

Rafael Wahl

Dr. med.

Adsorptions- und Infektionsstudien zur *in vitro*-Infektion von peripheren mononukleären Blutzellen und Zelllinien mit dem Hepatitis-C-Virus

Geboren am 17.03.1970 in Herbrechtingen-Bolheim

Reifeprüfung am 11.05.1989 in Heidenheim an der Brenz

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1991 bis SS 1998

Physikum am 12.03.1993 an der Freien Universität Berlin

Klinisches Studium in Berlin und Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und Bulawayo, Zimbabwe

Staatsexamen am 10.11.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. L. Theilmann

Das 1989 erstmalig charakterisierte Hepatitis-C-Virus (HCV) führt in etwa 85% der Fälle zu einer chronischen HCV-Infektion, aus der sich eine Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom entwickeln kann. Zur Entwicklung von Impfstoffen und neuartigen, antiviral wirksamen Substanzen wurde von vielen Arbeitsgruppen versucht, effiziente und zuverlässige *in vitro*-Zellkultursysteme für HCV zu etablieren. In den bisher verfügbaren *in vitro*-Systemen waren Replikationsaktivität und Viruspropagierung allerdings stets zu ineffizient, als daß diese Systeme als Goldstandard für HCV empfohlen werden konnten.

Da über die Mechanismen der Infektion des HCV bisher sehr wenig bekannt ist, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, den ersten Schritt der Virusinfektion - die Adsorption an die Wirtszelle - genauer zu erforschen. Hauptuntersuchungsgegenstand dieser Arbeit war dabei der Einfluß der Parameter Temperatur, Stimulation, Serum und Zellart auf die HCV-Adsorption. Periphere mononukleäre Blutzellen (PMB-Zellen), die als extrahepatisches Reservoir für das HCV angesehen werden, wurden auf T- und B-Zellen angereichert (TB-PMB-Zellen) und über einen definierten Zeitraum (10 Minuten bis 48 Stunden) bei 37°C bzw. 4°C *in vitro* mit HCV-positiven Seren inokuliert. Zusätzlich wurden humane Zelllinien lymphozytären (Molt4 und H9) bzw. monozytären Ursprungs (U937) für die Untersuchung

verwendet. Um die Virusadsorption durch eine Modifizierung der Wirtszellen möglicherweise zu verbessern, wurden die Zellen mit Phytohämagglutinin (PHA) und Tetanustoxoid (TT) vorstimuliert. Nach der Zellernte wurde die RNA extrahiert und das spezifische Virusgenom mittels Reverser Transkription (RT), Polymerasekettenreaktion (PCR) und Southernblot-Hybridisierung semiquantitativ nachgewiesen. Zum Replikationsnachweis diente die strangspezifische Detektion der HCV-Minusstrang-RNA mit erweiterten tag-Primern nach einer zweiten PCR-Amplifikation.

Bei den Adsorptionsversuchen wirkte sich ein Temperaturunterschied (4°C versus 37°C) bei der Inokulation auf die HCV-Adsorption nur marginal aus. Durch Vorstimulation der Zellen mit PHA- bzw. TT kam es v.a. an Molt4- und TB-PMB-Zellen zu einer zeitlich und quantitativ veränderten HCV-Adsorption. Bei jeder Zellart wirkte sich diese Stimulation aber unterschiedlich aus, so daß sich vor erfolgter Inokulation über eine Änderung der Adsorption nur spekulieren ließ. Auffällig war, daß die HCV-Adsorption an Molt4-Zellen vom Serum abhing und sich Veränderungen der Adsorption nach PHA- bzw. TT-Stimulation v.a. bei Verwendung eines bestimmten Inokulationsserums zeigten. Die HCV-Adsorption unterschied sich zudem bei den unterschiedlichen Zellarten, wobei an U937-Zellen eine gleichmäßige Adsorption bei allen Versuchskonstellationen nachweisbar war. An TB-PMB-Zellen adsorbierten mehr HCV-Virionen als an die anderen Zellarten. Bei Molt4-Zellen imponierte, daß sich die Adsorption durch Stimulation bzw. Serum stark beeinflussen ließ. Im Gegensatz zu TB-PMB- und U937-Zellen konnte in Molt4-Zellen nach einem Inokulationszeitraum von 24 bis 48 Stunden nahezu in allen Ansätzen eine replikative Aktivität festgestellt werden. Dies macht diese Zellart für weitergehende Untersuchungen wie *in vitro*-Infektionsstudien sehr interessant. Insgesamt gesehen wurde die Adsorption stärker durch die Verwendung unterschiedlicher Seren bzw. Zellarten beeinflußt als durch das gewählte Stimulationsagens.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war, ein *in vitro*-Zellkultursystem für HCV zu etablieren. In den Infektionsstudien konnte dabei unter Verwendung eines sensitiven Nachweises für HCV-RNA (Southernblot-Hybridisierung nach RT-PCR) gezeigt werden, daß Molt4-Zellen, die mit PHA stimuliert worden waren, sich im Ansatz erfolgreich mit HCV infizieren ließen. Das Virus wurde dabei über einen Zeitraum von mehr als 100 Tagen mit Plusstrang-RNA-Mengen in Höhe von 5×10^4 Genomäquivalenten (Gä) pro 10^6 Zellen bzw. $3,5 \times 10^4$ Gä pro ml Kulturüberstand propagiert, obgleich nur ein sporadischer und inkonstanter HCV-Minusstrang-RNA-Nachweis möglich war. Diese Daten legen nahe, daß im gewählten Ansatz der vorliegenden Arbeit eine zwar schwache, aber persistierende *in vitro*-Replikation von HCV in Molt4-Zellen stattfand.