. Anhaftende Zellen mit 10 ml PBS unter Zusatz von 0,2% EDTA und 5% FKS für 30 min bei 4°C im Kühlschrank inkubieren.</li> <li>9. Gelöste Zellen in sterilen Röhrchen aufnehmen.</li> <li>10. Spülen mit 5 ml 4°C kaltem PBS mit Zusatz von 0,2% EDTA und 5% FKS unter Verwendung eines Plattenschüttlers bei 900 rpm, anschließend gelöste Zellen aufnehmen.</li> <li>11. Spülvorgang dreimal wiederholen.</li> </ol>

### 2.7.3 Monozytenseparation mit MACS (magnetic cell sorting)

Die magnetische Zellisolierung beruht auf einer Markierung von Zellen mit Polysaccharid-Eisenmoleküle tragenden spezifischen Antikörpern (MicroBeads). Beim Durchfluss durch eine Separationssäule mit ferromagnetischen Kern, die in einen Separator mit einem starken Magneten eingespannt wird, erfolgt ein Zurückhalten der Eisenmoleküle tragenden Zellen. Diese

können durch Herausnahme der Separationssäule aus dem magnetischen Feld gewonnen werden. Durch entsprechende Antikörper Cocktails können mit dieser Technik sowohl positive, als auch negative Separationen ausgeführt werden, bei denen die erwünschten Zellen nicht Antikörper beladen sind.

Im Rahmen einer positiven Selektion wurden Monozyten mit MicroBeads gekoppelten Antikörpern gegen den CD14 Rezeptor markiert und in der Separationssäule von den anderen polymorphkernigen Zellen getrennt.

Die negative Selektion der Monozyten erfolgte durch ein Gemisch von Antikörpern gegen T- und B-Zellen, Granulozyten, NK-Zellen, und Dentritische Zellen. Der Cocktail aus anti CD3, CD7, CD19, CD45RA, CD56 und anti IgE Antikörpern führte zu einem Zurückhalten der polymorphkernigen Zellen in der Separationssäule. Diese sog. „untouched“ Technik wurde durchgeführt, um eine unspezifische Aktivierung der Monozyten durch Antikörpermarkierung zu vermeiden. Tabelle 5 gibt eine Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte.

**Tab.5:** Monozytenseparation mit MACS

Inkubation mit Antikörpern	Resuspension der über Ficoll gewonnenen PMNC in 80 µl Puffer je 10 <sup>7</sup> Zellen. Inkubation mit 20 µl Anti-CD-14-MicroBeads je 10 <sup>7</sup> Zellen für 15 min bei 4°C.
Waschen	Puffer zugeben und mit 300xg zentrifugieren, Überstand vollständig entfernen und 500µl Puffer pro 10 <sup>8</sup> Zellen hinzufügen
Vorbereitung der Separationssäule	Selektionssäule in den MACS Separator einspannen und Säule mit Puffer spülen
Separation	Zellsuspension in die vorbereitete Säule geben und die negativ Fraktion auffangen
	Separationsschritt wiederholen und mit Puffer spülen
Gewinnung der selektionierten Zellen	Separationssäule aus dem Magnetfeld entfernen und die positiv selektionierten Zellen mit Puffer herauspülen

## 2.8 Phänotypisierung der Zellen

Die Phänotypisierung der peripheren mononukleären Zellen wurde mit CD14 FITC bzw. PE sowie mit CD3 PE bzw. FITC Oberflächenmarkern (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Färbungen erfolgten nach dem in Tabelle 6 aufgeführten Schema. Die Färbung der Oberflächenmarker erfolgte vor der Zellfixierung aufgrund fehlender Paraformaldehyd Gängigkeit der verwendeten Oberflächenantikörper.

**Tab.6:** Färbung zellulärer Oberflächenmarker

Waschen nach 12h Kultur	1. Auffüllen der Vertiefungen mit HBSS, zentrifugieren mit 1400 rpm 5 min bei RT und dekantieren des Überstandes
Färbung der Oberflächenmarker	2. Inkubation mit Antikörperlösungen für die Oberflächenantigene 20 µl pro 10 <sup>6</sup> Zellen für 30 min bei 4°C im Dunkeln
Entfernung der nicht gebundenen Antikörper	3. Auffüllen der Vertiefungen mit HBSS 4. Zentrifugieren mit 1200 rpm 3 min bei RT 5. Dekantieren des Überstandes, Wiederholung der Schritte 3-5
Fixierung der Zellen	6. Zugabe von eiskaltem 4% PFA für 5 min zur Fixierung, 50 µl pro Vertiefung 7. Auffüllen der Vertiefungen mit HBSS unter Zusatz von 0,1% Saponin, zentrifugieren mit 1700 rpm 3min bei RT, dekantieren des Überstandes und Schritt 7 wiederholen

## 2.9 Stimulation und Kultur

Die optimale Inkubationszeit zur Detektion der monozytären Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  wurde auf der Basis kinetischer Vorversuche ermittelt.

Dazu wurden die Monozyten wie in Tabelle 7 beschrieben auf Rundbodenplatten ausplattiert und mit einer Verdünnung der rekombinanten HCV-Proteine (1µg/ml) Core, NS3, NS4, NS5a, NS5b und mit LPS (10-200ng/ml) stimuliert. Unter gleichzeitiger Zugabe von 1µM Monensin wurde nach 6, 12, 24 und 36 Stunden Kultur im Brutschrank die Anzahl der Zytokin exprimierenden Monozyten durchflusszytometrisch gemessen.

**Tab.7:** Ausplattierung und Kultur

Zellzahl einstellen	1. gewaschene Zellen in Kulturmedium aufnehmen und Zellzahl auf $1,8 \times 10^6$ Zellen/ml einstellen
Ausplattierung der Zellen und Stimulation	2. Pipettieren von 150 $\mu$ l dieser Zellsuspension pro Vertiefung einer Rundbodenplatte 3. Zugabe von 1 $\mu$ M Monensin 4. Zugabe von 50 $\mu$ l Probenlösung: rekombinante HCV-Antigene (1 $\mu$ g/ml): -Core-, NS3-, NS4-, NS5a-, NS5b Kontrollen: - Mediumkontrolle - Pufferkontrolle der rekombinanten Proteine - LPS-Stimulation: 10 ng/ml für IL-10 100 ng/ml für IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 200 ng/ml für IL-12
Inkubation	5. Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% relative Feuchte für 12 h

## 2.10 Darstellung intrazellulärer Zytokine

Die intrazelluläre Zytokindarstellung ermöglicht eine semiquantitative Messung auf Einzelzellniveau und eine gleichzeitige Identifikation der Zytokin-produzierenden Zelle. Eine Beeinflussung der Messergebnisse durch eine vorangehende Zellseparation entfällt bei dieser Methode. Der durchflusszytometrische intrazelluläre Zytokinnachweis in Monozyten wurde in Anlehnung an eine Methode etabliert, die von Jung und Mitarbeitern (Jung et al., 1993) beschrieben wurde. Das Verfahren ermöglicht es, Zytokine intrazytoplasmatisch darzustellen, indem man Zellen in Gegenwart von Monensin kultiviert, so dass es zu einer intrazytoplasmatischen Akkumulation der Zytokine kommt. Die Zellen werden dann mit Paraformaldehyd fixiert und mit Saponin permeabilisiert, so dass dann eine direkte oder indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt werden kann.

### Unterbrechung der intrazellulären Transportvorgänge durch Monensin

Monensin ist ein Metabolit des Pilzes *Streptomyces cinnamomensis*, der sich aufgrund seiner Lipophilie in Zellmembranen einfügen kann. Dort übernimmt es die Aufgabe eines Diffusionstransporters, der wegen seiner Bindungsstellen für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und H<sup>+</sup> zu einer erhöhten

Durchlässigkeit für diese Kationen führt und dadurch eine Störung des herrschenden Konzentrationsgefälle nach sich zieht. In Folge des veränderten  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  Gehaltes in der Zelle kommt es zu einer starken Verlangsamung intrazellulärer Transportvorgänge sekretorischer Proteine (Tartakoff, 1983). Der Proteintransport wird im Golgi-Apparat unterbrochen mit der Folge, dass sich dort die sekretorischen Proteine anreichern. Die Neusynthese der Proteine bleibt jedoch unbeeinträchtigt (Pohlmann et al., 1984). Monensin führt daher durch die Akkumulation von Proteinen zu einer Signalverstärkung der intrazellulären Zytokindarstellung.

#### Fixation mit Paraformaldehyd

Die intrazelluläre Färbung der Zellen erfordert eine Stabilisierung der Zellen. Eine Fixation der Zellen mit Paraformaldehyd erhält die Membranstabilität und die Zellmorphologie. Im weiteren bleiben die Streulicht-Eigenschaften der Zellen in der Durchflusszytometrie unbeeinträchtigt (Halldén et al., 1989).

#### Permeabilisation mit Saponin

Für die intrazellulären Färbeschritte ist der Zusatz von Saponin zu den Puffern notwendig. Saponin ist ein pflanzliches Glykosid, das sich aufgrund seiner hohen Affinität zu Cholesterol in die Zellmembran einfügt. Dort führt es zu einer reversiblen Erhöhung der Durchlässigkeit für größere Moleküle, was für die Einschleusung von Antikörpern in die Zelle genutzt werden kann. Mit Saponin behandelte Plasmamembranen wiesen in der Elektronenmikroskopie ringförmige Komplexe mit einer 8nm großen zentralen Öffnung auf (Seeman, 1974). Das Saponin muss während der gesamten intrazellulären Färbeschritte präsent sein, da es sich um eine reversible Erhöhung der Durchlässigkeit handelt.

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die einzelnen Schritte der Färbung intrazellulärer Zytokine bei Monozyten. Die Färbung der intrazellulären Zytokine erfolgte im Anschluss an die Anfärbung der zellulären Oberflächenmarker.

**Tab.8:** Färbung intrazellulärer Zytokine mit direktmarkierten Antikörpern

Fixierung der Zellen	1. Zugabe von eiskaltem 4% PFA für 5 min zur Fixierung, 50 µl pro Vertiefung 2. Auffüllen der Vertiefungen mit HBSS mit 0,1% Saponin, zentrifugieren mit 1700 rpm 3min bei RT, dekantieren des Überstandes und den Arbeitsschritt wiederholen
Intrazelluläre Zytokinfärbung	3. Zugabe der farbmarkierten anti-Zytokin-Antikörper 0,25 µg/10 <sup>6</sup> Zellen (PharMingen) bzw. 1 µl/10 <sup>6</sup> Zellen (Hölzel) in 0,1% Saponin für 25 min in Dunkelheit auf dem Rüttler platzieren
Waschen	4. Auffüllen der Vertiefungen mit HBSS mit 0,1% Saponin, zentrifugieren mit 1700 rpm 3 min bei RT, dekantieren des Überstandes und den Arbeitsschritt wiederholen
Vorbereitung zur FACS-Messung	5. Zugabe von 100 µl HBSS (ohne Saponin) pro Vertiefung und Überführen in Rundbodenröhrchen (6 ml, Falcon) zur FACS-Messung

### 2.11 Spezifitätsprüfung der direkt farbmarkierten Antikörper

Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der anti-Zytokin-Antikörper an Strukturen der Monozytenoberfläche wurden Kontrollen mit und ohne eine Permeabilisation der Zellmembran durchgeführt. Abweichend von der oben ausgeführten Vorschrift (Tab.8) wurden die Färbeschritte ohne den Zusatz von Saponin als Detergens vorgenommen. Dadurch wurde ein Eindringen der anti-Zytokin-Antikörper in das Zytoplasma der Antigen- oder LPS-stimulierten Monozyten verhindert.

Die Spezifität der direkt farbmarkierten anti-Zytokin-Antikörper wurde darüber hinaus in Blockierungsversuchen an Antigen- und/oder LPS-stimulierten Monozyten untersucht. Im Rahmen der Zytokinfärbung wurde hier nach erfolgter Permeabilisierung ein Inkubationsschritt mit einem Überschuss unmarkierten anti-Zytokin-Antikörpern (1µg/10<sup>6</sup> Zellen) durchgeführt. Diese Antikörper entsprachen in ihrer Antigenspezifität und ihrem Isotyp exakt dem monoklonalen Antikörper, der für die Farbmarkierung verwandt wurde. Nach 30 Minuten Inkubation wurde zweimalig mit Saponin PBS-Lösung gewaschen, danach wurden die farbmarkierten anti-Zytokin-Antikörper hinzugeben. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß dem Protokoll der intrazellulären Zytokinfärbung (vgl. Tab.8).

## 2.12 Isotypkontrolle

Tote Zellen führen durch eine unspezifische Aufnahme von Antikörpern zu einer Verfälschung der Immunfluoreszenzmessungen. Weiterhin können pH-Wert- oder Temperaturveränderungen die Emissionen der Fluorochrome beeinflussen.

Daher dienen fluoreszenzmarkierte Kontrollantikörper entsprechender IgG Subtypen, die keine spezifischen Antigen bindenden Eigenschaften aufwiesen zur Isotypkontrolle. Anhand dieses Experimentes erfolgte die Einstellung der Mess-Parameter und des „Cut off“ ab dem die Zellen als positiv gewertet wurden. Die Position der Markierung wurde so gewählt, dass nicht mehr als 1% der gemessenen Ereignisse darüber hinausgingen.

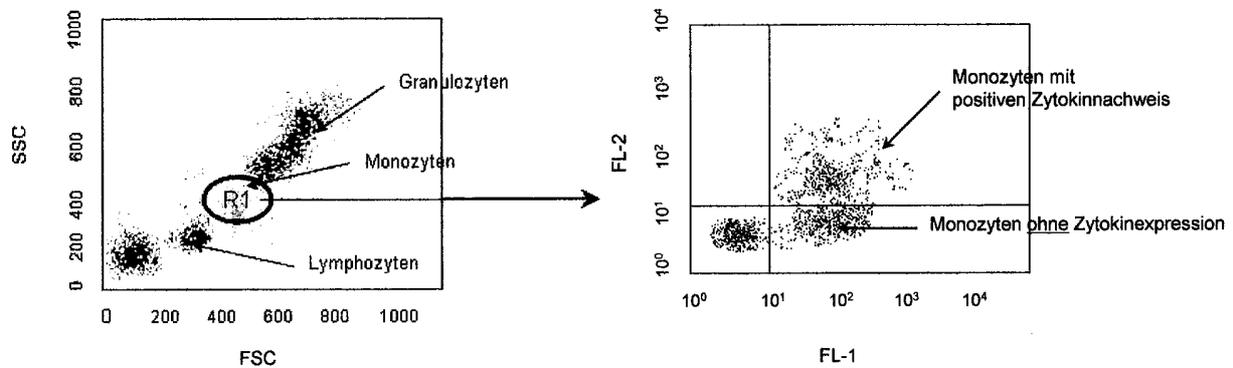
## 2.13 FACS-Auswertung

Die Monozytenpopulation wurde in einem ersten Zytogramm anhand der Granularität und Größe der Zellen identifiziert, indem die Seitwärtslichtstreuung gegen die Vorwärtslichtstreuung aufgetragen wurde. Die Messung erfolgte unter Einstellung eines Schwellenwertes (engl. Threshold), um Verunreinigungen und Zelltrümmer auszugrenzen.

Anhand der Isotypkontrolle wurde in das Zytogramm ein Quadrantenkreuz platziert, das eine Abgrenzung von Zellen mit spezifischer Fluoreszenz von Zellen mit unspezifischer Fluoreszenz ermöglichte.

Die Monozytenpopulation wurde mit einem elektronischen Fenster (R1) eingegrenzt und in einem zweiten Zytogramm bezüglich Fluoreszenz 1 (FL-1) und Fluoreszenz 2 (FL-2) dargestellt. Die Fluoreszenz 1 brachte die mit FITC markierten CD14<sup>+</sup> Zellen zur Darstellung, während die Fluoreszenz 2 die jeweils mit PE gefärbten intrazellulären Zytokine darstellte. (Abb.10).

Das Auswerteprogramm (CellQuest™) berechnete den prozentualen Anteil der sich innerhalb eines Quadranten befindlichen Zellen an der Gesamtpopulation. Der obere rechte Quadrant bildete die Schnittmenge der Zellen, die sowohl in Fluoreszenz 1 und Fluoreszenz 2 gemessen wurden. In diesem Quadranten des Zytogramms erfolgte die Darstellung der CD14<sup>+</sup> positiven Zellen, die Zytokine exprimierten (Abb.10).



**Abb.10:** Die linke Abbildung zeigt die Identifikation der Monozyten anhand der Größe und Granularität und die Eingrenzung der Population mittels des elektronischen Fensters R1. Die rechte Abbildung zeigt die CD14<sup>+</sup> positiven Monozyten ohne Zytokinexpression im rechten unteren Quadranten gemessen am FL-1 Detektor und die CD14<sup>+</sup> positiven Monozyten mit Zytokinexpression im rechten oberen Quadranten, der die Schnittmenge der am FL-1 und FL-2 Detektor positiven Zellen darstellt.

Die Analyse der intrazellulären Zytokine wurde nach Zählung von 5000 CD14<sup>+</sup> positiven Zellen mit der CellQuest<sup>TM</sup>-Software von Becton Dickinson durchgeführt.

Um einen Zytokinnachweis in Nicht-Monozyten auszuschließen, wurden die monozytären Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht identifiziert und das elektronische Messfenster auf die CD14<sup>+</sup> positiven Zellen gelegt. Gemessen wurde der Anteil der FL-1 und FL-2 positiven Zellen in der Pufferkontrolle und nach Stimulation mit einem rekombinaten HCV-Protein. Der Anteil der bereits im Puffer positiven Zellen wurde vom Anteil der positiven Zellen nach Stimulation subtrahiert.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Zelladhäsion**

Unter Verwendung herkömmlicher 96 Loch Rundbodenplatten konnten nach zwölfstündiger Kultur im Brutschrank keine Monozyten mehr für die durchflusszytometrische Analyse gewonnen werden. Die starke Adhäsion der Monozyten an Oberflächen erlaubte kein Ablösen der Zellen von den Zellkulturplatten.

Um eine Schädigung der Monozyten durch Ablöseverfahren mit Trypsin-EDTA zu vermeiden, wurde nach einer Möglichkeit der Monozytenkultur gesucht, die ein Anhaften der Zellen verhindert.

Das Problem konnte durch die Verwendung von Zellkulturplatten mit einer hydrophoben Oberfläche gelöst werden. Die spezielle Oberflächenbeschichtung der Zellkulturplatten (Sarstedt, Wiesbaden) verhinderte eine Zelladhärenz und ermöglichte ein einfaches Ablösen der Monozyten für die weiteren Untersuchungen<sup>1</sup>.

### **3.2 Optimierung des intrazytoplasmatischen Zytokinnachweises**

Für den durchflusszytometrischen intrazellulären Zytokinnachweis bei Monozyten wurde die Methode von Jung und Mitarbeitern (Jung et al., 1993) modifiziert, indem wir eine direkte Immunfluoreszenz durchführten. Denn die intrazelluläre Zytokindarstellung mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz führte bei Monozyten vermutlich durch Bindung via Fc-Rezeptoren zu einer unspezifischen Bindung der Antikörper auf der Zelloberfläche. Die Inkubation der Monozyten mit einem monoklonalen farbmarkierten sekundären Antikörper, ohne Verwendung eines anti-Zytokin-Antikörpers und ohne Permeabilisation der Zellmembran durch Saponin, führte in Kontrollexperimenten zu 80% positiven Monozyten. Blockierungsversuche mit unspezifischem IgG erbrachten keine befriedigende Reduktion der unspezifischen Signale.

<sup>1</sup> Persönliche Kommunikation mit A.Scriba aus der Arbeitsgruppe von B.Steiniger, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Marburg.

Die Umstellung auf eine direkte Färbung mit farbkonjugierten monoklonalen anti-Zytokin-Antikörpern führte zur Problemlösung, denn hier zeigten sich in Kontrollexperimenten mit unstimulierten und stimulierten Monozyten - bei fehlender Permeabilisation der Zellmembran durch Saponin - keine unspezifischen Fluoreszenzsignale (<1% falsch positiver Zellen).

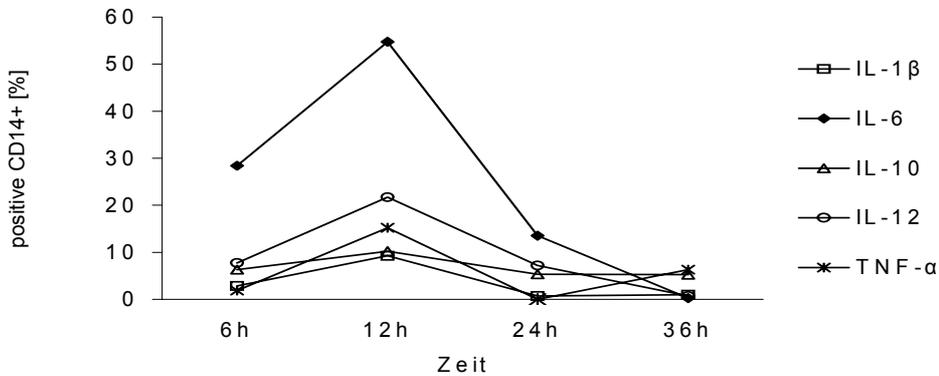
### **3.2.1 Ermittlung der Inkubationszeit**

Die optimale Inkubationszeit zur Detektion der monozytären Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  wurde nach Stimulation mit den HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a, NS5b und nach Stimulation mit LPS ermittelt. Dazu wurde die Anzahl der Zytokin exprimierenden Monozyten durchflusszytometrisch nach 6, 12, 24 und 36 Stunden gemessen.

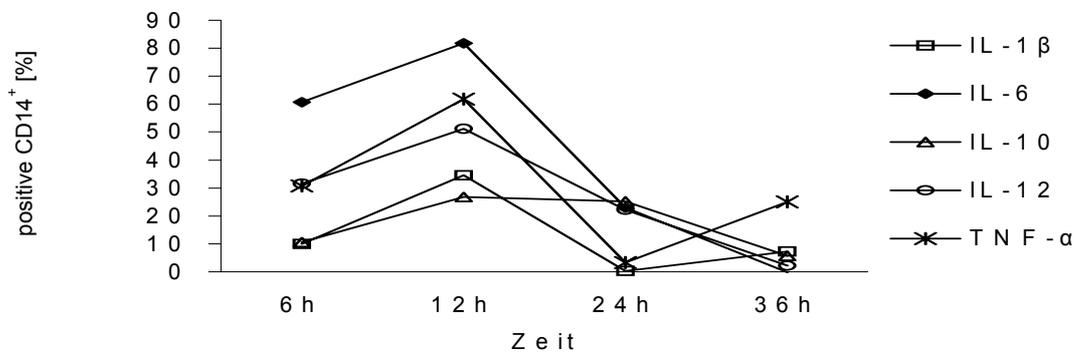
Bereits nach 6h Stimulation konnten die untersuchten Zytokine durchflusszytometrisch in den Monozyten nachgewiesen werden. Die Anzahl der IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  exprimierenden Monozyten nahm bis 12 Stunden Inkubationszeit deutlich zu. In den weiteren Messungen nach 24 und 36 Stunden Inkubation war der Anteil Zytokin-produzierender Monozyten rückläufig. Abbildung 11 zeigt den Zeitverlauf der Zytokininduktion exemplarisch nach einer antigenen Stimulation mit NS5a.

Auch die LPS-Stimulation zeigte nach 12 Stunden Inkubationszeit ein Maximum der für IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  positiven Monozyten (Abb.12).

Als optimale Inkubationszeit für die monozytäre Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  wurde für die weiteren Untersuchungen daher eine zwölfstündige Kultur gewählt.



**Abb.11:** Die monozytäre Zytokinproduktion nach Stimulation mit HCV-Proteinen (1 $\mu$ g/ml) am Beispiel von NS5a. Dargestellt ist die Anzahl der durchflusszytometrisch gemessenen Zytokin positiven CD14+ Monozyten zu unterschiedlichen Messzeitpunkten am Beispiel eines Patienten gemessen in einem dreifachem Versuchsansatz.

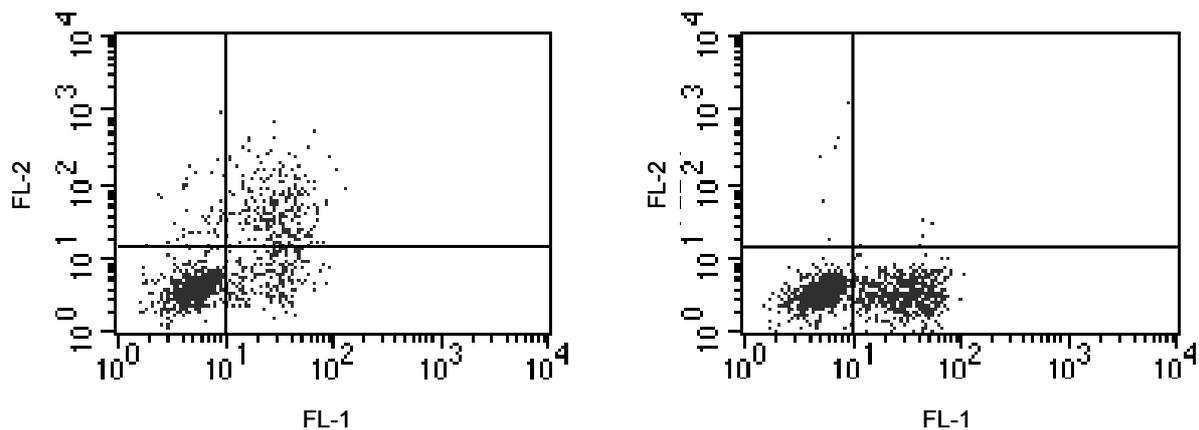


**Abb.12:** Die monozytäre Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS (10-200ng/ml). Dargestellt ist die Anzahl der Zytokin positiven CD14+ Monozyten zu unterschiedlichen Messzeitpunkten.

### 3.2.2 Spezifitätsprüfung der direktmarkierten Antikörper

Die Spezifität der direkt farbmarkierten anti-Zytokin-Antikörper wurde in Blockierungsversuchen an Antigen- oder LPS-stimulierten Monozyten untersucht. Im Rahmen der Zytokinfärbung wurde ein Inkubationsschritt mit unmarkierten anti-Zytokin-Antikörpern vorgenommen. Diese Antikörper entsprachen der Spezifität und dem Klon der farbmarkierten anti-Zytokin-Antikörper. Die

nachfolgende Zugabe von farbmarkierten anti-Zytokin-Antikörpern führte zu keinem Farbsignal in der durchflusszytometrischen Messung der Monozyten. Die entsprechenden Bindungsstellen der Zytokine waren bereits durch unmarkierte Antikörper besetzt (Prussin und Metcalf, 1995). Abb. 13 zeigt ein repräsentatives Versuchsergebnis am Beispiel von Interleukin-6.



**Abb.13:** Dot plot Darstellung zur Überprüfung der Antikörperspezifität am Beispiel von IL-6. Im rechten unteren Quadranten sind jeweils die mit FITC angefärbten CD14+ Monozyten dargestellt, die am FL-1 Detektor des Durchflusszytometers nachgewiesen werden können. Der rechte obere Quadrant zeigt die Schnittmenge der am FL-2 Detektor gemessenen PE-positiven, d.h. Zytokin-positiven und am FL-1 Detektor gemessenen CD14+ Monozyten.

Um die Spezifität des gemessenen Fluoreszenzsignals zu überprüfen, wurden die Monozyten mit unmarkierten Zytokin Antikörpern vorinkubiert. Nach zwölfstündiger Stimulation und Kultur wurden die farbmarkierten anti-Zytokin-Antikörper hinzugegeben (linke Abbildung). Die rechte Abbildung zeigt die Messergebnisse nach zwölfstündiger Stimulation ohne vorherige Vorinkubation mit unmarkierten Antikörpern. Nach anschließender Inkubation mit farbmarkierten anti-Zytokin-Antikörpern kommen im rechten oberen Quadranten jetzt keine Zellen mehr zur Darstellung, d.h. die farbmarkierten Antikörper haben weder am Zytokin noch unspezifisch gebunden.

### 3.2.3 Monensintoxizität

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die konzentrationsabhängige toxische Wirkung von Monensin auf Monozyten ermittelt.

Mit Hilfe von 7AAD können im Rahmen der Durchflusszytometrie avitale Zellen nachgewiesen werden, da nur abgestorbene Zellen diesen Stoff aufnehmen.

Nach einer Zellseparation aus Vollblut, einer zwölfstündigen Inkubation und einer anschließenden Aufarbeitung für die durchflusszytometrische Messung konnten im Mittel im Medium ohne Monensin 16,9% avitale Monozyten gemessen werden. Unter Zugabe von 1 $\mu$ M Monensin fanden sich nach 12 Stunden Inkubation 18,5% tote Monozyten. Die Erhöhung der

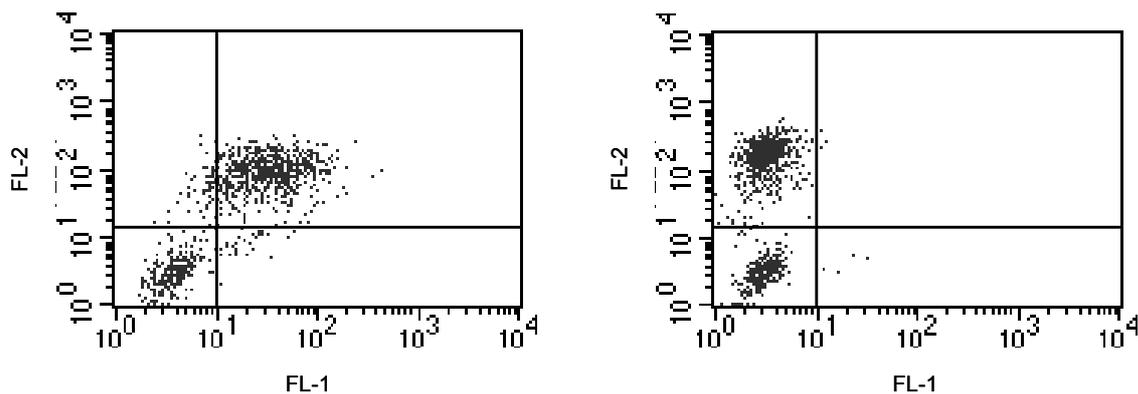
Monensinkonzentration auf 2 $\mu$ M führte zu einem signifikanten Anstieg der avitalen Monozyten auf 21,0% (Wilcoxon-Test  $p=0,02$ ). Die weitere schrittweise Erhöhung der Monensinkonzentration ging mit einer deutlichen Zunahme der toten Monozyten einher (vgl. Tab.9). Unter einer Konzentration von 5 $\mu$ M Monensin konnten schließlich etwa 30% avitale Monozyten nachgewiesen werden.

Monensin	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M	3 $\mu$ M	4 $\mu$ M	5 $\mu$ M
CD14+/7AAD+ %	16,94	18,54	21,01	23,67	24,36	29,44
SEM	1,94	4,21	4,55	6,15	5,81	6,82

Tab.9: Zunahme der avitalen CD14<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit von der Monensinkonzentration nach 12 Stunden Zellkultur (n = 6).

### 3.2.4 Einfluss von Monensin auf den Nachweis von IL-1 $\beta$

Am Beispiel von IL-1 $\beta$  wurde der Einfluss von Monensin auf die intrazelluläre Zytokindarstellung untersucht. LPS stimulierte Monozyten wurden nach zwölfstündiger Kultur mit und ohne Zugabe von 1 $\mu$ M Monensin im Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass IL-1 $\beta$  in den stimulierten Monozyten nicht nachgewiesen werden konnte, wenn Monensin während der Inkubation fehlte (Abb.14).



**Abb.14:** Dot plot Darstellung zum Einfluss von Monensin auf den intrazellulären Nachweis von IL-1 $\beta$ . Die linke Abbildung zeigt den Zytokinnachweis unter der Zugabe von 1 $\mu$ M Monensin zur zwölfstündigen Stimulation mit LPS. Im rechten oberen Quadranten kommt die Schnittmenge der am FL-1 Detektor gemessenen Zytokin positiven Zellen und der am FL-2 Detektor gemessenen CD14<sup>+</sup> Monozyten zur Darstellung.

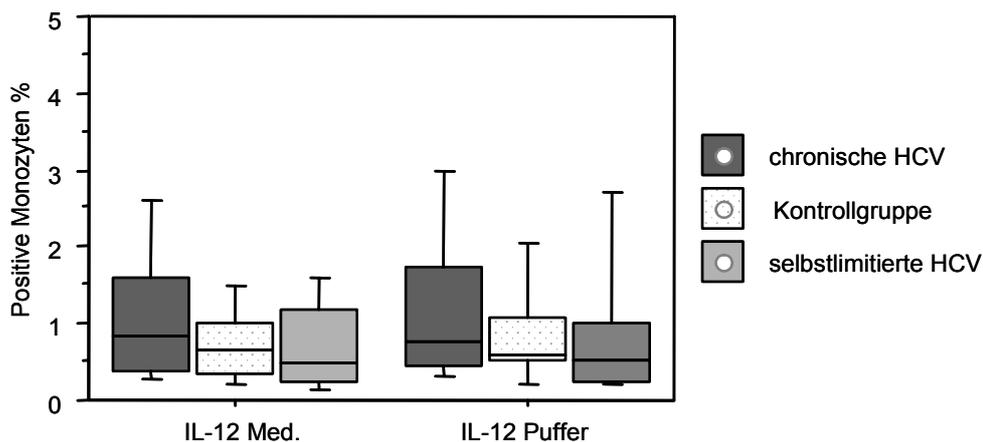
Die rechte Abbildung zeigt das Versuchsergebnis nach einer zwölfstündigen Stimulation mit LPS ohne Zugabe von Monensin. Im rechten oberen Quadranten kommen hier keine Zellen zur Darstellung, d.h. intrazellulär konnte kein IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden.

### 3.2.5 Induktion der IL-12 Synthese

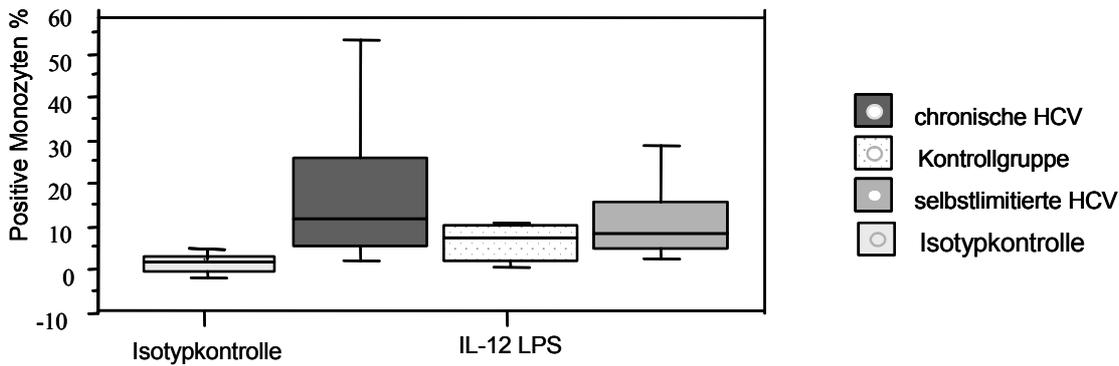
In Kontrollexperimenten wurde der Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die IL-12 Induktion untersucht, um eine optimierte Positivkontrolle zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde IFN- $\gamma$  in Konzentrationen von 2-10ng/ml an unterschiedlichen Zeitpunkten während der zwölfstündigen Stimulation mit HCV-Antigenen hinzugegeben. Die durchflusszytometrische Analyse der Ergebnisse zeigte jedoch einen hohen Verlust von CD14<sup>+</sup> Zellen unter Zunahme von toten Zellen. Eine Verstärkung der Interleukin-12 Sekretion konnte nicht erzielt werden. Daher wurde dieser Versuchsansatz nicht weiter verfolgt.

### 3.2.6 Medium- und Pufferkontrollen

Um eine unspezifische Stimulation der Monozyten durch Verunreinigungen des Mediums oder des Puffers auszuschließen, wurden Kontrollexperimente ohne Stimulation durchgeführt, welche die Zytokininduktion durch das Medium bzw. den Puffer untersuchten. Am Beispiel von Interleukin-12 lässt sich zeigen, dass das Kulturmedium und die Pufferträgerlösung der HCV-Proteine keine relevanten mitogenen Eigenschaften aufwiesen (Abb.15). Zum Vergleich ist in Abbildung 16 die monozytäre Interleukin-12 Ausschüttung nach LPS Stimulation dargestellt.



**Abb.15:** Vergleich der Medium und Puffer Kontrollen am Beispiel von IL-12 (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab).



**Abb.16:** Monozytäre Zytokin Produktion nach Stimulation mit LPS ( 200ng/ml) am Beispiel von Interleukin-12 (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab).

### 3.3 Monozytenseparation

#### 3.3.1 Monozytenseparation mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung von separierten Monozyten aus polymorphkernigen Zellen (PMNC) wurden verschiedene Versuchsansätze verfolgt.

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Percoll als Trennmedium wurde versucht, eine Separation der Zellen zu erzielen. Ulmer und Flad beschreiben ein Verfahren zur Isolation von Monozyten durch die Schichtung von Percoll-Lösungen mit Dichten von 1.062 bis 1.070 g/ml (Ulmer und Flad, 1979). Nach entsprechender Durchführung des Versuchsprotokolls fehlte die Ausbildung abgrenzbarer Zellbanden zwischen den verschiedenen Dichtestufen des Separationsmediums. Die durchflusszytometrische Auswertung der Versuche ergab Monozyten in einer Reinheit von nur ca. 40%.

Ein modifiziertes Vorgehen beschreiben Pertoft und Mitarbeiter, die zur Monozytenseparation die Percoll Trennlösung auf eine Dichte von 1.064 g/ml einstellen (Pertoft et al., 1980). Auch mit dieser Vorgehensweise konnte nur eine Reinheit der Monozyten von ca. 40% erreicht werden. Daher wurden beide Verfahren nicht weiter verfolgt.

### **3.3.2 Monozytenseparation mittels Adhäsion**

Kumagai und Mitarbeiter beschreiben eine Separationsmethode, die auf der ausgeprägten Tendenz der Monozyten zum Anhaften an Oberflächen beruht (Kumagai et al., 1979). Mit fetalem Kälberserum beschichtete Zellkulturflaschen wurden mit PMNC beschickt und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach mehreren Spülschritten erfolgte das Ablösen der Monozyten mit einer 0,2% EDTA / 5% FKS Lösung, die für je 30min hinzugegeben wurde.

Die durchflusszytometrische Überprüfung der abgelösten Zellen erbrachte eine Reinheit der Monozyten von 70-80%. Die Vitalitätsbestimmung der isolierten Monozyten ergab nach einer Färbung mit Trypanblau ca. 95% vitale Zellen.

Mikroskopische Kontrollen der Zellkulturflaschen zeigten, dass 50-60% der adhärenen Zellen nicht mehr abgelöst werden konnten, was den Einsatz großer Blutmengen erforderte.

### **3.3.3 Monozytenseparation mittels Immunomagnetischer Methoden**

Die Immunomagnetische Zellseparation erlaubt die Separation von Monozyten aus geringen Zellmengen über eine positive Selektion oder eine negative Selektion mit Hilfe von ferromagnetischen Separationssäulen.

Die Positivselektion der Monozyten erfolgt durch die Bindung von Antikörpern an den CD14 Rezeptor der Monozyten. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Separation von 90-95% reinen Monozyten.

Um eine Aktivierung der Monozyten durch die Antikörperbindung zu vermeiden, wurde das Verfahren der Negativselektion gewählt, welches durch ein Gemisch von Antikörpern alle „Nicht-Monozyten“ in der Separationssäule zurückhält. Über diesen indirekten Separationsweg konnten >90% reine Monozyten gewonnen werden.

Methoden	Grad der Aufreinigung in Prozent
Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll	40
Adhäsionsverfahren	70-80
Immunomagnetische Methoden	90-95

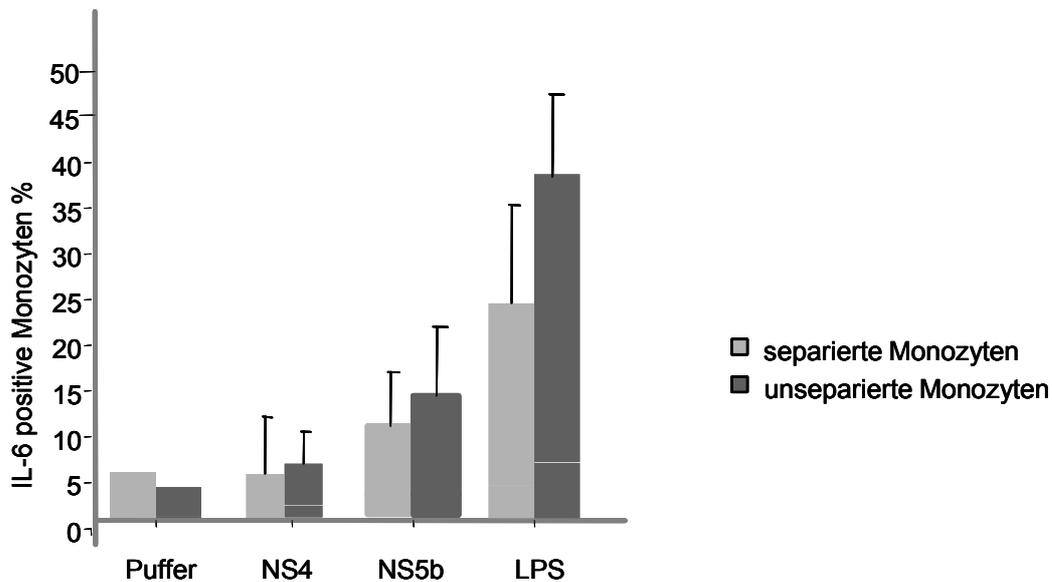
**Tab.10:** Ergebnisse der Monozytenaufreinigung mit Hilfe unterschiedlicher Separationsverfahren.

### 3.3.4 Vergleich der Zytokinexpression bei isolierten und nicht isolierten Monozyten

Die Untersuchungen zur spontanen und zur antigenen Stimulation mit HCV-Proteinen und zur LPS Stimulation wurden an Monozyten in Anwesenheit von T-Zellen durchgeführt, um ein möglichst natürliches Zellmilieu zu erhalten. Darüber hinaus wurden Kontrollexperimente mit immunomagnetisch isolierten Monozyten durchgeführt, um die Zytokinproduktion isolierter Monozyten beurteilen zu können.

Der Vergleich zwischen separierten und nicht separierten Monozyten zeigte bei exemplarisch durchgeführten Experimenten (n=3) nach Stimulation mit NS4 oder NS5b  $4,0\% \pm 3,2$  bzw.  $9,0\% \pm 6,9$  Interleukin-6 positive Monozyten, während bei den nicht aufgereinigten Monozyten nach Stimulation mit NS4  $4,5\% \pm 1,3$  bzw. nach Stimulation mit NS5b  $12,5\% \pm 6,2$  der Monozyten positiv für den Zytokinnachweis waren.

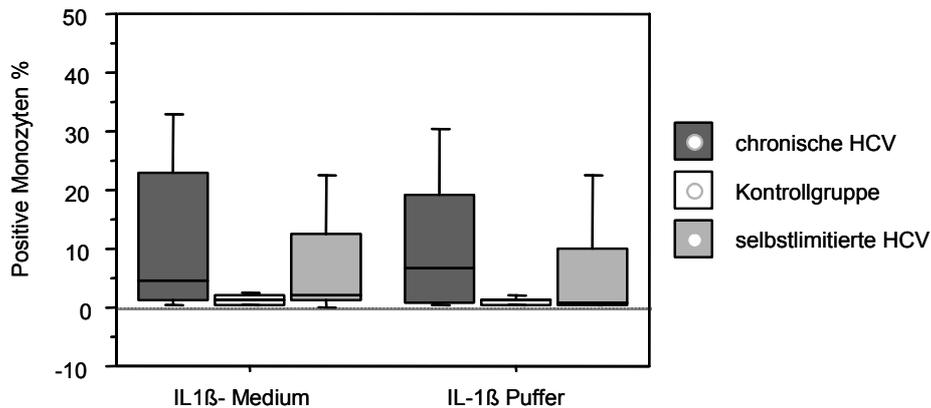
Eine unspezifische Stimulation mit LPS führte bei den separierten Monozyten zu  $21,1\% \pm 10,5$  Interleukin-6 positiven Monozyten und bei den nicht separierten Monozyten zu  $37,9\% \pm 9,5$  Zytokin positiven Monozyten (Abb.17).



**Abb.17:** Vergleich der Zytokinexpression am Beispiel von IL-6 bei separierten und nicht separierten Monozyten (n=3) mit Standardabweichung. Stimulation mit NS4 und NS5b mit je 1 µg/ml und mit LPS (100ng/ml).

### 3.4 Spontane monozytäre Zytokinexpression bei unterschiedlichem Verlauf der Hepatitis C Virus Infektion

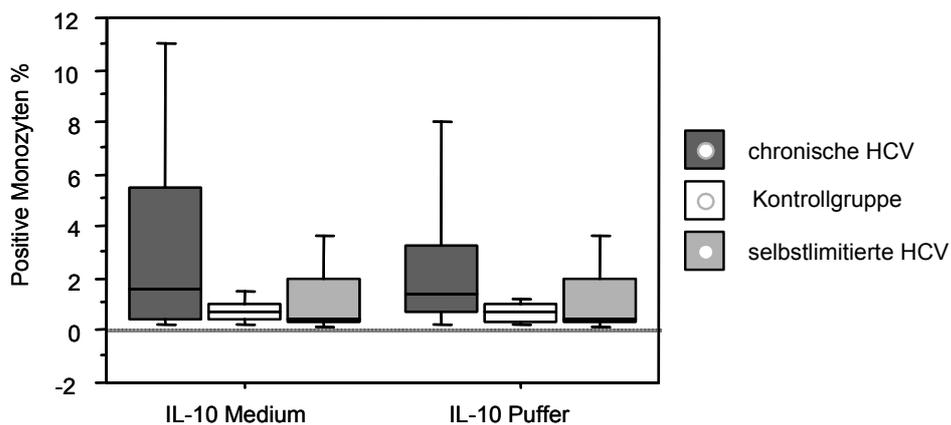
Die spontane Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-12 zeigte eine breite individuelle Variabilität besonders in der Gruppe der Patienten mit chronischer Hepatitis C. Die messbare spontane Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 war in der Gruppe der Patienten mit chronischer Hepatitis C höher als bei den avirämischen anti-HCV seropositiven Personen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen konnten nur für IL-1 $\beta$  und IL-10 gemessen werden. Mit 22,7 % zytokinpositiven Monozyten war die spontane IL-1 $\beta$  Expression in der Gruppe der chronischen Hepatitis C gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (p=0,005) (Abb.18).



**Abb.18:** Spontane IL-1 $\beta$  Expression in den Medium- und Puffer-Kontrollen (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab).

Die spontane IL-10 Produktion war bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C zweifach gegenüber den avirämischen anti-HCV seropositiven Patienten ( $p=0,003$ ) bzw. dreifach gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ( $p=0,002$ ) (Abb.19).

Die Anzahl der Monozyten mit einer spontanen Expression von IL-12 war allgemein niedrig und ohne signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen.



**Abb.19:** Spontane IL-10 Expression in Medium- und Puffer-Kontrollen (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab).

### **3.5 Vergleich der HCV-Virusantigen induzierten monozytären Zytokinexpression bei unterschiedlichem Verlauf der Hepatitis C Virus Infektion**

Die monozytäre IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  Expression wurde nach einer Stimulation mit den HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b bei 23 Patienten mit chronisch replikativer Hepatitis C (Gruppe 1) und bei 14 avirämischen anti-HCV positiven Patienten (Gruppe 2) untersucht.

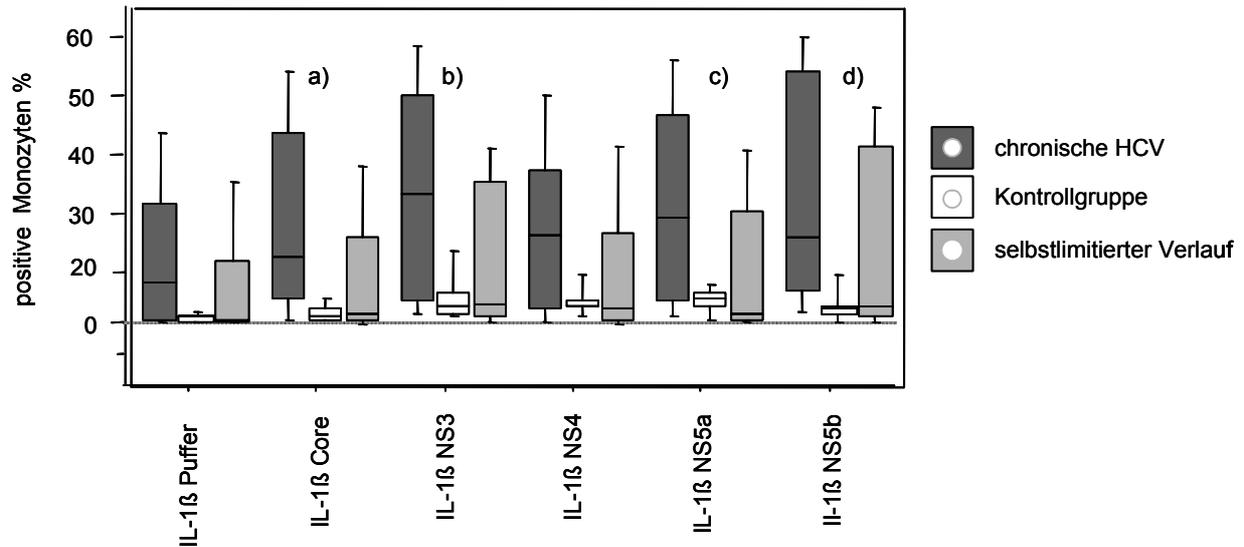
Die Kontrollgruppe wurde von 11 gesunden Personen gebildet.

#### 3.5.1 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre Interleukin-1 $\beta$ Expression

Die Untersuchung bezüglich der IL-1 $\beta$  produzierenden Monozyten, ergab nach antigenspezifischer Stimulation mit den HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b eine 2-6 fache Zunahme der Zytokin positiven Zellen in der Gruppe der Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Abb.20).

Im Einzelnen führte die Inkubation mit dem HCV-Core Protein und mit den Nichtstrukturbildenden HCV-Proteinen NS3, NS5a und NS5b bei Patienten mit chronischer Hepatitis C jeweils zu einer signifikanten Zunahme mit Verdopplung der IL-1 $\beta$  produzierenden Monozyten im Vergleich zu den avirämischen anti-HCV seropositiven Patienten (Tabelle 11).

Die Stimulation mit NS4 führte zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden zwischen dem chronischem und selbstlimitiertem Verlauf der Hepatitis C.

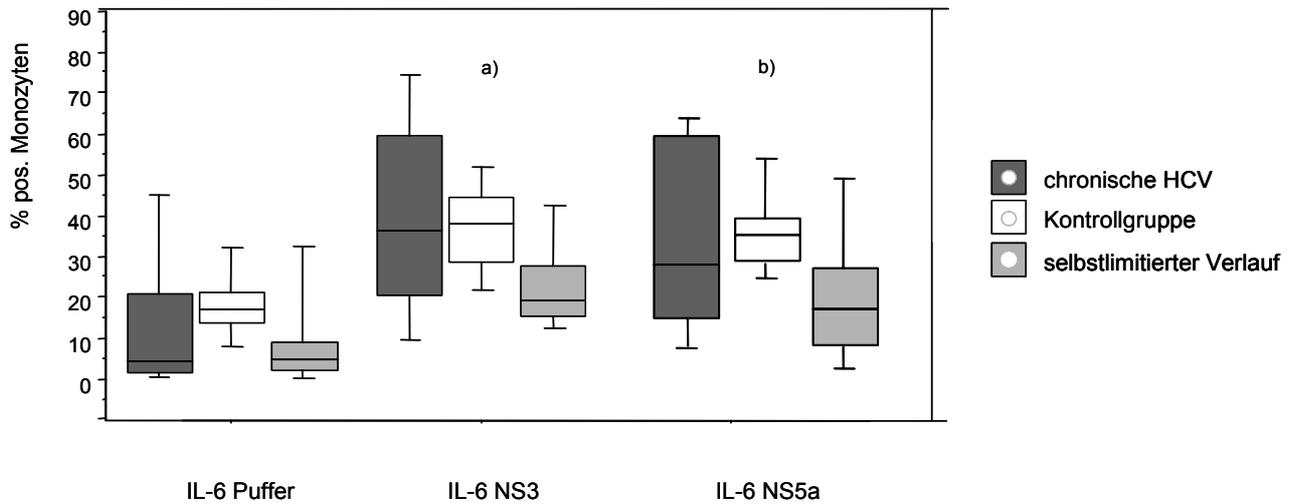


**Abb.20:** Monozytäre IL-1 $\beta$  Expression mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen chronischem und selbstlimitiertem Verlauf der HCV-Infektion nach Stimulation mit den HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b in einer Konzentration von 1 $\mu$ g/ml (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab). a)  $p=0,006$ ; b)  $p=0,01$ ; c)  $p=0,02$ ; d)  $p=0,002$

### 3.5.2 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre Interleukin-6 Expression

Die Interleukin-6 Synthese ließ sich bei Patienten mit chronischer Hepatitis C nach Stimulation mit NS3 im Mittel in 39% der Monozyten induzieren, wohingegen im selbstlimitierten Krankheitsverlauf nur in 21,8% der Monozyten IL-6 nach NS3-Stimulation nachgewiesen werden konnte. Die Unterschiede waren statistisch signifikant ( $p=0,01$ ).

Eine Stimulation mit dem HCV-Protein NS5a führte bei Patienten mit einem chronischen Krankheitsverlauf in 32% der Monozyten zu einem Nachweis von Interleukin-6. Im selbstlimitierten Krankheitsverlauf stieg nach Inkubation mit NS5a die Zahl der IL-6 positiven Monozyten nur auf 20% an, so dass sich eine statistische Signifikanz von  $p=0,008$  ergab (Abb.21, Tabelle11).

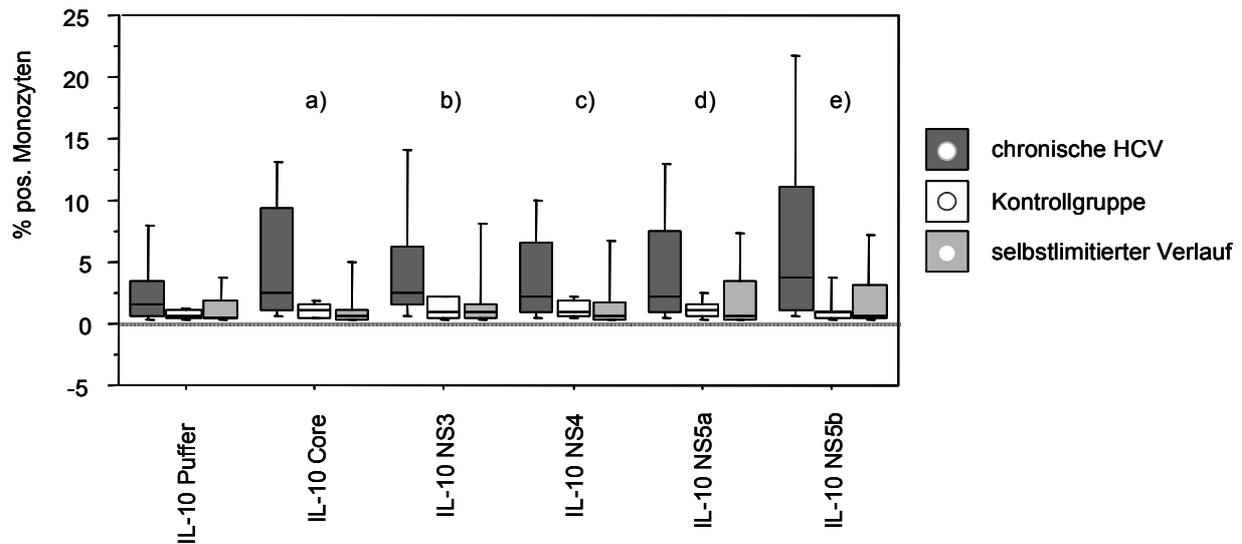


**Abb.21:** Monozytäre IL-6 Expression mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen chronischem und selbstlimitiertem Verlauf der HCV-Infektion nach Stimulation mit NS3 und NS5a in Konzentrationen von 1µg/ml (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab). a)  $p=0,01$ ; b)  $p=0,008$

### 3.5.3 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre Interleukin-10 Expression

Die monozytäre IL-10 Expression zeigte nach antigener Stimulation mit den HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b bei Patienten mit einem chronischen Krankheitsverlauf gegenüber den beiden anderen Patientenkollektiven jeweils eine statistisch signifikante Zunahme (Tabelle 11).

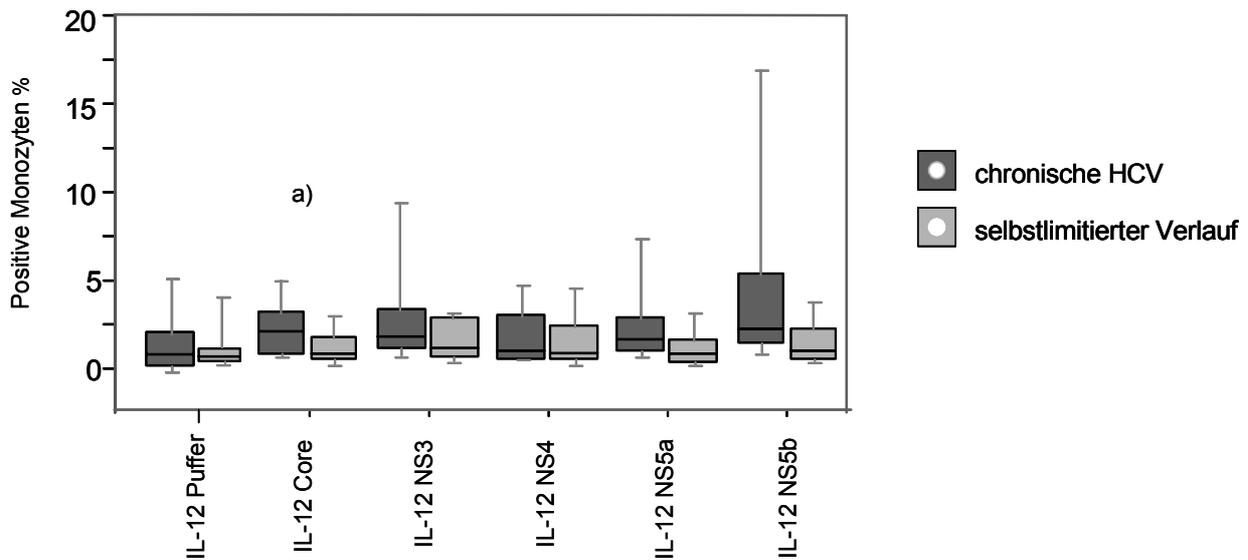
Die HCV-Proteine NS3, NS4 und NS5a führten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C jeweils zu einem etwa zweifach höheren Prozentsatz an Interleukin-10 exprimierenden Monozyten gegenüber avirämischen anti-HCV seropositiven Patienten oder gegenüber der Kontrollgruppe. Zu dem stärksten Anstieg der monozytären IL-10 Expression führte die Stimulation mit den HCV-Proteinen Core und NS5b. Unter der Einwirkung von Core oder von NS5b konnte eine etwa dreifache Zunahme der IL-10 produzierenden Monozyten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C gegenüber den beiden anderen Studiengruppen gemessen werden ( $p=0,003$  bzw.  $p=0,004$ ) (Abb.22).



**Abb.22:** Monozytäre IL-10 Expression mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen chronischem und selbstlimitiertem Verlauf der HCV-Infektion nach Stimulation mit den HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b in Konzentrationen von 1µg/ml (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab). a)  $p < 0,003$ ; b)  $p < 0,01$ ; c)  $p < 0,04$ ; d)  $p < 0,03$ ; e)  $p < 0,004$

### 3.5.4 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre Interleukin-12 Expression

Die Anzahl der IL-12 exprimierenden Monozyten zeigte nur nach einer antigenen Stimulation mit Core signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Verläufen der Hepatitis C (Tabelle 11). Die Stimulation mit dem HCV-Core Protein führte bei Patienten mit einem chronischen Krankheitsverlauf der Hepatitis C zu einer etwa zweifachen Zunahme der IL-12 positiven Monozyten im Vergleich zu Patienten mit einem selbstlimitierten Krankheitsverlauf (Abb.23). Die Inkubation mit den HCV-Proteinen NS3, NS4, NS5a und NS5b führte zu keiner signifikanten Zunahme der monozytären IL-12 Produktion zwischen den Studiengruppen.



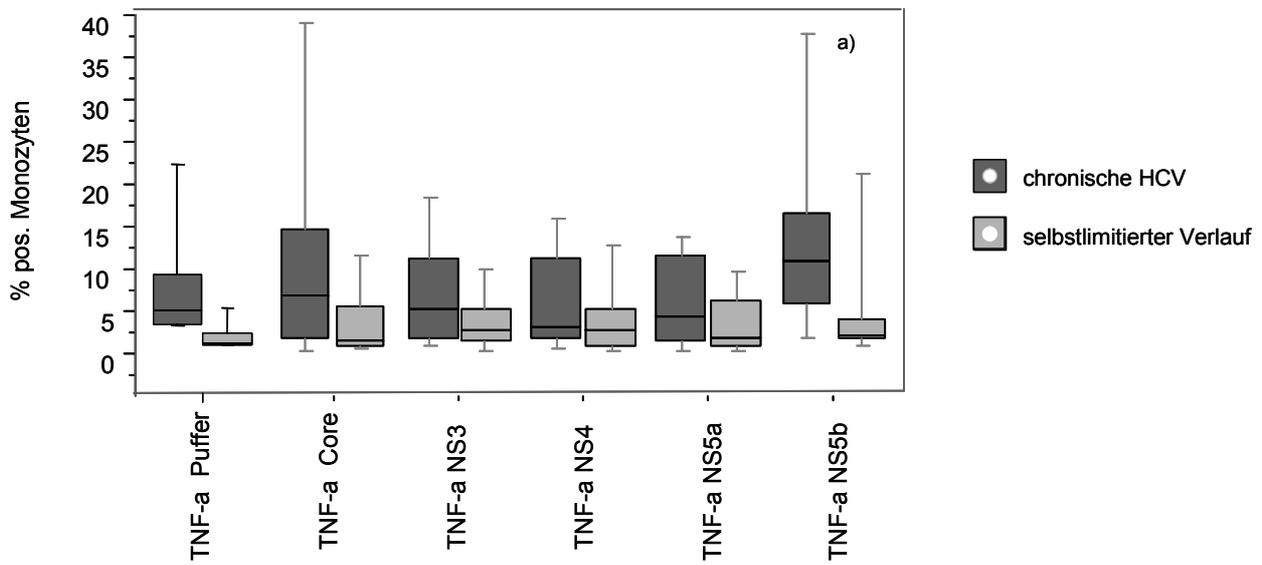
**Abb.23:** Monozytäre IL-12 Expression mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen chronischem und selbstlimitiertem Verlauf der HCV-Infektion nach Stimulation mit dem HCV-Protein Core (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab). a)  $p=0,02$ . Die HCV Proteine Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b wurden in Konzentrationen von  $1\mu\text{g/ml}$  eingesetzt.

### 3.5.5 HCV-Virusantigen induzierte monozytäre TNF- $\alpha$ Expression

Unter einer antigenen Stimulation mit NS5b konnte bei Patienten mit chronischer Hepatitis C eine statistisch signifikante Zunahme der monozytären TNF- $\alpha$  Expression im Vergleich zu den beiden anderen Studiengruppen gemessen werden ( $p=0,001$ )(Abb.24).

Eine Stimulation mit Core führte zu einer etwa vierfachen Zunahme der TNF- $\alpha$  positiven Monozyten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C mit signifikanten Unterschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 11).

Die Inkubation mit den HCV-Virusproteinen NS3, NS4 und NS5a führten zu keinem statistisch signifikantem Anstieg der TNF- $\alpha$  Produktion zwischen den Studiengruppen (Tabelle 11).



**Abb. 24:** Monozytäre TNF- $\alpha$  Expression nach Stimulation mit Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b in Konzentrationen von 1  $\mu$ g/ml. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen chronischem und selbstlimitiertem Verlauf der HCV-Infektion nur nach einer Stimulation mit NS5b (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab) a)  $p=0,001$ .

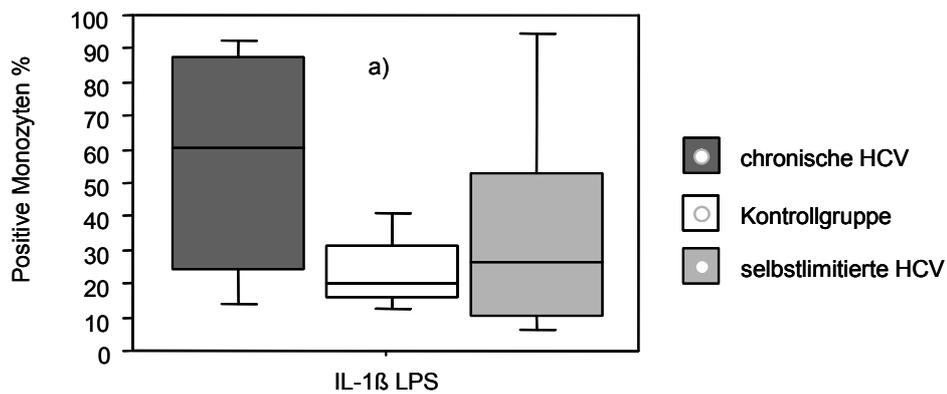
	<u>Chronische Hepatitis C (n=23)</u>	<u>Avirämische anti-HCV Seropositive (n=14)</u>	<u>Kontrollen (n=11)</u>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>			
Spontane Expression	22.7 [11.7-33.6]	12.4 [0.9-23.8]	2.1 [1.2-3.1]
Expression nach Stimulation mit			
Core	35.9 [22.7-49.1]	15.4 [2.6-28.2]	c
NS3	40.6 [26.4-54.9]	19.3 [5.4-33.2]	c
NS4	31.2 [18.9-43.4]	17.9 [3.3-32.5]	c
NS5a	35.6 [22.3-49.0]	17.4 [3.3-31.4]	c
NS5b	44.2 [29.5-58.9]	22.3 [5.9-38.7]	c
LPS	55.5 [42.2-68.8]	36.2 [17.6-54.7]	24.1 [16.5-31.8]
<b>IL-6</b>			
Spontane Expression	13.6 [5.5-21.7]	11.7 [2.6-20.8]	18.5 [10.9-26.0]
Expression nach Stimulation mit			
Core	22.4 [13.5-31.3]	16.7 [7.8-25.6]	23.7 [13.9-33.4]
NS3	39.0 [28.7-49.3]	21.8 [14.9-28.7]	36.4 [28.0-44.8]
NS4	25.8 [16.7-34.9]	18.2 [8.9-27.6]	28.9 [19.0-38.9]
NS5a	32.3 [22.9-41.8]	20.0 [9.7-30.3]	34.5 [27.7-41.2]
NS5b	50.1 [40.4-59.8]	30.1 [20.0-40.2]	26.8 [18.0-35.6]
LPS	60.1 [52.0-68.2]	44.9 [38.0-51.8]	49.1 [41.8-56.4]
<b>IL-10</b>			
Spontane Expression	2.7 [1.5-3.9]	1.2 [0.3-2.3]	0.7 [0.4-1.0]
Expression nach Stimulation mit			
Core	5.6 [3.0-8.2]	1.6 [0.2-3.0]	1.0 [0.6-1.3]
NS3	5.2 [2.7-7.7]	2.1 [0.3-3.9]	2.1 [0.7-1.7]
NS4	4.3 [2.2-6.5]	1.7 [0.3-3.2]	1.1 [0.7-1.6]
NS5a	4.8 [2.6-7.0]	2.0 [0.4-3.6]	1.1 [0.5-1.7]
NS5b	7.3 [4.0-10.6]	2.4 [0.4-4.4]	1.2 [0.2-2.2]
LPS	12.4 [7.4-17.4]	6.4 [1.8-10.9]	6.0 [2.0-9.8]
<b>IL-12</b>			
Spontane Expression	1.3 [0.8-1.9]	0.9 [0.3-1.4]	0.9 [0.4-1.3]
Expression nach Stimulation mit			
Core	2.3 [1.5-3.2]	1.1 [0.5-1.7]	1.1 [0.6-1.6]
NS3	3.3 [1.6-5.0]	1.6 [0.8-2.5]	2.4 [0.2-4.6]
NS4	2.0 [1.2-2.7]	1.6 [0.7-2.5]	2.2 [1.2-3.2]
NS5a	2.6 [1.5-3.7]	1.3 [0.6-2.0]	1.8 [0.9-2.6]
NS5b	6.0 [1.6-10.4]	1.5 [0.7-2.3]	1.3 [0.2-2.4]
LPS	18.7 [10.7-26.6]	6.2 [3.7-8.8]	11.8 [5.1-18.6]
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>			
Spontane Expression	8.4 [3.2-13.5]	2.3 [0.4-4.2]	1.6 [0.9-2.2]
Expression nach Stimulation mit			
Core	11.2 [5.1-17.2]	3.6 [1.2-6.0]	2.3 [1.2-3.4]
NS3	8.4 [4.4-12.4]	4.4 [1.9-6.9]	6.1 [1.8-10.5]
NS4	6.4 [3.6-9.2]	4.6 [1.6-7.7]	6.0 [3.0-9.0]
NS5a	6.2 [3.6-8.9]	3.5 [1.4-5.5]	4.1 [2.6-5.5]
NS5b	14.8 [8.8-20.8]	5.8 [1.5-10.2]	3.3 [1.5-5.1]
LPS	35.0 [25.1-44.9]	21.2 [12.8-29.8]	31.5 [23.7-39.2]

Ergebnisse sind als Median + Spannweite angegeben: a = p<0.05 Chronische HCV Infektion vs. avirämische anti-HCV Seropositive (Kruskal-Wallis Test und Mann-Whitney U Test)  
b = p<0.05 Chronische HCV Infektion vs. Kontrollgruppe (Kruskal-Wallis Test und Mann-Whitney U Test)  
c = p<0.05 Stimulierte vs. Spontane Zytokinexpression (Wilcoxon Rank Test)

**Tab. 11:** Prozent der CD14+ Monozyten mit intrazellulären Nachweis der Zytokinexpression

### 3.6 LPS induzierte monozytäre Zytokinexpression bei unterschiedlichem Verlauf der Hepatitis C Virus Infektion

Die Untersuchung der Expression von IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  zeigte nach einer Stimulation mit LPS keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen (Tabelle 11). Statistisch signifikante Unterschiede konnten lediglich für die monozytäre IL-1 $\beta$  Produktion zwischen Patienten mit chronischer Hepatitis C und der Kontrollgruppe gemessen werden. Patienten mit chronischer Hepatitis C und avirämische anti-HCV Seropositive unterschieden sich in den Untersuchungen nicht signifikant bezüglich der IL-1 $\beta$  Expression (Abb.25).



**Abb.25:** Nachweis der monozytären IL-1 $\beta$  Expression nach Stimulation mit LPS (100ng/ml) mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Patienten mit chronischer HCV und der Kontrollgruppe (Boxplots, die Fehlerbalken bilden die 10te und 90te Perzentile ab). a)  $p=0,02$

## 4 Diskussion

Die Pathogenese der Hepatitis C Virusinfektion und die Gründe für die oft fehlende Viruselimination konnten bisher noch nicht hinreichend geklärt werden.

Eine mögliche Ursache für die häufige Chronifizierung könnte in einer gestörten zellulären Kommunikation der T-Lymphozyten und der monozytären Zellen liegen, die durch eine veränderte monozytäre Zytokinexpression bedingt sein könnte.

Deshalb konzentrierten sich unsere Untersuchungen auf die monozytäre Zytokinproduktion bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Virus Infektion und bei Patienten mit einem selbstlimitierten Verlauf der HCV-Infektion.

In den durchflusszytometrischen Untersuchungen dieser Dissertation zeigte sich bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C eine signifikant erhöhte spontane Zytokinexpression von IL-1 $\beta$  und IL-10. Die Stimulation mit fast allen eingesetzten HCV Proteinen (Core, NS3, NS5a und NS5b) führte bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C zu einem signifikanten Anstieg der monozytären IL-1 $\beta$  Expression. Für die monozytäre IL-10 Expression konnte nach Stimulation mit allen verwendeten HCV-Proteinen (Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b) eine statistisch signifikante Zunahme der monozytären Expression im chronischen Krankheitsverlauf der Hepatitis C nachgewiesen werden.

Als ein weiteres Ergebnis unserer Untersuchungen konnte für die monozytäre IL-6 Expression eine signifikante Zunahme bei Patienten mit einer chronisch replikativen Hepatitis C gefunden werden, wenn die antigene Stimulation mit den HCV-Proteinen NS3 und NS5b durchgeführt wurde.

Für die monozytäre TNF- $\alpha$  Produktion ließ sich nachweisen, dass nur eine antigene Stimulation mit NS5b zu einer signifikanten Zunahme bei Patienten mit einer chronischen Verlaufsform der Hepatitis C führte.

Auch die monozytäre Interleukin-12 Expression zeigte in unseren Untersuchungen nur nach einer Stimulation mit dem HCV-Protein Core eine signifikante Zunahme in der Gruppe der chronischen Hepatitis C.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fanden Kishihara und Mitarbeiter eine gesteigerte Expression von IL-1 $\beta$  bei Patienten mit chronischer Hepatitis C, die sie durch eine Stimulation mit PHA (Phytohämagglutinin) erzielten (Kishihara et al., 1996).

Eine unspezifische Stimulation mit LPS führte hingegen in den Untersuchungen von Özyilkan und Mitarbeitern zu einem geringeren Anstieg der IL-1 $\beta$  Produktion bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C im Vergleich zu gesunden Probanden (Özyilkan et al., 1994).

Auch Mendoza und Mitarbeiter fanden eine geringere Expression von IL-1 $\beta$  bei Patienten mit chronischer HCV, wenn sie separierte Monozyten mit Phorbol Myristat Acetat (PMA) stimulierten (Mendoza et al., 1996).

Die abweichenden Ergebnisse von Özyilkan et al. und von Mendoza et al. sind möglicherweise durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen bedingt. Insbesondere wurde mittels ELISA die Zytokinsekretion aller Zellen in Kultur gemessen, so dass auch eine Zunahme der Zytokinproduktion der Lymphozyten nicht auszuschließen ist. Des Weiteren führten Mendoza und Mitarbeiter die Stimulation der Monozyten mit Phorbol Myristat Acetat (PMA) durch. Zusätzlich wurde die Stimulation und Kultur mit separierten Monozyten durchgeführt, so dass möglicherweise die physiologischen Wechselwirkungen der Zellen untereinander fehlten.

Bezüglich der Expression von IL-10 fanden Kakumu und Mitarbeiter in Einklang mit unseren Ergebnissen eine erhöhte spontane Expression bei Patienten mit chronischer Hepatitis C (Kakumu et al., 1997).

Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe von Kakumu in Bestätigung unserer Ergebnisse nach einer Stimulation mit Core Protein eine signifikante Zunahme der IL-10 Expression bei Patienten mit chronischer HCV messen (Kakumu et al., 1997).

Auch Dolganiuc und Mitarbeiter konnten bei Monozyten von Patienten mit einem chronischen Verlauf der Hepatitis C eine signifikante Zunahme der IL-10 Produktion nach antigener Stimulation mit Core und NS3 nachweisen (Dolganiuc et al., 2003).

Ebenfalls eine signifikante Zunahme der IL-10 Ausschüttung konnten Brady und Mitarbeiter bei polymorphkernigen Zellen von Patienten mit chronischer HCV nach einer Stimulation mit NS4 messen (Brady et al., 2003).

Die Interleukin-6 Expression wurde von Müller und Zielinski bei Patienten mit chronischer Hepatitis C untersucht.

Nach einer unspezifischen Stimulation mit LPS konnten sie keine signifikante Zunahme der IL-6 Produktion messen (Müller und Zielinski 1992).

Im Gegensatz dazu führte in unseren Untersuchungen die antigenspezifische Stimulation mit den HCV Proteinen NS3 und NS5a zu einer signifikanten Steigerung der monozytären IL-6 Expression bei Patienten mit chronisch replikativer HCV.

Mendoza und Mitarbeiter untersuchten die monozytäre TNF- $\alpha$  Produktion nach Stimulation mit PMA (Phorbol Myrestat Acetat) bei Patienten mit chronischer Hepatitis C verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe (Mendoza et al., 1996).

In ihren Untersuchungen fanden sie im Gegensatz zu unseren Ergebnissen eine geringere Ausschüttung von TNF- $\alpha$  in der Patientengruppe mit chronischer Hepatitis C. Der Zytokinnachweis erfolgte allerdings mittels ELISA im Überstand der PMNC und bei separierten Monozyten. Eine antigene Stimulation der Zellen führten sie nicht durch, so dass diese Befunde nicht direkt mit den jetzigen Ergebnissen vergleichbar sind.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen führte die antigene Stimulation mit NS3 in den Untersuchungen von Dolganiuc und Mitarbeitern zu einer signifikanten Zunahme der TNF- $\alpha$  Produktion bei Patienten mit chronischer HCV, wohingegen die Stimulation mit Core keine signifikante Steigerung der TNF- $\alpha$  Expression ergab (Dolganiuc et al. 2003).

Untersuchungen zur monozytären IL-12 Produktion führten Kakumu und Mitarbeiter durch. Sie konnten in ihren Arbeiten keine erhöhte spontane IL-12 Ausschüttung messen (Kakumu et al., 1997). Dies bestätigt die Ergebnisse unserer durchflusszytometrischen Messungen.

In Einklang mit unseren Untersuchungen konnten sie nach einer antigenspezifischen Stimulation mit Core eine signifikante Zunahme der IL-12 Produktion bei Patienten mit chronischer HCV nachweisen (Kakumu et al., 1997).

Bis dato durchgeführte Untersuchungen zur monozytären Zytokinproduktion bei unterschiedlichen Verläufen der Hepatitis C wurden durch den Zytokinnachweis im Überstand stimulierter polymorphkerniger Zellen mittels ELISA geführt (Kakumu et al., 1997; Mendoza et al., 1996; Özyilkan et al., 1994). Dieser methodische Ansatz hat den Nachteil, dass im Überstand die Zytokine aller eingesetzten Zellen gemessen werden und keine Differenzierung zwischen lymphozytärer und monozytärer Zytokinbildung möglich ist.

Nur eine Zellseparation, die der Stimulation und Zellkultur vorgeschaltet wurde, erlaubte die Zuordnung der Zytokine zur jeweils zytokinproduzierenden Zelle.

Die Verwendung von Kulturplatten mit hydrophober Oberfläche zur Monozytenkultur ermöglichte es in der vorliegenden Dissertationsarbeit die Monozyten von den Kulturplatten wieder abzulösen und dann in der Durchflusszytometrie zur Messung der monozytären Zytokinexpression einzusetzen. Die durchflusszytometrische Messung ermöglichte die Analyse auf Einzelzellniveau und gestattete hierdurch eine eindeutige Identifikation der Zytokin exprimierenden Zellen. Dadurch entfiel eine aufwendige Separation der Monozyten, die mit hohen Zellverlusten und mit der Gefahr einer unspezifischen Aktivierung der Zellen verbunden war.

Des weiteren konnte die Stimulation und Kultur der Monozyten im Verband mit anderen polymorphkernigen Zellen durchgeführt werden, was den physiologischen Bedingungen entspricht und Wechselwirkungen der Zellen während der Kultur möglich machte. Damit erfolgte die Untersuchung der Monozyten unter experimentellen Bedingungen, die der natürlichen Situation nahe kommen dürfte.

Als ein weiterer Unterschied zu vorangehenden Untersuchungen der verschiedenen Arbeitsgruppen wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit die Stimulation der Monozyten antigenspezifisch mit verschiedenen rekombinanten Proteinen des Hepatitis C Virus durchgeführt und nicht nur mit Mitogen.

Allerdings ist bei der Interpretation der Stimulationsexperimente zu berücksichtigen, dass die zur Stimulation eingesetzten Proteine (Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b) nur trunkierte Proteine des HCV-Polyproteins darstellten. Damit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass wichtige antigene Determinanten nur unvollständig im Stimulationsansatz enthalten waren.

Des weiteren wurden nur rekombinante Proteine des HCV Genotyps 1a verwendet. Die Patienten, die in die Untersuchung gingen, wiesen jedoch neben dem Genotyp 1a auch den Genotyp 1b, 2 oder 3 sowie gemischte Genotypen auf.

Im Rahmen einer Subanalyse konnten jedoch keine Unterschiede der monozytären Zytokinexpression bei den Patienten mit Genotyp 2 oder 3 im Vergleich zu den Patienten mit Genotyp 1 nach antigener Stimulation mit den rekombinanten Proteinen des HCV Genotyps 1 festgestellt werden.

In unseren Untersuchungen fiel auf, dass nicht nur einzelne sondern fast alle verwendeten Proteine (außer NS4 in der Untersuchung von IL-1 $\beta$ ) die monozytäre Expression von IL-1 $\beta$  und IL-10 signifikant in der Gruppe der Patienten mit chronischer Hepatitis C steigerten.

Die Relevanz dieses Befundes wird dadurch gestärkt, dass auch die spontane Zytokinproduktion dieser beiden Zytokine in der Patientengruppe mit chronischer HCV signifikant erhöht war.

Die Stimulation mit LPS – dem stärksten unspezifischen Stimulans für eine monozytäre Zytokinproduktion – führte zu einem deutlichen Anstieg der Expression von IL-1 $\beta$  und IL-10, zeigte aber keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der unterschiedlichen Patientengruppen. Dadurch wird weiter plausibel gemacht, dass es sich bei den mit HCV Proteinen gefundenen Unterschieden um antigenspezifische Effekte handelt. Dieser Befund zeigt, dass die monozytäre Zytokinexpression abhängig von der Auswahl der verwendeten Stimuli ist. Dies würde auch die fehlenden Unterschiede im Anstieg der IL-1 $\beta$  Expression erklären, den Özyilkan und Mendoza in ihren Arbeiten beobachteten (Özyilkan et al., 1994, Mendoza et al., 1996). Denn in diesen Untersuchungen war nur LPS als Stimulus verwendet worden.

Auch Dolganiuc und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass in Abhängigkeit der verwendeten Stimuli sich unterschiedliche Anstiege der monozytären Zytokine bei den verschiedenen Gruppen von Patienten ergaben. In ihren Untersuchungen führte die Stimulation mit Core oder NS3, aber nicht die Stimulation mit dem Hüllprotein E2 zu einem signifikanten Anstieg der monozytären Zytokinproduktion (Dolganiuc et al., 2003).

Weiterhin fiel in den Auswertungen unserer Untersuchungen auf, dass die für eine effektive antivirale Immunantwort erforderlichen Zytokine, wie IL-12 und TNF- $\alpha$  nur wenig antigen-spezifisch induziert wurden.

Dahingegen konnte vermehrt das proinflammatorische IL-1 $\beta$  und das monozytäre IL-10 nachgewiesen werden.

Das Überwiegen des monozytären IL-10, das eine Differenzierung der CD4-positiven T-Helferzellen in Richtung einer T-Helferzellantwort vom Typ 2 fördert, könnte über die Ausbildung einer bei viralen Infekten ineffektiven Immunantwort zu einer Chronifizierung der Hepatitis C beitragen.

Insgesamt deuten die Befunde auf eine qualitativ veränderte monozytäre Zytokinexpression in der chronischen Verlaufsform der Hepatitis C hin.

Eine Erklärung für eine alterierte monozytäre Zytokininduktion könnte eine kontinuierliche antigene Stimulation durch die persistierende Hepatitis C Virämie sein. Die beständige Exposition gegenüber HCV Antigenen könnte zu einer vermehrten Bildung von Antigen-Antikörper Komplexen führen, die an die Fc $\gamma$ -Rezeptoren der immunkompetenten Zellen binden. Eine fortwährende Bindung an Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Monozyten führt, wie Untersuchungen von Sutterwala und Mitarbeitern ergaben, zu Veränderungen der Entzündungsantwort mit einer Zunahme der IL-10 Antwort und Inhibierung der IL-12 Produktion (Sutterwala et al., 1998). In ihren Untersuchungen setzten Sutterwala und Mitarbeiter sowohl LPS opsonisiert mit IgG als auch IgG behaftete Gram-negative Bakterien ein. Beide Stimuli führten jeweils zu einer Zunahme der makrozytären Interleukin-10 Expression und zu einer Abnahme der Interleukin-12 Expression (Sutterwala et al., 1998).

Eine alternative Erklärung des unzureichenden Anstieges der monozytären TNF- $\alpha$  Expression bieten die Arbeiten von Haas und Mitarbeiter (Haas et al., 1990).

Sie fanden bei der humanen Mono-Mac-6 Zelllinie nach 24 bis 48 stündiger Kultur mit LPS eine fehlende Expression von TNF- $\alpha$  bei einer erneuten Re-Stimulation mit LPS (Haas et al., 1990). Die Zellen blieben selbst nach mehreren Waschschritten und erneuter LPS freier Kultur refraktär hinsichtlich einer TNF- $\alpha$  Induktion. Auch unter Verwendung des Mitogens PMA (Phorbol-Myristat-12-Acetat) konnte keine Expression von TNF- $\alpha$  bei derart vor-inkubierten Zellen induziert werden.

Eine Inkubationszeit mit LPS, die unter 24 Stunden lag, führte jedoch zu keiner signifikanten Blockierung der LPS Expression. Dies deutet darauf hin, dass eine längerfristige Stimulation mit LPS diese Zellen refraktär macht. Auch im Tiermodell ist ein Refraktärverhalten gegenüber einer wiederholten LPS-Stimulation schon seit geraumer Zeit bekannt (Freudenberg et al., 1988). Es ist anzunehmen, dass eine Refraktärität nicht nur durch LPS, sondern auch durch Monokin-induzierende Antigene möglich ist, wenn diese dauerhaft einwirken. Dies dürfte bei chronischer Hepatitis C für die HCV-Antigene zutreffen.

Die hohe Anzahl von Monozyten, die in der Gruppe der chronischen Hepatitis C Patienten spontan oder nach antigener Stimulation IL-1 $\beta$  bildeten, dürfte ebenfalls auf eine „Vor-Aktivierung“ der Zellen durch die chronische Virämie hindeuten.

Alternativ kommt auch eine Veränderung der Monozyten durch eine direkte Infektion in Betracht. In Untersuchungen von Bouffard und Mitarbeitern konnte HCV-RNA in Makrophagen von Patienten mit chronischer Hepatitis C nachgewiesen werden (Bouffard et al., 1992), aber der

Anteil der HCV-RNA positiven Monozyten erscheint zu niedrig zu sein, um eine veränderte Zytokin Induktion durch eine direkte Monozyteninfektion allein erklären zu können (Mellor et al., 1998).

Eine beeinträchtigte Funktion der Monozyten/Makrophagen mit nachfolgender unzureichender T-Zellantwort ist wahrscheinlich nicht spezifisch für die Hepatitis C. Analoge Befunde wurden auch im Rahmen einer Infektion mit dem Dengue Virus beschrieben, das eine nahe Verwandtschaft zu dem Hepatitis C Virus aufweist (Mathew et al., 1999). Auffallend war in diesen in-vitro Untersuchungen, dass die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen durch die Zugabe von akzessorischen Zellen aus nicht infizierten Spendern wiederhergestellt werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass es sich um funktionelle Veränderungen der Makrophagen handelt.

Wenn auch der ursächliche Mechanismus für eine veränderte Induktion von Monokinen durch HCV-Antigene nicht in dieser Arbeit geklärt werden konnte, so deuten die gefunden Befunde darauf hin, dass bei chronischer Hepatitis C bereits auf der Monozytenebene Zytokine induziert werden, die eine Differenzierung der T-Zellen in Richtung Typ 2 Zytokinprofil fördern. Es ist daher wahrscheinlich, dass dieses veränderte Monokinprofil einer effektiven antiviralen Immunantwort entgegen wirkt, für die IL-12 und TNF- $\alpha$  benötigt werden. Damit dürften auch Störungen auf der Monozytenebene zu einer Chronifizierung der Hepatitis C beitragen.

Den Angriffsort für diese Veränderungen auf der Ebene der Makrophagen zu identifizieren wird Aufgabe zukünftiger Arbeiten sein.

## 5 Zusammenfassung

Die Hepatitis C Virus Infektion nimmt in mehr als 85% der Fälle einen chronischen Verlauf mit den Folgen einer Leberzirrhose, sowie dem erhöhten Risiko des Entstehens eines hepatozellulären Karzinoms (Alter et al., 1997; Hoofnagle, 1997; Seef, 1997).

Die Pathogenese der Hepatitis C und die Gründe für die oft fehlende Viruselimination konnten bisher noch nicht ausreichend geklärt werden.

Der chronische Krankheitsverlauf der Hepatitis C scheint durch eine unzureichende antivirale Typ 1 Zytokinantwort begünstigt zu werden.

Unklar ist, ob die unzureichende Typ 1 Zytokinantwort und das potentielle Überwiegen einer Typ 2 Zytokinantwort die Folge einer primären T-Zellfunktionsstörung ist, oder aber die Folge einer veränderten Monozyten/Makrophagen Reaktion gegenüber HCV-spezifischen Antigenen ist, die eine ineffektive Aktivierung der CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten verursacht.

Im Rahmen der Dissertation galt es zu klären, ob eine Hepatitis C Virus Infektion Änderungen im Muster der monozytären Zytokinexpression hervorruft und ob diese antigenspezifisch sind.

Daher wurde bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Virus Infektion und bei Patienten mit einem selbstlimitierten Verlauf der Hepatitis C Virus Infektion die monozytäre Zytokinantwort auf Einzel-Zellniveau mittels Durchflusszytometrie nach einer Stimulation mit den HCV Antigenen Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b untersucht.

Die Untersuchungen nach HCV-antigenspezifischer Stimulation ergaben, dass bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C, die für eine effektive antivirale Immunantwort erforderlichen Zytokine, wie IL-12 und TNF- $\alpha$  nur wenig durch die unterschiedlichen HCV-Antigene stimuliert wurden.

Im Unterschied dazu stieg nach antigener Stimulation von Monozyten aus Patienten mit chronischer Hepatitis C die monozytäre Expression von IL-1 $\beta$ , IL-10 und IL-6 signifikant an. Es zeigte sich also ein Überwiegen derjenigen Zytokine, die eine allgemeine Entzündungsreaktion begünstigen.

Anhand der durchflusszytometrischen Analyse der antigenspezifischen monozytären Zytokinexpression konnte bei Patienten mit einem chronischen Krankheitsverlauf der Hepatitis C ein quantitativ und qualitativ verändertes monozytäres Zytokinmuster festgestellt werden, das Ausdruck einer beeinträchtigten Monozytenfunktion sein könnte.

Die veränderte monozytäre Zytokinexpression könnte wiederum eine Ursache der ineffektiven Aktivierung der CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten sein und über diesen Weg zu einer Chronifizierung der HCV-Infektion beitragen.

Anmerkung:

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift wurden 2002 im World Journal of Gastroenterology publiziert.

Woitars RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, Spengler U.

HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C.

World J Gastroenterol 2002; 8(3): 562-566

## 6 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994

Alter HJ, Conry-Cantilena C, Melpolder J, Tan D, VanRaden M, Herion D, Lau D, Hoofnagle JH. Hepatitis C in asymptomatic blood donors. *Hepatology* 1997; 26 (Suppl1): 29S-33S

Alter MJ. Epidemiologie of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 62S-65S

Bartenschlälger R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobson H. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* 1993; 67: 3835-3844

Battegay M, Fikes J, Di Bisceglie AM, Wentworth PA, Sette A, Celis E, Ching WM. Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus encoded peptides binding to HLA-A2.1 molecules. *J Virol* 1995; 69: 2462-2470

Benvegnù L, Pontisso P, Cavaletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus related cirrhosis. *Hepatology* 1997; 25: 211-215

Berg T, Hopf U, Stark K, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E. Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *J Hepatol* 1997; 26: 484-491

Bhardwaj N, Seder RA, Reddy A, Feldman MV. IL-12 in conjunction with dendritic cells enhances antiviral CD8+ CTL responses in vitro. *J Clin Invest* 1996; 98: 715-722

Botarelli P, Brunnetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weiner AJ, Choo QL, Shuster RJ, Kuo G, Bonino F, Houghton M, Abringnani S. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 104: 580-587

Bortolotti F, Tagger A, Cadrobbi P, Crivellaro C, Pregliasco F, Ribero ML, Alberti A. Antibodies to hepatitis C virus in community-acquired acute non-A, non-B hepatitis. *J Hepatol* 1991; 12: 176-180

Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 127

Böyum A. Isolation of leukocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97: 9-29

Brady MT, MacDonald AJ, Rowan AG, Mills KHG. Hepatitis C virus nonstructural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3448-3457

Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. *Gastroenterology* 1985; 88: 773-779

Brechot C, Kremsdorf D. Genetic variation of hepatitis C virus (HCV). *J Hepatol* 1993; 17: 265-268

Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-63

Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' non coding region of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4942-4946

Caspari G, Beyer J, Richter K, Gerlich WH, Schmitt H. Prevalence of antibodies to recombinant hepatitis C virus protein C100-3 and of elevated transaminase levels in blood donors from Northern Germany. *Med Microbiol Immunol* 1991; 180: 261-272

Chan SW, McOmish F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follet E, Yap PL, Simmonds P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; 73: 1131-1141

Chehimi J, Starr SE, Frank I, Rengaraju M, Jackson SJ, Llanes C, Kobayashi M, Perussia B, Young D, Nickbarg E, Wolf SF, Trinchieri G. Natural Killer (NK) cell stimulatory factor increases the cytotoxic activity of NK cells from both healthy donors and immunodeficiency virus-infected patients. *J Exp Med* 1992; 175: 789-796

Chien DL, Choo QL, Ralston R, Spaete R; Tong M; Houghton M; Kuo G. Persistence of HCV despite antibodies to both putative envelope glycoproteins. *Lancet* 1993; 342: 933

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby A, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Genetic organisation and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451-2455

Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990; 46: 423-441

Coffman RL, Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* 1986; 136: 949-954

Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Cherwinski HM, Savelkoul HF, Finkelman FD, Bond MW, Mosmann TR. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988; 102: 5-28

Conry-Cantilena C, Viladomiu L, Melpolder JC, Jett BW, Moss T, Alter HJ, Gibble J, Ness P. Risk factors for hepatitis C virus infection in a US urban blood donor population. *Transfusion* 1992; 32: 465

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159

Consensus Statement. EASL International Consensus Conference on hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 30: 956-961

D'Andrea A, Aste-Amezaga H, Valiante MN, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon- $\gamma$  production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1041-1048

Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follet EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgeysi GA. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1995; 76: 1197-1204

De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209-1220

De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, de Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991a; 174: 915-924

Denholm EM, Wolber FM. A simple method for purification of human peripheral blood monocytes. A substitute for Sepracell-MN. *J Immunol Methods* 1991; 144: 247-251

Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, Fikrig E, Rincón M. Inhibition of TH1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 2000; 13: 805-815

Dienstag JL, Alter HJ. Non-A, non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. *Semin Liver Disease* 1986; 6: 67-81

Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology* 1983; 85: 439-462

Diepolder HM, Zchoval R, Hoffmann R, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 346: 1006-1007

Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth* 1998; 4: 253-265

Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall Ch, Do T, Romics L Jr., Mandrekar P, Zapp M, Szabo G. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2003; 170: 5615-5624

Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russel DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and sindbis viruses. *J Virol* 1994; 68: 6147-6160.

Failla C, Tomei L, Defrancesco R. An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J Virol* 1995; 69: 1769-1777.

Falkoff RJ; Muraguchi A; Hong JX; Butler JL; Dinarello CA; Fauci AS. The effects of interleukin-1 on human B cell activation and proliferation. *J Immunol* 1983; 131: 801-805

Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewskie RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N, Purchell RH. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992; 258: 135-139

Feinstone SM, Kapikain AZ, Purchell RH, Alter HJ, Holland HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292: 767-770.

Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosman TR, Vitetta ES. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T Helper 1 and T Helper 2 cells. *J Exp Med* 1988; 168: 543-558

Ferrari C, Valli A, Galati L, Penna A, Scaccaglia P, Giuberti T, Schianci C, Missale G, Marin MG, Fiaccadori F. T-cell response to structural and non-structural hepatitis C virus antigens in persistent and self limited hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994; 19: 286-295

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by TH1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-3451

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991a; 147: 3815-3822

Foey A, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF- $\alpha$ : role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 1998; 160: 920-928

Fong TAT und Mosmann TR. The role of IFN- $\gamma$  in delayed type hypersensitivity mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1989; 143: 2887-2893

Freudenberg MA, Gulanos C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect Immun* 1988; 56:1352-1355

Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. IFN-gamma inhibits the proliferation of TH2 but not TH1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988; 140: 4245-4252

Gauldie J; Richards C; Harnish D; Lansdorp P; Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84(20):7251-7255

Gery I, Waksman BH. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens II. The cellular source of potentiating mediator (s). *J Exp Med* 1972; 136: 143-155

Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW, Howard M. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 1990; 172: 1625-1631

Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993; 67: 1388-1395

Haas JG, Baeuerle PA, Riethmüller G, Ziegler-Heitbrock HWL. Molecular mechanisms in down-regulation of tumor necrosis factor expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9563-9567

Haldén G, Andersson U, Hed J, Johansson SG. A new membrane permeabilization method for the detection of intracellular antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1989; 124: 103-109

He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purchell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* 1987; 156: 636-640

Hencore: Hepatitis C European Network for Co-Operative Research. Guidelines for control and management of hepatitis C: Report to the European Commission DG V 1998

Hijikata M, Mizushima H, Tanji Y, Komoda Y, Hrowatari Y, Akagi T, Kato N, Kimura K, Shimotohono K. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10773-10777

Hoffmann RM, Diepolder HM, Zachoval R, Zwiebel FM, Jung MC, Scholz S, Nitschko H, Riethmüller G, Pape GR. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during course of chronic infection. *Hepatology* 1995; 21: 632-638

Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; 26 (Suppl 1): 15S-20S

Hopf U, Berg T, König V, Küther S, Heuft HG, Lobeck H. Treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha: long-term follow-up and prognostic relevance of HCV genotypes. *J Hepatol* 1996; 24(Suppl 2): 67-73

Houssiau FA, Coulie PG, Olive D, Van Snick J. Synergistic activation of human T cells by interleukin 1 and interleukin 6. *Eur J Immunol* 1988; 18: 653-656

Imberti L, Cariani E, Bettinardi A, Zorano A, Albertini A, Primi D. An immunoassay for specific amplified HCV sequences. *J Virol Methods* 1991; 34: 233

Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; 159: 197-207

Kakumu S, Okumara A, Ishikawa T, Iwata K, Yano M, Yoshioka K. Production of interleukin 10 and 12 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1997; 108: 138-143

Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215(1): 160-166

Kisihara Y, Hayashi J, Yoshimura E, Yamaji K, Nakashima K, Kashiwagi S. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  produced by peripheral blood mononuclear cells before and during interferon therapy in patients with chronic Hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1996; 41:315-321

Kiyosawa K, Sodemaya T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakamo Y, Furuta S. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody of hepatitis C virus. *Hepatology* 1990; 14: 381-388

Knodell RG, Conrad ME, Dienstag JL, Bell CJ. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterology* 1975; 69: 1278-1285

Kobayashi M, Tanaka E, Sodeyama T, Urushihara A, Matsumoto A, Kiyosawa K. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology* 1996; 23: 695-699

Koretz RL; Brezina M; Polito AJ; Quan S; Wilber J; Dinello R; Gitnick G. Non-A, non-B posttransfusion hepatitis: comparing C and non-C hepatitis. *Hepatology* 1993; 17(3): 361-365

Koyama N, Harada N, Takahashi T, Mita S, Okamura H, Tominaga A. Role of recombinant interleukin-1 compared to recombinant T-cell replacing factor/interleukin-5 in B-cell differentiation. *Immunology* 1988; 63: 277-283

Koziel MJ. The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1997; 4 (Suppl 2): 31-41

Koziel MJ, Dudley D, Afdahl N, Choo QL, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognizes epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol* 1993; 67: 7422-7532

Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 1992; 149: 3339-3344

Kühnl P; Seidl S, Stangel W, Beyer J, Sibrowski W, Flik J. Antibodies to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet* 1989; 2: 324

Kumagai K, Itoh K, Hinuma S, Tada M. Pretreatment of plastic petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J Immunol Methods* 1979; 29: 17-25

Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shuster JR, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. An assay for circulation antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B Hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364

Lechmann M, Woitas RP, Langhans B, Kaiser R, Ihlenfeld HG, Jung G, Sauerbruch T, Spengler U. Decreased frequency of HCV core specific peripheral blood mononuclear cells with type 1 cytokine secretion in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31: 971-978

Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CW. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J virol* 1994; 68: 5063-5073

Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 1997; 71(11): 8416-8428

Lundahl J, Haldén G, Hallgren M, Sköld CM, Hed J. Altered expression of CD11b/CD18 and CD62L on human monocytes after cell preparation procedures *J Immunol Methods* 1995; 180: 93-100

Mathew A, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Ennis FA, Rothmann AL. Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. *J Immunol*, 1999; 162: 5609-5615

Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229

McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EAC, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R, Lin C, Lai C, Leong S, Medgyesi GA, Hejjas M, Kijokawa H, Fukada K, Cuypers T, Saeed AA, Al-Rasheed AM, Lin M, Simmonds P. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: An international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884-892

Mehrotra PT, Wu D, Crim JA, Mostowski HS, Siegel JP. Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol* 1993; 151: 2444-2452

Mellor J, Haydon G, Blair C, Livingstone W, Simmonds P. Low level or absent in vivo replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cell. *J Gen Virol* 1998; 79: 705-714

Mendoza EC, Paglieroni TG, Zeldis JB. Decreased phorbol myristate acetate-induced release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta from peripheral blood monocytes of patients chronically infected with hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1996;174: 842-844

Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Ficcadori F, Ferrati C. Different clinical behaviours of acute hepatitis C infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 706-714

Mondelli MU, Sileni E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1): 65-70

Mondelli MU. Is there a role for immune responses in the pathogenesis of hepatitis C? *J Hepatol* 1996; 25: 232-238

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.

J Immunol 1986; 136: 2348-2357

Mosmann TR und Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann Rev Immunol 1989; 7, 145-173

Müller Ch und Zielinski CC. Interleukin-6 production by peripheral blood monocytes in patients with chronic liver disease and acute viral hepatitis. J Hepatol 1992; 15: 372-377

Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T.

The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. J Exp Med 1988 ;167(2): 332-344

Murphy D, Willems B, Delage G. Use of the 5' non-coding region for genotyping hepatitis C virus. J Infect Dis 1994; 169: 473-475.

Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purchell RH. Nucleotid sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 3392-3396

Okamoto H, Kojima M, Okada SI, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Muchmore EE, Peterson DA, Ito Y, Mishiro S. Genetic drift of hepatitis C virus during a 8.2 year infection in a chimpanzee: variability and stability. Virology 1992, 190: 894-899

Özyilkan E, Tatar G, Hacibektasogulu A, Kayan B, Telatar H. Impaired lipopolysaccharide-induced Interleukin-beta production in patients with anti-Hepatitis C virus antibody-positive chronic liver disease. Scand J Gastroenterol 1994; 29: 280-283

Parry SL, Sebbag M, Feldmann M, Brennan FM. Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production. Role of T cell membrane TNF- $\alpha$  . J Immunol 1997; 158: 3673-3681

Pasi KJ, Evans JA, Wadhawa M, Thorpe R, Hill FG. Association of changes in monocytes antigen presentation and cytokine production in haemophilic boys with treatment and blood-borne virus infection. British J Haematol 1995; 91: 191-196

Paul WE, Ohara J. B-cell stimulatory factor-1/interleukin-4. *Annu Rev Immunol* 1987; 5: 429-459

Pertoft H, Johnsson A, Wärmegard B, Seljelid R. Separation of human monocytes on density gradients of Percoll. *J Immunol Methods* 1980; 33: 221-229

Poel van der CL, Cuypers HAT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 1994; 344: 1475-1479

Pohlmann R, Kruger S, Hasilik A, Figura K. Effect of monensin on intracellular transport and receptor-mediated endocytosis of lysosomal enzymes. *Biochem J* 1984; 217:649-658

Pozzato G, Moretti M, Franzin F, Croce LS, Tiribelli C, Masayu T, Kaneko S, Unoura Kobayashi K. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet* 1991; 338: 509

Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, Millian SJ. Long incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. *Lancet* 1974, 3: 241-246

Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmatic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Meth* 1995; 188: 117-128

Purchell RH. The Hepatitis C virus: Overview. *Hepatology* 1997, 26 (Suppl 1): 11S-14S

Rehermann B, Chang KM, McHutchinson JG, Kokka R, Houghton M, Chisari FV. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 1996; 98: 1432-1440

Rincón M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T Cell. *J Exp Med* 1997; 185: 461-469

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology* 1993 Mosby-Year Book Europe

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1890-1893

Seef LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26 (Suppl 1): 21S-28S

Seeman P. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug-induced lysis. *Fed Proc Natl Acad Sci USA* 1974;33: 2116-2124

Shakil AO, Conry C, Alter HJ, Hayashi P, Kleiner DE, Tedeshi V, Kraczyński K, Conjeevaram HS, Salie R, Di Bisceglie AM, and the hepatitis study group. Volunteer blood donors with antibodies to hepatitis C virus: Clinical, biochemical, virological, and histological features. *Ann Intern Med* 1995; 123: 330-337

Shalaby M, Espevik T, Rice G, Ammann A, Figari I, Palladino M. The involvement of the human tumor necrosis factor- $\alpha$  and  $\beta$  in the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 1988; 141: 499-503

Shindo M, Di Bisceglie AM, Biswas R, Mihalik K, Feinstone SM. Hepatitis C virus replication during acute infection in the chimpanzee. *J Infect Dis* 1992, 166(2): 424-427

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brower JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324

Simmonds P, Rose KA, Graham S, Chan SW, McOmish F, Dow BC, Follet EA, Yap PL, Marsden H. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): Use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2 and 3. *J Clin Microbiology* 1993; 31: 1493-1503

Simmonds P; McOmish F, Yap PL, Chan SW, Lin CK, Dusheiko G, Saeed AA, Holmes EC. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol* 1993a; 74: 661-668

Spaete RR, Alexander D, Rugroden ME, Choo QL, Berger K, Crawford K, Kuo G, Leng S, Lee C, Ralston R, Thudium K, Tung JW, Kuo G, Houghton M. Characterization of hepatitis E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells. *Virology* 1992; 188: 819-830

Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc $\gamma$  receptor type I. *J Exp Med* 1998; 188: 217-222

Suzich JA, Tamura JK, Palmer-Hill F, Warrener P, Grakoui A, Rice CM, Feinstone SM, Collett MS. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol* 1993; 67(10):6152-6158

Tartakoff AM. Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore Monensin. *Cell* 1983, 32: 1026-1028

Tomei L, Failla C, Santolini E, De Francesco R, La Monica N. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* 1993; 67: 4017-4026.

Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Go RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995; 332: 1463-1466

Trepo C, Pradat P. Hepatitis C virus infection in Western Europe. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1): 80-83

Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25(2): 449-458

Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 1992; 66: 1476-1483

Ulmer AJ, Flad HD. Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leukocytes using Percoll as gradient medium. *J Immunol Methods* 1979; 30: 1-10

Weiner AJ, Geysen HM, Christophersen C, Hall JE, Mason TJ, Sarraco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3468-3472

Williams J; Beutler E. Hematology. Philadelphia: The McGraw-Hill Companies USA, 2001

Wright TL; Hsu H; Donegan E; Feinstone S; Greenberg H; Read A; Ascher NL; Roberts JP; Lake JR. Hepatitis C virus not found in fulminant non-A, non-B hepatitis. *Ann Intern Med* 1991; 15:111-112

Yanagi M; Kaneko S; Unoura M; Murakami S; Kobayashi K; Sugihara J; Ohnishi H; Muto Y. Hepatitis C virus in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1991; 27;324(26): 1895-1896

Yogata S, Geppert T, Lipsky . Enhancement of antigen- and mitogen- induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Immunol* 1988; 140: 531-536

Zein NN, Persing DH. Hepatitis C Genotypes: Current trends and future implications. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 458-462

Zeuzem S, Teuber G, Lee JH, Ruster B, Roth WK. Risk factors for the transmission of hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 24: 3-10

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. U. Spengler danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die gute Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Ch. Kurts danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD. Dr. R.P. Woitas danke ich besonders für die geduldige und engagierte Betreuung und Unterstützung über die vielen Jahre hinweg.

Herrn Prof. Dr. B. Matz, Dr. R. Kaiser aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn und Frau E.M. Althausen immunologisches Labor der Medizinischen Klinik der Universität Bonn danke ich für die Durchführung der HCV-Diagnostik sowie der Teil-Sequenzierung von HCV-Isolaten.

Frau D. Krämer, Frau K. Henseler und Herrn Prof. Dr Brackmann und Herrn Dr. Oldenburg aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn und Frau M. Scheurlen aus der hepatologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik der Universität Bonn danke für die Hilfe bei der Rekrutierung der Patienten.

Herrn Dd. Bao du Quoc danke ich für die Durchführung der Versuchsreihe zur Toxizität von Monensin.

Den Mitarbeitern der immunologischen Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik danke ich für die freundliche Aufnahme und große Hilfsbereitschaft während der Arbeit im Labor.