

**Initiale Schritte der Hepatitis C Virus Infektion:
Evaluation mit verschiedenen Modellsystemen**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.**

**des Fachbereichs Biologie und Geografie
an der
Universität Duisburg-Essen**

vorgelegt von

Anna G. Tietjens

aus
Bayreuth

April 2008

meinen Eltern gewidmet

*Den Schlüssel zum Erfolg kenne ich nicht,
aber der Schlüssel zu Misserfolg ist der Versuch, es jedem recht zu machen.*

Bill Cosby

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am
Institut für Experimentelle Gastroenterologie und Hepatologie der Universität Duisburg-
Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. P. Hilgard

2. Gutachter: Prof. Dr. F. U. Schade

3. Gutachter: Prof. Dr. U. Dittmer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
1.1	Taxonomie.....	10
1.2	Genomorganisation.....	11
1.3	Die Strukturproteine von HCV.....	12
1.3.1	Das Core Protein.....	12
1.3.2	Die E1 und E2 Glykoproteine.....	12
1.3.3	Das p7 Protein.....	13
1.4	Die Nicht-Strukturproteine von HCV: NS2, NS3, NS4A, so wie NS5A und NS5B.....	13
1.5	HCV Eintritt in die Zelle.....	14
1.5.1	CD81 und HCV Eintritt in die Zelle.....	14
1.5.2	Claudin-1 als Co-Rezeptor.....	15
1.5.3	SR-BI und HCV Eintritt in die Zelle.....	16
1.5.4	Weitere zelluläre Faktoren, die am Eintritt von HCV in die Zelle beteiligt sind.....	17
1.6	HCV Lebenszyklus (Replikationszyklus).....	18
1.7	Modellsysteme zur Erforschung von HCV.....	19
1.7.1	Das Replikon-System.....	20
1.7.2	Lösliches HCV E2 Protein.....	20
1.7.3	HCV Pseudopartikel.....	20
1.7.4	HCV Zellkultursystem (HCVcc).....	21
1.7.5	In vivo Modelle.....	21
1.8	Leberschädigung durch HCV.....	21
1.9	Therapie der HCV Infektion.....	22
1.10	IFN induzierte Gene und ihre Wirkungsweise.....	23
1.11	Die Rolle von anti-inflammatorischen Zytokinen bei der HCV Infektion.....	24
1.11.1	Die Rolle von Interleukin-10 bei der Infektion mit HCV.....	24
1.11.2	Die Rolle von Transforming Growth Factor- β bei der HCV Infektion.....	24
1.12	Das Dengue Virus.....	25
1.13	Die Zielsetzungen dieser Arbeit.....	25

2	Material und Methoden	27
2.1	Materialien.....	27
2.1.1	Geräte.....	27
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3	Chemikalien	28
2.1.4	Enzyme	29
2.1.5	Verwendete Kits:	29
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	30
2.2.1	Bakterienstämme	30
2.2.2	Steriles Arbeiten	30
2.2.3	Anzucht und Lagerung von E.coli	30
2.2.4	Kompetente E.coli Zellen	31
2.3	Zellbiologische Methoden	31
2.3.1	Medien und Reagenzien für die Kultivierung humaner Zellen.....	31
2.3.2	Verwendete Zelllinien:.....	31
2.3.3	Passagieren von Zellen	32
2.3.4	Einfrieren von Zelllinien	32
2.3.5	Stimulation von Huh-7 Zellen mit IFN- α , TGF- β und IL-10	32
2.3.6	Produktion von Pseudopartikeln.....	33
2.3.7	Luziferase-Assay zur Quantifizierung der Infektiösität der Pseudopartikel	34
2.3.8	DNase I Behandlung von Pseudo-Partikeln.....	35
2.3.9	Antikörper-Blockierung von CEACAM1 auf Huh-7 Zellen	35
2.4	Molekularbiologische Methoden	35
2.4.1	Verwendete Plasmide	35
2.4.2	Anhängen von 3` Überhängen nach Amplifikation für Klonierung in pcDNA3.1/V5-His-TOPO.....	36
2.4.3	Klonierung von HCV E1E2 in pcDNA3.1/V5-His TOPO TA	37
2.4.4	Dephosphorylierung von Plasmid DNA	37
2.4.5	Agarosegelelektrophorese	37
2.4.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	38
2.4.7	Formaldehyd Agarosegel-Elektrophorese.....	38
2.4.8	Restriktion von DNA	39
2.4.9	Ligation	39

2.4.10	Transformation	40
2.4.11	Minipräp.....	40
2.4.12	Maxipräp.....	40
2.4.13	Isolation von genomischer DNA.....	40
2.4.14	PCR.....	41
2.4.15	Mutagenese PCR (Site-directed Mutagenesis) zum Einfügen einer neuen Sequenz in ein bestehendes Plasmid	42
2.4.16	RT-PCR.....	43
2.4.17	Quantitative Real-time PCR/Real-time RT-PCR.....	43
2.4.18	PCR basierter Entry Assay.....	46
2.4.19	Transfektion von TOPO-E1E2His (Transfektion mit Lipofectamine 2000).....	47
2.4.20	Transfektion mit ExGen500:.....	48
2.4.21	siRNA Transfektion und anschließende Infektion mit Pseudopartikeln	48
2.4.22	RNA Extraktion.....	50
2.4.23	Konzentration und Reinheit einer DNA Lösung.....	51
2.4.24	Generierung von in vitro RNA Transkripten	51
2.4.25	Transfektion von Huh-7 Zellen mit Elektroporation.....	51
2.4.26	Infektion von Huh-7 Zellen mit Zellkulturüberständen nach Elektroporation.....	52
2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	53
2.5.1	Verwendete Antikörper.....	53
2.5.2	Lyse von eukaryontischen Zellen.....	53
2.5.3	DC Protein Assay zur Proteinbestimmung	54
2.5.4	SDS-PAGE.....	55
2.5.5	Western Blot.....	56
2.5.6	Detektion.....	56
2.5.7	Coomassie Brilliant Blue Färbung von SDS-Gelen	57
2.5.8	Immunfluoreszenzfärbung	57
2.5.9	Immunpräzipitation (IP).....	58
2.5.10	Immunpräzipitation (IP) mit Zell-Lysaten.....	58
2.5.11	Immunpräzipitation (IP) mit Pseudopartikel enthaltendem Zellkulturüberstand und CEACAM1-Fc Konstrukten.....	59
2.5.12	CEACAM1-Fc Konstrukte.....	60

2.5.13	Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie	60
2.5.14	Oberflächenfärbung	61
2.5.15	Intrazelluläre Färbung.....	61
2.5.16	Quantifizierung von CEACAM Molekülen auf der Oberfläche von HeLa Zellen mittels Qifikit® von Dako.....	62
2.5.17	Immobilisierte Metall Ionen Affinitätschromatographie (IMAC) zur Isolierung von rekombinantem HCV E1E2 Protein über einen 6 x Histidin-Tag unter nativen Bedingungen.....	63
2.5.18	Aufreinigung des HCV E1E2 Proteins mittels Ni-NTA Matrix von Qiagen unter nativen Bedingungen	65
2.6	Computeranwendungen.....	66
3	Ergebnisse.....	67
3.1	Klonierung eines chimären HCV-Dengue Virus als Modellsystem	67
3.1.1	Struktur des chimären Konstruktes und Klonierungsstrategie.....	67
3.1.2	Konstruktion neuer Restriktionsschnittstellen in pBluescript II KS+	69
3.1.3	Subklonierung der Fragmente	69
3.1.4	Klonierung von DEN NS1-3'UTR.....	70
3.1.5	Generierung von In Vitro Transkripten (IVT)	73
3.1.6	Nachweis des chimären Konstruktes in Huh-7 Zellen durch RT-PCR und Immunfluoreszenz	73
3.1.7	Überprüfung der HCV E2 Expression in 293HEK und Huh-7 Zellen mit Immunfluoreszenz	75
3.2	Generierung eines Konstrukts zur Expression und Aufreinigung von HCV E1E2 in 293HEK Zellen.....	77
3.2.1	Klonierungsstrategie von HCV E1E2 in pcDNA3.1/V5-His TOPO TA.....	77
3.2.2	Klonierung von HCV E1E2 in pcDNA3.1/V5-His TOPO TA	78
3.2.3	HCV E1E2 wird als natives Heterodimer exprimiert.....	79
3.2.4	His-Tag Aufreinigung von HCV E1E2	81
3.2.5	Erhöhung der Imidazolkonzentration	84
3.2.6	Doppelte Aufreinigung	84
3.2.7	Verwendung von Ni-NTA Agarose.....	84
3.3	Einfluss von IFN- α und den anti-inflammatorischen Zytokinen IL-10 und TGF- β auf die Infektion mit HCV Pseudopartikeln (HCVpp).....	86
3.3.1	Einfluss von IFN- α auf die Infektion mit HCV(pp).....	86

3.3.2	Einfluss von IFN- α auf die Infektion mit HCVpp: Luziferase-Assay	86
3.3.3	IFN- α reduziert die Aufnahme der HCVpp in Abhängigkeit von Zeit und Dosis	88
3.3.4	Einfluss von IFN- α auf die Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI.....	90
3.3.5	Einfluss der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β auf die Infektion mit HCVpp.....	93
3.3.6	Die Wirkung von TGF- β ist Dosis abhängig	94
3.3.7	Einfluss von TGF- β auf die Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI.....	95
3.3.8	Einfluss von IL-10 auf die Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI.....	98
3.4	Die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 für die Aufnahme von HCV.....	99
3.4.1	CEACAM1 als potentieller Rezeptor von HCV	99
3.4.2	Charakterisierung der CEACAM1 Expression auf humanen Leberzellen: Huh-7, HepG2 und primäre Hepatozyten	99
3.4.3	Einfluss von IFN- α auf die Expression von CEACAM1 auf Huh-7 Zellen	101
3.4.4	Auswirkung der Antikörper-Blockierung von CEACAM1 auf die Infektion mit HCVpp.....	102
3.4.5	Homologe Überexpression von CEACAM1 in Huh-7 Zellen	103
3.4.6	Gen Knock-down von CEACAM1 und Auswirkung auf die Infektion mit HCVpp.....	106
3.4.7	Immunpräzipitation von HCVpp und CEACAM1	108
3.4.8	Infektion von HeLa Zellen, die mit verschiedenen CEACAMs stabil transfiziert sind.....	109
3.4.9	CEACAM1 als neuer Rezeptor für das Vesicular Stomatitis Virus.....	110
4	Diskussion.....	114
4.1	Ein Dengue-HCV Konstrukt zur Generierung von chimären Viruspartikeln	114
4.1.1	Klonierung des chimären Konstrukts	114
4.1.2	Funktionalität des Konstrukts.....	115
4.1.3	Spezielle Fehlerquellen des chimären Konstrukts.....	116
4.2	Aufreinigung von rekombinantem HCV E1E2	118
4.2.1	Aufreinigung mittels 6 x His-Tag.....	118
4.2.2	Alternatives HCV E1E2 Konstrukt und Aufreinigung von HCV E2.....	120

4.3	Einfluss von IFN- α und anti-inflammatorischen Zytokinen auf die Infektion mit HCV Pseudopartikeln.....	121
4.3.1	HCVpp als Modellsystem für die Untersuchung der ersten Schritte der Infektion nach Stimulation mit Zytokinen	121
4.3.2	Eine neue Rolle für IFN- α in der HCV Abwehr?	122
4.3.3	Indirekte Regulation der Claudin-1 Genexpression durch IFN- α	123
4.3.4	Die CD81 Expression verändert sich in Huh-7 Zellen durch IFN- α nicht.....	123
4.3.5	IL-10 und TGF- β verstärken die Infektion mit HCVpp	124
4.3.6	Lücken und Tücken: HCVpp und Huh-7 Zellen (Limitationen des verwendeten Modellsystems).....	125
4.4	CEACAM1 als potentieller Rezeptor von Hepatitis C	126
4.4.1	CEACAM1 Expression auf Huh-7 Zellen, HepG2 Zellen und primären Hepatozyten.....	126
4.4.2	CEACAM1 als IFN- α reguliertes Gen	127
4.4.3	Die Rolle von CEACAM1 bei der HCV Infektion	127
4.4.4	Überexpression von CEACAM1 in Huh-7 Zellen	129
4.4.5	CEACAM1 kämpft nicht nur außen sonder auch innen	130
4.4.6	CEACAM1 als neuer Rezeptor des Vesikular Stomatitis Virus	131
5	Zusammenfassung	134
6	Abbildungsverzeichnis	136
7	Tabellenverzeichnis	138
8	Literaturverzeichnis	139
9	Abkürzungen.....	151

1 Einleitung

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist die Hauptursache für Leberzirrhose und Leberkrebs weltweit. Nach Angaben der World Health Organization (WHO) sind ungefähr 3 Prozent der Weltbevölkerung - mehr als 170 Millionen Menschen- mit dem Virus infiziert. Etwa 50 Prozent der Infektionen führen zu chronischen Lebererkrankungen mit verschiedenen klinischen Manifestationen, die von einem hauptsächlich asymptomatischen Carrier- Zustand bis hin zu chronisch aktiver Hepatitis, Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom führen können. Erstmals identifiziert wurde das Virus 1989 als Erreger der Non-A, Non-B Hepatitis (Choo *et al.* 1989). Zur Zeit werden 6 Genotypen unterschieden, die in 76 bestätigte bzw. vorgeschlagene Subtypen aufgeteilt werden (Simmonds *et al.* 2005). Die einzige momentan zur Verfügung stehende Therapie für chronische Infektionen ist die systemische Gabe von pegyliertem Interferon-alpha (IFN- α) in Kombination mit Ribavirin. Jedoch wird ein anhaltender Therapieerfolg nur bei 50 – 80 Prozent der Patienten erreicht, abhängig vom Genotyp. Tatsächlich ist eine chronische Infektion mit HCV die häufigste Ursache für eine Lebertransplantation.

Trotz der Entdeckung des Virus mit molekularbiologischen Methoden vor mehr als 15 Jahren und der Sequenzierung des kompletten Genoms, sind das Wissen über dieses Virus und die Eigenheiten der protektiven Immunantwort limitiert. Bis vor kurzem wurde die Forschung durch das Fehlen eines robusten Zellkultursystems behindert, mit dem infektiöse Viruspartikel produziert werden konnten. Zudem steht lediglich der Schimpanse als Tiermodell zur Verfügung.

Nichtsdestotrotz konnten in den letzten Jahren immense Fortschritte erzielt werden und es wurde viel über den Lebenszyklus des Virus, die Immunantwort und die Mechanismen, durch die das Virus in der Lage ist, der Immunantwort zu entkommen, in Erfahrung gebracht. Im Gegensatz dazu sind die Kenntnisse über die initialen Infektionsschritte des HCV noch in weiten Teilen hypothetisch.

1.1 Taxonomie

HCV wurde als das einzige Mitglied des *Hepacivirus* Genus klassifiziert und gehört zur Familie der *Flaviviridae* (aus dem Lateinischen: *flavus* = gelb). Die *Flaviviridae* beinhalten drei Genera: die Flaviviren, die Pestiviren und die Hepaciviren. Zu den Flaviviren zählen u.a. das Gelbfieberevirus, die Dengue Viren Typ 1-4, das West-Nile-Virus und das Japanische

Encephalitis Virus. Das Classical-Swine-Fever-Virus und das Virus der bovinen Virusdiarrhö sind charakteristische Vertreter der Pestiviren.

1.2 Genomorganisation

Das Hepatitis C Virus besitzt – so wie alle Mitglieder der Flaviviren – einen von einer Hüllmembran umgebenen Partikel, der die in Plus-Strang Orientierung vorliegende RNA enthält. Im Fall von HCV weist sie eine ungefähre Länge von 9600 Nukleotiden auf. Das Genom besteht aus einem langen, offenen Leserahmen (long open reading frame, ORF), der für ein Polyprotein codiert, welches wiederum proteolytisch in eine distinkte Anzahl von Produkten gespalten wird. Die Translation des HCV ORF wird über eine etwa 340 Nukleotide lange 5' untranslatierte Region (UTR) eingeleitet, die die Funktion einer *IRES-Sequenz* (*internal ribosome entry site*) hat, welche die direkte Bindung der Ribosomen nahe dem Start Codon des ORF erlaubt (Tsukiyama-Kohara *et al.* 1992; Foy *et al.* 2005). Dies steht im Gegensatz zur RNA der Flavi- und Pestiviren, die am 5'-Ende eine sogenannte *Cap-Struktur* aufweisen.

Die Translation des ORF resultiert in einem Vorläuferpolyprotein, das co-und post-translational, sowohl durch zelluläre als auch virale Proteinasen in 10 verschiedene Produkte prozessiert wird (Bartenschlager & Lohmann 2000). Das erste Spaltprodukt des Polyproteins ist das Core Protein, das die Hauptkomponente des Nukleokapsids bildet (Yasui *et al.* 1998). Im Anschluss an das Kapsidprotein ist das E1-Protein lokalisiert, ein glykosiliertes Membranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 33 kD. Anschließend folgen das zweite Glykoprotein E2, ein kleines Protein, das p7 genannt wird und die Nichtstrukturproteine NS2 bis NS5B. In Abbildung 1.1 sind der Aufbau des HCV Genoms, so wie die Translation und Polyproteinprozessierung schematisch dargestellt.

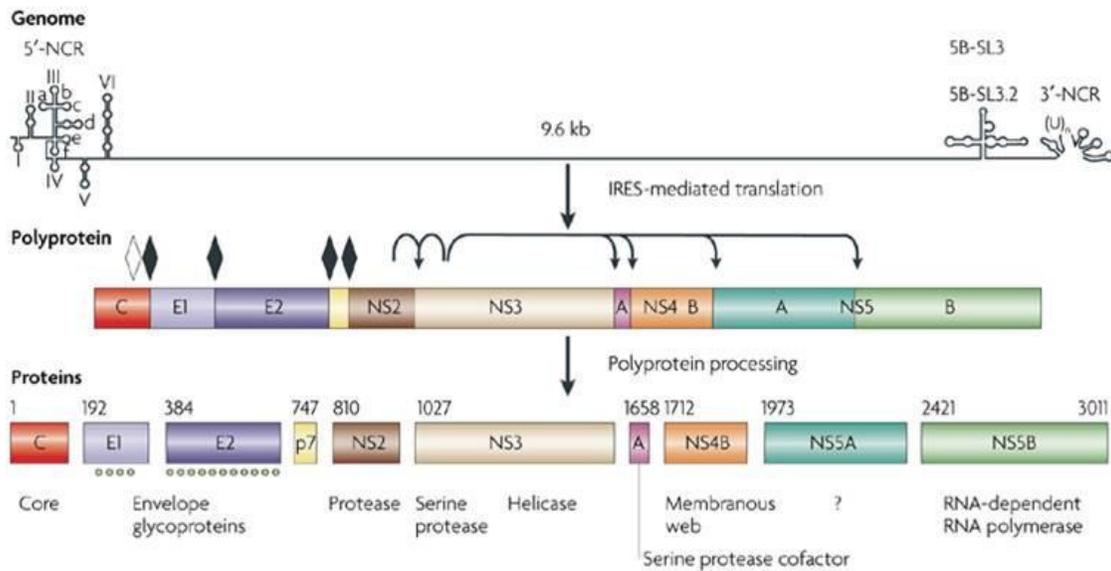


Abb. 1.1: Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des Hepatitis C Virus. Das 9,6 kb positiv-strangige RNA-Genom ist schematisch ganz oben auf der Zeichnung dargestellt. Die IRES-vermittelte Translation führt zu einem Polyprotein-Vorläufer, der prozessiert wird in die matten Struktur- und Nicht-Strukturproteine. Über jedem Protein sind die Aminosäure-Nummern abgebildet. Die schwarzen Raute-indizieren die Spaltstellen für die ER-Signalpeptidase. Die weiße Raute bedeutet eine weitere Prozessierung des Core-Proteins durch eine Signalpeptid-Peptidase. Die Pfeile deuten die Positionen an, an denen die Spaltung durch die HCV NS2-3 und NS3-4A Protease erfolgt. Die Punkte unter E1 und E2 indizieren die Glykosylierungen der Glykoproteine E1 und E2. Aus: (Moradpour *et al.* 2007b).

1.3 Die Strukturproteine von HCV

1.3.1 Das Core Protein

Beim Core Protein handelt es sich um ein RNA-bindendes Protein, bei dem man davon ausgeht, dass es das virale Nukleokapsid bildet. Es konnte gezeigt werden, dass das mature Core als Dimer in einer alpha-helicalen Form vorliegt und ein Membranprotein darstellt (Boulant *et al.* 2005).

1.3.2 Die E1 und E2 Glykoproteine

E1 und E2 sind Typ I Transmembran (TM) Glykoproteine mit N-terminalen Ektodomänen von 160 bzw. 334 Aminosäuren und einer kurzen C-terminalen Transmembrandomäne (TMD) von ungefähr 30 Aminosäuren. Die beiden Proteine setzen sich zu einem nicht-kovalenten Heterodimer zusammen (Deleersnyder *et al.* 1997), wobei ihre Transmembrandomänen eine wesentliche Rolle bei der Biogenese des E1E2 Heterodimers spielen (Op de *et al.* 2001). E1 und E2 sind zudem hoch glykosyliert, (Goffard & Dubuisson 2003).

In der Sequenz des E2 Hüll-Glykoproteins wurden so genannte Hypervariable Regionen (HVR) identifiziert (Weiner *et al.* 1991). Die Variabilität dieser Region wird vermutlich durch den Antikörper-Selektionsdruck des Immunsystems vorangetrieben. Es wurde außerdem eine zweite Hypervariable Region HVR2 beschrieben (Weiner *et al.* 1991), die wahrscheinlich an der E2 Rezeptorbindung beteiligt ist (Roccasecca *et al.* 2003).

Die zwei Hüll-Glykoproteine E1 und E2 spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Schritten im Lebenszyklus von HCV. Sie sind essentiell für die Virusaufnahme (Bartosch & Cosset 2006; Cocquerel *et al.* 2006) und sie sind beteiligt am Zusammenbau von infektiösen Viruspartikeln (Wakita *et al.* 2005). Das E1E2 Heterodimer repräsentiert die virale Komponente, die an der Oberfläche des HCV Partikels präsent ist und stellt aus diesem Grund den optimalen Kandidaten als Ligand für zelluläre Rezeptoren dar.

1.3.3 Das p7 Protein

Das p7 Polypeptid ist innerhalb des HCV Polyproteins zwischen den Struktur- und den Nicht-Strukturproteinen lokalisiert (Lin *et al.* 1994). Das p7 Polypeptid zeigt zumindest in artifiziellen Membranen Ionenkanal-Aktivitäten (Griffin *et al.* 2004). Neueste Untersuchungen zeigen, dass p7 äußerst wichtig ist für einen effektiven Zusammenbau (assembly) und die Freisetzung der Virionen, primär in der späten Phase des HCV Replikationszyklus (Steinmann *et al.* 2007). Zudem spielt es für die Infektiosität des Virus eine essentielle Rolle (Jones *et al.* 2007).

1.4 Die Nicht-Strukturproteine von HCV: NS2, NS3, NS4A, so wie NS5A und NS5B

Bei NS2 handelt es sich um ein integrales Membranprotein, das für den kompletten Replikationszyklus sowohl *in vitro* als auch *in vivo* essentiell ist (Pietschmann *et al.* 2006; Kolykhalov *et al.* 2000). NS2 spaltet autoproteolytisch zusammen mit NS3 an der Schnittstelle zwischen NS2 und NS3 (Grakoui *et al.* 1993). Zudem ist es für die Infektiosität der Viruspartikel wichtig (Jones *et al.* 2007).

NS3 assoziiert nicht-kovalent mit NS4A, welches die Protease gegen proteolytische Degradation stabilisiert. Die NS3-4A Protease ist für die Polyprotein-Spaltung der Region „downstream“ von NS3 verantwortlich, wobei diese Aktivität für die Generierung von

Komponenten des viralen RNA Replikationskomplexes essentiell ist (Lindenbach & Rice 2005).

Außer seiner Rolle in der Prozessierung des Polyproteins wurde gezeigt, dass die NS3-NS4A Protease verantwortlich für die Blockierung der IFN-Induktion ist, indem sie die IRF3 (Interferon regulatory factor 3) Phosphorylierung verhindert (Foy *et al.* 2003). Die NS3-NS4A Protease greift hierbei sowohl in den TLR3/TRIF Signalweg (Li *et al.* 2005a) als auch in den RIG-I Helicase Signalweg ein (Meylan *et al.* 2005; Lin *et al.* 2006; Li *et al.* 2005b).

Das integrale Membranprotein NS4B ist für die Verankerung des Replikationskomplexes an Membranen verantwortlich (Hugle *et al.* 2001; Moradpour *et al.* 2003). Bei NS5A handelt es sich um ein Protein, welches für die HCV Replikation von zentraler Bedeutung ist (Appel *et al.* 2006). Zusätzlich zu seiner Rolle in der HCV Genomreplikation, ist NS5A wahrscheinlich an der Modulation der Interferon Antwort beteiligt (Tan & Katze 2001). Das letzte Protein des Polyproteins, NS5B, hat die Funktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, welche die katalytische Komponente der HCV Replikationsmaschinerie repräsentiert (Lohmann *et al.* 1997).

1.5 HCV Eintritt in die Zelle

Die kürzlich entwickelten, funktionalen Modelle zur Untersuchung der frühen Schritte der HCV Infektion, konnten zeigen, dass es sich um einen langsamen und komplexen mehrschrittigen Prozess handelt, der das Vorhandensein von mehreren Faktoren beinhaltet, die zum Eintritt des Virus in die Zelle beitragen. Vor allem die Entwicklung von HCV Pseudopartikeln (Bartosch *et al.* 2003a) und dem Zellkultursystem für HCV (Wakita *et al.* 2005) haben dazu beigetragen. Nichtsdestotrotz ist dieser Prozess in weiten Teilen noch hypothetisch und beruht fast ausschließlich auf der Benutzung von Modellsystemen.

1.5.1 CD81 und HCV Eintritt in die Zelle

CD81, ein Mitglied der Tetraspaninfamilie, wurde als erster putativer Rezeptor von Pileri *et al.* (1998) mit Hilfe von löslichem HCV E2 (sE2 für *soluble E2*) identifiziert. CD81 enthält vier Transmembrandomänen, kurze intrazelluläre Domänen und zwei extrazelluläre Schlaufen, die als „small extracellular loop“ (SEL) und als „large extracellular loop“ (LEL) bezeichnet werden (Abb1.3). Untersuchungen sowohl mit HCV Pseudopartikeln (HCVpp) als auch mit dem Zellkultursystem für HCV (HCVcc; cc für *cell culture*) (Kap.1.12) haben eine Beteiligung von CD81 an der HCV Aufnahme in die Zelle bestätigt (Zhang *et al.* 2004; Akazawa *et al.*

2007). Die Bindungsstelle von CD81 für E2 wurde innerhalb des LEL lokalisiert und spezifische Aminosäuren, die für diese Interaktion essentiell sind, konnten identifiziert werden (Higginbottom *et al.* 2000; Drummer *et al.* 2002).

Die exakte Funktion für CD81 hinsichtlich der HCV Aufnahme ist noch nicht vollständig verstanden. Die Expression von humanem CD81 in nicht hepatischen Zelllinien vermittelt nicht automatisch eine Infektion mit HCVpp, was zu der Annahme führt, dass noch andere Moleküle für die HCV Aufnahme notwendig sind (Bartosch *et al.* 2003b). Zwar wird CD81 ubiquitär *in vivo* exprimiert, jedoch ist das Tetraspanninnetz Zelltyp-spezifisch, weshalb unter anderem auch nicht alle Zellarten, die CD81 auf ihrer Oberfläche besitzen, infiziert werden können.

1.5.2 Claudin-1 als Co-Rezeptor

2007 konnten Evans *et al.* Claudin-1 als neuen Co-Rezeptor für HCV identifizieren. Bei Claudin-1 (CLDN1) handelt es sich um ein *tight junction* Molekül, das sehr hoch in der Leber exprimiert wird. Dieses Molekül ist notwendig für die Infektion von humanen Hepatomzelllinien und ist von allen bisher beschriebenen Molekülen, die an der HCV Aufnahme beteiligt sind, das erste, das eine HCV Infektion von nicht-hepatischen Zellen ermöglicht, wenn diese CLDN1 rekombinant exprimieren. Claudin-1 ist ein 211 Aminosäuren umfassendes Protein mit vier transmembranen Helices, intrazellulären Amino- und Carboxyl-Termini und zwei extrazellulären Schleifen (*loops*; EL= Extracellular Loop) (Abb 1.3). Für die Infektion mit HCVpp wurde das N-terminale Drittel vom EL1 von Claudin-1 als essentiell identifiziert. Experimente mit blockierenden Antikörpern deuten darauf hin, dass CLDN1 an der späten Phase der HCV Aufnahme beteiligt ist, nach Virus-Bindung und Interaktion mit dem HCV Co-Rezeptor CD81. CD81, sowie die beiden anderen, für den Eintritt in die Zelle wichtigen Moleküle sind in Abb 1.3. schematisch dargestellt.

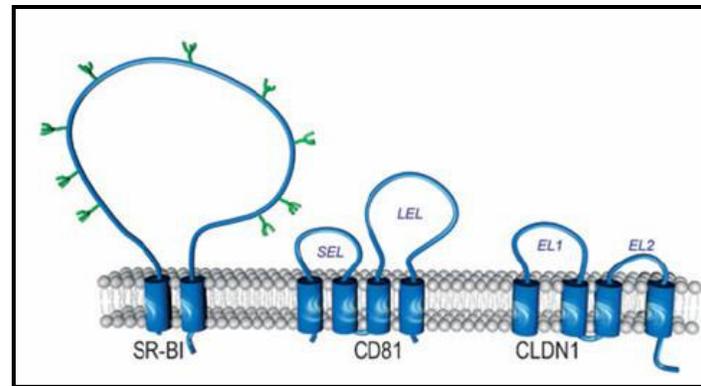


Abb. 1.2: Rezeptormoleküle für HCV. Schematische Darstellung von SR-BI, CD81 und Claudin-1. Abgebildet sind jeweils die Transmembrandomänen sowie bei SR-BI die neun Glykosylierungsstellen an der extrazellulären Schleife. SEL/LEL: small/large extracellulat loop. EL1/EL2: extracellular loop 1/2. Nach (Helle & Dubuisson 2007)

1.5.3 SR-BI und HCV Eintritt in die Zelle

Mit Hilfe von löslichem E2 haben Scarselli *et al.* (2002) den humanen „scavenger receptor class B type I“ (SR-BI) als weiteren möglichen Co-Rezeptor für HCV identifiziert. Bei SR-BI handelt es sich um ein Glykoprotein, das an der Zelloberfläche lokalisiert ist (Acton *et al.* 1994). Es besitzt zwei kurze zytoplasmatische Domänen und zwei membranspannende Domänen, die voneinander durch eine große, extrazelluläre Domäne getrennt sind (Rhains & Brissette 2004a) (Abb 1.3). Der humane SR-BI weist 9 potentielle N-Glykosylierungsstellen auf (Rhains & Brissette 2004b). SR-BI ist ein physiologisch relevanter Lipoproteinrezeptor, der für die Aufnahmen von Cholesterylestern aus High Density Lipoprotein (HDL) verantwortlich ist (Rigotti *et al.* 1997).

Obwohl die Interaktion mit löslichem E2 spezifisch ist (Scarselli *et al.* 2002), konnte bisher keine direkte Interaktion zwischen SR-BI und dem E1E2 Heterodimer gezeigt werden. Untersuchungen mit HCV Pseudopartikeln (HCVpp) konnten aber eine Beteiligung von SR-BI in der HCV Aufnahme bestätigen (Bartosch *et al.* 2003b; Voisset *et al.* 2005). Vorinkubation der humanen Hepatomzelllinie Huh-7 Zellen mit einem polyklonalen Antikörper gegen SR-BI, konnte die Infektiosität von HCVpp reduzieren (Bartosch *et al.* 2003b). SR-BI wird in einer Vielzahl von Säugergeweben und -zelltypen exprimiert (Bartosch *et al.* 2003b; Rhains & Brissette 2004a), aber seine Expression ist vor allem in der Leber stark erhöht (Acton *et al.* 1996; Landschulz *et al.* 1996). SR-BI ist u.a. für HDL (high density lipoprotein) ein Rezeptor (Acton *et al.* 1994). HDL wiederum erleichtert die HCV Infektion. Eine bestehende Theorie hierzu ist, dass die HCV Partikel mit SR-BI und HDL interagieren, um speziell Mikrodomänen,

die mit Cholesterol angereichert sind, anzusteuern, was wiederum die Aufnahme verbessert, indem die Fusion mit der Membran erleichtert wird (Voisset *et al.* 2005; Dreux & Cosset 2006).

1.5.4 Weitere zelluläre Faktoren, die am Eintritt von HCV in die Zelle beteiligt sind

Außer CD81, Claudin-1 und SR-BI sind noch weitere Moleküle beschrieben worden, die eine wahrscheinliche Rolle beim Eintritt des Virus in die Zelle spielen. Hierzu zählen die C-Typ Lektine L-SIGN und DC-SIGN. Sowohl für HCVpp als auch native HCV Partikel konnte gezeigt werden, dass diese an Zellen binden, die L-SIGN oder DC-SIGN exprimieren (Gardner *et al.* 2003; Pohlmann *et al.* 2003; Lozach *et al.* 2004). Da diese Moleküle aber nicht auf Hepatozyten exprimiert werden, dienen sie zumindest für diese Zellen nicht als Rezeptoren. HCV bindet in Serum an LDL (low density lipoprotein) und an VLDL (very low density lipoprotein) (Andre *et al.* 2002). Bei nativen Partikeln, die aus HCV-infizierten Patienten isoliert wurden, hat man festgestellt, dass der LDL Rezeptor die HCV Internalisierung vermittelt, in dem er an Virion-assoziierte LDL Partikel bindet. Aus diesem Grund wurde der LDL Rezeptor als putativer Rezeptor für HCV vorgeschlagen (Agnello *et al.* 1999; Wunschmann *et al.* 2000).

Auch hoch-sulfatisiertes Heparansulfat steht in der Diskussion als initiale Stelle für die HCV Anheftung und Konzentration auf der Zelloberfläche zu fungieren (Barth *et al.* 2003). Für verschiedene andere Viren, einschließlich der Flaviviren, konnte es als erste Bindungsstelle identifiziert werden (Hilgard & Stockert 2000). Jedoch konnte, zumindest für HCV Pseudopartikel, diese Annahme nicht bestätigt werden. In Abb. 1.4 ist das zur Zeit bestehende Modell für die HCV Bindung und die Virusaufnahme in die Zelle zusammengefasst.

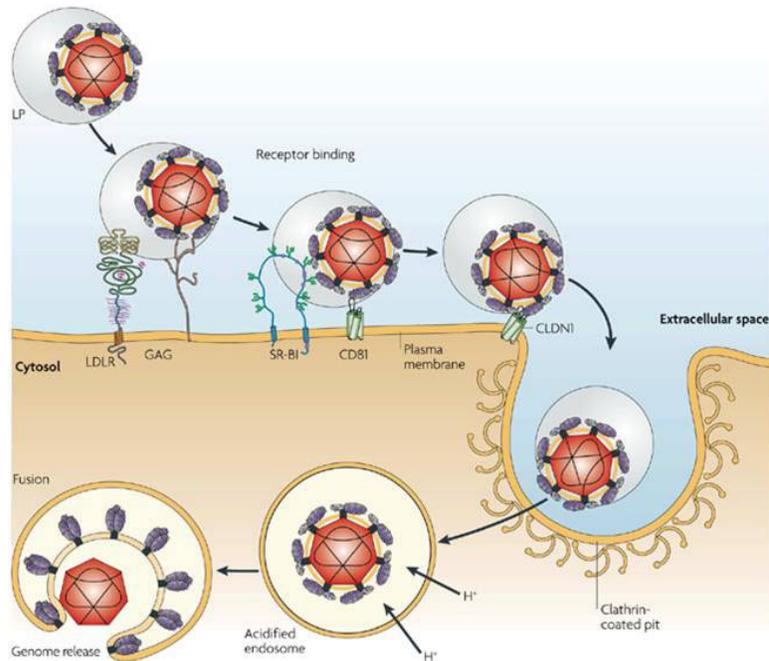


Abb. 1.3: Aktuelles Modell für den HCV Eintritt in die Zelle. Zirkulierende HCV Partikel assoziieren mit low und very low density Lipoprotein (LP). An der Bindung des Virus und der Aufnahme könnten der low density lipoprotein Rezeptor (LDLR), Glukosaminoglukane (GAG), SR-BI, CD81 und Claudin-1 beteiligt sein. Claudin-1 fungiert in einem späten Schritt der Aufnahme. Die Internalisierung des Virus erfolgt über eine Clathrin-vermittelte Endozytose. Ansäuerung des Endosoms induziert die Fusion mit dem HCV Glykoprotein. Aus: (Moradpour *et al.* 2007b).

1.6 HCV Lebenszyklus (Replikationszyklus)

Die primären Wirtszellen für HCV sind Hepatozyten, jedoch konnte eine Replikation auch für periphere Blut-Mononukleäre Zellen (PBMNCs) und verschiedene B- und T-Zelllinien gezeigt werden. Basierend auf den bis jetzt gewonnenen Erkenntnissen wurde für den HCV Lebenszyklus folgendes Modell vorgestellt.

Im ersten Schritt binden die HCV Partikel an die Wirtszelle durch spezifische Interaktionen des HCV Glykoproteins E2 mit einem bisher nicht identifizierten Rezeptorkomplex, der wahrscheinlich CD81 einschließt. Nach der Adsorption an die Zelloberfläche gelangt das Virus durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zellen (Blanchard *et al.* 2006). Die Endosomenmembran verschmilzt mit der des Virus, wodurch das Kapsid in das Zytoplasma gelangt und die Plus-Strang RNA ins Zytoplasma freigesetzt wird. Abbildung 1.2 fasst den HCV Lebenszyklus zusammen.

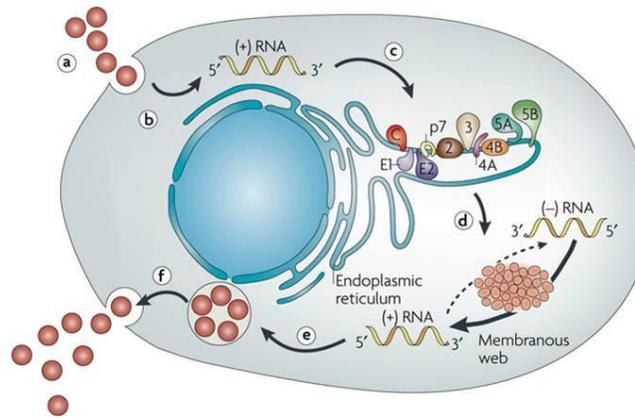


Abb. 1.4: Lebenszyklus des Hepatitis C Virus. Virus-Bindung und Internalisierung (a); Freisetzung im Zytoplasma und *uncoating* (b); IRES vermittelte Translation und Polyproteinprozessierung (c); RNA Replikation (d); Verpackung und Zusammensetzung der viralen Partikel (e) Heranreifung der Virionen und deren Freisetzung (f). Die Topologie der HCV Struktur und Nicht-Strukturproteine an der ER-Membran ist schematisch dargestellt. Die HCV Replikation findet in einer speziellen Membranalteration statt, dem *Membranous web*. Aus: (Moradpour *et al.* 2007b).

Durch Interaktion der IRES-Sequenz mit zellulären Ribosomeneinheiten wird die Translation initiiert. Das Polyprotein wird prozessiert und es bildet sich ein Membran-assoziiierter Replikationskomplex, der sich aus viralen Proteinen, replizierender RNA, umgewandelten zellulären Membranen und zusätzlichen Wirtszellfaktoren zusammensetzt (Egger *et al.* 2002; Gosert *et al.* 2003).

Die vorliegende Plus-Strang RNA wird durch die aus NS3-5B bestehende Replicase in Minus-Strang RNA umgeschrieben, die wiederum als Matrize für die Bildung neuer Plus-Stränge dient. Diese repräsentieren zum einen das RNA-Genom, zum anderen finden sie als mRNA für die Synthese weiterer Virusproteine Verwendung. Über Interaktion mit den Strukturproteinen wird die Plus-Strang RNA ins Kapsid eingelagert. Die Partikel werden mit einer Hüllmembran versehen, die sich durch so genanntes Budding in das Lumen der ER-Membran bildet und sich anschließend abgeschnürt. Nach Transport der Partikel durch den Golgi-Komplex erfolgt die Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel aus der infizierten Zelle.

1.7 Modellsysteme zur Erforschung von HCV

Da bis zur Entwicklung des HCV Zellkultursystems JFH1 (Wakita *et al.* 2005) kein System zur Verfügung stand, mit dem man den vollständigen Lebenszyklus des Hepatitis C Virus untersuchen konnte, wurden verschiedene Modellsysteme entwickelt, mit denen Teilaspekte,

wie der HCV Eintritt in die Zelle (entry) oder die Replikation untersucht werden konnten.

1.7.1 Das Replikon-System

Die Entwicklung des so genannten Replikonsystems stellt ein Meilenstein in der HCV Forschung dar (Lohmann *et al.* 1999; Bartenschlager 2005). Der Prototyp des subgenomischen Replikons benutzt einen definierten HCV Genotyp 1b Klon, der die Bezeichnung Con1 trägt. In diesem System wurde die Region für die Strukturgene durch die Sequenz, die für das Neomycin-Phosphotransferase Gen codiert, ersetzt, so dass nur noch die Nichtstrukturgene von HCV vorhanden waren. Mit Hilfe des Replikon-Systems war es möglich die HCV RNA Replikation *in vitro* zu untersuchen, so wie u.a. strukturelle Eigenschaften des Replikationskomplexes und Virus-Wirtzellinteraktionen (Bartenschlager & Lohmann 2000; Moradpour *et al.* 2007a).

Als kritisch für die Brauchbarkeit dieses Systems hat sich die Entdeckung von spezifischen Aminosäuresubstitutionen, d.h. Zellkultur-adaptiven Veränderungen erwiesen, die die Initiation der Replikation um ein Vielfaches erhöhen (Blight *et al.* 2000).

1.7.2 Lösliches HCV E2 Protein

Lösliche, trunkierte Formen von E2 (sE2 für *soluble* E2), die an humane Zellen binden, wurden benutzt, um Interaktionen mit verschiedenen zellulären Oberflächenmolekülen zu identifizieren. Hierzu gehören CD81 (Pileri *et al.* 1998) der Scavenger Rezeptor Class B Type I (SR-BI) (Scarselli *et al.* 2002) und das für dendritische Zellen spezifische *intercellular adhesion molecule3-grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) (Gardner *et al.* 2003; Lozach *et al.* 2003; Pohlmann *et al.* 2003).

1.7.3 HCV Pseudopartikel

Ein großer Fortschritt in der Erforschung des HCV Eintritts in die Zelle wurde durch die Generierung von HCV Pseudopartikeln (HCVpp) erlangt, die aus unmodifizierten HCV Hüllglykoproteinen, die in retrovirale Kapsidpartikel eingebaut sind, bestehen (Bartosch *et al.* 2003a; Drummer *et al.* 2003). Für einen retroviral basierten Ansatz hat man sich entschieden, da deren Kapside in der Lage sind, eine Vielzahl an zellulären und viralen Glykoproteinen zu inkorporieren (Sandrin *et al.* 2002). Zusätzlich können sie problemlos genetische Marker verpacken und sie in Wirtszell-DNA integrieren (Negre *et al.* 2002). Extensive

Charakterisierung der HCVpp zeigte, dass diese die ersten Schritte des HCV Lebenszyklus imitieren. Auf die Produktion der HCV Pseudopartikel wird ausführlich im Material- und Methodenteil eingegangen.

1.7.4 HCV Zellkultursystem (HCVcc)

Kürzlich haben 3 voneinander unabhängige Gruppen die Entwicklung eines stabilen *in vitro* HCV Infektionssystems bekannt gegeben. Dieses sog. Zellkultursystem (HCVcc) basiert auf der Transfektion der humanen Hepatomzelllinie Huh-7 mit genomischer HCV RNA, die von einem geklonten viralen Genom abstammt (Wakita *et al.* 2005). Dieses einzigartige HCV Genom (JFH1), stammt von dem Blut eines Japaners mit fulminanter Hepatitis. Es repliziert sehr gut *in vitro* und produziert zudem infektiöse Partikel, die in Zellkultur passagiert werden können (Lindenbach *et al.* 2005; Wakita *et al.* 2005).

1.7.5 In vivo Modelle

Die einzige Spezies außer dem Menschen, die reproduzierbar von HCV infiziert werden kann, ist der Schimpanse. Beim Schimpanse handelt es sich aber um eine bedrohte Spezies und auch ethische Gründe machen seinen Einsatz nur äußerst limitiert möglich.

1.8 Leberschädigung durch HCV

HCV an sich ist nicht zytotoxisch, das heißt es zerstört selbst die Leber, z.B. bei der Freisetzung neu gebildeter Virionen (Spengler & Nattermann 2007), nicht. Vielmehr wird die Leberschädigung durch die Viruserkrankung immunologischen, jedoch größtenteils hypothetischen Mechanismen zugeschrieben. Eine Theorie lautet, dass HCV spezifische zytotoxische T Lymphozyten (CTL für *Cytotoxic T Lymphocytes*) HCV infizierten Leberzellen angreifen, indem sie Apoptose über den Granzym B/ Perforin Signalweg induzieren (zytolytischer Mechanismus). Die CTLs setzen auch den Fas Liganden und inflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α frei. Die Freisetzung dieser löslichen Effektormoleküle hilft die Infektion zu kontrollieren, verursacht jedoch auch eine Zerstörung von nicht-infizierten Leberzellen bei, indem HCV-unspezifische Lymphozyten die Leber infiltrieren und nicht-infizierte Leberzellen schädigen. Hier konnte vor Allem die Interaktion zwischen FasL und Fas, so wie TNF- α und Perforin gezeigt werden (Ando *et al.* 1997; Gremion *et al.* 2004).

1.9 Therapie der HCV Infektion

Bei einer Erkrankung wird zur Zeit eine unspezifische immunstimulierende Kombinationstherapie mit pegyliertem IFN- α und dem Guanosin-Analogon Ribavirin, angewendet, da spezifische, antiviral wirkende Medikamente noch immer nicht zur Verfügung stehen (Bacon & McHutchison 2007). Bei pegyliertem IFN- α ist ein makromolekulares Polyethylenglycol (PEG) kovalent an rekombinantes IFN- α gebunden. Dies führt zu einem besserem pharmakokinetischem Profil, z.B. längerer Halbwertszeit und einer höheren Viruselimination (Glue *et al.* 2000; Zeuzem *et al.* 2000).

Bei dieser Kombinationstherapie erhält man eine Ansprechrate von ca. 55 % (Bacon & McHutchison 2007). Sie hängt unter anderem auch vom HCV Genotyp ab.

Das Ansprechen auf die antivirale Therapie gegen HCV kann in drei generelle Kategorien unterteilt werden:

1) eine langfristig anhaltende antivirale Antwort (*sustained virological response = SVR*), die zur Viruselimination führt (viral clearance), **2)** eine zunächst erfolgende erfolgreiche Therapie, bei der aber nach Beendigung der Therapie der Patient einen Rückfall erleidet (*end-of-treatment response and relapse*) und **3)** Patienten, die gar nicht auf die Therapie ansprechen (*non-response*) (Abb.1.5)

Ein Nicht-Ansprechen auf die Therapie (*non-response*) tritt bei etwa einem Drittel der Patienten mit chronischer Hepatitis C auf. Hier führt die Therapie weder zu einer Unterdrückung der Replikation, die sich in einem raschen Abfall der Viruslast widerspiegelt, noch zur Viruselimination von Virus-infizierten Zellen. Welche Faktoren hier vorliegen, warum die Mechanismen von Interferon- α und Ribavirin nicht adäquat greifen können, ist bisher nicht bekannt.

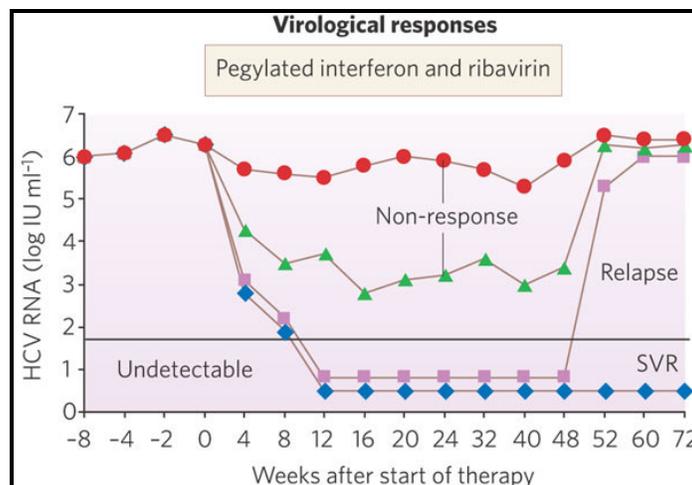


Abb. 1.5: Virologische Antwort (response) auf die HCV Therapie. Verschiedene Muster der virologischen Antwort während der Interferon- α basierten Therapie der chronischen HCV. SVR: sustained virological response. Aus (Feld & Hoofnagle 2005)

1.10 IFN induzierte Gene und ihre Wirkungsweise

IFN- α , das zu den Typ 1 Interferonen zusammen mit IFN- β , ω und λ gehört, spielt eine zentrale Rolle in der angeborenen antiviralen Immunantwort (Bekisz *et al.* 2004; Sen 2001). IFN- α hat zwar potente antivirale Eigenschaften, jedoch wirkt es nicht direkt gegen das Virus oder gegen den Replikationskomplex, sondern vielmehr induziert es sogenannte IFN-stimulierte Gene (ISGs), die einen nicht-Virus spezifischen antiviralen Status in der Zelle etablieren (Bekisz *et al.* 2004; Sen 2001). Dieser besteht u.a. in dem Abbau von viraler RNA und der Inhibition der viralen Replikation sowie Transkription.

Zu den bisher am besten charakterisierten Genen, die durch IFN induziert werden, zählen die Proteinkinase R (PKR), die 2',5'-Oligoadenylat Synthetase (OAS) und RNase L, die RNA-spezifische Adenosin Deaminase (ADAR1) und die Mx-Proteine (Samuel 2001).

Exogen appliziertes rekombinantes IFN- α bindet an zelluläre Rezeptoren und aktiviert diese, was dann zur gleichen Signalkaskade führt, wie sie bei endogener Produktion auftritt. Aus diesem Grund wird angenommen, dass bei der IFN Therapie ähnliche Mechanismen wirken wie bei endogenem IFN, wobei der größere Effekt des exogen angewendeten IFN unter anderem auf die höhere Konzentration im Organismus zurückgeführt wird.

1.11 Die Rolle von anti-inflammatorischen Zytokinen bei der HCV Infektion

HCV wird in der akuten Phase der Infektion selten komplett eliminiert, so dass die meisten Patienten chronisch infiziert werden und eine chronische Hepatitis entwickeln. Es gibt immer mehr Anzeichen dafür, dass sowohl der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) als auch Interleukin-10 (IL-10) zur Aufrechterhaltung einer persistierenden viralen Infektion beitragen (Ray *et al.* 2003; Hennig *et al.* 2007).

1.11.1 Die Rolle von Interleukin-10 bei der Infektion mit HCV

IL-10 ist ein Zytokin, das unter anderem das Zytokinprofil von T Helfer 1 (Th1)/ Th2 Zellen beeinflusst und somit sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort auf eine Infektion betrifft (Moore *et al.* 2001). Bei der HCV Infektion wird die Produktion von IL-10 induziert. Die erhöhte IL-10 Produktion wiederum wird mit persistierender Virusinfektion, einem höheren Grad an Leberentzündung und der Tendenz Leberkrebs zu entwickeln in Zusammenhang gebracht (Sobue *et al.* 2001).

IL-10 steht auch in der Diskussion, die Funktion von dendritischen Zellen durch IL-10 sekretierende natürliche Killerzellen (NK-Zellen) während einer HCV Infektion herunterzuregulieren (Kanto & Hayashi 2007). Zudem wurde die erhöhte IL-10 Produktion auch als ein möglicher Mechanismus vorgeschlagen, der zu einer ineffizienten CD4⁺ T-Zell Antwort beiträgt (Gramenzi *et al.* 2005).

IL-10 inhibiert außerdem die Entwicklung und Aktivierung von NK-Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der HCV Infektion vor allem während der akuten Phase spielen (Biron *et al.* 1999).

Innerhalb der der IFN- α Therapie hat IL-10 möglicherweise autoregulatorische Funktionen (Luik *et al.* 2004).

1.11.2 Die Rolle von Transforming Growth Factor- β bei der HCV Infektion

Die Expression von TGF- β wird ebenfalls mit einer persistierenden HCV Infektion und zudem mit Leberfibrose assoziiert (Ray *et al.* 2003). Eine niedrigere TGF- β Produktion hingegen scheint mit einer verbesserten Viruselimination zu korrelieren (Kimura *et al.* 2006). So wie IL-10 ist auch TGF- β ein wichtiger Faktor in der Immunreaktion bei einer HCV Infektion, indem es die Funktion von Immunzellen alteriert. TGF- β ist ein stark immunsuppressives Zytokin, dass die Proliferation und Zytotoxizität von NK-Zellen inhibiert (Rook *et al.* 1986). Diese wiederum

spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung der HCV Infektion, vor allem während der akuten Phase. TGF- β scheint auch in die Suppression einer HCV spezifischen T-Zellantwort involviert zu sein (Alatrakchi *et al.* 2007).

1.12 Das Dengue Virus

Das Dengue Virus (DEN) ist ein Mitglied des Genus Flavivirus innerhalb der Familie der *Flaviviridae*. Analog zu HCV enthält er ein etwa 10 kb langes positiv Strang RNA Genom, das in einem mit einer Hülle umgebenden Nukleokapsid eingeschlossen ist (Westaway *et al.* 1985). Die Lipidmembran enthält ein Haupt-Hüllprotein (*envelope* protein), das mit einem zweiten M (*membrane-*) Protein assoziiert vorliegt. In Einklang mit der Genomorganisation anderer Flaviviren, enthält die DEN RNA ein langes offenes Leseraster, das die genetische Information für ein Polyprotein enthält. Dabei liegen die Strukturproteine Core, E (*envelope* = Hüllprotein) und prM (prM = precursor M, entspricht einem Vorläuferprotein) auf der N-terminalen Hälfte und die Nicht-Strukturproteine (NS-Proteine) NS1-NS5 auf der C-terminalen Hälfte vor (Falgout *et al.* 1989).

Im Gegensatz zum Hepatitis C Virus, lässt sich das Dengue Virus sehr gut in Zellkultur vermehren (Hilgard & Stockert 2000).

1.13 Die Zielsetzungen dieser Arbeit

Das Zellkultursystem für Hepatitis C (HCVcc), mit dem es möglich ist, infektiöse Hepatitis C (HCV) Partikel zu generieren und den gesamten Lebenszyklus des Virus zu untersuchen, ist erst kürzlich publiziert worden. Zuvor wurden Modellsysteme benutzt, um Teilaspekte wie Replikation oder Aufnahme des Virus zu untersuchen.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, Modellsysteme zu generieren, um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, durch die das HCV seine Wirtszelle erkennt, an sie bindet und in diese Zellen aufgenommen wird. Als erstes Modellsystem sollte ein chimärer Flavivirus, bestehend aus den Nicht-Strukturproteinen von Dengue Virus (DEN) und den Strukturproteinen von HCV kloniert werden und so die Generierung von chimären HCV-DEN Viruspartikeln ermöglichen. Das Dengue Virus (DEN) weist alle typischen Charakteristika der Flaviviren auf und ist in seiner Genomorganisation dem Hepatitis C Virus sehr ähnlich. Nach Fertigstellung sollten die chimären Viruspartikel zunächst bezüglich ihrer Funktionalität charakterisiert werden. Begleitend bzw. alternativ sollte mit einem zweiten Modellsystem die

rekombinante Expression der HCV Glykoproteine E1E2 in 293HEK Zellen und die anschließende Isolierung des Proteinkomplexes über einen fusionierten His-Tag mittels Affinitätschromatographie ermöglicht werden. Mit Hilfe der chimären Viruspartikel und dem rekombinanten HCV Glykoprotein sollten neue potentielle Liganden für HCV identifiziert und charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoklav	Systec GmbH, Wetzlar
BioPhotometer	Eppendorf
Inkubator CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermocycler Gene Amp 9600	Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, USA
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad
Sterilbank (Biological Safety Cabinet Class II)	NuAire, Plymouth, USA
Zentrifuge 5810 R und 5415 R	Eppendorf, Hamburg
iCycler iQ™ Real-Time Detection	Bio-Rad
Ultra-Turraxx T25	IKA-Labortechnik
Power Supply Power Pack HC	Bio-Rad
Incubator Shaker innova 4000	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Mikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf
Wasserbad	GFL, Burgwedel
ELISA Reader ELx808	BIO-TEK Instruments

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

15 ml Röhren	Sarstedt
50 ml Röhren	Sarstedt
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
FACS Röhrchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube BD Falcon)	BD Falcon Erembodegem Belgien
15 ml Falcon Röhrchen	Falcon
Petrischalen für LB-Agarplatten	Falcon
Cellstar 6 Vertiefung -, 12 Vertiefung -, 24 Vertiefung Platten	Greiner bio-one
Cellstar Tissue Culture Flask (non pyrogenic, 50 ml und 250 ml)	Greiner bio-one
Gene Pulser Cuvette (0,4 cm)	Bio Rad
Hybond-P Blotting Membran	GE Healthcare
Petrischalen für die Zellkultur	Greiner bio-one
PharmAssure (0,45 µm)-Sterilfilter	Pall Medical
Pipetten (2, 5, 10 und 25 ml)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen 0,1 - 1000µl	Starlab GmbH, Ahrensburg
BD Microlance 3 (0,9 x 40 mm) Kanülen	Beckton Dickinson
BD Microlance 3 (0,4 x 19 mm) Kanülen	Beckton Dickinson
1ml Spritze (Syringe without needle)	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
Spritzen 2ml, 5 ml, 10 ml (BD Discardit II)	Beckton Dickinson

Whatman Papier
CryoTube 1,8 ml

Whatman
Nunc

2.1.3 Chemikalien

Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
Agarose	Sigma
Ampicillin	Sigma
Bicine	MP Biomedicals
Bis-Tris	Roth
Bromphenol Blau	Sigma
BSA	PAA, Pasching Österreich
Chlorform	Sigma
complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Deoxycholic Acid	Sigma
DEPC treated Water	Ambion
DTSSP	Pierce
Dynabeads Sheep anti-Mouse IgG	Dynal (Invitrogen)
Dynabeads Sheep anti-Rat IgG	Dynal (Invitrogen)
EDTA	Sigma
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma
ExGen 500 <i>in vitro</i> Transfection Reagent	Fermentas
Fluoromount	Southern Biotechnology
G418 Sulphat	PAA
Glycerol	Sigma
Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	PIERCE
HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen
Igepal CA-630 (NP40)	Sigma
Imidazol	Fluka
Interferon- α /D, Human recombinant	Sigma
Isopropanol	Sigma
LB Medium	Q Biogene
LB-Agar Medium	Q Biogene
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Magermilchpulver	Applichem
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
MOPS	MP Biomedicals
NaCl	Fluka
Oligofectamine	Invitrogen
PMA	Sigma
Protein A Agarose	Calbiochem
Recombinant Human IL-10	PeptoTech
Recombinant Human TGF- β 1	R&D Systems
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease	Invitrogen

Inhibitor	
RNase ZapWipes	Ambion
SDS	MP Biomedicals
β -Mercaptoethanol	Sigma
Tris	Sigma
Tris base	MP Biomedicals
Triton X-100	Sigma
Trizol	Invitrogen
Trizol Reagent	Invitrogen
Trypsin-EDTA	PAA
Tween 20	Sigma

2.1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme

EcoRI	Fermentas
Bsu36I	Fermentas
BsiWI	Fermentas
BamHI	Fermentas
XbaI	Fermentas
SbfI	Fermentas
HpaI	NEB (New England Biolabs)
NotI	Fermentas

Sonstige Enzyme

Antarctische Phosphatase	New England Biolabs
DNase I	Roche
T4 DNA Ligase	Invitrogen

2.1.5 Verwendete Kits:

<i>DC</i> Protein Assay Kit II	Bio-Rad
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
HiSpeed Plasmid Maxiprep System	Qiagen
Luciferase Assay System	Promega
MEGAscript High Yield Transcription Kit	Ambion
mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra	Ambion
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Rneasy Mini Kit	Qiagen
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

Wizard SV Genomic DNA Purification System

Promega

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstämme

Im Verlauf der Arbeit wurden drei *Escherichia coli* Stämme verwendet, die in der Tabelle 2.1 aufgelistet sind.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme. Die Bakterien wurden von Invitrogen bezogen. Die Stbl2 kompetenten Zellen besitzen zusätzlich zu *recA1* eine einzigartige Komposition an genetischen Markern, die die Klonierung von *direct repeat* und retroviralen Sequenzen möglich macht.

Stamm	Genotyp	Eigenschaften
<i>E. coli</i> DH5 α (Invitrogen)	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) <i>phoA supE44 λ thi⁻1 gyrA96 relA1</i>	Geeignet für alle Standardklonierungen
<i>E. coli</i> Stbl2 (Invitrogen)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mcrBC-hsdRMS-mrr</i>) <i>recA1 endA1lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ⁻ Δ(<i>lac-proAB</i>)</i>	Speziell für die Klonierung von instabilen Sequenzen geeignet
XL10-Gold ultracompetent cells (Stratagene, Kit für QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit)	Tet ^R Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZAM15 Tn10</i> (Tet ^R)Amy Cam ^R]	Erhöht die Transfektionseffizienz ligierter DNA, speziell Verwendung nach Site-directed Mutagenesis

2.2.2 Steriles Arbeiten

Alle Nährmedien, Lösungen und sonstige Arbeitsmaterialien wie Reaktionsgefäße oder Pipettenspitzen, wurden für 20 Minuten bei 120°C unter Dampfdruck (Druck 2 bar) autoklaviert. Thermolabile Substanzen wie beispielsweise Ampicillin, wurden durch Filtration durch einen 0,2 μ m oder 0,45 μ m Sterilfilter dekontaminiert.

2.2.3 Anzucht und Lagerung von E.coli

Sofern nicht anders angegeben orientieren sich die Methoden an (Sambroock J *et al.* 1989). Die Anzucht der Bakterien erfolgte routinemäßig in LB-Medium. Diesem wurde, um

Selektionsdruck auf die Plasmid-tragenden Bakterien auszuüben, das entsprechende Antibiotikum in definierten Mengen zugefügt.

Die Bakterien wurden bis zu vier Wochen auf LB-Agarplatten bei 4°C gelagert. Für eine Langzeitlagerung wurden 15 % Glycerin Kryokulturen verwendet, welche in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert wurden.

2.2.4 Kompetente E.coli Zellen

Kompetente E.coli Zellen für die Transformation von Plasmid-DNA wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Hierbei handelte es sich um One Shot MAX Efficiency DH5α Competent Cells und MAX Efficiency Stbl2 Competent Cells. Der Genotyp ist unter 2.2.1 beschrieben.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Medien und Reagenzien für die Kultivierung humaner Zellen

Alle humanen Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert. Weitere Reagenzien und Puffer, die in der Kultivierung humaner Zellen verwendet wurden, waren D-PBS zum Waschen und Trypsin-EDTA zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen. Alle verwendeten Medien und Reagenzien für die Zellkultur wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma PAA bezogen.

2.3.2 Verwendete Zelllinien:

Tabelle 2.2: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
Huh-7	humane Hepatom-Zelllinie; (Nakabayashi <i>et al.</i> 1984)
293T	SV40-T-Antigen-transformiertes Derivat der humanen, embryonalen Nierenzelllinie <u>293</u> (ATCC CRL-1573) (DuBridge <i>et al.</i> 1987)
293HEK	Humane, embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit Adenovirus Typ5 (Graham <i>et al.</i> 1975)
HepG2	Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie; DSMZ Nr.: ACC 180; (Aden <i>et al.</i> 1979)
HeLa „CEACAM“	Humane Zervixkarzinomzelllinie stabil transfiziert mit CEACAM1, 3, 5, 6, 7 und CEACAM8; diese Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Bernhard B. Singer, Institut für Anatomie I am Universitätsklinikum Essen (AG Prof. S. Ergün) zur Verfügung gestellt

2.3.3 Passagieren von Zellen

In Kultur gehaltene Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 70 – 90% passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und 1/5 in eine neue Zellkulturflasche überführt.

2.3.4 Einfrieren von Zelllinien

Eukaryontische Zellen lassen sich einfrieren und dauerhaft in flüssigem Stickstoff lagern. Die dafür vorgesehenen Zellen wurden, ausgehend von einer ca. 80 % konfluenten 75 cm² Kulturflasche mit Trypsin abgelöst. Nach Zugabe des entsprechenden Kulturmediums wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (300 x g, 3 min, 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml Medium ohne Zusätze resuspendiert (Waschen der Zellen) und dann erneut zentrifugiert (s.o.) Das daraus entstehende Zellpellet wurde in 2 ml Einfrier-Medium, bestehend aus 70% Medium, 20% FCS und 10 % DMSO, sanft resuspendiert und je 0,5 ml der Zellsuspension in Cryoröhrchen gefüllt. In einer Isopropanol gefüllten Einfrierbox wurden die Zellen im -80°C Gefrierschrank durch langsame, kontinuierliche Temperaturenniedrigung bis auf -70 C°C abgekühlt. Nach 24 Stunden, wurden die in den Kryogefäßen gefrorenen Zellen zur Dauerlagerung in den Stickstofftank transferiert.

Zur Reaktivierung der Zellen wurden diese schnell bei 37 C° aufgetaut und sofort in eine Zellkulturflasche mit warmem Medium überführt. Nach etwa 4 Stunden wurde das Medium gewechselt.

Einfrier-Medium:

70 % Medium
20 % FCS
10 % DMSO

2.3.5 Stimulation von Huh-7 Zellen mit IFN- α , TGF- β und IL-10

Für die Stimulation von Huh-7 Zellen mit den Zytokinen IFN- α , TGF- β oder IL-10 wurden die Huh-7 Zellen 24 Stunden vor Beginn der Stimulation ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Stimulation etwa 50% konfluent waren. IFN- α wurde, wenn nicht anders beschrieben, in 100 Einheiten (E)/ ml, TGF- β in 1 ng /ml und IL-10 in 5 ng /ml eingesetzt.

Zellen wurden entweder in Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen zu je 40.000 Zellen je Vertiefung, in Schalen mit 12 Vertiefungen zu je 50.000 Zellen je Vertiefung oder in 10 cm Petrischalen zu je $1,2 \times 10^6$ Zellen ausgesät.

Wenn es sich nicht um Zeitkinetiken handelte, wurden die Zellen stets 48 Stunden mit dem Zytokin inkubiert.

2.3.6 Produktion von Pseudopartikeln

Für die Produktion von HCV Pseudopartikeln wurden 293T Zellen mit 3 Expressionsvektoren transfiziert. Das erste Plasmid (Plasmid 1) codiert für die retroviralen Gag und Pol Proteine. Gag Proteine sind für das *Budding* der Partikel an der Plasmamembran und die Einkapselung der RNA über die spezifische retrovirale Enkapsidierungssequenz (ψ) verantwortlich. Der zweite Vektor (Plasmid 2) besitzt eine ψ Sequenz, die seine Verpackung ins Kapsid garantiert und codiert für das Reporterprotein Luziferase. Dieser Vektor enthält zudem noch retrovirale Sequenzen, die für die reverse Transkription der genomischen RNA in provirale DNA und für die Integration der proviralen DNA in die genomische DNA der Wirtszelle zuständig ist. Für diese Integration ist das retrovirale Protein Pol, das durch den ersten Vektor codiert wird, verantwortlich. Der dritte Vektor (Plasmid 3) enthält die Sequenz für die HCV Glykoproteine E1 und E2, die für den Zelltropismus und die Fusion der HCV Pseudopartikel mit der Zellmembran der Zielzelle verantwortlich sind.

Pseudopartikel wurden durch Transfektion von 293T Zellen mit den Plasmiden phCMV-5349 (gag-pol; Plasmid 1), pTG-Luc126 (Protein Firefly Luziferase; Plasmid 2) und pCDNA 3.1 E1E2 (Protein E1E2, H77 strain, Genotyp 1a Plasmid 3) bzw. pHCMV VSV-Gpp (Glykoprotein vom Vesikular Stomatitis Virus) generiert. Um Partikel ohne Glykoprotein herzustellen, wurden nur die ersten beiden Plasmide transfiziert.

Hierzu wurden 293T Zellen 24 Stunden vor der Transfektion in 10 cm Zellkulturschalen mit je $1,2 \times 10^6$ Zellen ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 40-50 % konfluent waren. Für die Co-Transfektion mit den verschiedenen Plasmiden wurde 2 μ g jeden Plasmids in 300 μ l 0,9 % NaCl verdünnt. Anschließend wurde das in 300 μ l 0,9 % NaCl verdünnte Transfektionsreagenzes ExGen 500 (24 μ l ExGen 500 in 300 μ l 0,9 % NaCl) dazugegeben und gemischt. Es folgte eine 20 minütige Inkubation bei RT. Während der Inkubationszeit wurde das Medium auf den 293T Zellen durch 5 ml OptiMEM ersetzt. Dann wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. 6 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch 10 ml DMEM ersetzt.

Nach 72 Stunden wurde der Überstand, in welchem sich die Pseudopartikel befanden, mit einer Spritze abgesaugt und durch einen Filter (Porengröße 0,45 µm) steril filtriert. Die Partikel wurden bei 4°C gelagert und konnten bis zu 14 Tage verwendet werden.

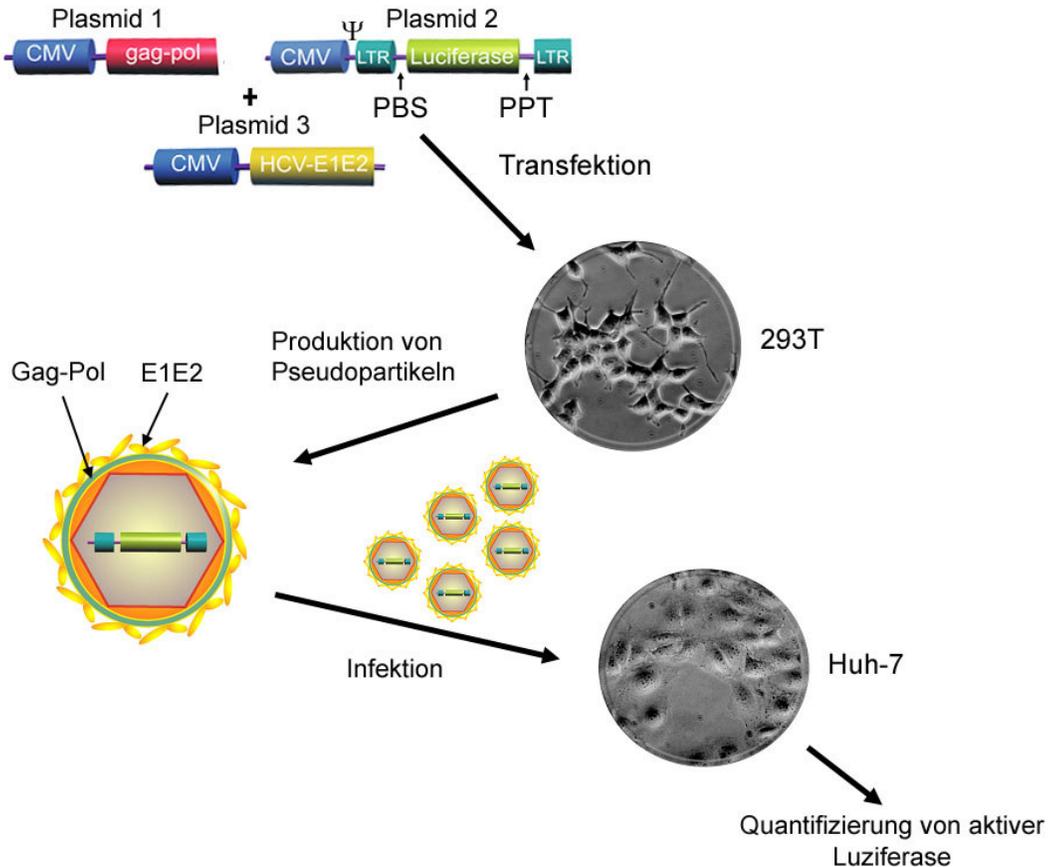


Abb. 2.1: Produktion von HCV Pseudopartikeln. Schematische Darstellung der Generierung von HCV Pseudopartikeln. Abgebildet sind die drei Plasmide mit deren jeweiligen Besonderheiten (Plasmid 1: gag-pol, Plasmid 2: LTRs und Luziferase und Plasmid 3: HCV E1E2 Glykoproteine). Die Generierung findet in 293T Zellen statt. Für die Infektion werden Huh-7 Zellen benutzt. LTR: long terminal repeat; PBS: Primer binding site; PPT: Polypurin Track). Aus (Voisset & Dubuisson 2004), modifiziert.

2.3.7 Luziferase-Assay zur Quantifizierung der Infektiösität der Pseudopartikel

Die Infektiösität der Pseudopartikel wurde mit Hilfe des Luziferase Assays quantifiziert. Hierzu wurden Huh-7 Zellen in Schalen mit 24 Vertiefungen zu je 40.000 -50.000 Zellen einen Tag vorher ausgesät. Zu den Zellen wurden dann 200 µl frisches Medium und 50 µl der Pseudopartikel gegeben. Nach 4 stündiger Inkubation im Zellkulturschrank, wurde der Überstand gegen 500 µl frisches Medium ausgetauscht. Nach 72 Stunden wurde der Luziferase-Assay mit dem Luziferase Assay System von Promega nach Angaben des

Herstellers durchgeführt. Alle Versuche, die mit Luziferase Assay ausgewertet wurden, sind in Triplets durchgeführt worden.

2.3.8 DNase I Behandlung von Pseudo-Partikeln

Um potentielle, aus der Transfektion der 293T Zellen stammende Plasmid-DNA Reste zu entfernen, wurde dem Pseudopartikel enthaltendem Überstand DNase I in einer Konzentration von 300 E /ml zugesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Partikel direkt zur Infektion der Zellen eingesetzt oder bei 4°C gelagert.

2.3.9 Antikörper-Blockierung von CEACAM1 auf Huh-7 Zellen

Um CEACAM1 auf der Oberfläche von Huh-7 Zellen zu blockieren, wurden 24 Stunden vor Beginn des Versuchs, Huh-7 Zellen in Schalen mit 12 Vertiefungen zu 50.000 Zellen je Vertiefung ausgesäht, so dass sie für das Experiment 60-70 % konfluent waren. Für die Antikörperblockierung wurden die Zellen mit 200 µl Medium mit entsprechendem Antikörper (5 µg /ml) für 5 Minuten vorinkubiert. Dann wurden 300 µl der Pseudopartikel, die zuvor ebenfalls mit Antikörper (5 µg /ml) inkubiert worden waren, zu den Zellen dazu gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C (Zelkulturinkubator), wurde genomische DNA isoliert und das Ergebnis mit Realtime PCR ausgewertet.

2.4 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Methoden nach (Sambroock J *et al.* 1989) durchgeführt.

2.4.1 Verwendete Plasmide

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Verwendung	Herkunft
pBluescript II KS+	Ampicillin-Resistenz, T7-Promotor, high copy Vektor	Subklonierung der Fragmente 1-3 für chimäres Konstrukt	Stratagene
pACNR1180	Ampicillin-Resistenz, T7-Promotor regulierte Expression. „low-copy“ Plasmid (Ruggli <i>et al.</i> 1996)	Subklonierung aller instabilen, zur Rekombination neigenden Sequenzen (DEN NS1-3'UTR) und dem Full length chimären Konstrukt	Geschenk von Prof. Dr. Charles M. Rice, Center for the Study of Hepatitis C, Rockefeller University, New York, USA
pCDNA 3.1/V5-His© TOPO® TA	Ampicillin Resistenz, G418 Resistenz, eukaryontischer Expressionsvektor	Expression von HCV E1E2 in 293HEK Zellen	Invitrogen
HCV FL	HCV Genotyp 1a Konsensus	Template für alle HCV	Geschenk von Prof. Dr.

/p90	Sequenz (H77) (Kolykhalov <i>et al.</i> 1997)	Sequenzen	Charles M. Rice, Center for the Study of Hepatitis C, Rockefeller University, New York, USA
DEN FL in pRS424	Full-length Sequenz von Dengue-1 Virus Western Pacific Strain, 74 Strain (Puri <i>et al.</i> 2000)	Template für alle Dengue Virus Sequenzen	Geschenk von Dr. Barry Falgout, FDA, Bethesda, Maryland, USA
pTM3-EMCV-IRES	Plasmid, das die EMCV-IRES Sequenz enthält	Template für die EMCV-IRES Sequenz	Geschenk von Prof. Dr. Charles M. Rice (s.o.)
pCDNA- 3.1 HCV E1E2	Eukaryontischer Expressionsvektor mit der Sequenz für das HCV E1E2 Glykoprotein (H77 strain, Genotyp 1a)	Eines der drei Plasmide zur Generierung der HCV Pseudopartikel	Geschenk von Jean Dubuisson, Institut de Biologie de Lille, Frankreich
pTG-Luc126	Eukaryontischer Expressionsvektor; codiert für Firefly Luziferase und LTRs	Eines der drei Plasmide zur Generierung der HCV Pseudopartikel	Zur Verfügung gestellt von B. Bartosch and F. Cosset (INSERM U412, Lyon, Frankreich)
phCMV-5349	Eukaryontischer Expressionsvektor, codiert für die gag-pol Elemente	Eines der drei Plasmide zur Generierung der Pseudopartikel	Zur Verfügung gestellt von B. Bartosch and F. Cosset (INSERM U412, Lyon, Frankreich)
phCMV-VSV-G	Eukaryontischer Expressionsvektor, codiert für das Glykoprotein vom Vesikular Stomatitis Virus	Generierung von VSV-Gpp	Zur Verfügung gestellt von B. Bartosch and F. Cosset (INSERM U412, Lyon, Frankreich)
pcDNA3.1 CEACAM1-4L (CEACAM1 Plasmid)	Eukaryontischer Expressionsvektor, codiert für humanes CEACAM1-4L	Überexpression von CEACAM1 in Huh-7 Zellen	Geschenk von Dr. Bernhard Singer (Institut für Anatomie I, Universitätsklinikum Essen)
pcDNA3.1 + neo (Mock Plasmid)	Eukaryontischer Expressionsvektor korrespondierend zu CEACAM1 Plasmid aber ohne Insert	Mock-Transfektion, Kontrolle für die Überexpression von CEACAM1 und ISG15	Geschenk von Dr. Bernhard Singer (Institut für Anatomie I, Universitätsklinikum Essen)
His ₆ -3xFLAG-ISG15	Eukaryontischer Expressionsvektor (pcDNA3 Vektor), codiert für ISG15	Überexpression von ISG15 in Huh-7 Zellen	Zur Verfügung gestellt von R.M. Krug (Austin, USA)

2.4.2 Anhängen von 3` Überhängen nach Amplifikation für Klonierung in pcDNA3.1/V5-His-TOPO

Um eine erfolgreiche Klonierung der PCR Produkte in den TOPO TA Klonierungsvektor zu ermöglichen, wurden nach Beendigung der eigentlichen PCR 3`Adenine nachträglich angefügt. Hierzu wurde nach Beendigung der PCR, 1 Einheit *Taq* Polymerase je Ansatz dazu gegeben und der Ansatz bei 72°C 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und direkt in den TOPO TA Klonierungsvektor ligiert.

2.4.3 Klonierung von HCV E1E2 in pcDNA3.1/V5-His TOPO TA

Das mit Hilfe von PCR (2.4.14) generierte Fragment HCV E1E2 wurde in den pcDNA3.1/V5-His TOPO Vektor (der aus dem pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit stammte) kloniert. Dieser Vektor liegt linearisiert vor und hat einzelne Desoxythymidinreste, die am 3'-Ende überhängen. So konnten PCR-Fragmente, an die am 3'-Ende einzelne Desoxyadenosinreste angehängt worden waren, mit dem Vektor ligiert werden. Diese Ligation wurde von der Topoisomerase I katalysiert, die kovalent an den Vektor gebunden ist.

2.4.4 Dephosphorylierung von Plasmid DNA

Die Dephosphorylierung erfolgte mit der Antarktischen Phosphatase von New England Biolabs (NEB) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.5 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (50x):

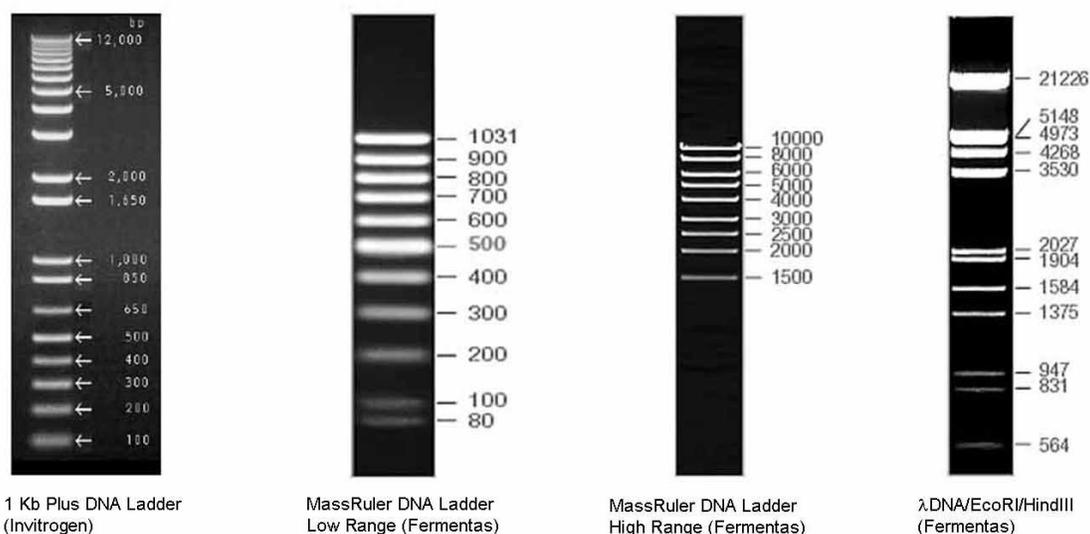
2 M Tris Base
1 M Essigsäure
50 mM EDTA, pH 8

6 x Probenpuffer:

40 % (w/v) Sucrose
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylenyanol

Zur Analyse oder Präparation von definierten DNA-Fragmenten, wurde die DNA einer horizontalen Agarosegelelektrophorese in einem TAE-Puffersystem (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8) unterzogen. Die Agarosekonzentration variierte in Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Fragmentlängen zwischen 0,6 – 2,0 Prozent. Die Visualisierung der verschiedenen DNA-Banden im Agarosegel erfolgte durch Ethidiumbromid (0,5 µg /ml), das in DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich (590 nm) fluoresziert. Zur Größenbestimmung wurden die unten abgebildeten Standards als Referenz herangezogen. Die angelegte Spannung betrug 6V /cm Elektrodenabstand.

Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurden die folgenden Marker verwendet:



2.4.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die präparative Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach der Elektrophorese wurde mit Hilfe des Gelextraktionskits Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System der Firma Promega durchgeführt. Dabei wurde die Vorschrift des Herstellers in allen Punkten eingehalten.

2.4.7 Formaldehyd Agarosegel-Elektrophorese

Nach Generierung der run-off Transkripte wurde zur Überprüfung der korrekten Fragmentgröße und Integrität der entstandenen RNA-Transkripte eine analytische Gelelektrophorese mittels eines denaturierenden Agarosegels durchgeführt. Für das Formaldehyd-Agarosegel wurden immer 50 ml Gel angesetzt, wobei die Konzentration an Agarose stets 1 % betrug. Für das Gel wurden 5 ml 10 x FA Gelpuffer, 0,5 g Agarose und RNase freies Wasser zusammen aufgeköcht. Die Mischung wurde anschließend in einem Wasserbad auf etwa 65-70°C abgekühlt und dann 0,9 ml einer 37% Formaldehyd-Lösung (12,3 M), sowie 0,5 µl Ethidiumbromid (Stocklösung 10 mg /ml) dazu gegeben. Vor Beladung des Gels mit den RNA Proben, wurde das Gel für mindestens 30 Minuten in 1 x FA Gel-Laufpuffer äquilibriert.

Die RNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit einem Volumen 5 x RNA Ladepuffer versetzt, zur Denaturierung 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Das Gel lief bei einer Spannung von 50 Volt so lange, bis die Bromphenolblau Front etwa 2/3 des Gels passiert hatte. Die RNA Banden wurden anschließend durch UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254-366 nm in einem Geldokumentationssystem sichtbar gemacht.

Verwendete Puffer:

1 x FA Gelpuffer:

20 mM MOPS
5 mM Natriumacetat
1 mM EDTA
pH 7.0

1 x FA Gel-Laufpuffer:

1 x FA Gelpuffer
2,5 M Formaldehyd

5 x RNA Ladepuffer:

0,25 % Bromphenolblau
4 mM EDTA
0,9 M Formaldehyd
20 % Glycerol
30,1 % Formamid
4 x FA Gelpuffer

2.4.8 Restriktion von DNA

Analytische Restriktionen enthielten 0,5 und präparative 3 µg DNA. Das Reaktionsvolumen betrug in der Regel 20 – 40 µl und die Reaktion wurde bezüglich der Enzymmenge und Temperatur gemäß den Herstellerangaben für 1 – 4 Stunden durchgeführt.

2.4.9 Ligation

Die Ligation von zuvor restringierten Vektor -und Insert-DNA-Fragmenten erfolgte meist in einem 20 µl Ansatz, wobei das Vektor/Insert-Verhältnis zwischen 1:3 und 1:10 variierte. Es wurden zwischen 50 und 200 ng linearisiertem Vektor und ein 3-5 facher molarer Überschuß an Insert-DNA eingesetzt.

Das einzusetzende Volumen von Vektor und Insert-Lösung wurde durch Vergleich der Fluoreszenz-Intensität im zuvor angefertigten Agarosegel bestimmt. Die Ligation wurde mit 1 Einheit T4 DNA Ligase von Invitrogen für 2-4 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16°C durchgeführt

Neben dem eigentlichen Reaktionsansatz wurde jeweils noch eine Ligationskontrolle angefertigt, die nur den Vektor ohne das gewünschte Insert enthielt.

2.4.10 Transformation

Die Transformation erfolgte im Allgemeinen in DH5- α kompetente Zellen der Firma Invitrogen. Das fertiggestellte chimäre Konstrukt, so wie alle Transformationen, bei denen die Nicht-Struktur Gene von Dengue kloniert bzw. transformiert worden waren, wurden in Stbl2 kompetente E.coli (Invitrogen) transformiert. Alle klonierten DEN Sequenzen wurden bei 30°C kultiviert (anstelle von 37°C), um eine Rekombination der Sequenzen zu verhindern. Die Transformationen erfolgten nach Angaben des Herstellers.

2.4.11 Minipräp

Plasmid DNA aus einer 5 -10 ml Bakterienkultur wurde mit dem Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System von Promega genau nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.12 Maxipräp

Für eine Präparation von Plasmid DNA im großen Maßstab (100-500 ml) wurde das PureYield[™] Plasmid Midiprep System von Promega verwendet. Für die Präparation ab einem Kulturvolumen von 200 ml wurden die Angaben im Manual entsprechend hoch skaliert.

Die Präparation der Plasmide, die für die Transfektion in Huh-7 Zellen isoliert wurden, mussten mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen isoliert werden. Diese Zellen reagieren äußerst sensibel auf Endotoxine und, starben nach Transfektion mit Plasmid DNA, die mit dem PureYield Kit isoliert worden war.

2.4.13 Isolation von genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit dem Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System vom Promega isoliert. Hierbei wurde das Protokoll „**IV. Isolation of Genomic DNA From Tissue Culture Cells**“ im Manual genau befolgt. Für die Isolation wurden immer zwei Vertiefungen aus einer Schale mit 12 Vertiefungen vereinigt und in 200 μ l eluiert.

2.4.14 PCR

PCRs wurden im Thermocycler Gene Amp 9600 (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham /USA) durchgeführt.

Da stets eine präparative Amplifikation von codierenden Bereichen durchgeführt wurde, wurde die Pfu-Polymerase verwendet, die im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine Korrekturlesefunktion (3'→5'-Exonuklease-Aktivität) besitzt. Wichtige Parameter wie die Anlagerungstemperatur und -zeit sowie die Elongationsdauer wurden für alle PCRs in Abhängigkeit der Fragmentlänge und Primerbeschaffenheit individuell optimiert.

Das Volumen der PCR-Ansätze betrug stets 50 µl und setzte sich aus 5 ng Plasmid-DNA, jeweils 0,3 µM Primer, 1 x PCR-Puffer, 300 µM von jedem dNTP und 1,25 Einheiten Pfu-Polymerase zusammen. Amplifizierte Sequenzen und zugehörige Primerpaare mit Anlagerungs-Temperaturen sind in Tabelle 2.3 angegeben.

PCR Programm allgemein:

PCR-Programme:

Initiale Denaturierung:	95°C	3 min
PCR (35 Zyklen)		
Denaturierung:	95°C	30 sec
Anlagerung:	Temperatur variabel	30 sec
Extension	72°C	Extensionszeit variable, abhängig von der Länge des Fragments
Finale Elongation:	72°C	10 min

Das Dengue NS1-3'UTR Fragment wurde mit der ProofStart DNA Polymerase von Qiagen nach dem Protokoll für die Amplifizierung von langen Fragmenten etabliert. Der Ansatz betrug 50 µl und setzte sich aus 5-50 ng Plasmid DNA, 1 x Taq Puffer, 1 x Q-Solution, 300 µM von jedem dNTP, je 0,5 µM Primer, 5 Einheiten Taq DNA Polymerase, 0,2 Einheiten ProofStart DNA Polymerase.

PCR Programm für Amplifizierung des DEN NS1-3'UTR:

Initialer Aktivierungsschritt 2 min 95°C

35 Zyklen

Denaturierung 10 sec 94°C

Anlagerung 1 min 67°C

Elongation 9 min 68°C

Die synthetischen Oligonukleotide (Primer) wurden über Auftragssynthesen der Firmen MWG-BIOTECH GmbH bezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 2.4: Auflistung der eingesetzten Oligonukleotide. In der rechten Spalte befinden sich die Annealing-Temperaturen.

Amplifizierte Sequenz	Primer	Sequenz 5'→ 3'	Annealing-Temperatur (°C)
HCV C-p7	HCV C-p7fw_HpaI	ccggtagttaacatgagcacgaatcct aaacc	65°C
HCV C-p7	HCV C-p7rv_BsiWI	ggcagtcgtacgtgcgtatgcccgctg agg	65°C
EMCV-IRES	EMCVfw_SbfI	ccggtacctgcaggagaccacaacgg ttccc	60°C
EMCV-IRES	EMCVrv_HpaI	ggcagtgtaacggattatcgtgttttc aa	60°C
DEN 5'UTR- Core20	D-5'fw_T7neu+Bsu36I	ggg'gcctgaggactaatacagactca ctatagggagtgtagtctactgga	54°C
DEN 5'UTR- Core20	DEN Crv_SbfI	ccggtacctgcaggttacgccagggct gtgggcag	54°C
HCV E1E2	E1fw+SIG+Kozak	gccaccatgggtgctctttctctatcttc c	63°C
HCV E1E2	E2rv_TOPO	cgctccgcttgggatagag	63°C
HCV E2	E2nested4_fw	tagcacggccttgaactgca	55°C
HCV E2	E2nested2_rv	atgacacaagggggcgctc	55°C
DEN NS1- 3'UTR	DEN NS1 fw_BsiWI	tcatcgctacgatggactcgggatgtgt aatc	67°C
DEN NS1- 3'UTR	DEN 3'/NotI rv Primer	caatgcggccgcagaacctgttgattc aacagacca	67°C

2.4.15 Mutagenese PCR (Site-directed Mutagenesis) zum Einfügen einer neuen Sequenz in ein bestehendes Plasmid

Die Insertion beim pBluescript II KS+ zur Erzeugung der neuen Schnittstellen, so wie die Insertion im chimären Konstrukt, um die Spaltstelle zwischen dem HCV Fragment (C-p7) und dem sich anschließenden Dengue Fragment (NS1-3'UTR) zu optimieren, wurden jeweils mit

dem QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene durchgeführt. Hierbei wurden die Primer nach den Besonderheiten des Manuals entworfen und die PCR entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.16 RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit dem OneStep RT-PCR Kit von Qiagen durchgeführt. Das Volumen des PCR Ansatzes betrug 50 µl und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 10 µl 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer, 2 µl 10 mM dNTP Mix (400 µM von jedem dNTP), je 0,6 µM Primer, 2 µl QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym Mix, 0,1 µl RNase Inhibitor (5 Einheiten; RNaseOut von Invitrogen) und 1 µg RNA Template.

PCR Programm für RT-PCR von HCV E2

Reverse Transkription	50 °C	30 min
Initialer PCR Aktivierungsschritt:	95°C	15 min
PCR (35 Zyklen)		
Denaturierung:	94°C	30 sec
Anlagerung:	55°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Finale Elongation:	72°C	10 min

2.4.17 Quantitative Real-time PCR/Real-time RT-PCR

Die Quantitative Real-time PCR (ab jetzt, der Einfachheit halber, als Real-time PCR bezeichnet) stellt eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren dar, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich eine Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (daher der Name „Real time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung benutzt, bei der die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes Haushaltsgen bezogen wurde (Normalisierung der Expressionsergebnisse). Die Normalisierung erfolgte entweder mit β -Aktin (im Falle einer von RNA ausgehenden PCR mit reverser Transkription) oder Albumin (im Falle der PCR, bei der genomische DNA als Template eingesetzt wurde).

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wird der sog. CT Wert (Cycle Threshold = Zyklus Schwellenwert) herangezogen. Er beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

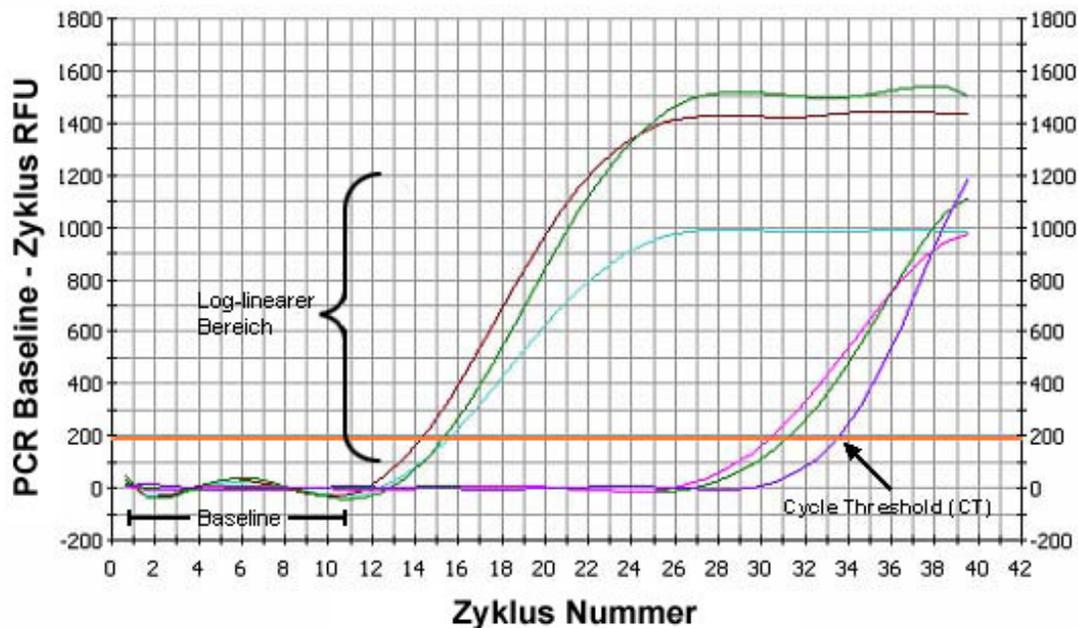


Abb. 2.2: Beispiel für den Verlauf einer Realtime PCR. Dargestellt ist die Threshold Linie in orange. Sie wird oberhalb der Baseline angesetzt und befindet sich stets im log-linearen Bereich der Kurven (niemals innerhalb der Plateau-Phase). Der Cycle Threshold (CT) bezeichnet die Zyklusnummer, bei der der Threshold in den einzelnen Zyklen überschritten wird. Je später die Fluoreszenzintensität ansteigt, desto später kreuzt sie die Threshold-Linie. Die drei Kurven auf der linken Seite sind Proben, die mit β -Aktin Primern gemessen wurden. Bei den drei Kurven auf der rechten Seite handelt es sich um die gleichen Proben, jedoch mit einem Primer gegen das Zielgen gemessen.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgte über die sog. $\Delta\Delta CT$ Methode. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CT Wert des Referenzgens vom CT Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCT Wert der experimentell behandelten Proben, der ΔCT Wert einer Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta CT$). Dies führt zum $\Delta\Delta CT$ - Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, wurde mit folgender arithmetischer Formel berechnet: $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen 2001).

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Behandlung}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Bei diesem Berechnungsschema wurde von einer optimalen Real-time PCR Effizienz in allen Proben ausgegangen, was einer Verdopplung der DNA Menge in jedem Zyklus entspricht.

Die eigentliche Berechnung der Ratios (Fold Changes) erfolgte in dieser Arbeit mit der so genannten „Paffl-Tabelle“ in Excel. Jede Messung bestand, wenn nicht anders angegeben, aus Triplets. Dies führte in der Berechnung der Ratios (Fold Changes) zu insgesamt 9 Werten aus denen der Mittelwert gebildet wurde, da jeder einzelne Kontrollwert mit jedem einzelnen der behandelten 3 Werte verrechnet werden musste. Da die Kontrolle (in den meisten Fällen die unbehandelten Zellen) immer gleich 1 gesetzt wurden, ergaben sich aufgrund dieses Berechnungsschemas für die Kontrollwerte keine Standardabweichungen.

Für die Quantifizierung von RNA wurde das QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von Qiagen verwendet, für die Quantifizierung von genomischer DNA wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Qiagen eingesetzt, welches die reverse Transkription von RNA in DNA auslöst. In beiden Fällen ist SYBR Green der interkalierende und fluoreszierende Farbstoff. Dabei ist die gemessene Intensität proportional zur Menge der amplifizierten DNA und zur Zahl der mRNA bzw. DNA Moleküle in der Probe. Die PCR erfolgte mit Hilfe des iCycler iQ™ der Firma Bio Rad.

Folgende Reaktionsansätze und folgendes PCR Programm wurde verwendet:

30 µl-Ansatz:

15 µl 2x QuantiTect SYBR Green
0,3 µl QuantiTect RT Mix
3 µl QuantiTect Primer Assays
2 µl RNA
9,7 µl H₂O

bzw. wenn Primer benutzt wurden, bei denen es sich nicht um QuantiTect Primer Assays handelte:

15 µl 2x QuantiTect SYBR Green
0,3 µl QuantiTect RT Mix
3 µl Primer 1 (forward)
3 µl Primer 2 (reverse)
2 µl RNA
6,7 µl H₂O

RT-PCR-Programm:

Reverse Transkription	52°C	30 min
Denaturierung	95°C	15 min
PCR (40 Zyklen)	96°C	20 sec
	53°C	30 sec
	72°C	40 sec
Schmelzkurve (80 Zyklen):	96°C	10 sec (ab Zyklus 2 je Zyklus Abkühlung um 0,5 °C)

Der PCR Ansatz und das Programm für die Real-time PCR ohne RT Schritt sind in Kap. 2.4.18 (PCR basierter Entry Assay) beschrieben.

Für die Real-time PCR, bei der für die Quantifizierung RNA als Template eingesetzt wurde, sind folgende Primer zum Einsatz gekommen:

Tabelle 2.5: Primer Sequenzen für Realtime Primer. Qiagen gibt keine Auskunft über die Sequenzen der QuantiTect Primer Assays.

Primer Bezeichnung	Sequenz
CEACAM1-fw	accacactgcacagtactcc
CEACAM1-rv	ttgatttggggctttgctac
β-Aktin-fw	aaatcgtgcgtgacatcaaa
β-Aktin-rv	caagaaggaaggctggaaaa
Hs_CD81_1SG (CD81)	Keine Angabe (QuantiTect Primer Assay, Qiagen)
Hs_CLDN1_1_SG (Claudin-1)	Keine Angabe (QuantiTect Primer Assay, Qiagen)
Hs_SCARB1_1_SG (SR-BI)	Keine Angabe (QuantiTect Primer Assay, Qiagen)

2.4.18 PCR basierter Entry Assay

Der PCR basierte Entry-Assay ist eine Methode, die auf der Quantifizierung von derjenigen cDNA beruht, die in den Zielzellen während der HCVpp Aufnahme synthetisiert wird. Sie wurde von Blanchard et al. (2006) publiziert.

Um die ersten Schritte während des HCVpp Eintritts zu quantifizieren, wurden Primer eingesetzt, die in der U3 Region der Long Terminal Repeats (LTR) binden, welche den ersten Teil des viralen Genoms darstellt, der retrotranskribiert wird während des Eintritts eines retroviralen Partikels (Goff 2001). Als Haushaltsgen zur Normalisierung wurde das Albumin Gen benutzt, wie in Gault et al (2007) beschrieben.

Für Experimente, die mit Hilfe dieses Assays ausgewertet werden sollten, wurden Huh-7 Zellen in Schalen mit 12 Vertiefungen kultiviert und bei Erreichen von 80-90 % Konfluenz mit 600 µl DNase I behandelten Pseudopartikeln infiziert. Ein Ansatz bestand aus 6 Vertiefungen einer Schale mit 12 Vertiefungen. Die Zellen wurden vier Stunden im

Brutschrank inkubiert, um eine vollständige Infektion zu erreichen. Anschließend wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen 3 mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 150 µl Lysepuffer je Vertiefung (SV Lysis Buffer) des Wizard SV Genomic DNA Purification System von Promega lysiert und danach die Extraktion der genomischen DNA durchgeführt. Hierbei wurden immer 2 Vertiefungen für die Extraktion vereinigt, so dass jeder Ansatz aus Triplets bestand.

Sequenzen der Forward und Reverse U3 Primer:

Forward: 5'- CCATCAGATGTTTCCAGGCT-3'
Reverse: 5'- GCGACTCAGTCTATCGGAGG- 3'

Sequenzen der Forward und Reverse Albumin Primer:

Forward: 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3'
Reverse: 5'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3'

PCR Ansatz 1x:

15 µl Sybr Green Mix
1µl fw Primer (0,5 µM)
1 µl rv Primer (0,5 µM)
9 µl H₂O
4µl Probe

RT-PCR-Programm:

Denaturierung	95°C	10 min
PCR (40 Zyklen)	95°C	30 sec
	60°C	30 sec
	72°C	30 sec
Schmelzkurve (50 Zyklen):	95°C	5 sec (ab Zyklus 2 je Zyklus Abkühlung um 1°C)

2.4.19 Transfektion von TOPO-E1E2His (Transfektion mit Lipofectamine 2000)

Die im Folgenden beschriebene Transfektion bezieht sich auf die Transfektion in einer 10 cm Petrischale, da die Zellen hauptsächlich in diesem Format transfiziert wurden. Für die Transfektion der 293HEK Zellen mit Lipofectamine 2000 wurden diese 24 Stunden vor der Transfektion so ausgesäht, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 90 – 95 % konfluent waren. Es wurde in Antibiotika freiem Medium mit einer Zellzahl von 4×10^6 Zellen je Schale, in einem Gesamtvolumen von 10 ml ausgesäht. Je Transfektionsansatz wurden 24 µg DNA in 1,5 ml Opti-MEM I Medium, einem Medium ohne Serum, verdünnt und sanft gemischt. Dann wurden 60 µl Lipofectamine 2000 ebenfalls in 1,5 ml Opti-MEM I Medium

verdünnt, gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die verdünnte DNA und das verdünnte Transfektionsreagenz vereinigt, gemischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann zu den Zellen gegeben. Nach 6 Stunden wurde das Medium gewechselt. Nach 48 Stunden konnten die Zellen bezüglich der transgenen Expression analysiert werden.

2.4.20 Transfektion mit ExGen500:

Dieses Protokoll bezieht sich auf die Transfektion in Schalen mit 12 Vertiefungen. Für die Transfektion mit ExGen500 wurden die Zellen 24 Stunden vorher in einer Schale mit 12 Vertiefungen zu 75.000 Zellen je Vertiefung ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 70-80 % konfluent waren. Für den Transfektionsansatz wurden zunächst 1 µg DNA in 100 µl 0,9 % NaCl verdünnt, 3,3 µl ExGen500 dazu gegeben und für 10 Sekunden gevortext. Nach einer Inkubation von 15-20 Minuten wurden 100 µl des Transfektionsansatzes zu jeder Vertiefung gegeben. Das Medium wurde spätestens nach 24 Stunden gewechselt. Nach 72 Stunden konnten weitere Analysen (oder Versuche) durchgeführt werden. Sowohl die Transfektion zur Herstellung der Pseudopartikel als auch alle Transfektionen von Huh-7 Zellen wurden mit ExGen500 durchgeführt. Die Huh-7 Zellen reagierten toxisch auf die Transfektion mit Lipofectamine 2000.

2.4.21 siRNA Transfektion und anschließende Infektion mit Pseudopartikeln

Huh-7 Zellen wurden 24 Stunden vorher in Schalen mit 6 Vertiefungen in Antibiotika freiem Medium zu $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Anzahl der Vertiefungen richtete sich nach der im eigentlichen Versuch benötigten Menge an Zellen. Um einen effizienten Knock-down auch auf Proteinebene zu erreichen, wurden die Zellen 2 mal nacheinander transfiziert, wobei der Abstand zwischen den beiden Transfektionen 72 – 96 Stunden betrug. Die Transfektion fand in Serum und Antibiotika freiem Medium (Opti-MEM I) statt. Bei den Ansätzen handelte es sich immer um siRNA gegen ein spezifisches Zielgen, unbehandelte Zellen und so genannte non-silencing (NC-) siRNA als Negativ-Kontrolle. Bei der non-silencing siRNA handelt es sich um siRNA, die keine homologe Sequenz in der Zielzelle hat. Sie dient somit als Kontrolle für von der Transfektion stammende Off-Target Effekte, also unspezifische Effekte.

Bei der verwendeten siRNA handelte es sich um synthetische doppelsträngige siRNA von Dharmacon, die mit Oligofectamine (Invitrogen) als Transfektionsreagenz komplexiert und in

die Zellen geschleust wurde. Bei der Transfektion wurden je Ansatz 4 μl siRNA (entsprechend 80 pmol) mit 181 μl Opti-MEM I und dann 4 μl Oligofectamine mit 11 μl Opti-MEM I Medium gemischt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT wurden die beiden Ansätze vereinigt, durch mehrmaliges auf und ab pipettieren sanft gemischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurde bei den zu transfizierenden Zellen das Medium abgenommen und durch 800 μl Opti-MEM I Medium ersetzt. Nach Beendigung der Inkubation wurde der Transfektionsansatz (200 μl) zu den Zellen tröpfchenweise dazu gegeben und die Platte vor und zurück geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Komplexe im Medium zu erreichen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit dem Transfektionsansatz im Inkubator inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz durch Medium ersetzt und weiter inkubiert.

Um die Funktion von CEACAM1 bei der Aufnahme von HCV Pseudopartikeln zu untersuchen, wurden Huh-7 Zellen mit siRNA gegen CEACAM1 wie oben beschrieben transfiziert. 24 Stunden nach der zweiten Transfektion (s.o.) wurden die Zellen trypsiniert und in Schalen mit 12 Vertiefungen ausgesät. Hier richtete sich die Anzahl der ausgesäten Zellen nach den Versuchsbedingungen. Wiederum 24 Stunden später wurden die Zellen mit 600 μl DNase I behandelten Pseudopartikeln je Vertiefung für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert, um eine vollständige Infektion zu erreichen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und dann mit 150 μl Wizard SV Lysis Buffer (Promega) lysiert. Es folgte die Isolation von genomischer DNA.

Zur Kontrolle einer effizienten Reduktion der Genexpression des Zielgens zum Zeitpunkt der Infektion mit den Pseudopartikeln, wurde zudem die Knock-down Effizienz auf Genexpressionsebene mittels Realtime PCR und die Proteinexpression des Zielgens durch Western Blot und Durchflusszytometrie überprüft.

Für die Analyse auf mRNA Ebene wurde RNA aus 3 Vertiefungen je siRNA Transfektion einer Schale mit 12 Vertiefungen isoliert. Anschließend wurde eine Realtime PCR (Kap. 2.4.17) mit Primern gegen das Zielgen durchgeführt, um die Knock-down Effizienz zu ermitteln. Pro Zielgen wurde immer RNA des eigentlichen Knock-down Ansatzes, RNA des non-silencing Ansatzes und RNA der unbehandelten Zellen gemessen.

Für die Analyse auf Proteinebene mittels Western Blot wurden Lysate aus drei Vertiefungen vereinigt. Die Knock-down Effizienz von CEACAM1 auf der Zelloberfläche wurde zusätzlich mit Durchflusszytometrie überprüft. Pro Ansatz wurden Zellen aus 6 Vertiefungen vereinigt und die Färbung und Messung wie unter 2.5.13 beschrieben durchgeführt.

2.4.22 RNA Extraktion

Bei der RNA Isolation mittels Trizol Reagenz handelt es sich um eine optimierte Methode der von Chomczynski and Sacchi (Chomczynski & Sacchi 1987) entwickelten RNA Extraktion. Sie basiert auf der sauren Guanidinium Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat.

Die Trizol-Extraktion gliederte sich in mehrere Schritte:

1) Homogenisierung:

Hierzu wurden die Zellen direkt aus der Zellkulturschale mit Trizol abgelöst, wobei 1 ml Trizol /10 cm² verwendet wurde. Die Trizol lysierten Zellen konnten jetzt bei -20°C gelagert werden oder direkt weiter verarbeitet werden. Um unlösliches Material wie DNA und Proteine zu entfernen, wurde eine Zentrifugation bei 12.000 x g für 10min bei 4°C durchgeführt und der geklärte Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2) Separation der Phasen

Es folgte eine 5 minütige Inkubation, was zur Auflösung der Nukleoproteinkomplexe führte. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 15 sek von Hand stark geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde bei 12000 x g 15 min bei 4 °C zentrifugiert.

3) RNA Präzipitation

Die obere klare, wässrige Phase, mit der darin enthaltenen RNA, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei RT. Um die RNA zu pelletieren folgte eine weitere Zentrifugation bei 12000 x g für 10min bei 4 °C.

4) RNA waschen

Der Überstand wurde verworfen, 1 ml 75 % EtOH auf das Pellet gegeben und gevortext. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation bei 7.500 x g für 5min bei 4°C.

5) RNA resuspendieren

Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet für 5-10 Minuten in der SpeedVac ohne Zentrifugation vakuumgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl A.dest resuspendiert und bei 55-60°C für 10 Minuten inkubiert.

Es folgte die zweite Extraktion mittels RNeasy Kit von Qiagen. Hierbei wurde das Protokoll für „RNA Cleanup“ im Handbuch des RNeasy Mini Kits exakt befolgt. Der optionale DNase Verdau zur Elimination von genomischer DNA Kontamination wurde ebenfalls durchgeführt. Die RNA wurde mit 30 µl eluiert.

2.4.23 Konzentration und Reinheit einer DNA Lösung

Nach der Durchführung einer Plasmid-Präparation wurde stets die Konzentration und Reinheit der Lösung ermittelt. Dazu wurde die DNA zwischen 1:50 und 1:10 in 10 mM Tris, pH 8 verdünnt und die OD bei 260 und 280 nm im Photometer bestimmt.

2.4.24 Generierung von in vitro RNA Transkripten

Die Generierung von RNA Transkripten in vitro erfolgte mit dem MEGAscript® Kit von Ambion für Transkripte, die keine Cap Struktur am Anfang benötigen, und mit dem mMMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kit von Ambion für die Transkripte, die am 5'Ende ein Cap aufweisen müssen.

Hierzu wurde die Plasmid DNA zunächst mit NotI linearisiert (NotI ist direkt am 5'Ende des Konstruktes lokalisiert) und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 1/20 Volumen 0,5 M EDTA, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen EtOH terminiert. Die Mischung wurde bei -20°C mindestens 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (13000 RPM, 5 Min., 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in RNase freiem Wasser zu einer Konzentration von 0,5- 1 µg /µl aufgenommen.

Die in vitro Transkription wurde exakt, wie in den Manuals beschrieben, durchgeführt. Um das DNA Template zu entfernen, wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Hierzu wurde zum Transkriptionsansatz 1 µl TURBO DNase aus dem Kit dazugegeben, gemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die erhaltene RNA wurde anschließend mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen aufgereinigt.

2.4.25 Transfektion von Huh-7 Zellen mit Elektroporation

Die RNA Transkripte wurden mittels Elektroporation in die Huh-7 Zellen transfiziert. Hierzu wurden die Huh-7 Zellen mit einer Konfluenz von 70 -90 % mit Trypsin-EDTA abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in einer Konzentration von $1,1 \times 10^7$ Zellen/ml in Cytomix Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt. 500 µl der

Zellsuspension wurde mit 8 -10 µg der in vitro transkribierten RNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette (4 mm Durchmesser, Bio-Rad) überführt. Die Zellen wurden dann einem Puls von 270 V und 975µF (Gene Pulser II Apparatus, Bio-Rad) ausgesetzt. Die transfizierten Zellen wurden dann sofort in zwei 10 cm Zellkultur Schalen transferiert, die jeweils 8 ml warmes Medium enthielten. Die Zellkulturschalen enthielten außerdem Collagen Typ I beschichtete Deckgläschen, auf den die Zellen auch wachsen. Diese konnten zu bestimmten Zeitpunkten aus der Schale entnommen werden und für eine Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt werden. Das Medium wurde an Tag 1 und Tag 4 gewechselt.

Cytomix (sterilfiltriert)	120 mM	KCl
	0,15 mM	CaCl ₂
	10 mM	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄
	25 mM	HEPES
	2 mM	EGTA
	5 mM	MgCl ₂
	2 mM	ATP
	5 mM	Glutathion
	pH 7,6	

Die Elektroporation der IVTs und die nachfolgende Kultivierung wurde während eines Aufenthaltes in Frankreich am Institut de Biologie de Lille im Labor von Prof. Jean Dubuisson in Kooperation durchgeführt.

2.4.26 Infektion von Huh-7 Zellen mit Zellkulturüberständen nach Elektroporation

Um die Bildung von infektiösen chimären Viruspartikeln zu überprüfen, wurde das Medium auf den Zellen 4-6 Tage nach Transfektion abgenommen und zur Klärung 10 min. bei 2000 rpm und 18 °C zentrifugiert. Anschließend wurde es sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm, Millipore). Der Überstand wurde dann auf einen Tag zuvor in 10 cm Zellkulturschalen mit 2×10^6 ausgesähte Huh-7 Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 6 Stunden, dann wurde der Überstand abgenommen, 3 mal mit PBS gewaschen und anschließend 8 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach 4 Tagen in Trizol aufgenommen und die RNA extrahiert. Der Nachweis von BC-Konstrukt RNA erfolgte mittels RT-PCR mit Primern gegen HCV E2.

Die beschriebene „Infektion“ von Huh-7 Zellen mit den Zellkulturüberständen nach Elektroporation erfolgte ebenfalls in Frankreich im Institut de Biologie de Lille im Labor von Prof. Jean Dubuisson in Kooperation.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft
Goat anti rabbit PE	Dianova (Jackson Immunoresearch)
Monoclonal anti β -Aktin (Clone AC-15)	Sigma
Phospho-Stat1 Antibody (Tyr701)	Cell Signaling
Stat1 Antibody	Cell Signaling
Phospho Stat2 (Tyr690)	Cell Signaling
Stat2 Antibody	Cell Signaling
Mouse Anti-Hepatitis C Virus E2 Antigen IgG Fraction monoclonal	IBT-Immunological and Biochemical Testsystems GmbH
ISG15 Rabbit mAB	Cell Signaling
Scavenging Receptor SR-BI antibody (rabbit polyclonal antibody)	Biozol
Claudin-1 Ab-1 (rabbit polyclonal antibody)	Dianova
CD81-FITC antibody (Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)	BD Biosciences
HCV E1 Antikörper (A4)	Geschenk von Harry B. Greenberg, Stanford University School of Medicine, Stanford, USA
Goat anti-Mouse IgG FITC	Dianova (Jackson Immunoresearch)
Goat anti-Rabbit IgG FITC	Dianova (Jackson Immunoresearch)
CBH-2	Geschenk von Steven Foung, Stanford University Medical Center, USA
Alexa Fluor 488 goat anti mouse	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 goat anti rat	Molecular Probes

2.5.2 Lyse von eukaryontischen Zellen

Die Zellen wurden nach Abnahme der Zellkulturmediums einmal mit PBS gespült, anschließend in RIPA Lysepuffer von der Platte geschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das verwendete Volumen an Lysepuffer richtete sich nach der Größe der Zellkulturschale. Bei einer 10 cm Schale wurde 1 ml RIPA Lysepuffer eingesetzt. Es folgte Inkubation auf Eis für 30-60 Minuten um eine vollständige Lyse der Zellen herbei

zu führen. Die erfolgreiche Lyse wurde unter dem Mikroskop überprüft. Die Lysate wurden anschließend 6 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden entweder sofort verwendet oder mit Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

Um die 293HEK Zellen vollständig zu lysieren und die genomische DNA ausreichend zu zerkleinern, mussten diese nach Aufnahme in Lyse-Puffer mit dem Ultra-Thurrax 10 Sekunden mechanisch homogenisiert werden. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert und wie oben beschrieben fortgesetzt.

RIPA Puffer:

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

0,5 % Igepal (NP40)

0,25 % Deoxycholic Acid

Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (PIC) von Roche

2.5.3 DC Protein Assay zur Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem DC Protein Assay Kit II (Bio-Rad GmbH, München) basierend auf der Proteinbestimmung nach Lowry (LOWRY *et al.* 1951) um Proteine quantitativ zu bestimmen, durchgeführt.

In einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurden als Referenz 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 und 0,03125 mg/ml BSA als Standardkurve aufgetragen und je 5µl der zu untersuchenden Probe, die zuvor 1:10 verdünnt worden war, in Dubletten aufgetragen. Dazu wurden je 25 µl der Lösung A` (1 ml Lösung A und 20 µl Lösung S) gegeben und jeweils 200 µl Lösung B. Nach 15 minütiger Inkubationszeit wurden eventuelle Luftblasen entfernt und die Proben im Elisa-Reader bei 660 nm ausgelesen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der aufgetragenen Eichkurve berechnet.

Materialien:

DC Protein Assay Reagenz A der Firma Bio-Rad Laboratories, München

DC Protein Assay Reagenz B der Firma Bio-Rad Laboratories

DC Protein Assay Reagenz S der Firma Bio-Rad Laboratories

Albumin Standard: BSA 2mg/ml in 0,9% NaCl der Firma Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn

2.5.4 SDS-PAGE

Zu untersuchende Lösungen wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli aufgetrennt.

Zum Erstellen von Gelen wurde die Minigel-Apparatur der Fa. Biometra (Göttingen) verwendet. Die Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und nach 5-minütigem Aufkochen bei 96°C, bei RT gekühlt und abzentrifugiert. Die Elektrophorese wurde bei ca. 25mA gestartet und, sobald die Proben ins Gel gewandert waren, mit ca. 30mA-35mA fortgesetzt.

Dazu wurden Gele in einer Biometra Apparatur nach folgendem Rezept gegossen:

Für 2 10 % Polyacrylamidgele:

6,3 ml 30% Acrylamid-bisAcrylamid (37,5:1)
4 ml Lösung B
6 ml 10 M Harnstoff
2,7 ml Aqua bidest.
15 µl TEMED,
1 ml 1,5 % APS (Ammoniumpersulfat)

Lösung B: 0,5 M Tris, 0,5 M Bicin, 0,5 % SDS

Laufpuffer: Lösung B 1:5 verdünnt

Standard: PageRuler Prestained Protein Ladder, von Fermentas GmbH, St. Leon-Roth.

Wenn es sich nicht um HCV Proteine handelte, die detektiert werden sollten, dann wurden Fertig-Gele der Firma Invitrogen (NuPAGE® Novex Bis-Tis Gel 10 %) eingesetzt. Die Elektrophorese lief bei konstanter Spannung und wurde bei 120V gestartet. Sobald die Proben ins Gel gewandert waren, wurde die Spannung auf 150V erhöht.

NuPage® Mops SDS Running buffer:

50 mM Mops
50 mM Tris Base
0,1 % SDS
1 mM EDTA
ph 7,7

5x Laemmli SDS-Probenpuffer:

0,6 ml 1,0M Tris-HCl (ph 6,8) [60 mM]
1,0 ml 20 % SDS-solution [14,4 mM]
5,0 ml 50 % Glycerol solution [25%]
1,0 ml 1 % Bromphenol Blau [0,1%]

Direkt vor Benutzung wurde, um reduzierende Bedingungen zu erhalten, 20% 2-Mercaptoethanol (2-ME) (v/v) dazu gegeben, so dass sich im 1 x konzentrierten Puffer 5% 2-ME befanden.

2.5.5 Western Blot

Zur spezifischen Detektion mit entsprechenden Antikörpern erfolgte der Transfer, der im Gel aufgetrennten Proteine, auf eine PVDF (Polyvinyl-Difluorid)-Membran. Das Blotten erfolgte bei konstanter Stromstärke von 200 mA und gekühltem Transferpuffer für ca. 1 Stunde.

Materialien

PVDF-Membran (Amersham Hybond™-P)

NuPage® Transfer Buffer:

50 mM Bicine
25 mM Bis-Tris (free base)
1 mM EDTA
ph 7,2

XCell II™ Blot Module der Firma Invitrogen

XCell *Sure Lock*™ Mini-Cell der Firma Invitrogen

2.5.6 Detektion

Zur Detektion spezifischer Proteine wurde die Membran mit einem spezifischen Erstantikörper und mit einem für den Erstantikörper spezifischen Zweitantikörper inkubiert. Zuerst wurden die unspezifischen Bindungen mit einem Blocking-Puffer (5 % Milchpulver in TBS-T oder 5 % BSA in TBS-T, je nach Angabe für den Erstantikörper) 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt (alternativ über Nacht bei 4°C). Die Membran wurde nun mit dem jeweiligen ersten Antikörper in Blocking-Puffer für 1 Stunde bei RT (alternativ über Nacht bei 4°C, je nach Angabe des Herstellers) auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundenen und überschüssigen Antikörper zu entfernen. Nun folgte die Inkubation mit dem mit

Merrettichperoxidase (HRP) markierten Zweitantikörper in Blocking-Puffer für eine Stunde bei RT. Nach dieser Inkubation wurde wie oben mit TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte dann mit dem ECL-System Plus (GE Healthcare). Die Membran wurde dazu fünf Minuten mit dem ECL Substrat inkubiert und die Signale mit einem ECL-Film in der Dunkelkammer mit geeigneter Belichtungszeit detektiert.

2.5.7 Coomassie Brilliant Blue Färbung von SDS-Gelen

Eine Anfärbung von Proteinen im SDS-Gel wurde mit der PageBlue™ Protein Staining Solution von Fermentas nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Bei der PageBlue Protein Staining Solution handelt es sich um eine optimierte Färbe-Methode der klassischen Coomassie Brilliant Blue Färbung.

2.5.8 Immunfluoreszenzfärbung

Lösungen/Materialien:

1. Fixierpuffer: 3% Paraformaldehyd (PFA) in PBS
2. Permeabilisierungspuffer: 0,05% Triton 100 in PBS
3. Blockingpuffer: 2% Serum, 1% BSA, 0,1% Tween 20 in PBS
4. Fluoromount (Southern Biotech, Birmingham, USA)
5. Antikörper: Verdünnt in Blockingpuffer
6. Rat Tail Collagen 22mm Round Coverslips (BD BioCoat)

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen zuvor auf sterilen Deckgläschen ausgesät und bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert. Für die Färbung wurden die Deckgläschen in je eine Vertiefung einer Schale mit 6 Vertiefungen überführt und einmal mit je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden diese mit 2 ml Fixierpuffer bedeckt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde 3 mal mit je 2 ml PBS gewaschen. Für die nachfolgende Permeabilisierung wurden die Zellen mit 2 ml Permeabilisierungspuffer 20 Minuten bei RT permeabilisiert und anschließend wieder 3 mal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern wurden die Zellen mit 2 ml Blockingpuffer für mindestens 2 Stunden bei RT inkubiert, wobei das im Puffer enthaltene Serum aus der selben Spezies stammte, aus welcher der 2. Antikörper generiert wurde. Es folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C. Dazu wurde ein Tropfen (ca. 100µl) des Antikörpers auf ein Stück Parafilm aufgebracht und in einer Feuchtkammer platziert. Dann wurden die Deckgläschen mit der Zellen tragenden Seite nach unten auf den Tropfen gelegt und wie oben beschrieben inkubiert. Nachfolgend

wurden die Deckgläschen wieder in die Platte gelegt und 3 mal mit PBS gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten 2. Antikörper erfolgte nun wie bereits beschrieben, jedoch wurde die Feuchtkammer dazu verdunkelt. Nachfolgend wurden die Deckgläschen wieder in die Platte mit den 6 Vertiefungen gelegt und 3 mal mit PBS gewaschen. Zum Eindeckeln wurde auf den Objektträger eine Tropfen Fluoromount aufgebracht und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf den Tropfen gelegt. Zum Aushärten wurden die Objektträger mindestens 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert und danach die Ränder mit klarem Nagellack abgedichtet.

2.5.9 Immunpräzipitation (IP)

Bei der Immunpräzipitation wird ein Protein aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert. Dabei entsteht durch die Bindung spezifischer Antikörper entweder sofort ein Präzipitat, oder es wird zusätzlich an Beads (z.B. Agarose) gekoppelt. Die resultierenden Präzipitate werden dann durch Zentrifugation gesammelt und aufgereinigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunpräzipitation in mehreren Schritten durchgeführt. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Alle Zentrifugationen wurden bei 4°C, 2000 rpm und für 2 Minuten durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Um unspezifische Bindungen der Proteine zu vermeiden wurde dem Puffer 0,2 % NP40 zugegeben.

2.5.10 Immunpräzipitation (IP) mit Zell-Lysaten

Die Protein A Agarose wurde vor der IP 3 mal mit 500 -1000 µl PBS, je nach Menge, gewaschen. Dies bedeutet, es wurde das PBS dazu gegeben, vorsichtig resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 2 mal wiederholt. Dann wurde das Protein A Agarose Pellet in IP-Puffer aufgenommen (Volumen entsprach der Hälfte des Ausgangsvolumens, um eine 50 %-tige Suspension zu bekommen).

Prä-Absorption des Lysats:

Um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, wurde mit dem Lysat zunächst eine Prä-Absorption durchgeführt, wodurch alle unspezifischen Bindungen abgesättigt werden sollten. Hierfür wurde zum Lysat aus einer 10 cm Schale 2,5 µg normales IgG der Spezies gegeben, aus welcher der Immunpräzipitierende Antikörper stammt und für 30 min. bei 4°C auf dem Über-Kopf-Roller inkubiert. Anschließend wurde 20 µl Protein A Agarose dazu gegeben und

für eine Stunde bei 4°C auf dem Über-Kopf-Roller inkubiert. Nach dieser Vor-Klärung des Lysats wurde der Ansatz zentrifugiert, um die Protein A Agarose zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und in neues Reaktionsgefäß überführt.

Immobilisierung des Antikörpers:

5 µg des Antikörpers wurden in 500 µl IP-Puffer über Nacht bei 4°C auf dem Über-Kopf-Roller zusammen mit 40 µl Protein A Agarose inkubiert, um den Antikörper an die Protein A Agarose zu binden. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das vorgeklärte Lysat zu dem Protein A Agarose immobilisiertem Antikörper gegeben. Die jetzt folgende Immunpräzipitation wurde bei 4°C auf dem Über-Kopf-Roller für mindestens 2 Stunden oder über Nacht durchgeführt.

Anschließend wurde die Mixtur zentrifugiert (s.o.) und der Überstand verworfen. Die Protein A Agarose Beads wurden 3 mal mit 800 µl PBS gewaschen (jeweils Zentrifugation wie oben) und dann in 50 µl 1 x reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurde die Bindung der Präzipitate an die Protein A Agarose Beads durch 10 minütiges Kochen bei 95°C gelöst. Die Proben der IP wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot identifiziert.

Verwendete Materialien und Puffer:

Protein A Agarose

Humanes IgG (Sigma)

Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Complete EDTA free, Roche Diagnostics, Mannheim)

IP-Puffer: PBS mit 0,2 % NP40 und Protease Inhibitor Cocktail

2.5.11 Immunpräzipitation (IP) mit Pseudopartikel enthaltendem Zellkulturüberstand und CEACAM1-Fc Konstrukten

Für die IP mit Pseudopartikeln wurden 1,5 ml der Pseudopartikel zunächst 1 Stunde mit 40 µl einer 50 %igen Protein A Agarose haltigen Lösung (*Slurry*) zur Vor-Klärung (so genanntes *pre-clearing*, verhindert unspezifische Bindungen der Proteine an die Protein A Agarose) der Pseudopartikel haltigen Lösung im Kühlraum über Kopf gerollt. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (2000 rpm, 2 Minuten, 4°C), der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und jeweils eines der zu testenden CEACAM1-Fc Konstrukte in einer Menge von 5 µg dazugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Kühlraum auf dem Über-Kopf-Roller (*end-over-end mixer*). Danach wurden 60 µl der 50 % Protein A

Agarose Lösung zugesetzt und 2 Stunden im Kühlraum auf dem Über-Kopf-Roller inkubiert. Die Beendigung der Präzipitation verlief genauso, wie in 2.5.10 beschrieben.

2.5.12 CEACAM1-Fc Konstrukte

Die CEACAM1-Fc Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Bernhard Singer, Abteilung für Anatomie I am Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich im Einzelnen um folgende Konstrukte: huCC1-Fc (humanes CEACAM1-Fc), huΔN-Fc (humanes CEACAM1-Fc ohne N-Domäne) und ratCC1-Fc (Ratten CEACAM1-Fc). Hierbei handelt es sich um chimäre Proteine, bei denen lösliche extrazelluläre Domänen von humanem und Ratten-CEACAM1 mit einer humanen schweren Kette Fc Domäne fusioniert wurden. Die komplette Prozedur ist in (Singer *et al.* 2005) nachzulesen.

2.5.13 Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Da es sich bei den zu analysierenden Molekülen um Oberflächenmoleküle handelt, wurden die Zellen nicht mit Trypsin/ EDTA von der Zellkulturschale abgelöst sondern mit eiskaltem PBS-EDTA (5mM). Bei einer 10 cm Schale beispielsweise, wurden die Zellen in 4 ml PBS-EDTA für 10 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend mit einer 1000 µl Pipette abgespült. Je Ansatz wurden 300.000 – 500.000 Zellen gefärbt. Alle verwendeten Lösungen waren kalt und alle Inkubationsschritte bzw. Färbe- oder Waschschrte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt, um ein Internalisieren der Oberflächenmoleküle zu verhindern. CEACAM1 war gegenüber Trypsin-EDTA unempfindlich, weshalb Zellen bei denen CEACAM1 analysiert werden sollte, mit Trypsin-EDTA abgelöst werden konnten. Alle Antikörperinkubationen erfolgten in einem Volumen von 50 µl und einer Zeit von 30 Minuten (Ausnahme CEACAM1 Antikörper 18/20, dieser 1 Stunde), bei 4°C und im Dunkeln. Die extrazellulären Färbungen hierbei in Cell Wash Puffer, die intrazellulären Färbungen in Perm/Wash Buffer. Alle Zentrifugationen erfolgten bei 4°C, bei einer Geschwindigkeit von 460 g und einer Länge von 6 Minuten. Als Kontrollen wurden dem jeweiligen Antikörper entsprechende Isotyp-Kontrollen verwendet. Für die Antikörper gegen Claudin-1 und SR-BI, bei denen es sich um polyklonale Antikörper aus Kaninchen handelte, wurde als „Isotyp-Kontrolle“ gereinigtes Kaninchen IgG verwendet, das in der gleichen Konzentration wie der Antikörper eingesetzt wurde.

2.5.14 Oberflächenfärbung

Für die Oberflächenfärbung wurden die Zellen in eine Rundbodenplatte mit 96 Vertiefungen überführt und mit Cell Wash Puffer gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand verworfen, die Zellen durch Schütteln gelöst und in 50µl Cell Wash Puffer mit entsprechendem Antikörper resuspendiert.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4°C wurden die Zellen zweimal in Cell Wash Puffer resuspendiert, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem Waschen wurden die Zellen entweder in 50 µl Cell Wash Puffer mit Fluoreszenz gekoppeltem Zweit-Antikörper aufgenommen, oder direkt in 100 µl Cell Wash Puffer resuspendiert und in Facsröhrchen, in denen 200µl Cell Wash Puffer vorgelegt worden waren, überführt. Falls noch eine Inkubation mit Zweit-Antikörper erfolgen musste, so wurde nach Beendigung dieser Inkubation ebenfalls gewaschen und dann die Zellen wie beschrieben in Facsröhrchen aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Zellen im dunklen bei 4°C maximal 2 Stunden gelagert.

2.5.15 Intrazelluläre Färbung

Für die Färbung mit dem anti-Claudin-1 und dem anti-SR-BI Antikörper wurde eine intrazelluläre Färbung durchgeführt, da der verwendete Antikörper gegen ein Epitop gerichtet war, dass in beiden Fällen im C-terminalen Bereich lokalisiert war und durch eine extrazelluläre Färbung nur schlecht detektierbar gewesen wäre.

Die Zellen wurden in eine Rundbodenplatte mit 96 Vertiefungen überführt und einmal mit 150 µl Cell Wash Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes wurden die Zellen in je 150 Fc-Blocker von Innovex aufgenommen und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Dies diente dem Blockieren der Fc-Rezeptoren und sollte somit unspezifische Bindungen der Antikörper verhindern. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Cell Wash Puffer gewaschen und dann in mit je 150 µl Cytofix/Cytoperm (BD) für 20 Minuten fixiert und permeabilisiert. Nach 2 maligem Waschen mit Perm/Wash Buffer (BD) wurden die Zellen mit entweder anti-Claudin-1 oder anti-SR-BI intrazellulär gefärbt. Die Zellen wurden zweimal mit Perm/Wash Puffer gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper Goat anti-rabbit- FITC inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit Perm/Wash Puffer (zweimal) wurden die Zellen 100 µl Cell Wash Puffer aufgenommen und in die Facs-Röhrchen (s.o.) überführt. Für alle Färbungen wurden entsprechende

Isotypkontrollen durchgeführt. Die Datenaufnahme erfolgte mit einem FACScalibur (BD Bioscience) und mit Hilfe der CellQuest pro Software (BD) analysiert.

Verwendete Materialien:

Rundbodenplatten mit 96 Vertiefungen Nunc Biotechnologies Wiesbaden
Cell-wash BD Bioscience Heidelberg
Facs Röhrrchen 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube BD Falcon Erembodegem Belgien
FACS Flow BD Biosciences
Cytotfix/Cytoperm™ BD Biosciences
Perm/Wash™ Buffer BD Biosciences
Phosphate Buffer Saline Dulbecco's Gibco, Karlsruhe

2.5.16 Quantifizierung von CEACAM Molekülen auf der Oberfläche von HeLa Zellen mittels Qifikit® von Dako

Die Quantifizierung von CEACAM Molekülen auf der Oberfläche von CEACAM Molekülen auf der Oberfläche von HeLa Zellen erfolgte mit Hilfe des Qifikit® der Firma Dako. Dabei wird das sich auf der Zelloberfläche befindende Antigen (in diesem Fall CEACAM) mittels Durchflusszytometrie in einem indirekten Immunfluoreszenzassay detektiert. Die Menge an Antigen wird in Antikörper-Bindungs-Kapazität (ABC für Antibody-Binding Capacity) Einheiten (units) ausgedrückt.

Das Qifikit enthält unterschiedliche Beads (Durchmesser 10 µm), die mit verschiedenen, präzise definierten Mengen von monoklonalen Mausantikörpern (anti-Human CD-5, Klon ST1, Isotyp IgG2a) überzogen (*gecoated*) sind (Kalibrations-Beads). Diese Beads repräsentieren Zellen mit unterschiedlichen Antigendichten, die mit einem primären, monoklonalem Mausantikörper (Isotyp IgG) markiert sind.

Zusätzlich dazu enthält es sog. Set-Up Beads, die aus einer Mischung von Blank Beads und Beads mit einer hohen Anzahl an monoklonalen Antikörpermolekülen bestehen. Diese dienen der ersten Einstellung des Messfensters bei der Durchflusszytometrie.

CEACAM exprimierende HeLa Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst, in 10 ml Medium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und abzentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C). Das Pellet wurde in Medium in einer Menge von 3×10^6 Zellen aufgenommen, so dass sich in 100 µl 3×10^5 Zellen befanden. 100 µl je Ansatz wurden mit entsprechendem zu quantifizierendem anti-CEACAM Antikörper (anti CEACAM1, anti CEACAM3, anti CEACAM5, anti-CAEACAM6, anti CEACAM7 oder anti CEACAM8) oder Maus IgG im Falle der Negativ-Kontrolle in einer Konzentration von 10 µg /ml für einer Stunde bei 4°C

inkubiert. Anschließend wurde 3 ml PBS-BSA-Azid (0,1 % BSA und 15 mM NaN₃ in PBS) dazugegeben, kurz gevortext und zentrifugiert (300 x g, 5 min., 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und erneut 3 mal PBS-BSA-Azid gewaschen. Nach Vortexen folgte eine weitere Zentrifugation (s.o). Dieser Waschschrift wurde ein drittes Mal wiederholt. Dann wurden 100 µl des im Kit enthaltenen FITC Konjugats (zuvor 1:50 in PBS verdünnt) zu jedem Ansatz gegeben. Zusätzlich wurden 100 µl der Set-Up Beads und 100 µl der Kalibrations-Beads, die zuvor mit je 3ml PBS-BSA-Azid gewaschen worden waren (s.o.) mit je 100 µl FITC Konjugat versetzt. Nach einer 45 Minütigen Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurden die Ansätze dreimal mit 3 ml PBS-BSA-Azid gewaschen (s.o). Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen und die Beads in 500 µl PBS-BSA-Azid aufgenommen und direkt in der Durchflusszytometrie analysiert.

2.5.17 Immobilisierte Metall Ionen Affinitätschromatographie (IMAC) zur Isolierung von rekombinantem HCV E1E2 Protein über einen 6 x Histidin-Tag unter nativen Bedingungen

Das HCV E1E2 Heterodimer sollte mittels immobilisierter Metall Ionen Affinitätschromatographie (IMAC) über einen 6x Histidin-Tag, der sich am C-Terminus des Proteins befand, isoliert werden. Hierzu wurden HisTrap™ HP Säulen der Firma Amersham Biosciences (jetzt GE Healthcare) verwendet, die mit 1 ml Nickel (Ni) Sepharose™ High Performance vorgepackt waren.

Verwendete Puffer und deren Vorbereitung:

Bindungspuffer (Waschpuffer):

20 mM Natriumphosphat
0,5 M NaCl
40 mM Imidazol
0,05 % NP-40
Proteaseinhibitorcocktail
pH 7,4

Elutionspuffer:

20 mM Natriumphosphat
0,5 M NaCl
variable Imidazolkonzentration (zwischen 50 mM und 500 mM)
0,05 % NP-40
Proteaseinhibitorcocktail
pH 7,4

Bei jedem Puffer musste der pH Wert nach Zugabe von frisch eingewogenem Imidazol kontrolliert und neu eingestellt werden. Die Puffer wurden alle vor der Benutzung durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert und kalt gestellt.

Vorbereitung des Zelllysats:

Für eine Aufreinigung wurden Lysate aus zwei vereinigten 10 cm Zellkutschalen genommen. Dabei handelte es sich entweder um E1E2 exprimierende Zellen oder um unbehandelte Zellen als Negativkontrolle. Um optimale Bindungsbedingungen für die Säule zu schaffen, wurden die Zellen in Bindungspuffer lysiert. Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgenommen, 1 mal mit 5 ml PBS vorsichtig gespült und anschließend in 1,8 ml Bindungspuffer von der Zellkutschale geschabt. Um eine schnelle und vollständige Lyse zu erzielen, so wie die ausgefallene genomische DNA effizient zu zerkleinern, wurden die Zellen für 10 Sekunden im Ultra-Thurax homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat 10 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt, auf Eis gelagert und konnte anschließend für die Aufreinigung verwendet werden.

Aufreinigung:

Das Beladen der Säule mit Puffer bzw. Lysat erfolgte mit einer 5 ml Luer Lok™ Spritze (Beckton Dickinson), die auf die Säule aufgeschraubt wurde. Anschließend wurde der Inhalt der Spritze (Puffer oder Lysat) manuell durch die Säule gedrückt (Fließgeschwindigkeit 1 Tropfen pro Sekunde).

Die Säule wurde als erstes mit 5 Säulenvolumen (CV für *Column Volumes*) Aqua bidest gespült und anschließend mit 5 CV Bindungspuffer äquilibriert. Dann wurde das Lysat auf die Säule geladen und die Säule mit 15 CV Bindungspuffer gewaschen. Für die Elution in Form eines Gradienten wurden jeweils 2 CV in aufsteigender Imidazolkonzentration auf die Säule gegeben und 1 ml Fraktionen gesammelt. Folgende Imidazolkonzentrationen wurden eingesetzt: 50 mM, 100 mM, 250 mM, 300 mM, 500 mM, 1000 mM. Die Eluate, so wie ein

Teil der Waschfraktionen, wurde bis zur weiteren Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.18 Aufreinigung des HCV E1E2 Proteins mittels Ni-NTA Matrix von Qiagen unter nativen Bedingungen

Für die Aufreinigung mit dem System von Qiagen wurde Ni-NTA Agarose eingesetzt. Diese besteht aus Ni-NTA, das an Sepharose® CL-6B gekoppelt ist. Die Bindungskapazität liegt bei 5-10 mg His-getagtes Protein pro ml Säulenmaterial.

Verwendete Puffer und deren Vorbereitung:

Lyse-Puffer:

50 mM NaH_2PO_4
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
0,05 % NP-40
Proteaseinhibitorcocktail
pH 8.0

Waschpuffer:

50 mM NaH_2PO_4
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
0,05 % NP-40
Proteaseinhibitorcocktail
pH 8.0

Elutionspuffer:

50 mM NaH_2PO_4
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
0,05 % NP-40
Proteaseinhibitorcocktail
pH 8.0

Vorbereitung des Zelllysats:

Das Zelllysats wurde wie unter 2.5.2 beschreiben gewonnen, jedoch mit dem in diesem Kapitel beschriebenen Lysepuffer.

Aufreinigung:

Zu dem Zelllysate wurde 50 µl der Ni-NTA Agarose gegeben und der Ansatz im Über-Kopf-Roller für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Ni-NTA Agarose mit daran gebundenen Proteinen durch Zentrifugation (1000 rpm, 1 min., 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde entweder zur weiteren Analyse verwahrt oder verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl Waschpuffer vorsichtig resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (s.o.). Dieser Waschschrift wurde 3 mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl Elutionspuffer resuspendiert, 1 min. bei RT und zentrifugiert (s.o.). Der Überstand (Eluat) wurde abgenommen und auf Eis gestellt. Der Elutionsschritt wurde noch 1 mal mit 50 µl Elutionspuffer und ein drittes mal mit 100 µl Elutionspuffer wiederholt. Die Eluate wurde bis zur weiteren Analyse mit flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.6 Computeranwendungen

Für die Anfertigung dieser Arbeit wurde eine Anzahl von Computerprogrammen verwendet. Sie wurden zur Analyse, Überarbeitung und Darstellung von Daten genutzt. Alle gezeigten SDS-Gele, Blots und Agarose-Gele wurden digital überarbeitet aber inhaltlich nicht verändert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden in der Tabelle aufgeführten Computerprogramme verwendet:

Tabelle 2.7: Verwendete Computerprogramme

Computerprogramm	Hersteller	Anwendung
Mozilla Firefox	Mozilla Foundation	Internetzugang
Word 2003	Microsoft	Textverarbeitung
Excel 2003	Microsoft	Tabellenkalkulation
Reference Manager Version 11	Thomson ISI ResearchSoft	Verwaltung von Literaturangaben
Photoshop 7.0	Adobe	Bildbearbeitung
Prism 4	GraphPad Software Inc.	Tabellenkalkulation
Adobe Reader 7.0	Adobe	Lesen von pdf- Dateien
Bioedit 4.8.10	Dep. of Microbiology, North Carolina State University, USA	DNA-Sequenzanalyse
JellyFish 3.2	Infotrieve, Inc.	DNA – und Proteinsequenzanalyse
Vector NTI 8	Informax	DNA Analyse
Phoretix Grabber	Biostep, Jahnsdorf	Geldokumentation
Systemsoftware v2.3	Bio-Rad	Dokumentation und Auswertung der Realtime PCR

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung eines chimären HCV-Dengue Virus als Modellsystem

Die Mechanismen der Bindung, Aufnahme und der Partikelgenese von HCV sind auch heute noch zu weiten Teilen ungeklärt.

Zu Beginn dieser Doktorarbeit existierte das kürzlich publizierte Zellkultursystem für HCV (Wakita *et al.* 2005), mit dem es möglich ist infektiöse Partikel zu generieren, noch nicht. Somit stand zu Beginn dieser Arbeit noch kein System zur Verfügung, mit dem der komplette Lebenszyklus des Virus, vor allem aber die initialen Schritte der Infektion suffizient untersucht werden konnte. Zwar gab es schon Publikationen zu den Mechanismen der Replikation aufgrund der zur Verfügung stehenden Replikons. Auch verschiedene Modellsysteme für Pseudo-Partikel waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit veröffentlicht worden. Jedoch sind diese auf die Charakterisierung bestimmter Teilaspekte des HCV Lebenszyklus limitiert.

Ziel war es ein eigenes System zu erstellen, mit dem es möglich wäre, replikationsfähige und infektiöse Partikel zu generieren. Da das Dengue Virus dem Hepatitis C Virus strukturell sehr ähnlich ist und zudem in Zellkultur sehr gut mit hohen Titern repliziert, sollte das chimäre Konstrukt aus HCV und Dengue Virus Sequenzen gebildet werden.

3.1.1 Struktur des chimären Konstruktes und Klonierungsstrategie

Die Klonierung sollte in mehreren sukzessiven Schritten erfolgen: Das Konstrukt sollte mit dem DEN 5'UTR (untranslatierte Region) beginnen, dem noch die ersten 20 Aminosäuren des DEN Core Fragmentes folgten (Fragment 1). Die DEN 5'UTR beinhaltet eine *Cap-Struktur*, die an der Initiation der Translation beteiligt ist. Die sich an die DEN 5'UTR anschließenden 20 Aminosäuren sollten eine korrekte Bildung der Cap-Struktur ermöglichen. Die Translation der ersten 20 Aminosäuren des DEN Core sollte durch ein sich anschließendes Stopcodon terminiert werden. Dem 5'-Ende des Fragments sollte zusätzlich durch die PCR ein T7 Promotor vorgelagert sein, um die Generierung von *in vitro* RNA Transkripten zu ermöglichen. An dieses erste Fragment sollte sich die IRES Sequenz des Enzephalomyocarditis Virus (EMCV-IRES, Fragment 2) anschließen. Diese sollte eine effiziente und starke Translation des nachfolgenden Polyproteins bewirken. Das dritte Fragment bestand aus den Strukturproteinen von HCV: Core, E1, E2 und p7 (Fragment 3).

Das letzte Fragment bestand aus den DEN Nicht-Strukturproteinen NS1-NS5 und der 3'UTR (Fragment 4). Die Fragmente sollten mittels PCR, mit zusätzlichen Schnittstellen am 5' und 3'-Ende zur gerichteten Klonierung der Fragmente, amplifiziert werden. Die Fragmente 1, 2 und 3 sollten dann nacheinander zunächst in einen bezüglich der Schnittstellen modifizierten pBluescript II KS+ Vektor subkloniert werden. Anschließend sollten sie in 5' Richtung vor das zuvor in den low-copy Vektor pACNR klonierte DEN Fragment 4, gesetzt werden.

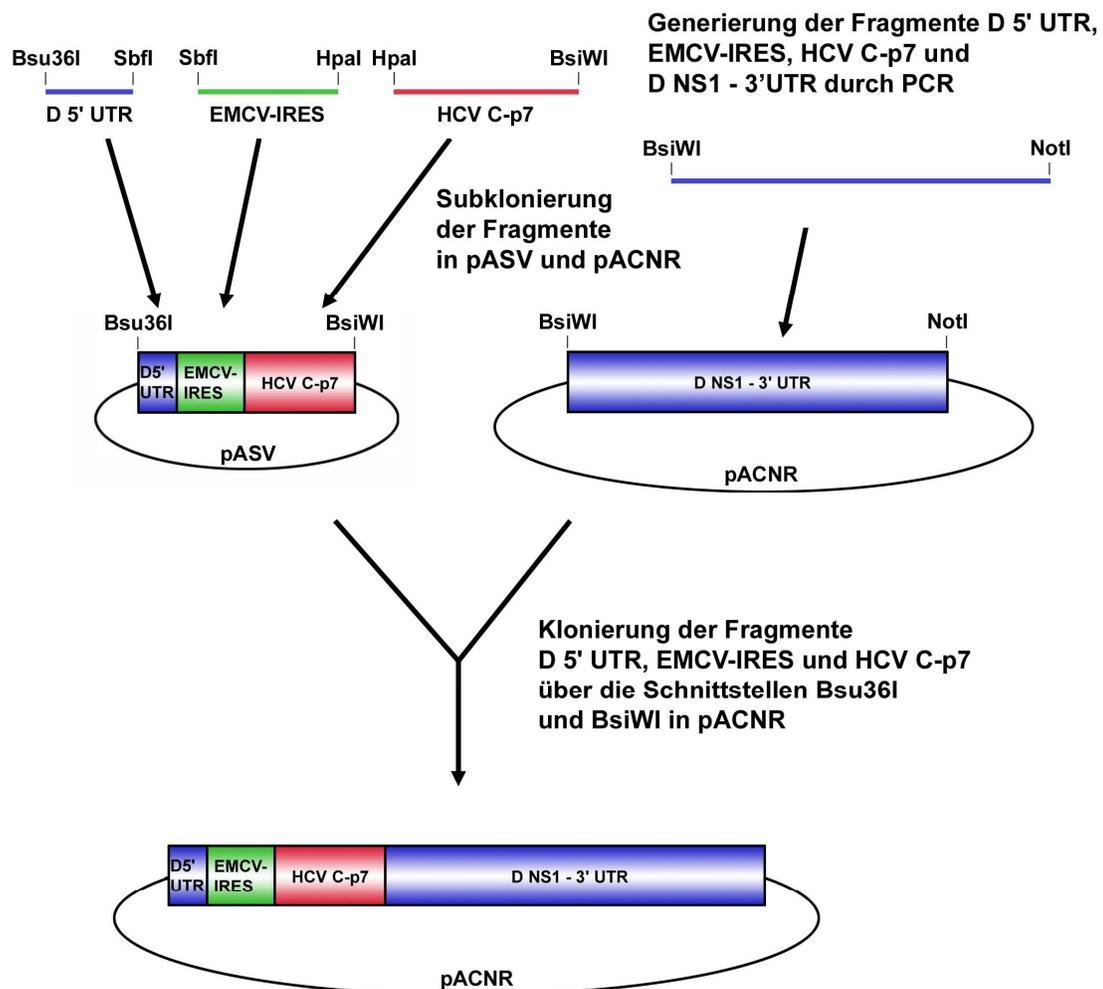


Abb. 3.1: Klonierungsschema zur Generierung des chimären Konstruktes. Die von Dengue Virus stammenden Sequenzen sind in blau dargestellt, die von HCV stammenden in rot. Alle vier Fragmente wurden durch PCR generiert, wobei die Schnittstellen über die Primer angefügt wurden. Da sich der low-copy Vektor pACNR nicht für viele verschiedene Klonierungsschritte eignet, wurden die Fragmente 1, 2 und 3 in pASV subkloniert und später in einem einzigen Schritt in den Zielvektor kloniert. D = Dengue.

3.1.2 Konstruktion neuer Restriktionsschnittstellen in pBluescript II KS+

Für die Klonierung des chimären Konstruktes standen insgesamt nur 5 verschiedene Restriktionsschnittstellen zur Verfügung, die weder im Vektor pBluescript II KS+ noch im Vektor pACNR vorkommen. Hierbei handelt es sich um die Schnittstellen Bsu36I, SbfI, HpaI, BsiWI und NotI. Da diese aber bis auf NotI in der benötigten Anordnung zur Subklonierung der Fragmente 1-3 in den pBluescript Vektor nicht zur Verfügung standen, wurden die erforderlichen Schnittstellen jeweils durch eine „Site directed Mutagenesis“ Reaktion in den Vektor eingefügt. Dabei sind die Bsu36I und die BsiWI zuvor durch Punktmutation (Austausch von einzelnen Basenpaaren) und die SbfI und HpaI Schnittstellen durch Insertion eingefügt worden. Der daraus resultierende Vektor wurde pASV genannt. Die erfolgreiche Mutagenese wurde mit Restriktion (Daten nicht gezeigt) und Sequenzierung verifiziert (Abb 3.2).

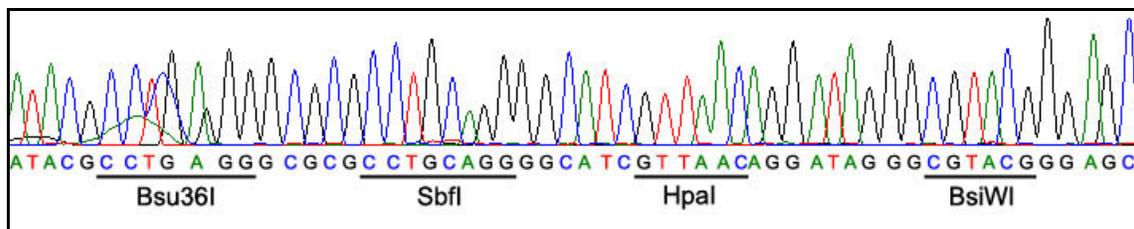


Abb. 3.2: Ausschnitt der Sequenzierung von pASV. Die neu eingefügten Schnittstellen sind schwarz unterstrichen und benannt.

Wie die Sequenzierung belegt, sind alle neuen Schnittstellen in der richtigen Reihenfolge vorhanden.

3.1.3 Subklonierung der Fragmente

Für die Subklonierung der Fragmente 1-3 wurden diese jeweils durch PCR amplifiziert und die für die Klonierung vorgesehenen Schnittstellen sowie andere Modifizierungen mittels der PCR Primer angefügt. Als Template für die von HCV stammenden Sequenzen diente der *full length* cDNA Konsensus Klon H77, der zu Genotyp 1a korrespondiert und im p90 Vektor vorlag (genaue Beschreibung unter 2.4.1). Für die Amplifikation der DEN Sequenzen diente die *full length* cDNA Sequenz vom Western Pacific Dengue-1 Virusstamm, die in dem Hefe-Shuttlevektor pRS424FL kloniert vorlag (genaue Beschreibung unter 2.4.1).

Die Fragmente mit den entsprechenden Modifizierungen sind in Abb. 3.1 dargestellt. Dabei wurde Fragment 1 über Bsu36I am 5'-Ende und SbfI am 3'-Ende, Fragment 2 über SbfI am

5'-Ende und HpaI am 3'-Ende, sowie Fragment 3 über HpaI am 5'-Ende und BsiWI am 3'-Ende in pASV kloniert und somit die einzelnen Fragmente nacheinander an der entsprechend gemeinsamen Schnittstelle miteinander verbunden.

Da keine Schwierigkeiten über die Klonierung der ersten 3 Fragmente bekannt waren, wurden sie, um eine schnelle und effiziente Klonierung zu erzielen, jeweils nacheinander in den *High Copy* Vektor pASV kloniert. Eine erfolgreiche Klonierung wurde durch analytische Restriktion und Sequenzierung überprüft.

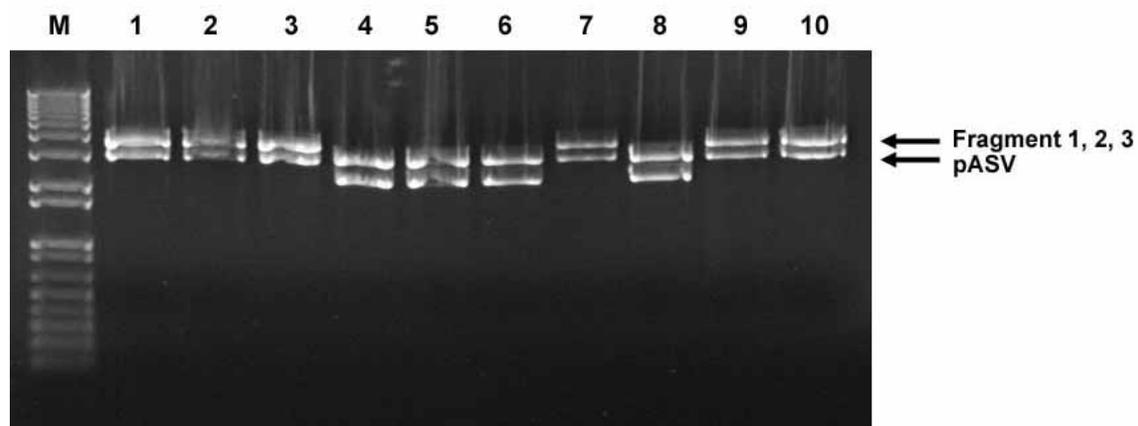


Abb. 3.3: Analytische Restriktion der Subklonierung der Fragmente 1,2 und 3 in pASV. Restriktion mit Bsu36I und BsiWI. Die Pfeile markieren die erwarteten Fragmente pASV auf Höhe von 3 kb und das aus den Fragmenten 1, 2 und 3 bestehende komplette Sub-Fragment mit einer Größe von ca. 3,5 kb

3.1.4 Klonierung von DEN NS1-3'UTR

Für die Klonierung des DEN NS1-3'UTR Fragments (Fragment 4) sollte das Fragment ebenfalls mit den erforderlichen Schnittstellen mittels PCR amplifiziert und dann in den Vektor pACNR über die Schnittstellen BsiWI am 5' Ende und NotI am 3' Ende ligiert werden. Für die Klonierung von den äußerst langen und instabilen Dengue Sequenzen hatte sich der hier verwendete Vektor pACNR, der nur in sehr geringer Kopienzahl in E.coli vorliegt, als vorteilhaft gegenüber einem herkömmlichen Vektor wie ein pBluescript erwiesen, der in sehr hoher Kopienzahl vorliegt (persönliche Mitteilung PD Dr. Philip Hilgard).

Aufgrund der ungewöhnlichen Länge dieses Fragments von etwa 8 kb gestaltete sich diese PCR als schwierig. Zunächst wurde die *PfuTurbo* DNA Polymerase von Stratagene eingesetzt, die speziell für die Amplifizierung von längeren Fragmenten geeignet ist. Sie besteht aus einer Mischung von *Pfu* Polymerase und einem neuartigen thermostabilen Faktor

und ermöglicht so die PCR von bis zu 19 kb langen Fragmenten aus Plasmid-DNA Templates. Zudem besitzt sie eine extrem niedrige Fehlerrate. Die Generierung des Fragments an sich gelang zwar, aber es wurden zudem noch viele unspezifische Fragmente amplifiziert oder die Banden waren sehr „schmierig“. Mit Hilfe eines PCR Kits von Qiagen (ProofStart DNA Polymerase) gelang schließlich eine akzeptable Generierung des Fragments (Abb 3.4).

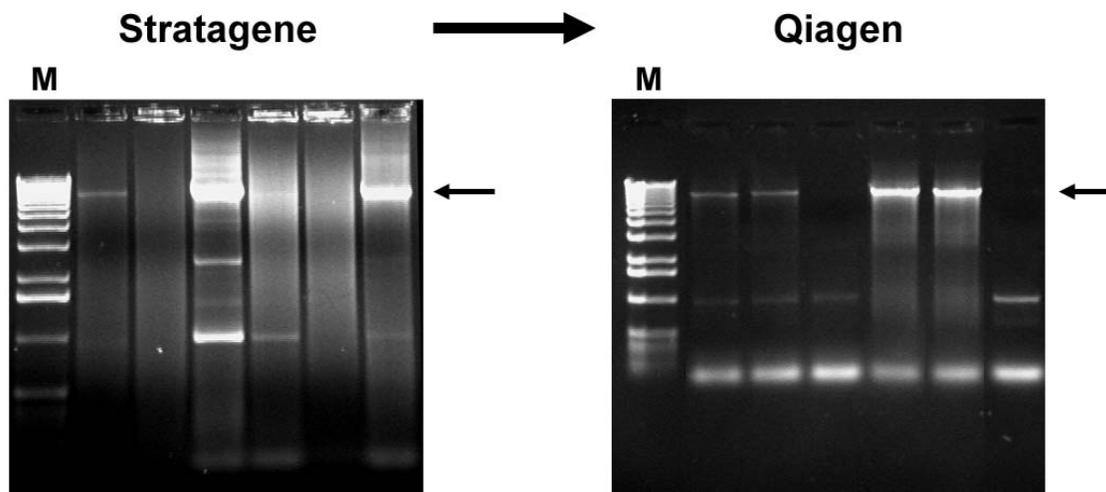


Abb. 3.4: Optimierung der 8 kb Fragment PCR. Dargestellt sind beispielhaft ein PCR Ansatz mit der PfuTurbo DNA Polymerase von Stratagene (links), die zuerst benutzt wurde und der ProofStart DNA Polymerase von Qiagen (rechts), die letztendlich eingesetzt wurde. In jedem Gel sind verschiedene Reaktionsbedingungen zusammen aufgetragen. Die Pfeile indizieren die 8 kb Fragmente, die DEN NS1-3'UTR repräsentieren. Je nach dem, welche Reaktionsbedingung gewählt wurde, ist kein Fragment bzw. ein relativ sauberes Fragment amplifiziert worden.

Das gewünschte Fragment wurde in den Vektor pACNR ligiert. Dies gelang allerdings erst nach mehrfachen Versuchen, da erst noch das geeignete Verhältnis von Vektor zu Insert ausgetestet werden musste, aufgrund des außergewöhnlich großen Inserts (8 kb) im Verhältnis zum 2,4 kb „kleinen“ Vektors. In diesem Fall stellte sich heraus, dass ein 5 fach molarer Überschuss von Vektor zu Insert vorliegen musste.

Nach erfolgter Subklonierung der Fragmente 1-3 in pASV sollte das komplette Insert, bestehend aus DEN 5'UTR – DEN Core20 (Fragment 1), EMCV-IRES (Fragment 2) und HCV C-p7 (Fragment 3) über die Schnittstellen Bsu36I am 5'-Ende und BsiWI am 3'-Ende ausgeschnitten werden. Anschließend sollte es in den Vektor pACNR, der bereits das DEN NS1-3'UTR Fragment enthält, über die Schnittstellen Bsu36I und BsiWI in 5'Richtung vor das DEN Fragment kloniert werden.

Dieser finale Klonierungsschritt gelang jedoch nicht auf Anhieb, sondern erst nachdem sämtliche Schritte dieser Klonierung alle nacheinander erfolgten und keines der Produkte bei -20°C zwischengelagert wurde.

Nach etwa 24 Stunden wurden Klone sichtbar, von denen einige deutlich kleiner waren als die anderen. Die Fertigstellung des Konstruktes wurde durch eine analytische Restriktion verifiziert. Abb. 3.5 zeigt ein Beispiel für einen Klon, bei dem alle zu erwartenden Fragmente ausgeschnitten wurden.

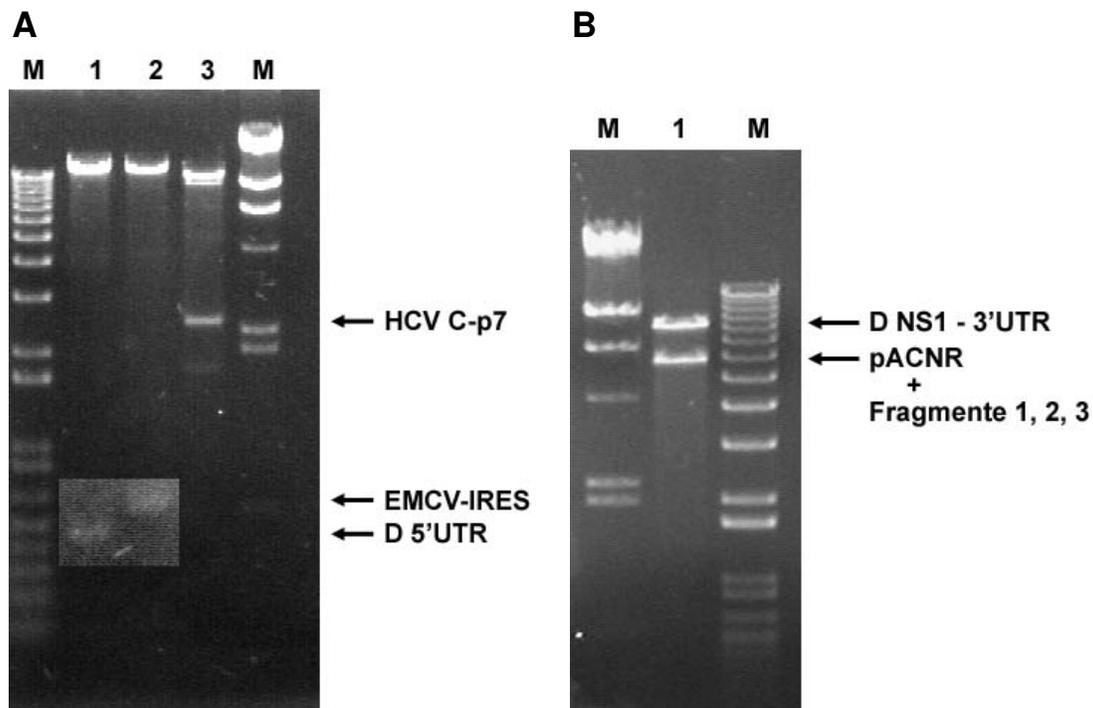


Abb. 3.5: Analytische Restriktion des fertig klonierten chimären Konstruktes. Aufgrund der äußerst unterschiedlichen Fragmentgrößen mussten 2 Gele mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen zur Auftrennung benutzt werden. A: 1 % Agarosegel. Einzeln ausgeschnittene Fragmente. Spur 1: Fragment 1 (DEN 5'UTR) auf Höhe von 465 bp, Spur 2: Fragment 2 (EMCV-IRES) auf Höhe von 611 bp, Spur 3: Fragment 3 (HCV C-p7) mit 2427 bp. Marker links: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Marker rechts: λ -DNA/EcoRI/HindIII (Fermentas). Um die Fragmente 1 und 2 besser sichtbar zu machen, stammt dieser Teil der Abbildung aus einem stärker belichteten Gel. B: 0,8 % Agarosegel. Ausgeschnittenes Fragment 4 (DEN NS1-3'UTR) bei ca. 8,3 Kb. Das Plasmid mit den restlichen Inserts ist die darunter mit dem Pfeil markierte Bande.

3.1.5 Generierung von In Vitro Transkripten (IVT)

Für eine effiziente *In vitro* Transkription (IVT) musste das Plasmid linearisiert werden. Die Linearisierung führt zur Termination der IVT am Ende des linearisierten Fragments.

Hierfür wurde mit NotI geschnitten, das das Konstrukt direkt am Ende von DEN NS1-3'UTR linearisiert. Die *In vitro* Transkription (Abb. 3.6) war nur dann erfolgreich, wenn das Template vorher vollständig linearisiert worden war.

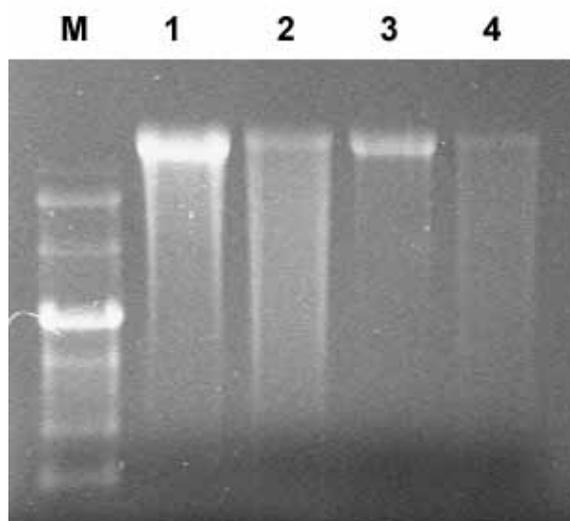


Abb. 3.6: Erfolgreiche *In vitro* Transkription des chimären Konstruktes. Aufgetragen sind verschiedene Mengen an RNA. Spur 1: 2 µg, Spur 2: 0,5 µg, Spur 3: 1 µg, Spur 4: 0,2 µg. Da die Transkripte eine Länge von etwa 12 kb hatten, war die Bande stets höher als der zur Verfügung stehende Marker. M: ss RNA Ladder (NEB)

3.1.6 Nachweis des chimären Konstruktes in Huh-7 Zellen durch RT-PCR und Immunfluoreszenz

Die generierten IVTs wurden in Huh-7 Zellen durch Elektroporation transfiziert. Um RNA des transfizierten chimären Konstruktes nachzuweisen, wurde bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % (nach 4-6 Tagen) die RNA aus den Zellen extrahiert und mit der erhaltenen RNA eine RT-PCR durchgeführt, wobei Primer gegen HCV E2 eingesetzt wurden. Die erhaltene cDNA wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Um zu überprüfen, ob durch die Transfektion mit dem chimären Konstrukt infektiöse chimäre Viruspartikel gebildet werden, wurde der Überstand nach 4 Tagen geerntet und naive Huh-7 Zellen damit inokuliert. 4 Tage später wurde ebenfalls die RNA extrahiert und mit RT-PCR mit Primern gegen HCV E2 analysiert (Abb 3.7).

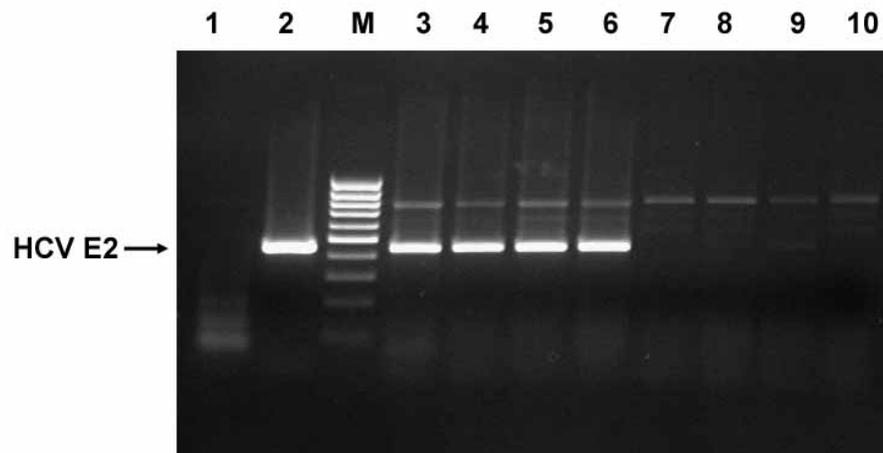


Abb. 3.7: RT-PCR zur Detektion von HCV E2 in Huh-7 Zellen, die mit dem chimären Konstrukt transfiziert wurden. Es sind zwei voneinander unabhängige Transfektionen (hier als Transfektion I und II bezeichnet) zusammen auf das Gel aufgetragen worden. Spur 1: Naive Huh-7 Zellen, Spur 2: Positiv-Kontrolle für die RT-PCR (Plasmid DNA vom BC-Konstrukt), M: MassRuler DNA Ladder Low Range, Spur 3 und 4: Transfektion I, Spur 5 und 6: Transfektion II, Spuren 7 und 8: RT-PCR von Proben, die mit Überstand von Transfektion I inkubiert worden waren, Spuren 9 und 10: wie Spuren 7 und 8 aber Überstände aus Transfektion II.

Die Detektion von HCV E2 durch RT-PCR, lässt auf vorhandene RNA in den mit dem chimären Konstrukt transfizierten Zellen schließen. Da nach 4 bzw. 6 Tagen die durch die Elektroporation in die Zellen eingebrachte RNA höchstwahrscheinlich degradiert ist, könnte dies auf eine Replikation des Konstrukts hindeuten.

Für die Immunfluoreszenz zum Nachweis von HCV E2 Proteinen wurden die Zellen nach Elektroporation in 10 cm Zellkultur-Schalen ausgesät, in denen sich kollagenisierte Deckgläschen befanden. Bei Erreichen von etwa 80 % Konfluenz (nach etwa 4-6 Tagen) wurden die Deckgläschen herausgenommen und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Durch die Immunfluoreszenz sollten translatierte E2 Proteine des Konstrukts nachgewiesen werden und somit gezeigt werden, dass das Konstrukt in den Huh-7 Zellen in der Lage ist HCV Proteine zu exprimieren. Dies wäre einer der erster Schritte zu Generierung von infektiösen Partikeln.

In der Immunfluoreszenz konnten keine für HCV E2 positiven Zellen nachgewiesen werden. Es konnten also keine oder nur in sehr geringen Mengen infektiösen Partikel produziert werden.

3.1.7 Überprüfung der HCV E2 Expression in 293HEK und Huh-7 Zellen mit Immunfluoreszenz

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Anfärbung von HCV E2 durch Immunfluoreszenz aufgrund der Technik an sich nicht funktioniert (beispielsweise nicht-funktionierende Antikörper), wurde das TOPO E1E2-His Plasmid (Kap. 3.2.2) zunächst in 293HEK Zellen, in denen eine Expression dieses Plasmids durch WB im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, transfiziert und eine Immunfluoreszenz durchgeführt (Abb 3.8).

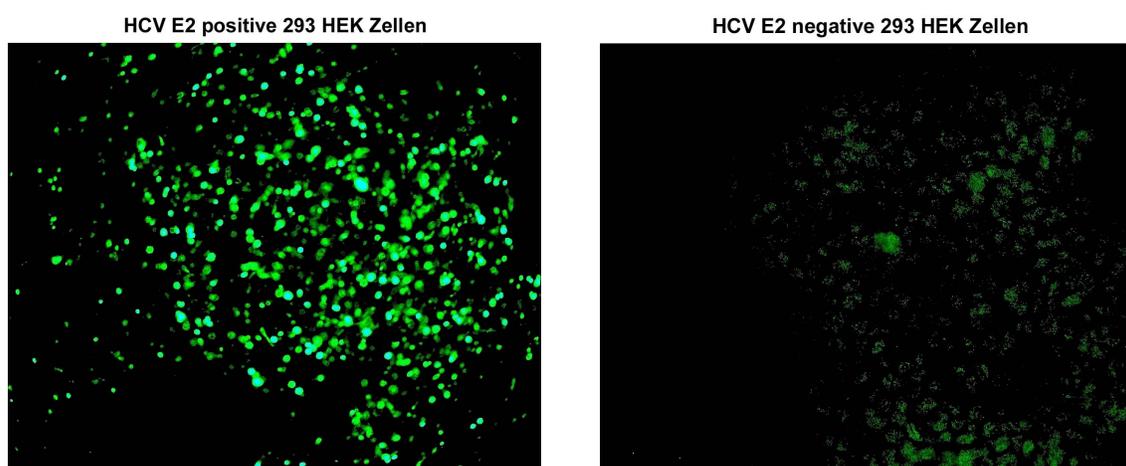


Abb. 3.8: Immunfluoreszenz von 293HEK Zellen transfiziert mit TOPO E1E2-His Plasmid (Kap.3.2.2) (linke Abbildung) und nicht-transfizierte Zellen (rechte Abbildung). Die Zellen wurden mit anti HCV E2 Antikörper und mit dem entsprechenden Zweitantikörper (anti mouse-AlexaFluor488 gekoppelt) gefärbt. Belichtungszeit Abb. links: 0,596 Sekunden. Belichtungszeit rechts: 2,3 Sekunden. Die längere Belichtungszeit war notwendig, um Hintergrundfluoreszenz detektieren zu können. Bei kürzerer Belichtung war keine Fluoreszenz zu sehen.

Wie die obige Abbildung zeigt, konnte durch Immunfluoreszenz HCV E2 angefärbt werden. Der verwendete Antikörper ist also spezifisch für HCV E2 und auch in der Immunfluoreszenz verwendbar. Verglichen mit der rechten Abbildung, bei der die Signale lediglich Hintergrundfluoreszenz repräsentieren, handelt es sich bei der linken Abbildung eindeutig um HCV E2 positive Zellen.

Als nächstes wurden Huh-7 Zellen ebenfalls mit dem TOPO E1E2-His Plasmid transfiziert und eine Immunfluoreszenz durchgeführt (Abb 3.9).

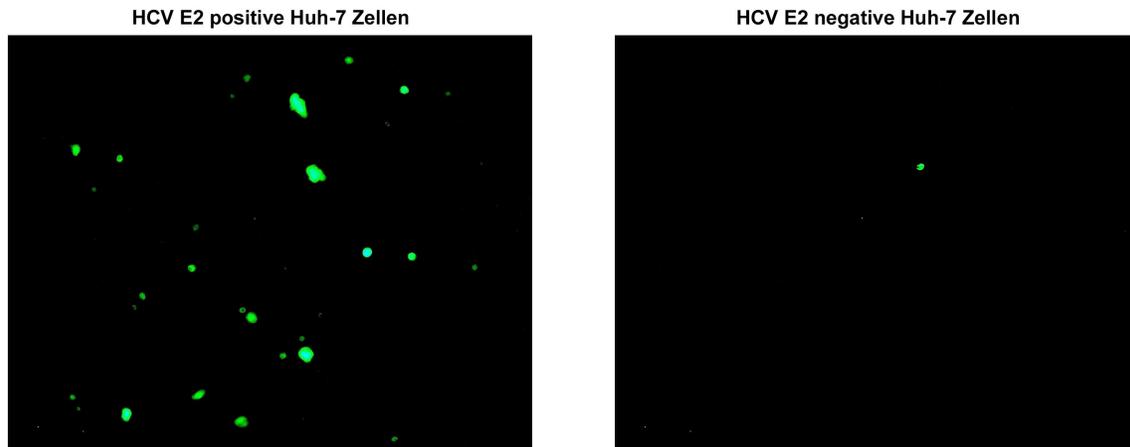


Abb. 3.9: Immunfluoreszenz von Huh-7 Zellen, transfiziert mit TOPO E1E2-His Plasmid (linke Abbildung) und nicht-transfizierte Huh-7 Zellen (rechte Abbildung). Die Zellen wurden mit anti HCV E2 Antikörper und mit dem entsprechenden Zweitantikörper (anti mouse-AlexaFluor488 gekoppelt) gefärbt. Belichtung bei beiden Abbildungen: 1,2 Sekunden

Auch bei den transfizierten Huh-7 Zellen konnten HCV E2 positive Zellen angefärbt werden, wenn auch nicht in so starkem Maße, wie bei den 293HEK Zellen.

Dieser Versuch belegt, dass eine Immunfluoreszenzfärbung von HCV E2 möglich ist. Leider belegt dieser Versuch auch, dass das Fehlen eines Immunfluoreszenzsignals nach Elektroporation der Huh-7 Zellen mit dem chimären Konstrukt nicht experimentell begründet ist, sondern tatsächlich kein HCV E2 exprimiert wird. Da das HCV E2 Protein ein essentieller Bestandteil des chimären Partikels wäre, konnten offensichtlich keine oder nur in sehr geringen Mengen infektiöse Partikel gebildet werden.

Während der Fertigstellung und Analyse dieses Konstrukts wurde von Wakita et al. (2005) die Produktion von infektiösem Hepatitis C Virus in Zellkultur publiziert. Ab diesem Zeitpunkt war eine Möglichkeit entstanden, den kompletten Lebenszyklus von HCV zu analysieren, da es sich um einen „Full-length“ Klon handelte. Aufgrund der Tatsache, dass es bis zu diesem Zeitpunkt im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nicht gelungen war, ein chimäre Viruspartikel produzierendes System zu entwickeln, wurde dieses Projekt nicht mehr weiter verfolgt.

3.2 Generierung eines Konstrukts zur Expression und Aufreinigung von HCV E1E2 in 293HEK Zellen

Ziel war es durch die Expression und Aufreinigung von rekombinanten HCV E1E2 Molekülen, ein robustes System zu schaffen, mit dem es möglich wäre neue Liganden bzw. Rezeptoren zu identifizieren und zu charakterisieren.

3.2.1 Klonierungsstrategie von HCV E1E2 in pcDNA3.1/V5-His TOPO TA

Um das HCV E1E2 Heterodimer zu exprimieren und eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins zu ermöglichen, wurde die Sequenz für HCV E1E2 in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA kloniert. Dieser Vektor enthält einen CMV Promotor (Human cytomegalovirus immediate-early promoter), der eine effiziente und starke Expression des rekombinanten Proteins in eukaryontischen Zellen ermöglicht. Zudem ist in der C-terminalen Region des Inserts ein Polyhistidin (6x)-Tag lokalisiert, der für die Aufreinigung des HCV E1E2 Proteins benutzt werden sollte. Es wurde ein His-Tag für die Aufreinigung gewählt, da dieser wesentlich kleiner ist als andere herkömmliche Tags und so in jedem Expressionssystem verwendet werden kann. Zudem interferiert er nicht mit der Struktur und Funktion des rekombinanten Proteins. Ein weiterer Vorteil liegt in den sanften Elutionsbedingungen, so dass sowohl Bindung und Waschen als auch Elution keinen Effekt auf die Proteinstruktur haben.

Ein Expressionssystem in *E.coli* kam nicht in Betracht, da *E.coli* die notwendigen posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Glykosilierungen am E1 und E2 Protein nicht bewerkstelligen kann.

Als Template diente die Full length Sequenz von HCV, die im p90 Vektor vorliegt (H77 Konsensus Klon Genotyp 1a). (2.4.1) Um die native Form des E1E2 Heterodimers zu generieren, wurde die volle Sequenz für HCV E1E2 kloniert. Die Sequenz für das HCV Glykoprotein von Genotyp 1a (strain H) entsprach den Aminosäuren 171 bis 746. Hierbei entsprachen die Aminosäuren 171-191 der Signalsequenz am N-Terminus von E1 (letzte 20 Aminosäuren von HCV Core) zur ordnungsgemäßen Orientierung und Verankerung von E1 in die ER-Membran. Für E2 fungierte wiederum die C-terminale Hälfte von E1 als Signalsequenz.

3.2.2 Klonierung von HCV E1E2 in pcDNA3.1/V5-His TOPO TA

Nach Amplifikation des HCV E1E2 Fragments wurde dieses in der pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Vektor ligiert. Da die Ligation ungerichtet erfolgte, wurde die Klone einer sog. asymmetrischen Restriktionsanalyse unterzogen, bei der je nach Orientierung unterschiedliche Fragmentgrößen entstehen sollten. Anhand dieser Größen konnten die Klone, bei denen das Insert in korrekter Orientierung vorlag, verifiziert werden. Für die Restriktion wurde BamHI verwendet, dessen Schnittstelle einmal kurz vor der Multiple Cloning Site (MCS) im Vektor und ein zweites Mal nach etwa 500 Basenpaaren im Insert vorliegt. Das heißt bei korrekter Orientierung sollten zwei Fragmente mit einer Größe von 548 und etwa 6700 Basenpaaren entstehen. Liegt das Insert in umgekehrter Orientierung vor, dann würde man zwei Fragmente von der Größe 1263 und 5997 Basenpaaren erwarten.

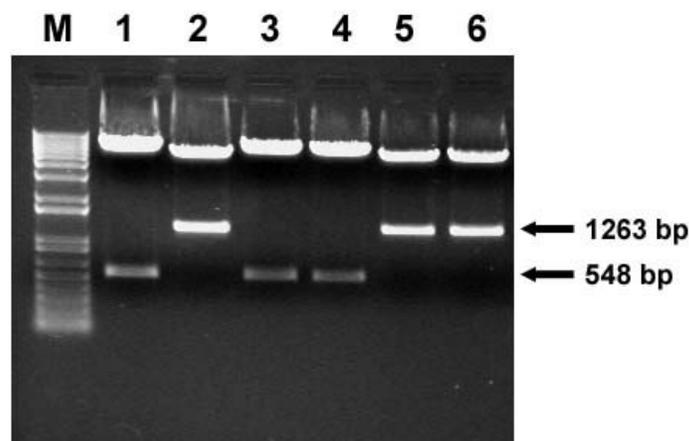


Abb. 3.10: Asymmetrische Restriktion des HCV E1E2 Fragments in pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Vektor. Restriktion der Minipräps erfolgte mit BamHI zur Feststellung der Orientierung der Inserts im Vektor. Richtige Orientierung ist in Ansatz 1, 3 und 4 zu sehen. M: Marker (1Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen). Die Pfeile betonen die ausgeschnittenen Fragmente.

Abb 3.10 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese. Man sieht bei Klonen 1 und 3 und 4 deutlich die verschiedenen Fragmentgrößen von 548 Basenpaaren und 6700 Basenpaaren bzw. bei den Klonen 2 und 5 und 6 die Fragmente mit der Größe von 1263 Basenpaaren und 5997 Basenpaaren. Das bedeutet, dass bei den Klonen 1,3 und 4 durch die Restriktion die erwarteten Fragmente aus dem Vektor ausgeschnitten worden, die eine korrekte Orientierung des Inserts im Vektor belegen. Um sicherzugehen, dass auch die klonierte Sequenz absolut richtig ist, wurden die in Frage kommenden Klone einer Sequenzierung unterzogen.

Die Sequenzierung verifiziert eine korrekte Klonierung bei allen drei Klonen. Die Sequenzierung belegte eine korrekte Abfolge der Aminosäuren, die für die Generierung des HCV E1E2 Proteins notwendig sind. Zudem bestätigte sie, dass das klonierte Fragment *in frame* mit dem in 3'Richtung befindlichen 6 x Histidin-Tag vorlag. Für weitere Versuche wurde Klon 1 eingesetzt.

Das entstandene Plasmid in der endgültigen Fassung ist in der Abb. 3.11 dargestellt.

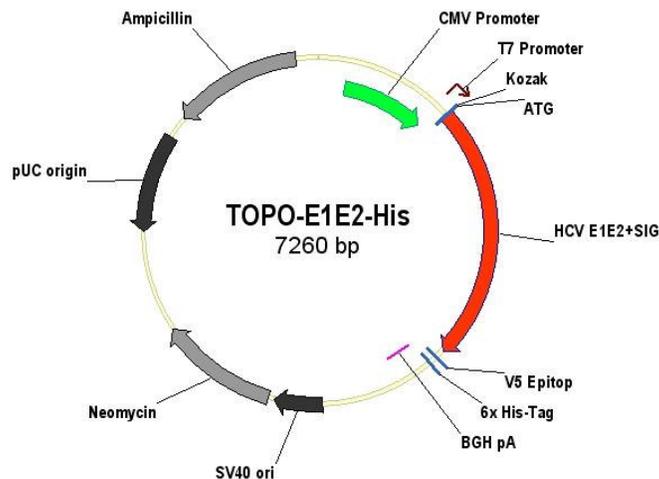


Abb. 3.11: Vektorkarte des TOPO-E1E2-His Vektors. Dargestellt sind alle wichtigen Merkmale des Vektors. HCV E1E2+SIG bedeutet mit Signalsequenz; BGH pA Bovine Growth Hormone Polyadenylierungssignal. Neomycinresistenz zur Selektionierung von Klonen bei stabiler Transfektion

3.2.3 HCV E1E2 wird als natives Heterodimer exprimiert

Wird das HCV E1E2 Protein in Zellkultur exprimiert, dann lagern sich E1 und E2 zu nicht-kovalent gebundenen Heterodimeren zusammen. Diese Komplexe repräsentieren vermutlich funktionale Untereinheiten des HCV Partikels. Zusätzlich neigen sie dazu, hochmolekulare über Disulfide gebundene Aggregate zu bilden (Cocquerel *et al.* 2003a). Um zu überprüfen, ob das HCV E1E2 Glykoprotein in der nativen Konformation als Heterodimer vorliegt, wurde eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper durchgeführt, der konformations-abhängig ist, d.h. nur an HCV E2 bindet, wenn es in Zusammenhang mit HCV E1 und somit als Heterodimer exprimiert wird. Bei dem Antikörper handelt es sich um CBH-2. Dieser wurde von Steven Fong (Stanford University School of Medicine, Kalifornien, USA)

freundlicherweise zur Verfügung gestellt und ist in (Cocquerel *et al.* 2003b) beschrieben. Die Immunpräzipitation wurde mittels WB ausgewertet. Abb.3.12 zeigt das Ergebnis des Western Blots.

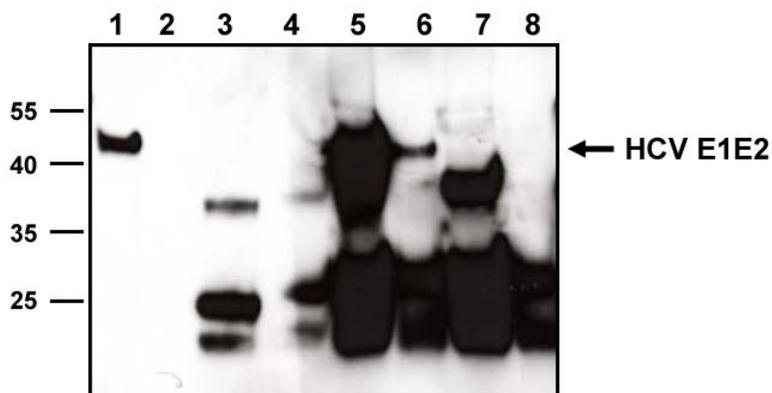


Abb. 3.12: Immunpräzipitation von HCV E2 mit konformations-sensitivem CBH-2 Antikörper. Spur 1: Lysat von HCV E1E2-His transfizierten 293HEK Zellen (Positiv-Kontrolle), Spur 2: Lysat von untransfizierten 293HEK Zellen (Negativ-Kontrolle), Spur 3: anti HCV E2 Antikörper (AK) von IBT Reutlingen (anti E2 IBT), Spur 4: anti HCV E2 Antikörper CBH-2, Spur 5: Präzipitat E1E2-His Zellen mit anti E2 IBT, Spur 6: Präzipitat E1E2-His Zellen mit anti CBH-2 AK, Spur 7 und 8 entsprechen 5 und 6 jedoch wurden hier Lysate von untransfizierten Zellen in die IP eingesetzt. Die starken Signale in den Spuren 5-8 repräsentieren Artefakte der Immunpräzipitation (schwere und leichte Kette der Antikörper sowie Protein A Agarose).

Die Präzipitation mit dem anti HCV E2 Antikörper von IBT führt zu einer starken Präzipitation (sehr starke „Bande“ auf Höhe des Pfeils in Spur 5). Das Signal im WB wird zudem noch verstärkt, da auch mit diesem Antikörper detektiert wurde. Mit dem konformations-sensitivem Antikörper CBH-2, der nur HCV E2 erkennt, wenn es als Dimer zusammen mit E1 exprimiert wird, konnte ebenfalls eine gute Präzipitation erzielt werden (Bande auf Höhe des Pfeils in Spur 6). Mit Hilfe dieser IP konnte gezeigt werden, dass die exprimierten HCV E1E2 Glykoproteine ordentlich gefaltet sind und somit die Konformation des nativen Heterodimers repräsentieren. Dies ist wichtig, um eine Funktionalität des rekombinanten Proteins zu gewährleisten. Zudem scheint die zusätzliche C-terminale Expression eines His-Tags, die Faltung der Heterodimere nicht zu stören.

3.2.4 His-Tag Aufreinigung von HCV E1E2

Das rekombinante HCV E1E2 His-Tag Protein sollte mittels immobilisierter Metall-Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden. Hierzu wurde die HisTrap HP Säule von GE Healthcare (zum Zeitpunkt der Verwendung noch Amersham Biosciences) verwendet. Bei der HisTrap HP Säule handelt es sich um eine Säule, die mit Ni Sepharose™ (Nickel Sepharose) High Performance schon vorgepackt ist. Diese vorgepackte Säule eignet sich laut Angaben des Herstellers gut für die präparative Aufreinigung von Proteinen, die mit einem His-Tag fusioniert sind. Detailliertere Angaben zum Prinzip der Aufreinigung, der Aufreinigungsprozedur, so wie den verwendeten Puffern, finden sich in Material und Methoden in Kap. 2.5.19.

Da die optimale Konzentration an Imidazol, bei der das Protein eluiert nicht bekannt war, wurde die Elution mit einem Gradienten durchgeführt, das heißt es wurde nacheinander Elutionspuffer mit steigender Imidazolkonzentration auf die Säule gegeben, die Fraktionen gesammelt und anschließend mit Western Blot analysiert. Folgende Imidazolkonzentrationen wurden eingesetzt: 50 mM, 100 mM, 250 mM, 300 mM, 500 mM, 1000 mM. Bei der Aufreinigung wurde sowohl ein Lysat von E1E2His transfizierten 293HEK Zellen eingesetzt als auch ein Lysat von nicht-transfizierten 293HEK Zellen als Negativ-Kontrolle.

Beim ersten WB (Abb.3.13) wurde als Erstantikörper ein Antikörper (Penta-His von Qiagen) eingesetzt, der 6xHis-Tags erkennt und somit das His-getagte Protein detektieren sollte.

Ab einer Konzentration von 250 mM Imidazol bei der Aufreinigung der E1E2-His transfizierten Zellen und ab einer Konzentration von 300 mM bei den nicht-transfizierten Zellen, konnten bei den Aufreinigungen His-Tag bzw. Histidin positive Proteine detektiert werden. Dieses erste Ergebnis zeigt bereits, dass auch bei den Zellen, die nicht transfiziert wurden, Proteine mit Histidinen eluieren, die auch die gleiche oder zumindest eine ähnliche Größe, wie die bei den E1E2-His transfizierten Zellen aufweisen. Dieses Ergebnis gibt außerdem zu der Frage Anlass, ob es sich bei den eluierten Proteinen der transfizierten Zellen überhaupt um HCV E1E2-His handelt oder um die gleichen Proteine, die bei den nicht-transfizierten Zellen eluieren.

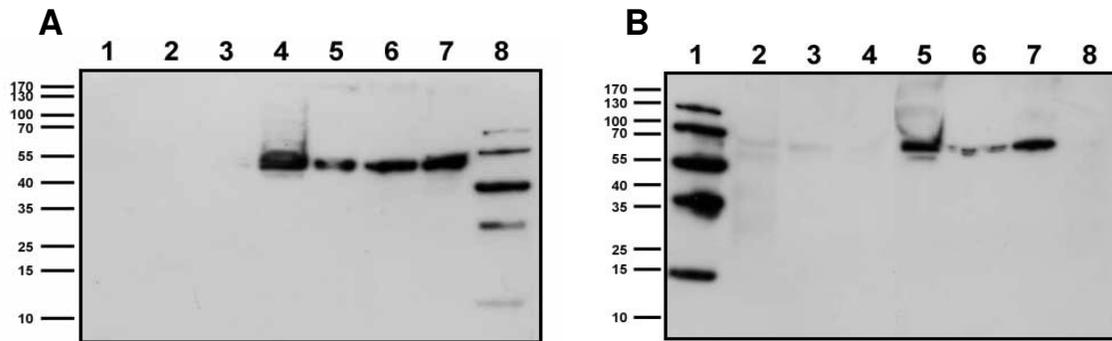


Abb. 3.13: Eluate der His-Tag Aufreinigung (Gradient). Detektiert wurde mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper (Penta His, Qiagen). A: Gradient zu E1E2-His transfizierten Zellen. Spur 1: erster Durchfluss aus der Säule bei Start der Elution. Die Spuren 2-7 sind die Eluate in aufsteigender Reihenfolge mit folgenden Imidazol-Konzentrationen: 50, 100, 250, 300, 500 und 1000 mM Imidazol. In Spur 8 ist der 6xHis Protein Ladder als Positiv-Kontrolle für den Antikörper aufgetragen. B: Gradient zu nicht-transfizierten Zellen. Spur 1: 6xHis Protein Ladder, Spuren 2-7 in aufsteigender Reihenfolge, siehe A. Spur 8 entspricht Spur 1 in A. Jeweils links außen an den Blots befindet sich der verwendete Größenstandard.

Die Eluate wurden ein zweites Mal mittels WB analysiert, dieses mal jedoch mit einem Antikörper gegen HCV E2. Das Ergebnis des WB ist in Abb. 3.14 dargestellt.

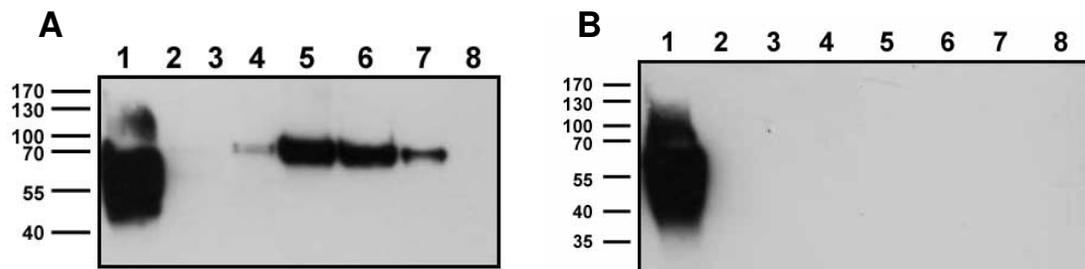


Abb. 3.14: Eluate der His-Tag Aufreinigung. Detektion mit anti HCV E2 Antikörper. Spur 1: E2 Antigen (Positiv-Kontrolle), Spuren 2-7: Eluate der Imidazolkonzentrationen wie in Abb. 3.13. Spur 8: erster Durchfluss aus der Säule bei Start der Elution

Bei der Detektion des Zieproteins sieht man, dass in diesem Fall nur die HCV E1E2-His Eluate positiv sind. Bei den nicht-transfizierten Zellen ist das Ergebnis komplett negativ. Vergleicht man die zwei Ergebnisse der WB Analyse, so stellt man fest, dass die Aufreinigung des Proteins zwar funktioniert, jedoch liegt die Vermutung nahe, dass auch in dem HCV E1E2 Eluat Histidine der Zellen vorhanden sind, die das Eluat verunreinigen.

Die Reinheit der Proteine wurde mittels SDS-Gel und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blue analysiert (Abb. 3.15).

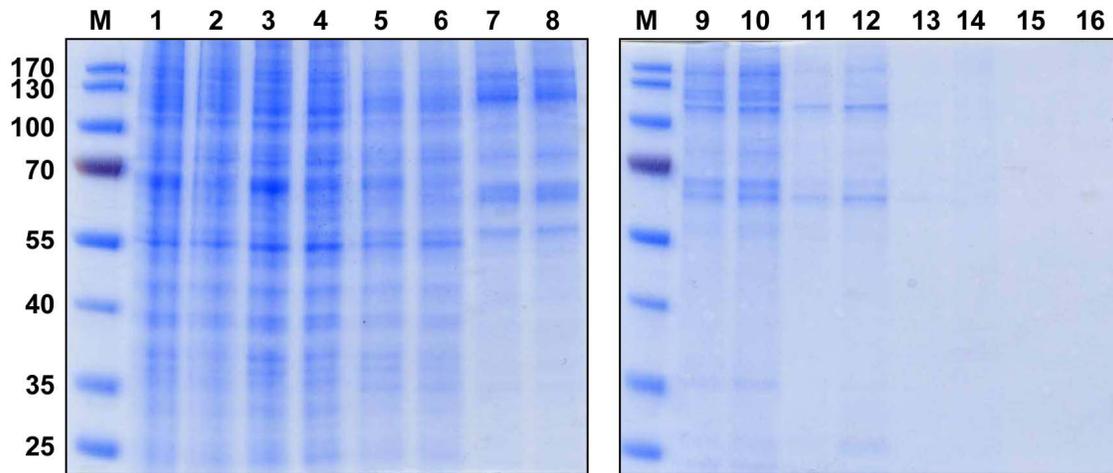


Abb. 3.15: His-Tag Aufreinigung von HCV E1E2 aus 293HEK Zellen, Coomassie gefärbt. Es wurde immer paarweise erst die Probe der nicht-transfizierten Zellen, dann die entsprechende Probe der E1E2 transfizierten Zellen aufgetragen. Spuren 1,2: Lysate; Spuren 3,4: erste Durchflüsse nach Start der Elution; 5,6: Eluat 20 mM Imidazol; 7,8: Eluat 50 mM Imidazol; 9,10: Eluat 100 mM Imidazol; 11,12: Eluat 200 mM Imidazol; 13,14: Eluat 300 mM Imidazol; 15,16: Eluat 500 mM Imidazol.

Die Coomassie Färbung zeigt, dass bei keiner der Elutionen ein sauberes Protein aufgereinigt wurde. Es kann auch keine verstärkte Expression des Zielproteins gezeigt werden, was sich in einer prägnanten Bande bei der zu erwartenden Größe äußern würde. Das Bandenmuster ist bei den transfizierten Zellen und den nicht-transfizierten Zellen nahezu identisch. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass HCV E1E2 exprimiert wird und auch nach der Aufreinigung nachgewiesen werden kann. Jedoch gibt es in den 293 HEK Zellen augenscheinlich Histidin-haltige Proteine, die mit gleicher Affinität zur Ni Sepharose binden und dementsprechend auch ein ähnliches Elutionsverhalten haben. Diese Proteine kontaminieren wahrscheinlich auch die HCV E2 Eluate, wodurch eine saubere Aufreinigung unmöglich wird.

Um die Aufreinigung zu optimieren wurde verschiedene Ansätze ausprobiert, u.a.:

- 1) Erhöhung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer auf 100 mM Imidazol, so dass die Konzentration knapp unter der Elutionsgrenze lag.
- 2) Zunächst Voraufreinigung des Lysats über einen spezifischen Antikörper und anschließende Aufreinigung über Ni Sepharose.
- 3) Verwendung von Ni-NTA Agarose (Qiagen), die aufgrund der Verwendung von Nitrilotriacetic Acid (NTA) eine hohe Reinheit und Effizienz bei der Ausbeute versprach.

3.2.5 Erhöhung der Imidazolkonzentration

Trotz der stringenteren Waschbedingungen konnte kein besseres Ergebnis erzielt werden. Das Ergebnis ähnelte dem von der ersten Aufreinigung, was vermutlich damit zusammenhängt, dass die Zelleigenen Histidin-haltigen Proteine in etwa die gleiche Affinität zur Ni Sepharose besitzen und somit auch nicht durch stringenteres Waschen vorher von der Säule entfernt werden können.

3.2.6 Doppelte Aufreinigung

Bei der doppelten Aufreinigung wurde die Strategie verfolgt, zunächst die His-getagten HCV E1E2 Proteine mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen HCV E2 aus dem Komplett-Zelllysat ,ähnlich einer Immunpräzipitation, „heraus zu fischen“ und in einem zweiten Schritt das schon vorgereinigte Lysat über die Ni Sepharose Säule noch spezifischer aufzureinigen (Protokoll zu dieser Aufreinigung siehe Material und Methodenteil). Hierbei ergab sich die Schwierigkeit, dass der Antikörper- E1E2 HisTag Komplex zunächst über magnetische Beads (Dynabeads® Sheep anti-Mouse IgG) präzipitiert werden musste und dann aber wieder von den Beads eluiert werden musste, um das gereinigte Protein für weitere Verwendungszwecke (ggfs die zweite Aufreinigung über Ni Sepharose) zu erhalten. Für die Elution kamen zwei verschiedene Möglichkeiten in Betracht. Entweder mit einer Hochsalzkonzentration (2 M NaCl) oder durch starke Ansäuerung des pH Wertes (pH 3,1). Da ein stark saurer pH zum Verlust der Funktionalität des Zielproteins führen kann, wurde die Elution mit 2 M NaCl als etwas „mildere“ Elutionsart gewählt. Auch in diesem Fall konnte keine Verbesserung der Aufreinigung erzielt werden. Hier lag es aber daran, dass bereits die Elution von den Dynabeads Sheep anti-Mouse IgG nicht funktionierte, was eine nachfolgende Aufreinigung zwecklos machte.

3.2.7 Verwendung von Ni-NTA Agarose

Für die Aufreinigung wurde alternativ die Ni-NTA (Nitrilotriacetic Acid) Agarose von Qiagen ausprobiert. Auch mit diesem Material konnte keine gute Aufreinigung erzielt werden. Im Gegenteil- hier wird schon bei der Detektion mit dem His Tag Antikörper deutlich, dass die Eluate verunreinigt sind (Abb. 3.16).

Die Eluate wurden immer im Wechsel aufgetragen d.h., immer nebeneinander ein Eluat von E1E2-His transfizierten Zellen und ein Eluat von nicht transfizierten Zellen. Man sieht anhand

der Western Blots sehr deutlich, dass sowohl in den Eluaten der transfizierten Zellen, als auch in den Eluaten der nicht-transfizierten Zellen Histidine aufgereinigt wurden, die auch alle ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen, so dass eine Unterscheidung nicht möglich ist. Der zweite Blot belegt allerdings auch, dass sich nur in den Eluaten der transfizierten Zellen das Zielprotein HCV E2 befindet.

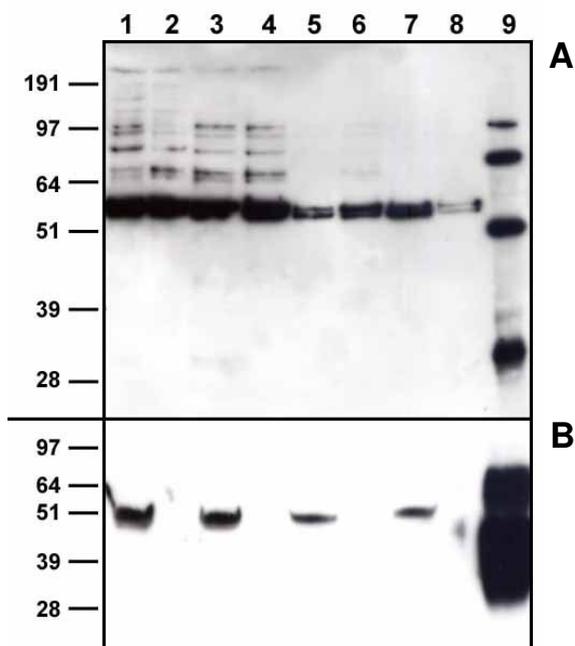


Abb. 3.16 His-Tag Aufreinigung mit Ni-NTA Agarose von Qiagen. A: Detektion mit Penta His Antikörper. Spur 1: Eluat (EL) 1, E1E2-His transfizierte Zellen, Spur 2: EL1 nicht-transfizierte Zellen. Spuren 3, 5 und 7: nachfolgende Eluate E1E2-His transfizierter Zellen. Spuren 4, 6 und 8: nachfolgende Eluate nicht-transfizierter Zellen. Spur 9: 6xHis Protein Ladder. B: Detektion mit anti-HCV E2 Antikörper. Auftragung äquivalent zu A. Spur 9: E2 Antigen

Mit den zur Verfügung stehenden Systemen war eine Aufreinigung des rekombinanten HCV E1E2 Proteins, über den fusionierten His-Tag, offensichtlich nicht möglich.

Da sich im Verlauf dieser Doktorarbeit der Fokus auf funktionale Assays gerichtet hat, wurde für die Untersuchung der initialen Schritte der HCV Infektion HCV Pseudopartikel verwendet. Auf diese Technik wird den folgenden Abschnitten detailliert eingegangen.

3.3 Einfluss von IFN- α und den anti-inflammatorischen Zytokinen IL-10 und TGF- β auf die Infektion mit HCV Pseudopartikeln (HCVpp)

Da die bisher beschriebenen Modellsysteme nicht in dem Maße etabliert werden konnten, um sie für die Analyse der initialen Schritte der HCV Infektion einzusetzen, wurde durch freundliche Unterstützung von Prof. Jean Dubuisson am Institut de Biologie de Lille in Frankreich das HCV Pseudopartikelsystem (HCVpp) etabliert (2.3.6). Hierbei handelt es sich um virale Partikel, die aus einem replikationsdefizienten murinem Leukämievirus (MLV) bestehen, die in ihre Membran die HCV E1E2 Glykoproteine inkorporiert haben. Da die HCV E1E2 Glykoproteine die Infektion von Huh-7 Zellen mit diesen Pseudopartikeln vermitteln, sind sie als Modellsystem geeignet, um die ersten Infektionsschritte des Virus zu untersuchen.

3.3.1 Einfluss von IFN- α auf die Infektion mit HCV(pp)

Die Infektion mit HCV wird schon seit mehr als 15 Jahren mit IFN- α behandelt. Trotz dieses relativ langen Zeitraums sind die genauen Mechanismen dieses Zytokins, bezogen auf die Hepatitis C Viruselimination noch unbekannt. Zudem spricht auch nicht jeder Patient auf die Therapie an. Warum genau aber die Therapie bei einigen Patienten Erfolg (responder) hat und bei anderen Patienten scheitert (non-responder) ist bisher unklar. Es wird vermutet, dass es zum Teil genetisch bedingt ist, ob die Therapie mit IFN- α Erfolg hat. Bislang wurde der Einfluss von IFN- α auf die Replikation mit Hilfe des Replikonsystems untersucht.

Über den Einfluss von IFN- α auf die Virusaufnahme bzw. den Eintritt des Virus in die Zelle ist bisher nichts bekannt. Ebenso wenig ist bekannt, wie sich die Moleküle CD81, Claudin-1 und SR-BI, die an der Virusaufnahme beteiligt sind, in Huh-7 Zellen unter IFN- α Stimulation verhalten.

3.3.2 Einfluss von IFN- α auf die Infektion mit HCVpp: Luziferase-Assay

Um die Auswirkung von IFN- α auf die Infektion mit HCVpp zu untersuchen, wurden Huh-7 Zellen 24 Stunden mit IFN- α stimuliert und anschließend die Zellen mit den HCVpp infiziert. Nach 48 Stunden weiterer Inkubation wurde die Infektion mittels Luziferase-Assay quantifiziert.

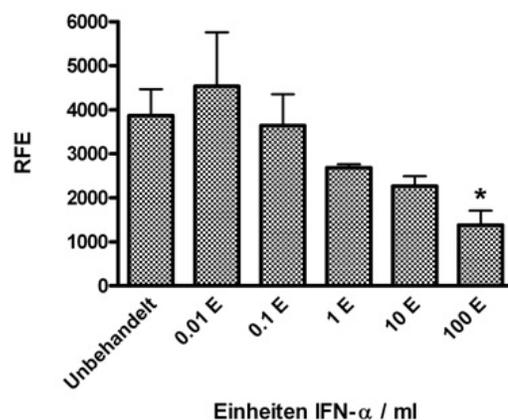


Abb. 3.17 Luciferase Expression von HCVpp infizierten Huh-7 Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Dosen IFN- α . Die Rate an Infektion mit den HCVpp wurde mit Hilfe des Luciferase Assays quantifiziert. Die Abnahme der Luciferase-Aktivität ist abhängig von der Dosis an IFN- α . RFE: Relative Fluoreszenz Einheiten. Student's T-Test. *P<0,05. Unbehandelt gegen 100 Einheiten.

Der Luciferase-Assay zeigt, dass die gemessene Aktivität an Luciferase, abhängig von der Dosis an IFN- α , um etwa 50 Prozent im besten Fall (100 E) abnimmt. Da bei einer Dosis von 100 E/ml die durch das IFN- α angeschalteten Mechanismen in der Zelle am stärksten waren, wurden alle weiteren Versuche mit einer Dosis von 100 E/ml durchgeführt.

Eine mögliche Interpretation des vorliegenden Ergebnisses ist, dass die Vorbehandlung mit IFN- α eine verringerte Infektion mit HCVpp bewirkt und sich dies in einer niedrigeren Luciferase Expression widerspiegelt. Eine zweite Möglichkeit besteht in einer direkten Einwirkung auf die Luciferase-Expression durch Mechanismen in der Zelle, die durch das IFN- α induziert wurden. Um dies zu überprüfen, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen wie oben beschrieben 24 Stunden zuvor mit IFN- α stimuliert und anschließend das Plasmid pTG-Luc126 (Kap.2.3.6), das die genetische Information für die Luciferase enthält, in die Zellen transfiziert. 48 Stunden später wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt (Abb.3.18)

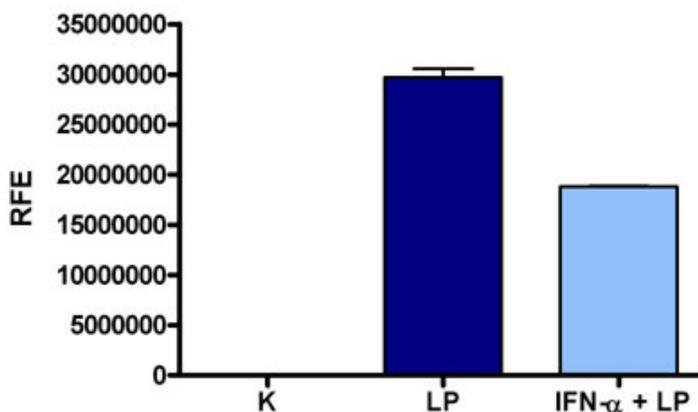


Abb. 3.18: Luziferase Assay von Huh-7 Zellen, transfiziert mit dem Luziferase codierendem Plasmid. Dunkelblauer Balken: mit Luziferase Plasmid pTG-Luc126 transfizierte Huh-7 Zellen (LP: Luziferase Plasmid). Hellblauer Balken: mit Luziferase Plasmid transfizierte Huh-7 Zellen, die zuvor mit IFN- α stimuliert worden waren (IFN- α + LP: IFN- α + Luziferase Plasmid). Die Hintergrundfluoreszenz der Kontrolle war so niedrig (2511 RFE), dass sie in diesem Graphen aufgrund der sehr hohen Werte der anderen beiden Ansätze nicht zu sehen ist.

Es stellte sich heraus, dass die IFN-Stimulation auch eine geringere Luziferaseexpression in der Zelle bewirkt, wenn diese direkt mit einem Luziferase exprimierenden Plasmid transfiziert wird. Aufgrund dieses Ergebnisses kann nicht eindeutig geschlossen werden, ob die verminderte Luziferase-Expression auch ein Maß für eine geringere Infektion ist oder die verminderte Expression der Luziferase ein direkter Effekt des IFN ist.

3.3.3 IFN- α reduziert die Aufnahme der HCVpp in Abhängigkeit von Zeit und Dosis

Der Luziferase-Assay, als Methode um die Infektion mit den Pseudopartikeln zu quantifizieren schien ungeeignet, da eine Manipulation der Zielzelle zur Aktivierung von Signalwegen und Reaktionen führt, die die Expression von Fremdproteinen (in diesem Fall die Luziferaseexpression) beeinflusst. Eine eindeutige Interpretation war somit problematisch. Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, wurde ein neuer Assay für die Quantifizierung der HCVpp Aufnahme benutzt, der von Blanchard et al. (2006) publiziert wurde aber ursprünglich von Mothes et al. (2000) entwickelt wurde, um die Aufnahme von Retroviren zu untersuchen.

Für die Auswertung aller folgenden Versuche wurde ab jetzt der in Material und Methoden unter 2.4.18 beschriebene PCR basierte Assay verwendet. Das Maß an detektierten LTRs wurde für alle Ergebnisse als Maß für die Infektion mit den Pseudopartikeln gleichgesetzt.

In einem ersten Versuch zur Etablierung der Methode wurden Huh-7 Zellen mit allen drei Partikelsorten (HCVpp, VSV-Gpp und Δ env) infiziert und eine Realtime PCR durchgeführt. Hierbei konnten bei denen mit Δ env Pseudopartikeln infizierte Zellen keine LTRs, also keine Infektion mit diesen Kontrollpartikeln, detektiert werden, weshalb sie für Versuche, die mit dem PCR basierten Assay ausgewertet wurden, nicht eingesetzt wurden.

Um den Einfluss von IFN- α auf die Infektion mit HCV zu untersuchen wurden Huh-7 Zellen mit 100 E/ml IFN- α für unterschiedlich lange Zeiträume (8 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunde und 48 Stunden) stimuliert und anschließend mit den HCVpp infiziert. Zudem wurde überprüft, ob die Wirkung von IFN- α Dosis abhängig ist. Das Maß der Infektion wurde mit Hilfe des PCR basierten Assays ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abb. 3.19 dargestellt.

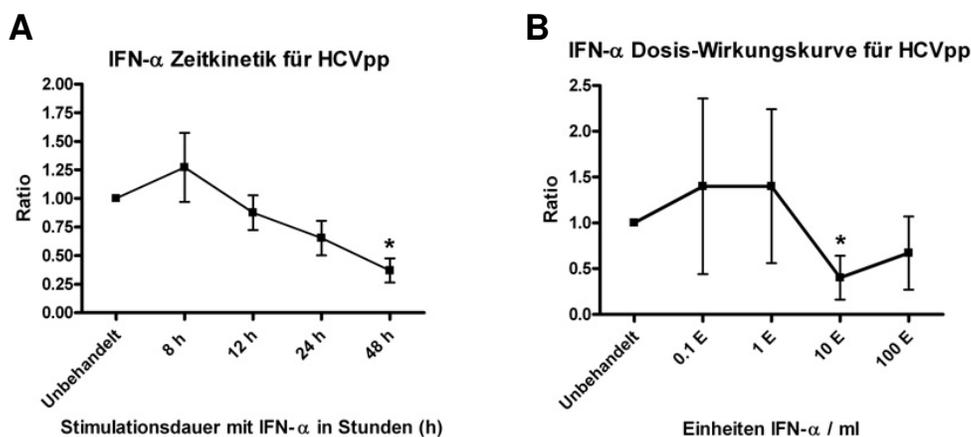


Abb. 3.19: Real-time PCR zur Erstellung einer IFN- α Zeitkinetik (A) und Dosis-Wirkungskurve (B). A: Quantifizierung der ins Genom integrierten LTRs, abhängig von der Dauer der Stimulation mit IFN- α . Die Reduktion der HCVpp Aufnahme ist anhängig von der Dauer der Stimulation. Student's T-Test. * $P < 0.05$. Unbehandelt gegen 48 h. B: Quantifizierung der ins Genom integrierten LTRs, abhängig von der Dosis an IFN- α , mit der die Zellen inubiert wurden. IFN- α reduziert die Aufnahme der HCVpp abhängig von der Dosis. Student's T-Test. * $P < 0.05$. Unbehandelt gegen 10 Einheiten (E).

Abhängig von der Dauer der Stimulation reduziert IFN- α die Aufnahme der Pseudopartikel bis zu einem gewissen Grad. 24 Stunden bewirkten in diesem Versuch eine Reduktion um 35 Prozent während die Inkubation der Huh-7 Zellen mit IFN- α über 48 Stunden die Infektion sogar um 65 Prozent reduzierte. In Wiederholungen des Experiments wurde deutlich, dass der beste Effekt, bezogen auf eine Reduktion der Partikelaufnahme, stets nach 48 Stunden erzielt

wurde. Aus diesem Grund wurden die Zellen bei weiteren Versuchen mit IFN- α (z.B. einer Dosis-Wirkungskurve) stets 48 Stunden mit IFN- α inkubiert. Die Wirkung von IFN- α auf die Aufnahme der HCVpp ist zudem Dosis abhängig. 100 Einheiten und 10 Einheiten haben in diesem Fall den stärksten Effekt.

3.3.4 Einfluss von IFN- α auf die Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI

IFN- α scheint die Infektion mit den HCVpp zu reduzieren. Um diesem Effekt zugrunde liegende Mechanismen zu evaluieren wurde der Einfluss von IFN- α auf die Oberflächenmoleküle CD81, Claudin-1 und SR-BI untersucht. Bei diesen Molekülen handelt es sich um potentielle HCV Rezeptormoleküle, die eine Rolle bei der Virusaufnahme spielen. Huh-7 Zellen wurden mit IFN- α über verschieden lange Zeiträume stimuliert und die Expression der genannten Proteine mittels Durchflusszytometrie (Oberflächenexpression), WB (Gesamtproteinexpression) und quantitativer Realtime RT-PCR (Realtime PCR) analysiert.

Bei CD81 war nur eine Analyse der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie möglich und die Charakterisierung des mRNA Expressionsprofils mit Hilfe von Realtime PCR. Mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern konnte kein funktionierender Western Blot etabliert werden. Das Ergebnis der Durchflusszytometrie ist in Abb 3.20 zu sehen.

Die Oberflächenexpression von CD81 wird nicht durch Inkubation der Zellen mit IFN- α beeinflusst. Die gemessenen Veränderungen sind marginal und daher nicht als signifikant zu betrachten. Dagegen wird die Claudin-1 Expression unter IFN- α Stimulation bis auf den Wert der Isotyp-Kontrolle herunter reguliert. Dies zeigt das abgebildete Histogramm sehr deutlich. Es findet also eine starke Reduktion von über 50 Prozent der Expression aufgrund von IFN- α statt. Bei SR-BI sieht man einen schwachen Abfall der Expression unter IFN- α .

Die Auswirkung der Stimulation mit IFN- α auf die Gesamtproteinexpression, wurde anhand von WB Analysen untersucht. Die Zellen wurden, wie bei der Durchflusszytometrie, mit IFN- α stimuliert und anschließend die Zell-Lysate im WB überprüft. (Abb. 3.21)

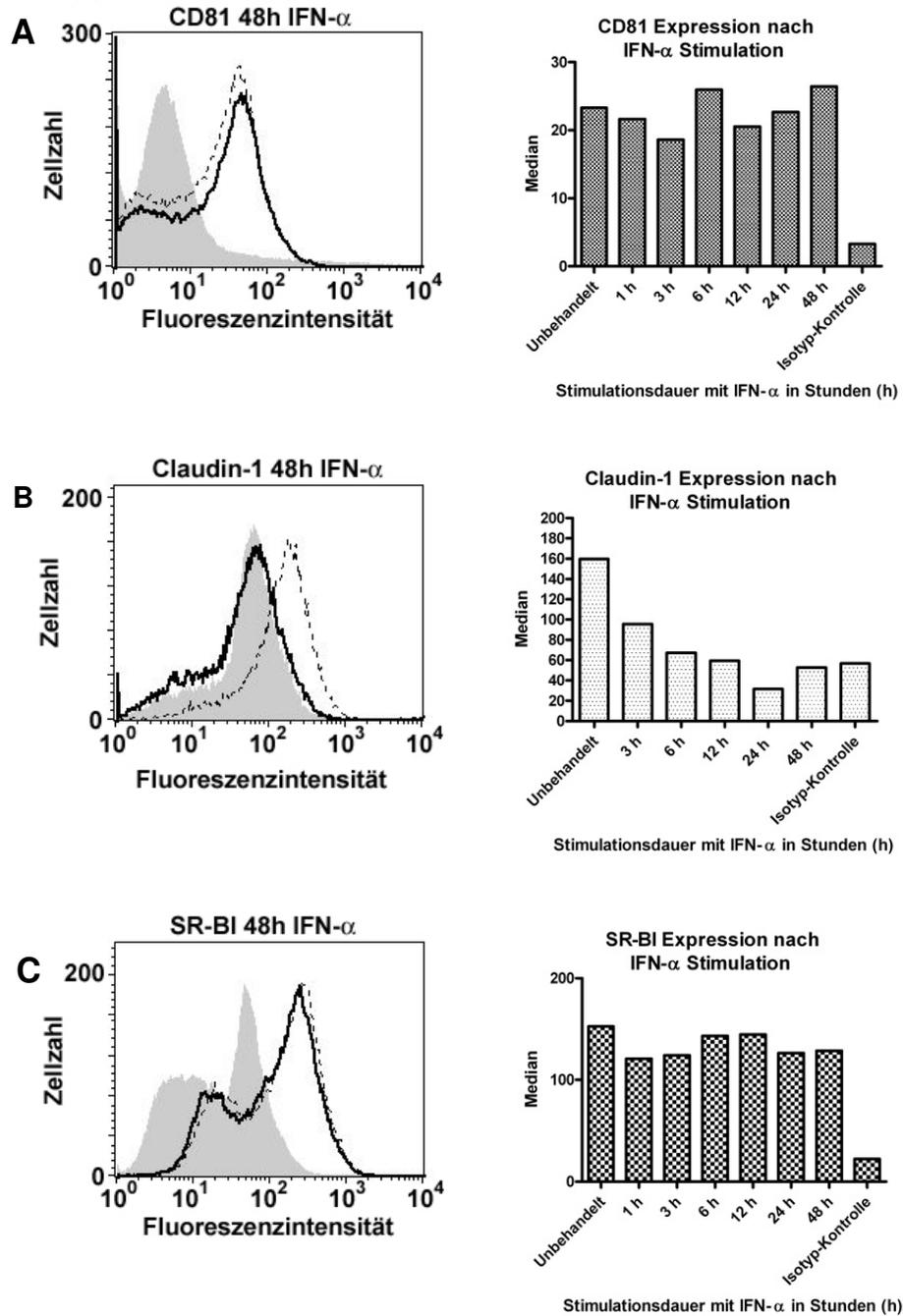


Abb. 3.20: Durchflusszytometrie IFN- α stimulierter Zellen. A Färbung der Huh-7 Zellen mit anti-CD81 Antikörper; B Färbung der Zellen mit anti-Claudin-1 Antikörper; C Färbung der Zellen mit anti-SR-BI Antikörper. Die Abbildungen jeweils auf der linken Seite repräsentieren ein Histogramm der Messung. Es wurde als Beispiel jeweils die Messung nach 48 h IFN- α Stimulation abgebildet. Graue Schattierung: Isotyp-Kontrolle, gestrichelte Linie: Unbehandelte Zellen, durchgängige schwarze Linie: IFN- α stimulierte Zellen. Die Säulendiagramme (rechte Abbildungen) zeigen die Medianwerte, d.h. die Werte, die sich aus der mittleren Fluoreszenz ergeben. Hierbei sind alle Messwerte dargestellt.

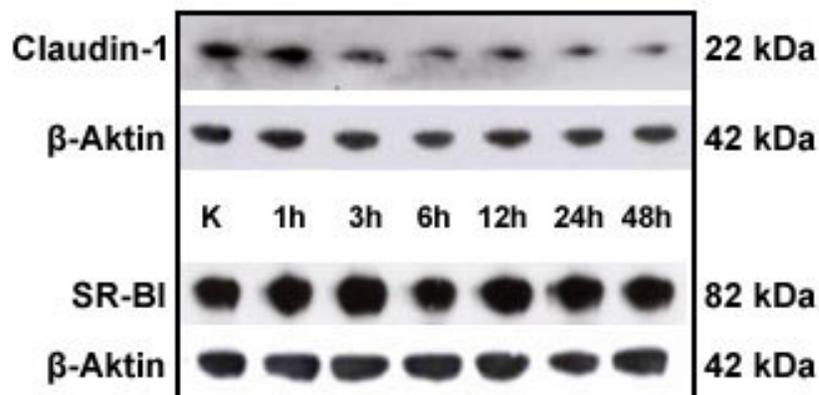


Abb. 3.21: Western Blot mit Zelllysaten IFN- α stimulierter Huh-7 Zellen. Aufgetragen sind Zelllysate von Huh-7 Zellen, die unterschiedlich lange mit IFN- α stimuliert wurden. Nur Claudin-1 und SR-BI wurden mittels WB analysiert. Es wurden jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

Der WB bestätigt für Claudin-1 das bereits bei der Durchflusszytometrie erzielte Ergebnis. Die Expression von Claudin-1 nimmt unter IFN- α Stimulation kontinuierlich ab. Die Gesamtproteinexpression von SR-BI bleibt unter IFN- α Stimulation gleich. Die Auftragung gleicher Proteinmengen für jeden Ansatz wurde durch Inkubation mit β -Aktin Antikörper belegt.

Da die Expression von Claudin-1 nicht nur auf der Oberfläche zurück geht, sondern auch die Gesamtproteinexpression vermindert ist, wirkt sich die IFN- α Stimulation wahrscheinlich auch schon auf die mRNA Expression aus. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Huh-7 Zellen ebenfalls mit IFN- α stimuliert, die RNA extrahiert und Menge an RNA für die entsprechenden Gene mittels Realtime PCR analysiert.

Auffällig ist vor allem die Abnahme der Expression von Claudin-1 bereits nach 6 Stunden Stimulation. Auch bei längerer Stimulation mit IFN- α ist die Claudin-1 Expression reduziert. Dieses Ergebnis korreliert mit den Befunden der Durchflusszytometrie und des Western Blots, bei denen auch eine verminderte Expression von Claudin-1 gemessen wurde. Bei CD81 ist keine Veränderung zu verzeichnen außer bei dem Wert nach 48 Stunden (dreifacher Anstieg der Expression). Für SR-BI verhält es sich zumindest in den ersten 12 Stunden ähnlich wie für CD81. Die Werte sind ähnlich wie die der unbehandelten Zellen. Ab 24 Stunden Stimulation steigt die Expression an (um 80 Prozent nach 24 Stunden, um das 3,6 fache nach 48 Stunden). IFN- α bewirkt also eine Reduktion von Claudin-1 auf der Zelloberfläche, was sich auch in der mRNA Expression und der Gesamtproteinexpression widerspiegelt. Dies könnte zumindest zum Teil die verringerte HCVpp Aufnahme in die

Huh-7 Zellen nach IFN- α Stimulation erklären, da Claudin-1 einen wichtigen Faktor für die Infektion mit HCV darstellt.

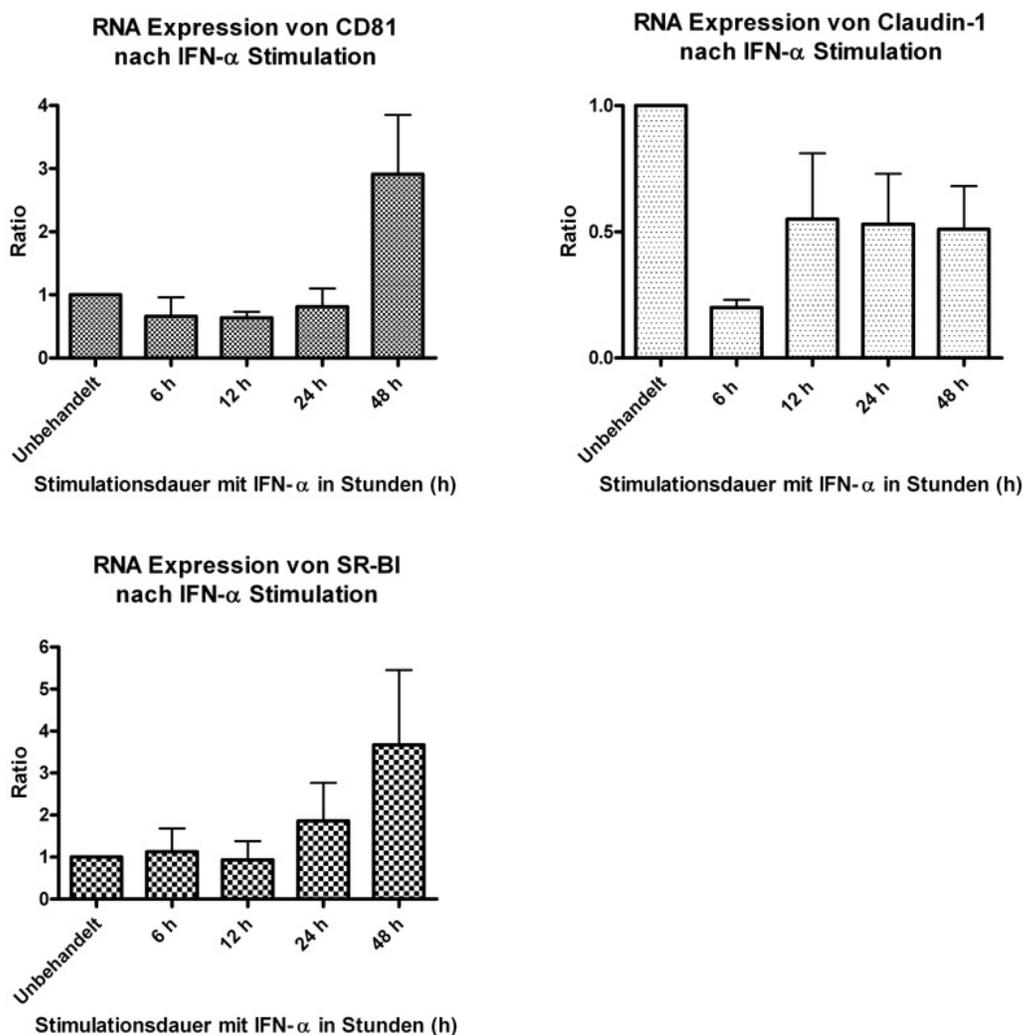


Abb. 3.22: mRNA Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI unter IFN- α in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation.

3.3.5 Einfluss der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β auf die Infektion mit HCVpp

IL-10 und TGF- β stehen beide in der Diskussion an der Etablierung eines chronischen Status der HCV Infektion involviert zu sein. Auch bei diesen Zytokinen ist die Rolle bei den initialen Schritten der Infektion unklar und in wie weit sie auch an der Modifikation der Zielzellen beteiligt sind, so dass möglicherweise eine persistierende Infektion begünstigt wird.

Huh-7 Zellen wurden für 48 Stunden mit TGF- β oder IL-10 inkubiert und anschließend mit HCVpp infiziert. Das Maß an Infektion mit den Pseudopartikeln wurde durch Quantifizierung der LTRs bestimmt.

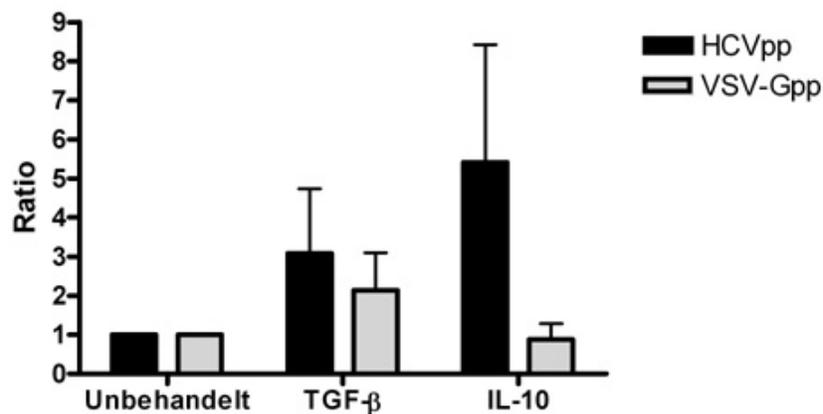


Abb. 3.23: Auswirkung der Stimulation mit TGF- β und IL-10 auf die Infektion mit HCVpp. Huh-7 Zellen sind mit TGF- β bzw. IL-10 stimuliert und anschließend mit HCVpp bzw. VSV-Gpp inkubiert worden. Die Auswirkung auf die Infektion wurde mit Hilfe des PCR basierten Assays ausgewertet. Die Ratio zeigt an, um ein wieviel Faches sich die Aufnahme der Pseudopartikel gegenüber unbehandelten Zellen erhöht. HCVpp: schwarze Balken. VSV-Gpp: graue Balken

Sowohl die Stimulation mit TGF- β als auch die mit IL-10 bewirkt im Falle der HCVpp eine verstärkte Infektion (Faktor 3 für TGF- β , Faktor 5 IL-10), wobei in allen Versuchen für IL-10 stets ein höherer Wert erzielt wurde als für TGF- β . Bei den als Kontrolle benutzten VSV-Gpp konnte zumindest bei der Stimulation mit TGF- β ebenfalls eine Zunahme der Infektion verzeichnet werden.

3.3.6 Die Wirkung von TGF- β ist Dosis abhängig

Wie für IFN- α wurde überprüft, ob der für TGF- β erzielte Effekt auch Dosis abhängig ist. Der Versuch wurde ebenfalls mit PCR basierendem Assay ausgewertet und graphisch dargestellt.

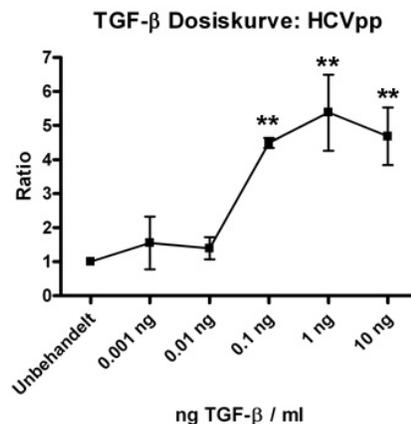


Abb. 3.24: Dosis-Wirkungskurve TGF-β für die Infektion mit HCVpp. Huh-7 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an TGF-β stimuliert und anschließend mit HCVpp inkubiert. Die veränderte Aufnahme an HCVpp wurde mit dem PCR basierten Assay ausgewertet. Student's T-Test. ***P<0.01. Unbehandelt gegen 0,1 ng, 1 ng und 10 ng

Für TGF-β scheint der Effekt auch von der Dosis abhängig zu sein. Erst ab einer Konzentration von 0,1 ng /ml steigt der Wert für die detektierten LTRs signifikant an. Die in allen Stimulationsversuchen eingesetzte Konzentration von 1 ng /ml erzielte auch in der Dosis-Wirkungskurve den höchsten Wert.

3.3.7 Einfluss von TGF-β auf die Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI

Für IFN-α konnte im Rahmen dieser Arbeit ein potentieller Zusammenhang zwischen der Dauer der Stimulation, der reduzierten Expression von Claudin-1 und einer Reduktion der HCVpp Aufnahme in die Zelle gezeigt werden. TGF-β und IL-10 führen dagegen zu einer verstärkten Infektion. Ob auch in diesem Fall Faktoren, die direkt mit der Infektion zu tun haben, durch die Stimulation mit einem der beiden anti-inflammatorischen Zytokine beeinflusst werden, wurde untersucht.

Als erstes wurde die Oberflächenexpression der bisher bekannten Moleküle, die in die Aufnahme des Virus involviert sind analysiert (Abb. 3.25).

Die Stimulation mit TGF-β hat auf die Oberflächenexpression von CD81 und Claudin-1 keinen Einfluss. Bei SR-BI steigt die Expression des Moleküls an der Zelloberfläche nach Stimulation mit TGF-β. Nach 48 Stunden hat sich die Expression in diesem Fall sogar verdoppelt. Das abgebildete Histogramm zeigt eine deutliche Verschiebung des Peaks nach rechts. Möglicherweise ist die gesteigerte SR-BI-Expression zumindest ein beteiligter Faktor, welcher für die verbesserte HCVpp Infektion nach TGF-β Stimulation verantwortlich ist.

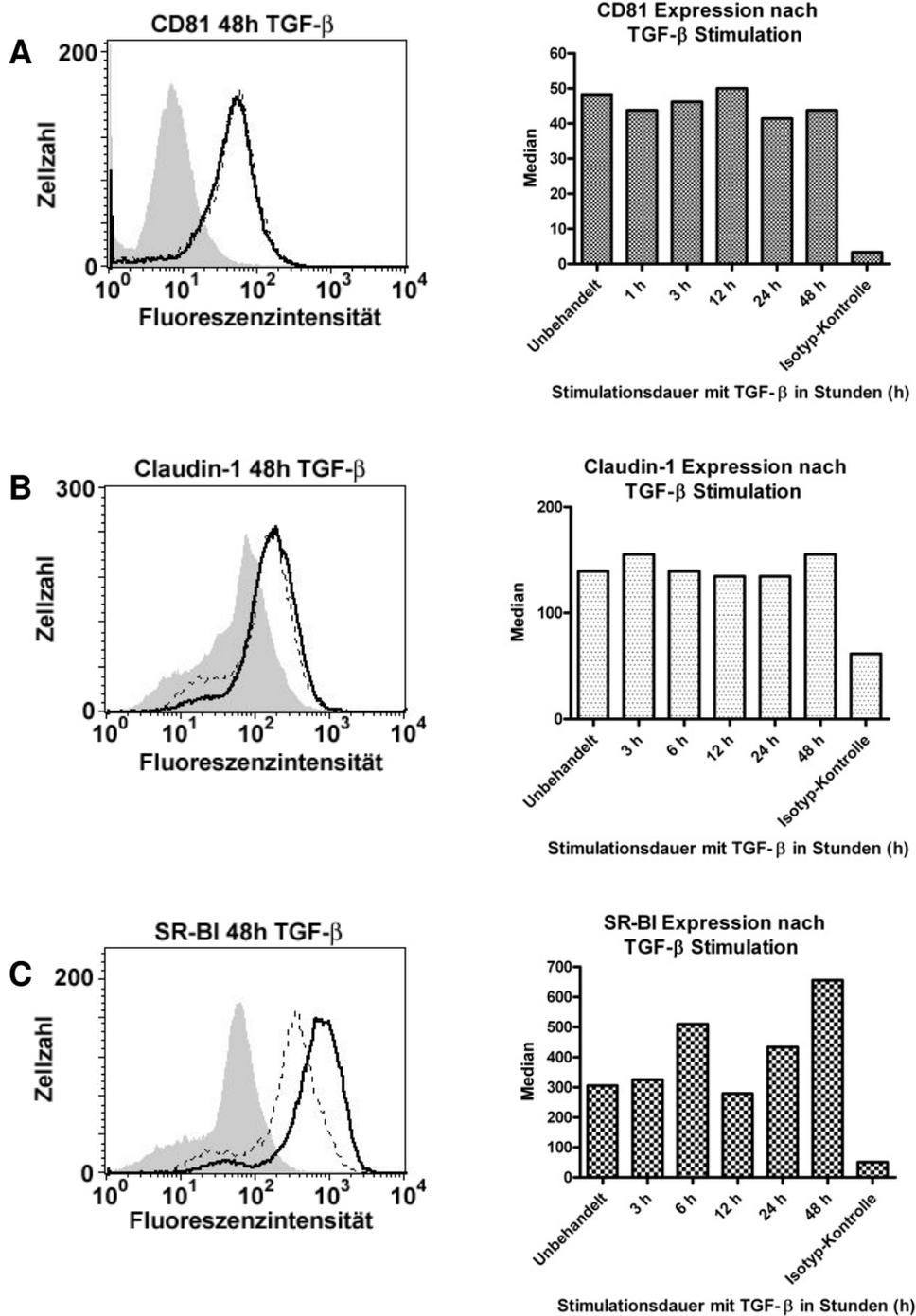


Abb. 3.25: Durchflusszytometrie TGF- β stimulierter Huh-7 Zellen. A Färbung der Huh-7 Zellen mit anti-CD81 Antikörper; B Färbung der Zellen mit anti-Claudin-1 Antikörper; C Färbung der Zellen mit anti-SR-BI Antikörper. Die Abbildungen jeweils auf der linken Seite repräsentieren ein Histogramm der Messung. Es wurde als Beispiel die jeweils die Messung nach 48 h TGF- β abgebildet. Graue Schattierung: Isotyp-Kontrolle, gestrichelte Linie: Unbehandelte Zellen, durchgängige schwarze Linie: TGF- β stimulierte Zellen. Die Säulendiagramme (rechte Abbildungen) zeigen die Medianwerte, d.h. die Werte, die sich aus der mittleren Fluoreszenz ergeben. Hierbei sind alle Messwerte dargestellt.

Die Durchflusszytometrie zeigte, dass die Oberflächenexpression von SR-BI unter TGF- β zunimmt. Ob dies auch für die Genexpression zutrifft sollte mit Realtime PCR nach Stimulation von Huh-7 Zellen mit TGF- β analysiert werden. Parallel dazu wurde auch die Genexpression von CD81 und Claudin-1 gemessen (Abb. 3.26).

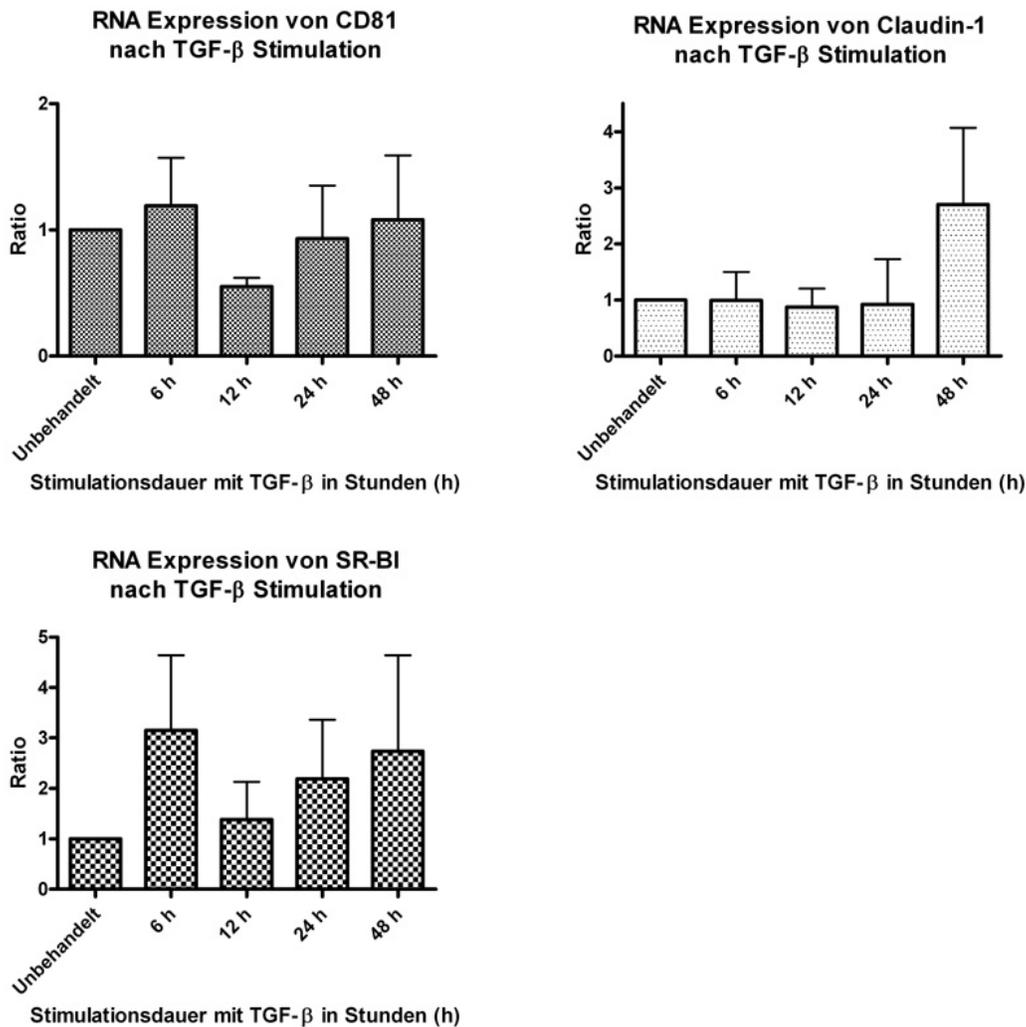


Abb. 3.26: mRNA Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI unter TGF- β in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation. $n=3$

Durch TGF- β Stimulation wird auch die Genexpression von SR-BI induziert. Auffällig ist hier, dass parallel zur Oberflächenexpression nach 6 Stunden die Expression zunächst um das Dreifache angestiegen ist, dann abfällt, um darauf erneut anzusteigen und den höchsten Wert

bei 48 Stunden zu erreichen. Bei diesem Versuch handelt es sich nicht um Proben aus demselben Versuchsansatz wie bei der Durchflusszytometrie, sondern um einen unabhängig davon durchgeführten. CD81 bleibt von der Stimulation mit dem Zytokin unbeeinträchtigt, Claudin-1 bis auf den 48 Stunden Wert auch. Der für 48 Stunden ermittelte Wert kann als „Ausreißer“ betrachtet werden.

Diese Messung zeigt außerdem, dass SR-BI durch die Stimulation *de novo* synthetisiert wird und anscheinend zwischen neuer Synthese und der Präsenz an der Oberfläche nur ein kurzer Zeitraum besteht.

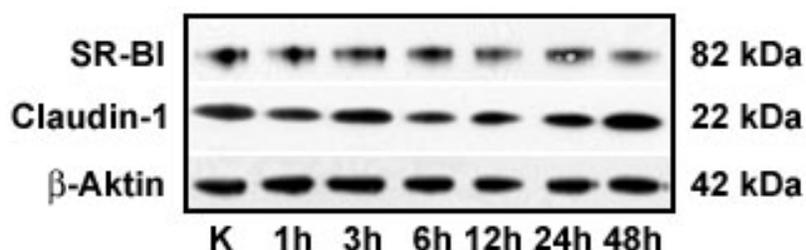


Abb. 3.27: Western Blot mit Gesamtproteinlysaten von TGF- β stimulierten Huh-7 Zellen. Aufgetragen sind jeweils gleiche Proteinmengen (15 μ g).

Durch den Western Blot lässt sich keine Veränderung der Gesamtproteinexpression von SR-BI feststellen. Bei Claudin-1 ist die Expression bei 48 Stunden leicht erhöht, was mit dem zunächst als „Ausreißer“ gewerteten 48 Stunden Wert der RNA Messung korreliert. Die Inkubation mit β -Aktin Antikörper zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

3.3.8 Einfluss von IL-10 auf die Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI

Auch zu IL-10 waren die gleichen Experimente geplant, wie für IFN- α und TGF- β . Aus Zeitgründen konnten diese jedoch nur einmal durchgeführt werden und wurden daher nicht ausgewertet. Die ersten Ergebnisse zeigten für keines der Moleküle eine Veränderung der Expression unter IL-10 Stimulation.

3.4 Die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 für die Aufnahme von HCV

3.4.1 CEACAM1 als potentieller Rezeptor von HCV

In einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie, wurde das zur Immunglobulinsuperfamilie gehörende Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 in PBMNCs als Interferon sensitives Gen (ISG) bei Patienten mit HCV identifiziert. Es konnte sowohl in Microarray Analysen als auch durch quantitative Realtime RT-PCR gezeigt werden, dass das für CEACAM1 codierende Gen unter Gabe von IFN höher exprimiert wurde und diese Zunahme der CEACAM1 Genexpression signifikant mit dem Rückgang der viralen RNA innerhalb der ersten 36 Stunden (sog. „*early viral response*“) korrelierte. Deshalb wurde für CEACAM1 eine Beteiligung bei der Reaktion von HCV auf IFN- α postuliert, wobei es möglicherweise einen zellulären Faktor darstellt, der die Sensitivität von HCV infizierten Leberzellen für IFN- α bestimmt.

Da es sich bei CEACAM1 um ein Oberflächenmolekül handelt, könnte es auch einen potentiellen Rezeptor für HCV darstellen bzw. dessen Aufnahmeprozess modifizieren, zumal für das Maus Hepatitis Virus bereits gezeigt wurde, dass CEACAM1 ein entscheidender Faktor für die Infektion ist. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die mögliche Bedeutung von CEACAM1 bei der Infektion mit HCV untersucht werden.

3.4.2 Charakterisierung der CEACAM1 Expression auf humanen Leberzellen: Huh-7, HepG2 und primäre Hepatozyten

Das Transmembranprotein CEACAM1 wird auf verschiedenen Epithelien unterschiedlicher Organe exprimiert (Singer 2005). Über die Expression auf humanen Leberzellen bzw. (Tumor)-Leberzelllinien ist bisher wenig bekannt. Hokari et al., (2007) konnten zumindest für die humanen Hepatomzelllinien HLF, PLC/PRF/5 und KYN-2 keine Expression von CEACAM1 auf ihrer Oberfläche nachweisen, wohingegen HepG2 Zellen positiv für CEACAM1 waren (Hokari *et al.* 2007).

Über eine Expression von CEACAM1 auf Huh-7 Zellen war bis zu dieser Arbeit nichts bekannt. Um die Oberflächenexpression von CEACAM1 auf Huh-7 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert, wobei auch HepG2 Zellen und primäre Hepatozyten in die Analyse mit einbezogen wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

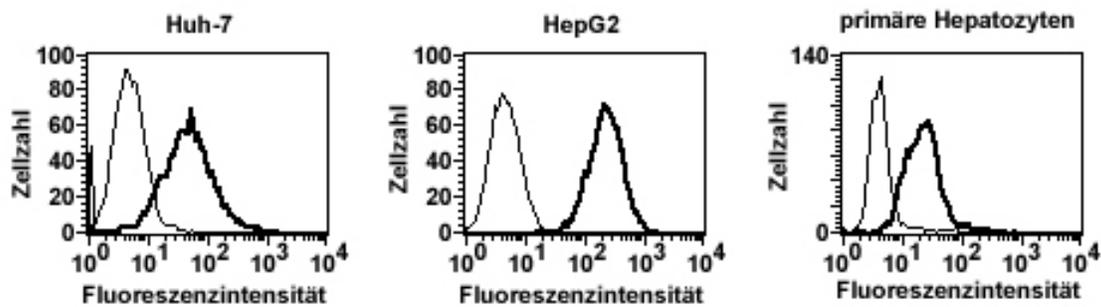


Abb. 3.28: Basale Expression von CEACAM1 auf humanen Leberzellen. Links: Huh-7, mitte: HepG2 und rechts: primäre Hepatozyten. Der linke Peak repräsentiert jeweils die Isotypkontrolle, der nach rechts verschobene Peak die für CEACAM1 auf der Oberfläche positiven Zellen.

Alle drei untersuchten Leberzelltypen zeigen eine deutliche endogene Expression von CEACAM1 auf ihrer Zelloberfläche. Die Huh-7 Zellen, HepG2 Zellen und die primären Hepatozyten wurden zudem bezüglich der Expression von CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8 auf ihrer Oberfläche mittels Durchflusszytometrie analysiert, jedoch konnte außer CEACAM1 kein weiteres CEACAM-Molekül nachgewiesen werden.

Auch die Gesamtproteinanalyse zeigt deutlich, dass CEACAM1 in allen drei untersuchten Zellarten exprimiert wird (Abb. 3.29).

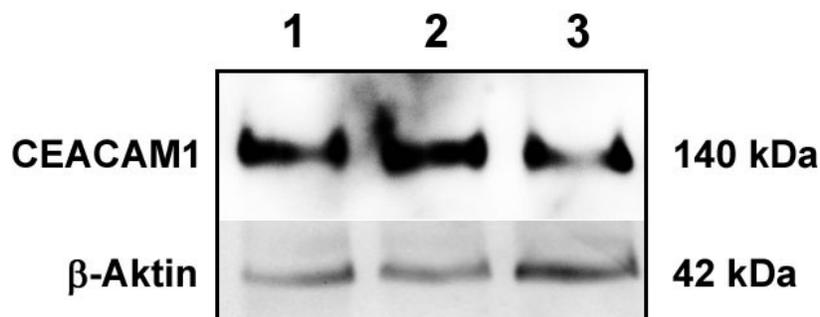


Abb. 3.29: Western Blot der CEACAM1 Expression in humanen Leberzellen. Spur 1: Huh-7 Zellen, Spur 2: HepG2 Zellen, Spur 3: primäre Hepatozyten. Aufgetragene Proteinmenge: 25 μ g. Durch Inkubation mit anti β -Aktin Antikörper, wurde die Menge an geladenem Protein kontrolliert.

3.4.3 Einfluss von IFN- α auf die Expression von CEACAM1 auf Huh-7 Zellen

Über die Wirkung der IFN- α Stimulation auf die Expression von CEACAM1 in Huh-7, ist bisher nichts bekannt. Eine veränderte Expression von CEACAM1 in Leberzellen, die das Hauptziel bei der Infektion mit dem Hepatitis C Virus darstellen, könnte weitere Aufschlüsse über zelluläre Mechanismen bei der IFN Antwort und der Viruselimination geben.

Um zu untersuchen, ob sich in Huh-7 Zellen die CEACAM1 Expression IFN- α abhängig analog zu den Ergebnissen in PBMNC Blutzellen ändert, wurden diese Zellen unterschiedlich lange mit IFN- α stimuliert und anschließend die Expression von CEACAM1 sowohl auf Gesamtproteinebene mittels Western Blot als auch auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 3.30)

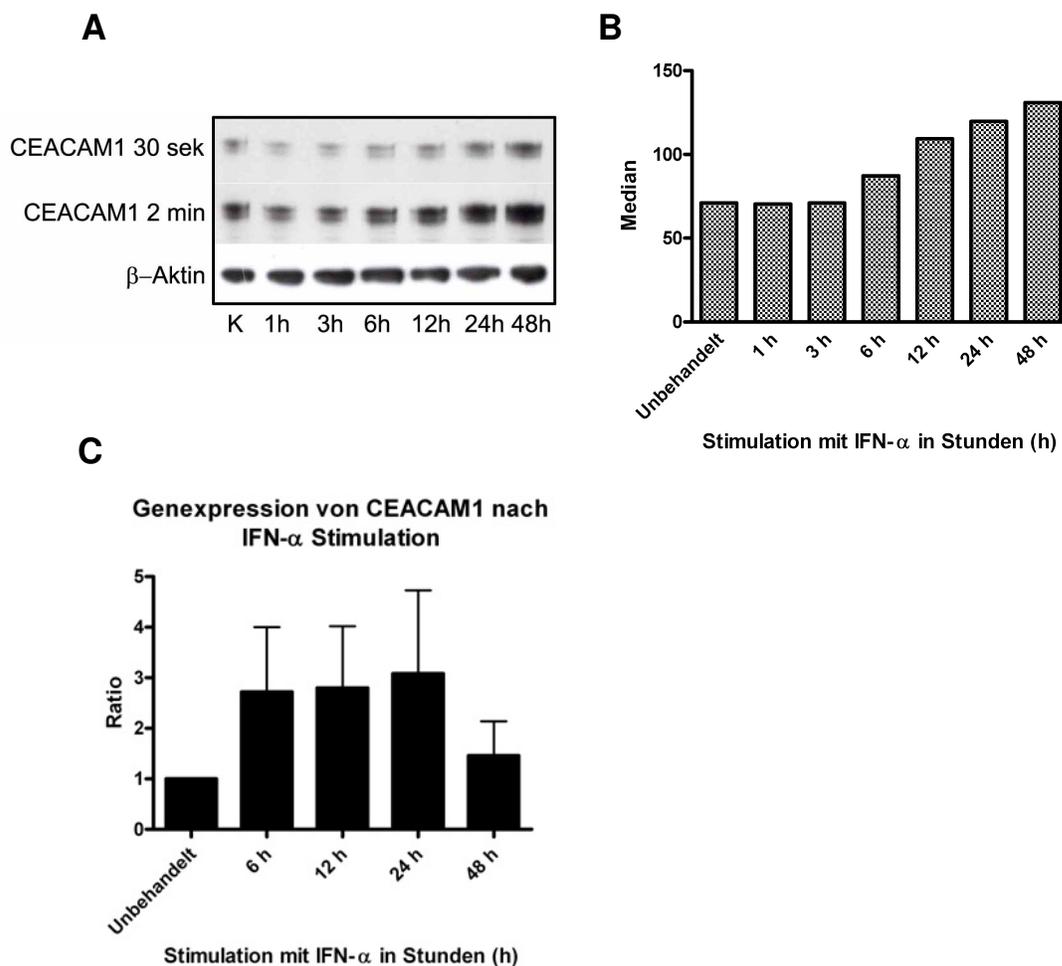


Abb. 3.30: CEACAM1 Expression in Huh-7 Zellen nach IFN- α Stimulation. Der Western Blot in Abb. A zeigt die Gesamtproteinexpression über 48 Stunden. Dargestellt sind zwei unterschiedliche Belichtungszeiten. Abb. B zeigt die aus der Durchflusszytometrie ermittelten Medianwerte. Abb. C: Genexpression von CEACAM1 nach IFN- α Stimulation. n= 3.

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Expressionssteigerung von CEACAM1 auf Proteinebene. Da dieser Effekt erst nach ungefähr sechs bis zwölf Stunden einsetzte, deutet dies auf eine *de novo* Synthese nach Stimulation hin. Somit scheint CEACAM1 nicht in internen Reservoiren der Zelle vorzuliegen und als Reaktion auf die IFN- α Stimulation an die Zelloberfläche transferiert zu werden.

3.4.4 Auswirkung der Antikörper-Blockierung von CEACAM1 auf die Infektion mit HCVpp

Für das Maus Hepatitis Virus (MHV) gilt CEACAM1 schon lange als der entscheidende Rezeptor (Dveksler *et al.* 1991). Um zu prüfen, ob CEACAM1 als Rezeptor für die HCVpp Infektion in Frage kommt, wurde CEACAM1 auf den Huh-7 Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Epitope bzw. einem Liganden von CEACAM1 inkubiert, um so potentielle Bindungsstellen für HCVpp zu blockieren. CEACAM1 ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie und besteht aus mehreren extrazellulären Ig-artigen Domänen. Die N-terminale Domäne zeigt Charakteristika einer variablen, V-ähnlichen Ig-Domäne, wohingegen die anderen drei extrazellulären Ig-Domänen strukturelle Ähnlichkeit mit konstanten ig-Domänen vom Typ C2 aufweisen (Abb. 4.1, Seite 132) (Tan *et al.* 2002). In allen bisher untersuchten Fällen wird die Anheftung und Gewebeinvasion über die N-Domänen vermittelt (Hill *et al.* 2001; Hill & Virji 2003; Tsai *et al.* 2003).

Die Auswirkung der Antikörper-Blockierung wurde mit dem PCR basierten Assay ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abb 3.31 dargestellt.

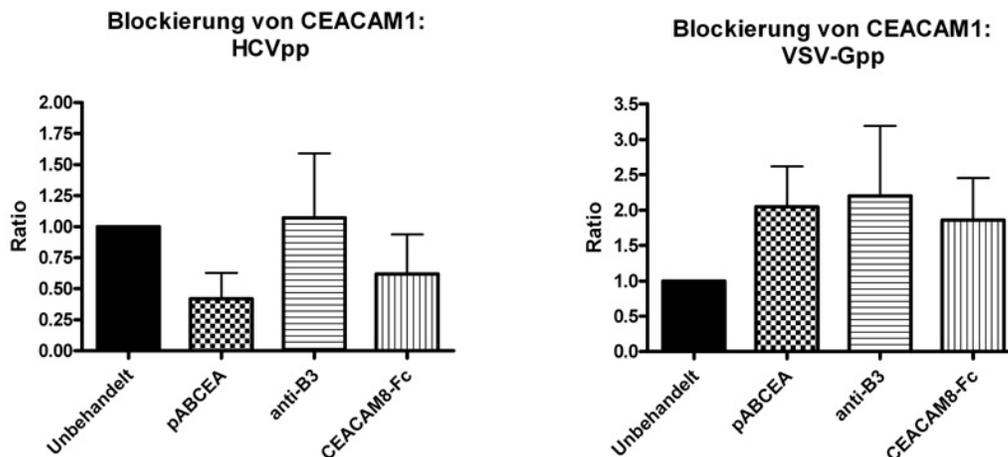


Abb. 3.31: Realtime PCR zur Quantifizierung der Infektion von Pseudopartikeln nach Blockierung von CEACAM1 auf der Oberfläche von Huh-7 Zellen. Es wurden Antikörper gegen verschiedene Epitope von CEACAM1 verwendet. pABCEA: polyklonaler Antikörper, der gegen die N-Domäne von CEACAM1 gerichtet ist, B3: monoklonaler Antikörper gegen die C-Domäne, CEACAM8-Fc: humanes, rekombinantes CEACAM8 fusioniert mit humaner schwerer Kette Fc Domäne.

Die Blockierung von CEACAM1 mit verschiedenen „Liganden“ wirkt sich auf die Infektion von HCVpp und VSV-Gpp unterschiedlich aus. Sowohl die Inkubation mit dem polyklonalen Antikörper (pABCEA) als auch CEACAM8-Fc, das einen physiologischen Liganden der N-Domäne (Abb. 4.1, Seite 132) von CEACAM1 darstellt (persönliche Information von Dr. Bernhard B. Singer) bewirkt eine Suppression der Infektion mit den HCVpp. Dagegen hat der Antikörper B3, der gegen die C-Domäne (Abb.4.1) von CEACAM1 gerichtet ist, keine Auswirkung auf die Infektion. Die Infektion mit den VSV-Gpp wird, unabhängig von der Art des „Liganden“, verstärkt.

3.4.5 Homologe Überexpression von CEACAM1 in Huh-7 Zellen

Unter IFN- α Stimulation nimmt die Expression von CEACAM1 auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation zu. Durch exogenes IFN- α wird aber auch die Expression einer Vielzahl anderer Gene bzw. Proteine induziert und gesteigert. Daher sollten Huh-7 Zellen mit einem Plasmid, das die Expression von CEACAM1 in den Zellen ermöglicht, transfiziert werden und die Auswirkungen der daraus resultierenden, vermehrten Expression von CEACAM1 auf die Infektion mit den HCVpp analysiert werden.

Hierzu wurden Huh-7 Zellen mit einem Plasmid, das die genetische Information für CEACAM1 trägt transfiziert. Um unspezifische Effekte der Transfektion auszuschließen, wurde ein so genanntes Mock-Plasmid transfiziert, das das gleiche Plasmid darstellt, wie das

CEACAM1 Plasmid, aber dem die Sequenz für CEACAM1 fehlt. Nach 48-72 Stunden (je nach Konfluenz der Zellen) wurden diese mit HCVpp bzw. VSV-Gpp infiziert (Abb. 3.34). Die Überexpression wurde sowohl mittels WB (Abb. 3.32) als auch mit Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 3.33).

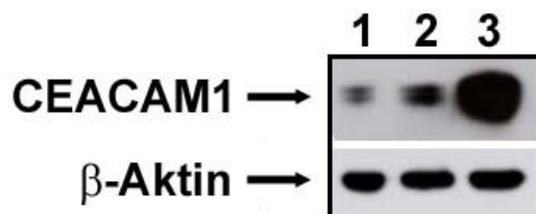


Abb. 3.32: Western Blot zur CEACAM1 Expression in Huh-7 Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Spur 1: untransfizierte Zellen, Spur2: Mock-transfizierte Zellen, Spur 3: CEACAM1-transfizierte Zellen. Es wurden jeweils 25 µg aufgetragen.

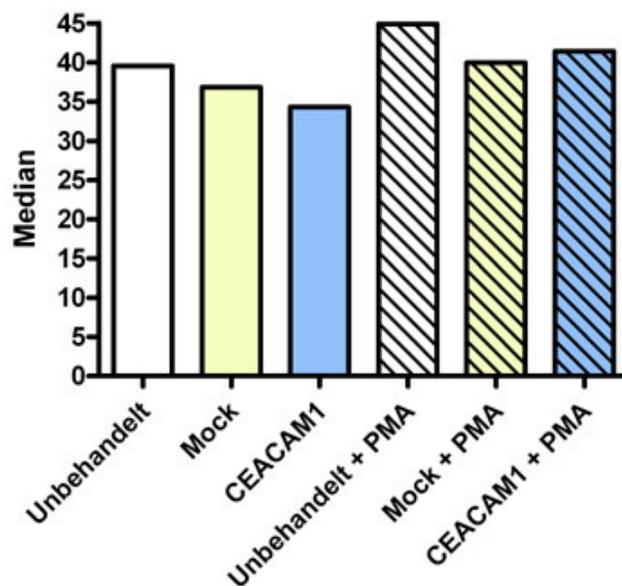


Abb. 3.33: Durchflusszytometrie von CEACAM1 auf Huh-7 Zellen nach Transfektion mit CEACAM1. Gemessen wurden Zellen, die nicht-transfiziert wurden, gegen Mock transfizierte und CEACAM1 transfizierte Zellen. Zudem wurden in parallel die gleichen Ansätze gemessen, die jedoch zuvor mit PMA stimuliert worden waren (Balken mit Querstrichen).

Durch die Transfektion konnte eine massive Überexpression an CEACAM1 erreicht werden, jedoch nur intrazellulär. An der Oberfläche der Zelle blieb die Anzahl der CEACAM1 Moleküle nahezu unverändert, was mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen wurde. Auch durch eine Stimulation mit PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) kurz vor der Infektion mit den Pseudopartikeln, konnte keine Sekretion der Lagergranula und somit eine Steigerung der CEACAM1 Expression an der Oberfläche erreicht werden. In Abb. 3.33 sind die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie zusammen dargestellt. Man sieht deutlich, dass die Anzahl der CEACAM1 Moleküle auf der Zelloberfläche nicht erhöht ist.

Ein Beispiel für eine Messung der Infektion mit den Pseudopartikeln nach Transfektion ist in Abb. 3.34 dargestellt.

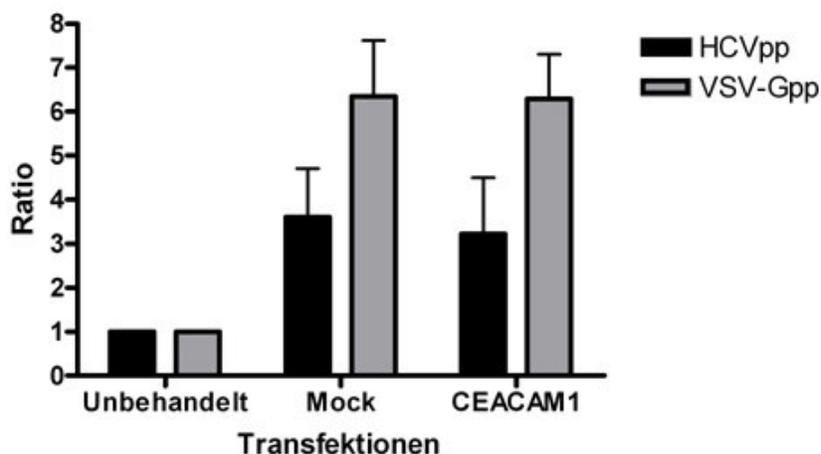


Abb. 3.34: Realtime PCR zur Quantifizierung der Infektion von CEACAM1 transfizierten Huh-7 Zellen mit Pseudopartikeln. Die Auswirkung auf die Infektion mit HCVpp oder VSV-Gpp wurde mit Hilfe des PCR basierten Assays bestimmt. Mock: transfiziert mit Mock Plasmid, CEACAM1: transfiziert mit CEACAM1 Plasmid. Schwarze Balken: HCVpp, graue Balken: VSV-Gpp. Bei dem Mock-Plasmid handelt es sich um das gleiche Plasmid, wie das CEACAM1 Plasmid, jedoch ohne die CEACAM1 kodierende Sequenz.

Auffällig bei der Messung der LTRs zur Quantifizierung der Infektion ist der hohe Wert bei den Mock-transfizierten Zellen. Er gleicht jeweils dem korrespondierendem Wert für die CEACAM1 transfizierten Zellen, weshalb keine Aussage über den Effekt der „Über“-Expression von CEACAM1 in Huh-7 Zellen möglich ist. Insgesamt können, zumindest mit dem vorliegenden experimentellen Aufbau, keine eindeutigen Rückschlüsse auf die

Auswirkungen einer vermehrten CEACAM1 Präsenz auf der Zelloberfläche geschlossen werden. Offenbar hat die Transfektion als solche und die Expression eines Plasmids in den Zellen starke Auswirkungen auf die Infektion mit den Pseudopartikeln. Da es nicht möglich war eine erhöhte Expression des Moleküls auf der Zelloberfläche zu bewirken, kann über einen Effekt auf die Infektion mit HCVpp bzw. VSV-Gpp auf diesem Wege keine Aussage getroffen werden.

3.4.6 Gen Knock-down von CEACAM1 und Auswirkung auf die Infektion mit HCVpp

Im folgenden Versuchsansatz sollten die Auswirkungen einer durch siRNA Transfektion bewirkten herunter regulierten CEACAM1 Expression durch siRNA- Transfektion auf die Infektionspotenz von HCVpp ermittelt werden.

Die Menge an aufgenommenen HCVpp wurde mit Hilfe des PCR basierten Assays quantifiziert. Die Knock-down Effizienz wurde auf mRNA Ebene durch Realtime PCR, auf Gesamtproteinebene durch WB und auf der Zelloberfläche durch FACS-Analyse überprüft.

Das Hauptaugenmerk lag auf dem CEACAM1 Knock-down auf der Zelloberfläche. Hier konnte ein Knock-down von etwa 60 Prozent erreicht werden, was sich auch in den Ergebnissen der Realtime PCR widerspiegelt (Abb. 3.36).

Der Knock-down von CEACAM1 in den Huh-7 Zellen führte zu einer verstärkten Infektion mit den HCVpp. Auch für die Infektion mit den VSV-Gpp konnte dieser Effekt festgestellt werden (Abb. 3.35).

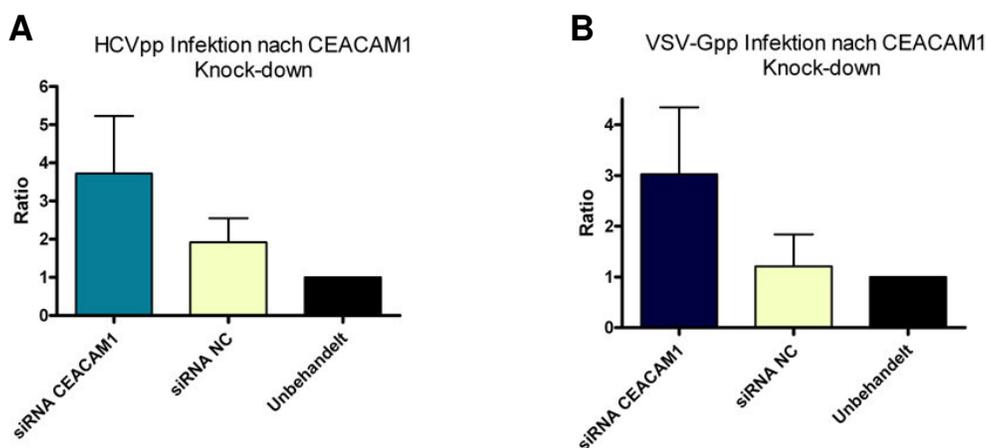


Abb. 3.35: Realtime PCR zur Quantifizierung der Infektion von Huh-7 Zellen mit Pseudopartikeln nach CEACAM1 Knock-down durch siRNA. A: Infektion mit HCVpp. B: Infektion mit VSV-Gpp. Dargestellt sind die sich aus der Realtime PCR ergebenden Ratios. n = 3.

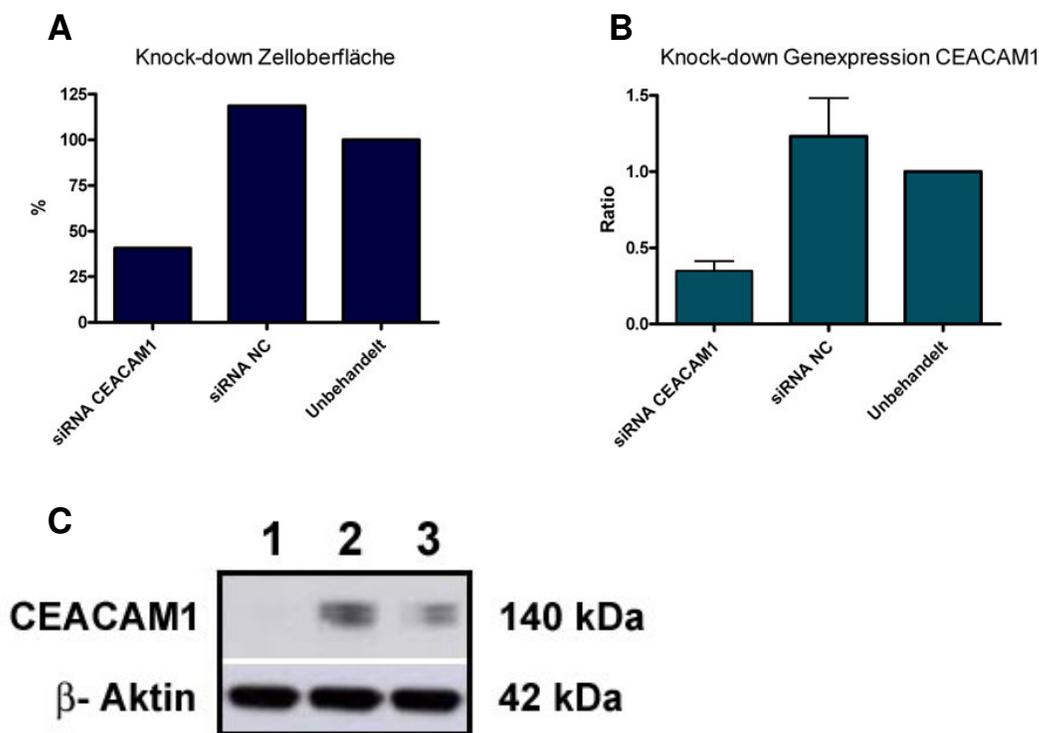


Abb. 3.36: Knock-down Kontrollen zu CEACAM1 siRNA Knock-down. A: Durchflusszytometrie (Oberfläche). Dargestellt sind die mit Durchflusszytometrie ermittelten Medianwerte umgewandelt in Prozent. Hierbei wurde jeweils nur eine Probe gemessen, die sich aus 6 vereinigten Vertiefungen einer Schale mit 12 Vertiefungen zusammensetzten, weshalb sich keine Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben. B: Realtime PCR (RNA Ebene). n = 3. C: WB (Gesamtprotein), Spur 1: siRNA CEACAM1, Spur 2: siRNA NC, Spur 3: unbehandelt.

Sowohl bei den mit HCVpp als auch bei den mit VSV-Gpp infizierten Zellen führte die Reduktion der CEACAM1 Expression zu einer erhöhten Aufnahme an Pseudopartikeln. Bei den HCVpp konnte im Durchschnitt eine zwei- bis dreifache Steigerung der Infektion gemessen werden. Bei den VSV-Gpp handelte es sich um eine drei- bis vierfach höhere Rate an Infektion. Bei der Etablierung des Versuchs stellte sich heraus, dass die höchste Rate an Infektion bei der besten Knock-down Effizienz erreicht wurde.

3.4.7 Immunpräzipitation von HCVpp und CEACAM1

Die Immunpräzipitation stellt eine Möglichkeit dar, festzustellen, ob zwei Moleküle aktiv eine Bindung miteinander eingehen. CEACAM1 ist ein Molekül, das auch für andere Pathogene als Rezeptor beschrieben wurde. Zudem ist dieses Molekül in Mäusen ein wichtiger Rezeptor für das Maus Hepatitis Virus, bei dem es sich allerdings nicht um einen Flavivirus sondern um einen Coronavirus handelt.

Um eine potentielle Bindung von CEACAM1 an die HCV Glykoproteine E1E2, die für den Eintritt des Virus in die Leberzellen wahrscheinlich hauptverantwortlich sind, zu untersuchen, wurde eine Co-Immunpräzipitation mit CEACAM1-Fc (ein rekombinantes CEACAM1 Molekül, fusioniert mit einem humanen Fc-Teil) und den HCVpp bzw. als Kontrolle VSV-Gpp durchgeführt. Parallel wurde die Präzipitation mit einem CEACAM1-Fc Konstrukt durchgeführt, welchem die N-Domäne fehlt (Δ N-Fc). Dies sollte zeigen, ob für die Bindung die N-Domäne verantwortlich ist oder eine der anderen Domänen des CEACAM1 Moleküls. Die Co-Immunpräzipitation wurde durch WB analysiert. In der Abb. 3.37 sind die Ergebnisse der Präzipitation dargestellt. Im oberen WB wurde zunächst die Co-Präzipitation von den HCVpp mit CEACAM1 mit dem Antikörper anti HCV E2 inkubiert, um präzipitiertes E2 zu detektieren (Spuren 1-5). Analog dazu wurde der WB mit den VSV-Gpp Präzipitaten mit einem Antikörper gegen das Glykoprotein des Vesikular Stomatitis Virus (VSV) inkubiert (Spuren 6-9). Um CEACAM1 zu detektieren wurden beide Membranen mit dem CEACAM1 Antikörper B3 inkubiert, der auch an solches CEACAM1 bindet, welchem die N-Domäne fehlt.

Die Western Blots zeigen, dass HCV E2 nicht durch CEACAM1 präzipitiert wurde, jedoch wurde das Glykoprotein des VSV offensichtlich durch CEACAM1 gebunden. Die anschließende Inkubation der Membran mit dem Antikörper gegen CEACAM1 zeigt in allen Spuren, in denen Proben von der Präzipitation eingesetzt wurden, eine Bande für CEACAM1. Das bedeutet, dass sowohl bei der HCVpp Präzipitation, als auch bei der VSV-Gpp Präzipitation zumindest die Bindung an die Protein A Agarose Beads funktioniert hat.

CEACAM1 scheint also direkt mit dem Glykoprotein des Vesikular Stomatitis Virus zu interagieren. Für HCV E2 könnte eine indirekte Interaktion eine Rolle spielen.

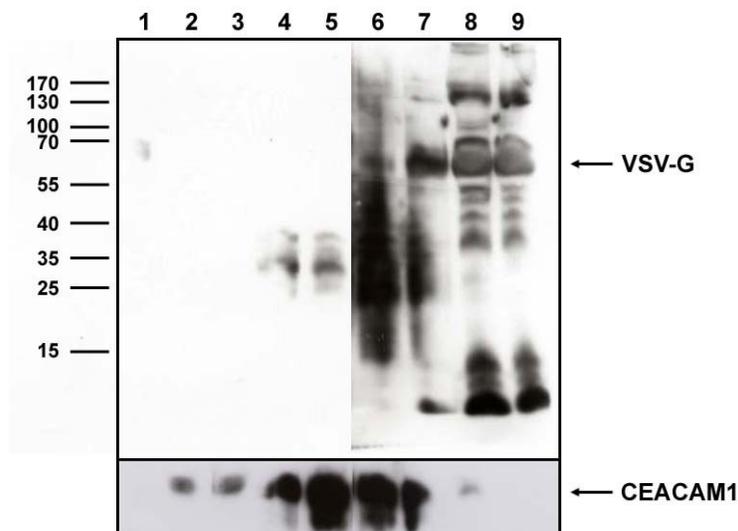


Abb. 3.37: Western Blot der Immunpräzipitation von CEACAM1 mit HCVpp /VSV-Gpp. Spur 1: Lysat von E1E2-His transfizierten 293HEK Zellen (Positiv-Kontrolle)., Spur 2:Überstand vor Inkubation mit Protein A Agarose, Spur 3: Überstand nach Inkubation mit Protein A Agarose; Spur 4: CEACAM1-Fc mit HCVpp Präzipitat, Spur 5: Δ N-Fc mit HCVpp Präzipitat, Spur 6: CEACAM1-Fc mit VSV-Gpp Präzipitat, Spur 7: Δ N-Fc mit VSV-Gpp Präzipitat, Spur 8: Überstand vor Inkubation mit Protein A Agarose, Spur 9: Überstand nach Inkubation mit Protein A Agarose. In Spur 1 ist ganz schwach HCV E2 auf Höhe von etwa 65 kDa zu sehen. Der untere WB repräsentiert die Detektion von CEACAM1 in den IP Proben. Dabei sind die stärksten Banden erwartungsgemäß in den Präzipitaten zu finden.

3.4.8 Infektion von HeLa Zellen, die mit verschiedenen CEACAMs stabil transfiziert sind

Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, ob CEACAM1 in die Infektion mit HCV involviert ist, ist die Inkubation der HCVpp mit CEACAM1 exprimierenden Zellen, die normalerweise nicht von HCVpp infizierbar sind und auch kein CEACAM1 endogen exprimieren. Hierfür wurden HeLa Zellen benutzt, die stabil mit CEACAM1 transfiziert waren und signifikante Mengen des Moleküls an ihrer Oberfläche aufweisen.

In diesem Fall erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Luziferase-Assays verwendet.

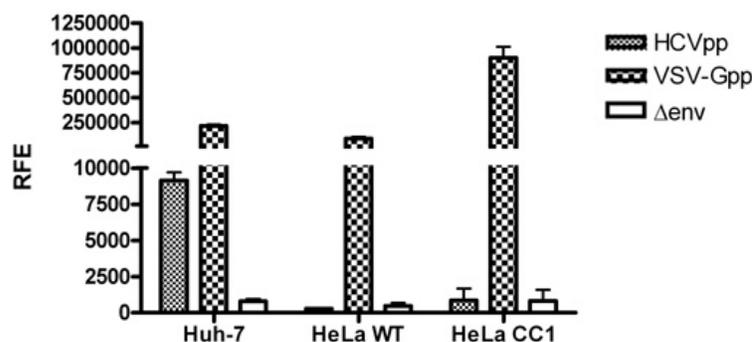


Abb. 3.38: Luziferase Assay zur Quantifizierung der Infektion von CEACAM1 exprimierenden HeLa Zellen mit HCVpp. Als Kontrollen wurden für die HeLa Zellen auch mit den VSV-Gpp und den als Negativ-Kontrolle dienenden Δenv Pseudopartikeln infiziert. Zum Vergleich wurden auch Huh-7 Zellen und HeLa Wildtypzellen (WT), die kein CEACAM1 endogen exprimieren, in parallel infiziert. Das Maß an Infektion wurde mit Luciferase Assay quantifiziert. n = 3; RFE: Relative Fluoreszenzeinheiten. CC1: CEACAM1.

Das Experiment zeigt, dass durch CEACAM1 an der Oberfläche der HeLa Zellen keine Infektion durch die HCVpp bewirkt wird. CEACAM1 ist also wahrscheinlich kein Rezeptor für HCV(pp). Vermutlich fehlen aber auch andere wichtige Rezeptormoleküle auf den HeLa Zellen, ohne die eine Infektion nicht möglich ist. Dagegen gibt es offensichtlich von den VSV-Gpp eine stärkere Affinität zu denjenigen HeLa Zellen, die CEACAM1 auf ihrer Oberfläche tragen. Die Infektion konnte in diesem Fall um den Faktor 10 gesteigert werden.

Dieses Experiment wurde auch mit HeLa Zellen durchgeführt, die jeweils CEACAM3, 5, 6, 7 und 8 exprimieren, jedoch konnten auch andere CEACAMs keine Infektion der HeLa Zellen mit HCVpp bewirken (Ergebnis deshalb nicht graphisch dargestellt). Dagegen zeigte sich, dass CEACAM3, 5, 6, 7 und 8 die Infektion mit VSV-Gpp auch verstärken können, jeweils immer im Vergleich zu den Wildtyp HeLa Zellen.

3.4.9 CEACAM1 als neuer Rezeptor für das Vesicular Stomatitis Virus

Eigentlich dienen VSV-Gpp als Positiv-Kontrolle für alle viralen Infektions-Experimente, die mit den HCVpp durchgeführt werden. Im beschriebenen Experiment zeigte sich jedoch überraschender Weise, dass die Expression von CEACAM1, und weiterer humaner CEACAMs eine deutlich verstärkte Infektionsrate der HeLa Zellen mit den VSV-Gpp bewirkt. (Abb 3.39 A). Um Rückschlüsse schliessen zu können, ob die verschiedenen

CEACAMs mit unterschiedlichen Bindungsstärken mit dem VSV-Gpp interagieren, wurde parallel zu der CEACAM-Virus Interaktionsmessung die absolute Zahl der CEACAM Moleküle auf der Zelloberfläche der HeLa Zellen quantifiziert (Abb 3.39 B).

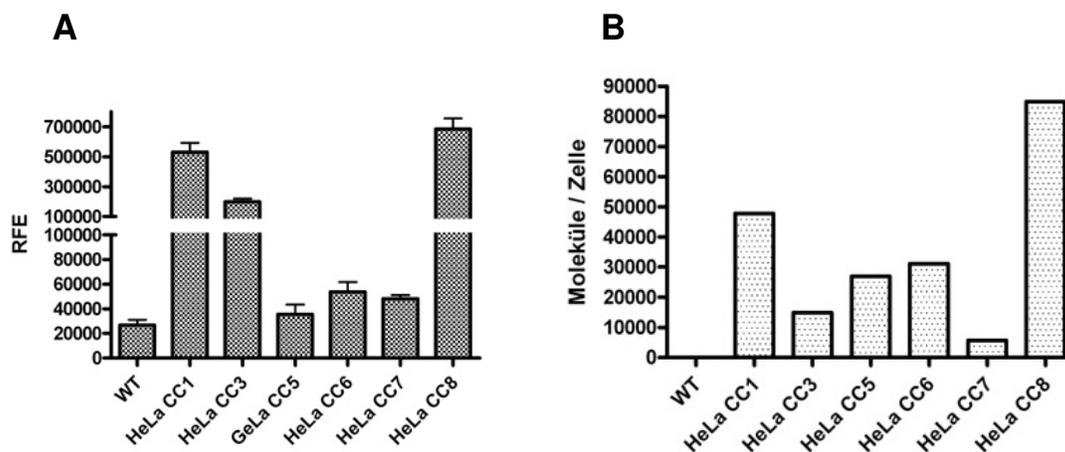


Abb. 3.39: Infektion von CEACAM exprimierenden HeLa Zellen mit VSV-Gpp und Quantifizierung der CEACAM Moleküle auf den HeLa Zellen. A: Die Infektionsrate wurde mittels Luziferase Assay quantifiziert. RFE: Relative Fluoreszenzeinheit. n = 3. B: Die Quantifizierung wurde mit dem Qifikit von Dako durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Der WT ist wie zu erwarten negativ.

Abb. 3.39 A zeigt das Ergebnis des Luziferase-Assays nach Infektion der verschiedenen CEACAM exprimierenden HeLa Zellen mit VSV-Gpp. Bei CEACAM1 und CEACAM8 erhält man einen über 20 mal höheren Wert als mit WT-Zellen. Man könnte vermuten, dass das Maß an Infektion mit dem Anteil an CEACAM-Molekülen auf der Oberfläche direkt korreliert. Um dies genauer zu evaluieren, wurde als erstes eine Quantifizierung der jeweiligen CEACAM-Moleküle, die sich auf der Zelloberfläche befinden, durchgeführt (Abb. 3.39 B). Die Quantifizierung sollte Aufschluss darüber geben, ob gewissermaßen jedes CEACAM die Infektion der HeLa Zellen mit VSV-Gpp gleichermaßen verstärkt, und die Rate an Infektion sich nur aufgrund unterschiedlich vieler CEACAM Moleküle auf der Zelloberfläche unterscheidet oder, ob die unterschiedlichen Charakteristiken der verschiedenen CEACAM Moleküle die Infektion mit VSV-Gpp beeinflussen. Die absolute Quantifizierung zeigt, dass die verschiedenen CEACAM Moleküle in unterschiedlichen Mengen auf den HeLa Zellen exprimiert werden.

CEACAM8 und CEACAM1 sind am meisten auf der Zelloberfläche vorhanden, wohingegen CEACAM 3, 5, 6 und vor allem 7 eine niedrigere Expression auf den Zellen zeigen.

Diese Quantifizierung wurde mit der gemessenen Luziferaseexpression abgeglichen. Dabei wurden sowohl die RFE als auch die Werte aus der absoluten Quantifizierung zunächst in Prozent umgerechnet um gleiche Einheiten zu erhalten. Bei den RFE wurden zusätzlich alle Werte um die „Hintergrundinfektion“ des WT korrigiert. CEACAM8 als jeweils höchster Wert wurde als 100 Prozent Wert gesetzt. Anschließend wurde der Quotient aus RFE in Prozent und Molekülen pro Zelle in Prozent gebildet, um RFE pro Molekül CEACAM darzustellen. Dieser Quotient wurde als Bindungsquotient bezeichnet. Abb. 3.40 zeigt die graphische Umsetzung.

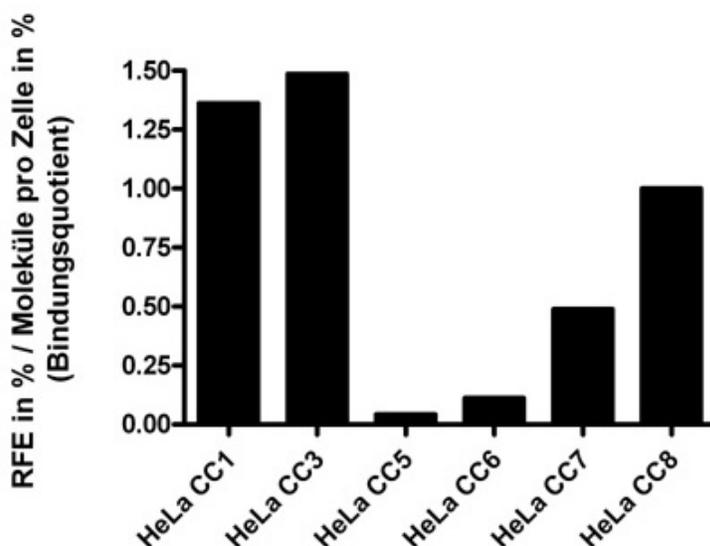


Abb. 3.40: Bindungsquotient VSV-Gpp zu verschiedenen CEACAMs. Bevor der Quotient gebildet wurde, wurden die beim WT ermittelten RFE von den übrigen Werten subtrahiert. Für die Berechnung des Bindungsquotienten wurden die RFE und die Moleküle pro Zelle in Prozent umgerechnet, wobei jeweils der Wert von CEACAM8 als höchster Wert = 100% gesetzt wurde.

Diese Graphik verdeutlicht, dass keine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der CEACAM Moleküle auf den Zellen und der Rate an Infektion besteht, sondern vielmehr, dass das Glykoprotein vom Vesikular Stomatitis Virus zu den verschiedenen CEACAM Molekülen unterschiedlich starke Affinitäten zu haben scheint. Vergleicht man zunächst die Werte von CEACAM1 und CEACAM3 miteinander, so sieht man in diesem Fall, dass tatsächlich im Fall von CEACAM1 relativ viele CEACAM1 Moleküle auf der Zelloberfläche sind und auch die RFE (die Infektion) relativ hoch sind (jeweils Zweithöchster Wert). Bei CEACAM3 sind dagegen weniger Moleküle auf der Zelle und auch die RFE sind im

Verhältnis niedriger. Die Bindungsquotienten von CEACAM1 und 3 sind ähnlich, da die Affinität des Viruspartikels zu beiden CEACAMs ähnlich stark zu sein scheint. Bei CEACAM5 und CEACAM6 dagegen ergibt sich ein anderes Verhältnis. Hier sieht man, dass obwohl mehr Moleküle als bei CEACAM3 auf der Zelle sind, die gemessenen RFE niedriger sind. Daraus ergibt sich der kleinere Bindungsquotient. VSV-G scheint in diesem Fall zu CEACAM5 und 6 eine geringere Affinität aufzuweisen als zu CEACAM3. CEACAM8 dagegen ist ein Beispiel für eine relativ schlechte Affinität des VSV-G zu diesem Molekül. Hier sind über 84000 Moleküle auf der Zelloberfläche, wohingegen auf CEACAM1 etwa 47000 Moleküle gemessen wurden. Das sind bezogen auf CEACAM8 fast doppelt so viele Moleküle. Trotzdem ist der RFE Wert nicht doppelt so hoch, sondern nur 29 Prozent höher. Zusammengefasst kann man sagen, dass das Glykoprotein des Vesikular Stomatitis Virus zu CEACAM1 und 3 die beste Affinität hat.

4 Diskussion

4.1 Ein Dengue-HCV Konstrukt zur Generierung von chimären Viruspartikeln

4.1.1 Klonierung des chimären Konstrukts

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es noch kein Modellsystem zur Untersuchung des kompletten Lebenszyklus von HCV. Ein bestehendes Problem ist, dass das Hepatitis C Virus nicht in Zellkultur repliziert. Andere Flaviviren hingegen, wie Dengue -, Gelbfieber- oder das Japanische Enzephalitis-Virus, replizieren relativ gut in Zellkultur und haben auch zytotoxische Eigenschaften (Hilgard & Stockert 2000; Chambers *et al.* 1999; Guirakhoo *et al.* 2000). Da das Virus auch *in vivo* nur in sehr niedriger Rate repliziert, ist es zudem sehr schwierig, Viruspartikel in ausreichender Menge aus Serum von infizierten Zellen zu isolieren. Im Gegensatz zu zuvor beschriebenen Modellsystemen zur Untersuchung von Teilaspekten des viralen Lebenszyklus von HCV, wie dem Baculovirussystem (Baumert *et al.* 1998) oder retroviralen Pseudopartikeln (Bartosch *et al.* 2003a), sollte durch die Generierung von chimären Dengue-Hepatitis C Viruspartikeln die Viruspartikel und der Viruslebenszyklus so echt wie möglich nachgeahmt werden. Die Idee eines chimären Virus war diesbezüglich nicht neu. Beispielsweise wurde versucht, die Strukturproteine von HCV mit Gelbfiebervirus Replikons zu kombinieren (Molenkamp *et al.* 2003). Aber auch chimäre Viruskonstrukte aus Gelbfiebervirus und Japanischer Enzephalitis oder Gelbfiebervirus und Dengue Virus Typ2 wurden publiziert (Chambers *et al.* 1999; Guirakhoo *et al.* 2000). Bereits zuvor war es unserer Arbeitsgruppe gelungen ein funktionsfähiges chimäres Dengue-HCV Konstrukt (Konstruktnamen: DC 1.8) in den USA zu entwickeln, bei welchem die Nicht-Strukturproteine so wie das Gen, das für Core codierte, von Dengue stammten und die HCV Glykoproteine E1E2 und das p7 Protein die HCV Sequenzen repräsentierten. Dieses monozistronische Konstrukt war in der Lage, in Huh-7 Zellen zu replizieren und in geringen Mengen infektiöse chimäre Viruspartikel zu produzieren (unveröffentlichte Daten, Hilgard *et al.*).

Auf der Basis dieser Vorarbeiten sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein chimäres Konstrukt generiert werden, bei dem die Strukturproteine/-proteine komplett von HCV stammen sollten und die Nichtstrukturproteine von Dengue Virus. Mit dieser Konstruktion erhoffte man sich die Effizienz der Partikelbildung zu erhöhen. Insgesamt sah die Klonierungsstrategie vor, 4 verschiedene Fragmente zunächst nach Generierung durch PCR einzeln zu klonieren,

um sie anschließend hintereinander zu setzen. Hierbei gestaltete sich vor allem die Amplifikation aber auch die anschließende Klonierung der Dengue (DEN) Nichtstrukturgene als äußerst schwierig. Zum einen lag dies an der Länge des zu amplifizierenden Fragments von etwa 8kb. Die PCR musste speziell etabliert werden und es konnte in keinem der verschiedenen Ansätze ein wirklich sauberes Amplifikat generiert werden. Zudem waren die Dengue Sequenzen extrem instabil (Puri *et al.* 2000) und neigten zum Rearrangement ihrer Sequenzen in *E.coli*, was entweder zu Deletionen oder auch zu Insertionen führen könnte (Polo *et al.* 1997). Die Länge der Sequenzen verkomplizierte die Klonierung zusätzlich und trug zur Instabilität bei. Bis zum letztendlichen Gelingen der Klonierung waren alle erhaltenen Plasmid-DNA Fragmente nach Transformation und Minipräp zu klein. Wahrscheinlich wurde immer wieder ein Teil des Fragments nicht ligiert bzw. kloniert, weil er schon im Vorfeld beschädigt worden war oder fiel einer Rekombination in *E.coli* zum Opfer. Trotz dessen, dass a) alle Transformationen und Flüssigkulturen von *E.coli*, die Sequenzen von Dengue enthielten, bei 30°C kultiviert wurden, b) spezielle kompetente *E.coli* verwendet wurden, die für diese Art von Klonierung besonders geeignet sein sollten und c) ein Plasmid mit extrem niedriger Kopienzahl verwendet wurde, konnten offensichtlich nicht alle Rekombinationen unterdrückt werden.

Auch die Ligation dieses 8 kb langen Fragments in einen 2,8 kb großen Vektor gelang nicht auf Anhieb, was vermutlich an den stark differierenden Größen lag.

4.1.2 Funktionalität des Konstrukts

Als letztendlich die Klonierung des gesamten Konstrukts gelungen war, konnten erfolgreich *in vitro* RNA Transkripte generiert werden. Nach Elektroporation der RNA Transkripte in Huh-7 Zellen war es zunächst möglich, mit Hilfe von RT-PCR, RNA von HCV in den Huh-7 Zellen, sogar noch sechs Tage nach der Elektroporation, nachzuweisen. Dies deutete darauf hin, dass das Konstrukt in der Lage ist, zu replizieren. Vermutlich wäre die Fremd DNA nach sechs Tagen bereits degradiert worden. Aber es konnten keine HCV Proteine in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, was zumindest die Translation der Proteine gezeigt hätte. In Kooperation mit Herrn Dr. Wychowski am Institut de Biologie de Lille in Frankreich, wurde das Konstrukt *in vitro* mit Hilfe eines Vaccinia Virussystems auf seine Funktionalität getestet. Mit diesem System ist es möglich große Konstrukte, so wie das in dieser Arbeit entwickelte, *in vitro* zu transkribieren und zu translatieren. Anschließend können

die Lysate im WB hinsichtlich der zu erwartenden Proteine analysiert werden. Auch mit diesem Versuchssystem konnten keine HCV Proteine detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.3 Spezielle Fehlerquellen des chimären Konstrukts

Die EMCV-IRES Sequenz

Die Komplexität des Konstrukts barg genug Möglichkeiten um Fehler zu produzieren. Ein nahe liegender Gedanke war der oben schon erwähnte, dass die im Konstrukt enthaltene Dengue Sequenz rearrangiert wurde und somit die für die Funktionalität korrekte Sequenz nicht mehr vorhanden war. Auch die PCRs und Klonierungsschritte stellten eine Quelle für auftretende Mutationen dar. Ein wichtiger Faktor für eine effiziente Translationsinitiation ist die IRES Sequenz. Die *interne ribosomale entry site* initiiert eine *cap* unabhängige Translation in eukaryontischen Zellen. Auch das Hepatitis C Virus besitzt, im Gegensatz zu anderen Flaviviren, eine IRES Sequenz anstelle einer *cap* Struktur, um die Translation zu starten. Hier wurde die HCV eigene IRES Sequenz nun gegen die des Enzephalomyocarditis Virus ausgetauscht, da gezeigt werden konnte, dass diese Sequenz von allen getesteten IRES Sequenzen am effektivsten war (Borman *et al.* 1997). Die EMCV-IRES Sequenz ist aber gegenüber Veränderungen in der Sequenz, die das Startkodon ATG des zweiten Zistrons umgibt sehr empfindlich. Es könnte also sein, dass die Translation der nachfolgenden HCV Strukturproteine nicht ordnungsgemäß eingeleitet wurde. Zudem ist die verwendete Sequenz ein entscheidender Faktor. Bei der Generierung des Konstrukts und zwischendurch erfolgreichem „Trouble shooting“ fiel auf, dass es offensichtlich nicht eine speziell definierte EMCV-IRES Sequenz gibt, sondern verschiedene Varianten. Die hier verwendete (von der zugesichert wurde, dass sie funktioniert), unterschied sich in einigen Basenpaaren von der, die beispielsweise Clontech vertreibt. Auch stimmte sie nicht exakt mit der Sequenz aus einem befreundeten Labor überein. Die Sequenz ist aber extrem wichtig für eine optimale Translationsinitiation (Bochkov & Palmenberg 2006). Möglicherweise war die zur Verfügung stehende Sequenz für die Initiation der Translation des in dieser Promotionsarbeit angestrebten Konstrukts nicht geeignet oder gar fehlerhaft. Für ein funktionierendes HCV-Dengue Virus Chimär wäre es vielleicht auch vorteilhaft gewesen, die bestehende HCV IRES Sequenz zu benutzen, um möglichst nah an der nativen Sequenz zu bleiben und nicht durch die Klonierung für eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle zu sorgen. Diese sorgte auch für eine Veränderung der Sequenz zwischen EMCV-IRES und dem Startkodon von HCV.

Die Verknüpfung zwischen HCV p7 und Dengue NS1

Ein weiterer Punkt ist der Übergang von HCV p7 zu Dengue NS1. Direkt an die Sequenz, die für HCV p7 kodiert, schließt sich der Anfang von NS1 an, getrennt durch die BsiWI Schnittstelle. Heterologe Sequenzen können sowohl auf die virale Replikation und den Zusammenbau, als auch die Freisetzung der Partikel, Einfluss nehmen (Pietschmann *et al.* 2006). Zum einen ist hier also eine komplett artifizielle Sequenz eingefügt, die für zwei zusätzliche Aminosäuren im ORF des Polypeptids sorgt. Zum anderen sind für eine optimale co- bzw. posttranskriptionale Spaltung der einzelnen Proteine vom Polyprotein bestimmte Sequenzen notwendig, die als Signalsequenzen für die Spaltung dienen. Für Dengue Virus ist beschrieben worden, dass eine NS1 vorgelagerte 24 Aminosäuren lange Sequenz für die optimale und korrekte Spaltung von NS1 notwendig ist (Falgout *et al.* 1989). Hierfür ist zudem noch ein Teil des nachfolgenden NS2 Proteins essentiell. Dies dürfte aber nicht der Knackpunkt sein, da die komplette Dengue Nichtstruktursequenz kloniert worden war. Auch für die Spaltung des HCV Polyproteins sind bestimmte Signalsequenzen notwendig. Vermutlich war der kombinierte Übergang zwischen HCV p7 und Dengue NS1 zu artifiziell und verhinderte so eine korrekte Spaltung der Proteine. Allerdings ist beim oben beschriebenen DC 1.8 Konstrukt der p7-NS1 Übergang ähnlich kloniert worden und war in der Lage chimäre Partikel zu erzeugen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der DC 1.8 Klon als Positivkontrolle dienen. Es konnten jedoch keine HCV Proteine detektiert werden. Eine analytische Restriktion zeigte, dass das für diesen Klon charakteristische Bandenmuster noch intakt war. Dies deutet darauf hin, dass diese Sequenzen extrem anfällig für Mutationen sind und somit die Generierung von Proteinen oder gar chimären Partikeln erschwerten. Für das im Rahmen dieser Arbeit generierte Konstrukt kann es auch bedeuten, dass zu viele Mutationen durch PCR, die Klonierungsschritte und die Instabilität der Dengue Sequenzen aufgetreten sein könnten.

Im Gegensatz zum DC 1.8 Konstrukt, wurden in diesem Fall die kompletten Strukturgene von HCV kloniert. Bei DC 1.8 stammt die Sequenz für Core von Dengue. Möglicherweise war diese Kombination im Sinne eines chimären Konstrukts ideal, wohingegen die kompletten Strukturgene in Kombination mit den Dengue Genen, die Bildung von HCV Proteinen inhibierten. Bis zur Publikation des HCVcc (Blanchard *et al.* 2006) gab es keine funktionierende HCV Sequenz, die vollständig in Zellkultur replizierte und auch neue infektiöse Viruspartikel bildete. Dieser Klon ist aber eine Genotyp 2 Sequenz. Bei einem Versuch, Teile der JFH1 Sequenz durch Sequenzen zu ersetzen, die für die Strukturgene von anderen HCV Genotypen kodieren, wurde die Entdeckung gemacht, dass die Position des

Übergangs zwischen der JFH1 und der Sequenz anderer Genotypen ausschlaggebend ist (Pietschmann *et al.* 2006). Das heißt selbst bei inter- bzw. intragenotypischen Chimären ist die Kombination der Sequenzen für die Replikation und die Entstehung infektiöser Partikel entscheidend.

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung des chimären Konstruktes wurde das Zellkultursystem (HCVcc) publiziert. Die Weiterverfolgung dieses Projektes, das chimäre und nicht native Viruspartikel erzeugt hätte, ist daher eingestellt worden.

4.2 Aufreinigung von rekombinantem HCV E1E2

4.2.1 Aufreinigung mittels 6 x His-Tag

Das Glykoprotein von HCV E1E2 repräsentiert den Teil des Virus, der für die Infektion der Zielzelle verantwortlich ist. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte ein eigenes Modellsystem etabliert werden, mit dem es dann möglich sein sollte, neue potentielle Liganden bzw. Rezeptoren für HCV zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierbei sollte das vollständige HCV E1E2 Heterodimer, fusioniert an einen 6 x Histidin-Tag (His-Tag) kloniert werden. Der His-Tag sollte die Aufreinigung der HCV E1E2 Heterodimere mittels immobilisierter Metall Ionen Affinitätschromatographie ermöglichen.

Auch von anderen Gruppen sind verschiedene Modellsysteme entwickelt worden, um die Eigenschaften des Glykoproteins zu charakterisieren und um putative Interaktionspartner von HCV zu identifizieren. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die lösliche Form von HCV E2, generiert durch Trunkierung an der Aminosäure 661 (E₆₆₁), eine vergleichbare Faltung des Glykoproteins aufweist, wie das *Full-length* Glykoprotein und daher als lösliches Imitat des nativen Glykoproteinkomplexes benutzt wurde (Flint *et al.* 1999; Michalak *et al.* 1997). Das trunkierte, lösliche E2 bot gegenüber in Zellen exprimiertem „Full-length E2“ den Vorteil, dass es relativ einfach produziert werden konnte, da es in den Zellkulturüberstand sezerniert wurde.

Tatsächlich wurde CD81, als ein an der Aufnahme von HCV beteiligtes Rezeptormolekül, mit Hilfe von löslichem E2 identifiziert (Pileri *et al.* 1998). Auch für die Entdeckung von SR-BI als Rezeptormolekül für HCV wurde mit löslichem E2 bewerkstelligt (Scarselli *et al.* 2002).

HCV E2 ist für einige Studien auch aufgereinigt worden. Hierzu wurden verschiedene Strategien verfolgt. Beispielsweise wurde HCV E2 als lösliches E2 mit einem C-terminalen 6 x Histidin Tag kloniert und das E2 Protein aus dem Zellkulturmedium mittels Ni-NTA

Chromatographie isoliert (Patel *et al.* 2000). Eine weitere Gruppe beschreibt die Expression von HCV E2 in Sf9 Insektenzellen nach Infektion mit einem rekombinanten Baculovirus und die nachfolgende Aufreinigung über einen fusionierten Glutathion S-Transferase Tag (Chan-Fook *et al.* 2000). Für funktionale Assays ist die Expression in *E.coli* nicht sinnvoll, da in *E.coli* die notwendigen Co- bzw. posttranslationalen Modifikationen, welche von eukaryontischen Zellen vollzogen werden, nicht stattfinden.

Es sollte die vollständige Sequenz für das E1E2 Heterodimer kloniert werden, um HCV E2 bzw. E1E2 in möglichst nativer Form zu exprimieren. Die bereits veröffentlichte trunkierte Variante, bei der HCV E2 ins Medium sezerniert wird, kam nicht in Frage, da sie für funktionale Studien nicht geeignet ist (Cocquerel *et al.* 2003a). Die Klonierung und anschließende Expression in 293HEK Zellen gelang und die Immunpräzipitation mit dem konformationssensitivem Antikörper CBH-2 (Cocquerel *et al.* 2003b) zeigte, dass das exprimierte Protein das native E1E2 Heterodimer repräsentierte. Jedoch war eine Aufreinigung von HCV E1E2 nur unzureichend möglich. Als erstes wurde die HisTrap HP Säule von GE Healthcare ausprobiert. Diese Säule versprach, diejenige mit den besten Bindungseigenschaften unter allen kommerziell erhältlichen Säulen zu sein und zudem garantierte sie ein sehr reines Protein nach Elution. Das HCV E2 Glykoprotein konnte mit einem spezifischen Antikörper gegen HCV E2 zwar in Eluaten der E1E2 transfizierten Zellen im Western Blot detektiert werden, in den Eluaten der naiven Zellen jedoch nicht. Bei Verwendung eines Antikörpers gegen den His-Tag konnte dagegen auch in den nicht-transfizierten Zellen eine Bande detektiert werden, die sich auf der gleichen Höhe befand, wie die Bande bei den transfizierten Zellen. Hieraus konnten mehrere Punkte gefolgert werden: Erstens, dass zelleigene Histidin-haltige Proteine mit einem offensichtlich ähnlichen Molekulargewicht, wie das His-getagte HCV E1E2 Protein an die Säulenmatrix binden und zweitens diese Proteine bei der gleichen Imidazolkonzentration eluieren und somit das Eluat verunreinigen. Die Analyse der Eluate im Coomassie Gel bestätigte dieses Ergebnis und zeigte zudem, dass auch die Eluate, die das E1E2 Protein enthielten mit vielen anderen Proteinen der Zelle, unterschiedlicher Größe, verunreinigt waren. Es konnte außerdem keine sich davon abhebende starke Bande angefärbt werden, die die eluierten HCV E1E2 His-Tag Komplexe repräsentierte. Das bedeutet, dass die HCV Proteine zwar exprimiert werden und auch so stark exprimiert werden, dass man im Western Blot ein sehr gutes Signal erhält (20 µl aus 1 ml Eluat wurde auf das Gel aufgetragen), jedoch scheint die Menge nicht ausreichend zu sein, um sich aus dem Gesamtproteingemisch abzuheben. Um gebundene, unspezifische Proteine besser von der Säule vor der eigentlichen Elution zu entfernen, wurde mit einer

Imidazolkonzentration im Waschpuffer gewaschen, die knapp unter der Imidazolkonzentration lag, bei der Das HCV E1E2 Protein eluierte. Sowohl dieses Vorgehen als auch die anderen im Ergebnisteil beschriebenen Strategien führten nicht zum Erfolg. Es lässt sich vermuten, dass sich der His-Tag in diesem Fall nicht für eine spezifische Aufreinigung eignet. Rücksprache mit mehreren technischen Diensten verschiedener Firmen bestätigten den Verdacht, dass zelleigene Histidin haltige Proteine sehr oft ein Problem für eine saubere Isolation darstellen können (aber nicht müssen).

4.2.2 Alternatives HCV E1E2 Konstrukt und Aufreinigung von HCV E2

Zusätzlich zu den im Ergebnisteil verwendeten Methoden wurde die HCV Sequenz in einen Vektor mit einem His-Tag und einem zusätzlichen Strep-Tag kloniert, um eine Isolierung über eine doppelte Affinitätschromatographie zu versuchen. Der Strep-Tag ermöglicht eine Aufreinigung über eine Streptactin Matrix. Eine gelungene Klonierung *in frame* mit dem Strep-Tag und dem His-Tag in den neuen Vektor wurde durch Sequenzierung belegt. In diesem Fall konnte der Strep-Tag, bei Analyse von Zelllysaten von transfizierten Zellen, im Western Blot nicht eindeutig detektiert werden. Auch war die Expression in den Zellen nicht so gut, wie in dem zuvor verwendeten System. Eine Analyse der Aufreinigung zeigte, dass das Protein nicht an die Streptactin Säule band, sondern in den Waschfraktionen detektiert wurde. Der Vektor eignete sich zumindest in dem vorliegenden System nicht gut für eine Expression in 293HEK Zellen. Außerdem schien der Strep-Tag sich nicht ordentlich zu falten bzw. war möglicherweise nicht exponiert genug, um an die Säulenmatrix zu binden. Für den Western Blot wurde ein Harnstoff haltiges SDS-Gel benutzt, so dass also stark denaturierende Bedingungen herrschten. Der Strep-Tag hätte also, selbst bei schlechter Exposition im nativen Zustand, detektiert werden müssen.

Das aufgereinigte, rekombinate HCV E2 Protein hätte dazu dienen sollen, neue potentielle Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen für HCV zu identifizieren. Das isolierte Protein sollte in aufgereinigter Form an eine Säulenmatrix, z.B. über den His-Tag an Ni-NTA gekoppelt werden und anschließend Zell-Lysate auf die Säule gegeben werden. Die anschließenden Eluate hätten dann durch SDS-PAGE separiert werden, die Banden ausgeschnitten und durch MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) analysiert und identifiziert werden können. Auf diese Weise konnten auch HSP70 und HSP90 als neue Rezeptoren für Dengue Virus entdeckt werden (Reyes-Del *et al.* 2005).

4.3 Einfluss von IFN- α und anti-inflammatorischen Zytokinen auf die Infektion mit HCV Pseudopartikeln

4.3.1 HCVpp als Modellsystem für die Untersuchung der ersten Schritte der Infektion nach Stimulation mit Zytokinen

Die antiviralen Eigenschaften von Interferon bestehen in der Induktion von IFN- α stimulierten Genen (ISGs), die einen nicht-Virus-spezifischen, antiviralen Status innerhalb der Zelle schaffen (Bekisz *et al.* 2004; Sen 2001). Zusätzlich zu diesen „direkten“ antiviralen Eigenschaften interagiert IFN- α mit dem adaptiven und angeborenen Immunsystem (Tilg 1997). IFN- α verhindert also möglicherweise „Immunerschöpfung“ und erleichtert die HCV spezifische Immunantwort (Lechner *et al.* 2000b).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Therapieerfolg nicht nur mit der Unterdrückung des Replikationszyklus des Virus nach Infektion der Zielzelle zu tun hat, sondern möglicherweise auch Mechanismen angeschaltet werden, die bereits die initiale Infektion der Zelle beeinflussen und so den Infektions/Re-Infektionszyklus des Virus unterbrechen. Um die Auswirkungen auf die HCV Aufnahme nach Behandlung von Zellen mit IFN- α zu untersuchen, wurden HCV Pseudopartikel als Modellsystem benutzt. Diese bestehen aus einem replikationsdefizienten Retrovirus (MLV = murines Leukämievirus), das auf seiner Oberfläche HCV E1E2 Glykoproteine trägt. Mit den Pseudopartikeln ist es möglich die ersten, initialen Schritte der HCV Infektion zu untersuchen, da das E1E2 Heterodimer die Anheftung (*attachment*) an die Zielzelle und den Eintritt (*entry*) in die Zielzelle über spezifische Rezeptoren vermittelt. Da die E1E2 Proteine die einzigen Komponenten in den Pseudopartikeln sind, die vom HCV stammen, können ausschließlich die ersten Schritte der Infektion (das so genannte *Entry*) analysiert werden. Als Quantifizierung für die Infektion diente entweder ein Luziferase oder ein Realtime PCR basierter Assay. Bei der Etablierung der Versuche wurde sehr schnell klar, dass der Luziferase-Assay zumindest dann nicht angewendet werden konnte, wenn die Zielzelle in irgendeiner Form manipuliert worden war, so dass sich dies auf die Proteinexpression in der Zelle auswirkte. Dies war z.B. bei der Stimulation mit den Zytokinen der Fall. In diesem Fall wurde der Versuch mit dem PCR basierten Assay ausgewertet. Da die Zellen bereits 4 Stunden nach Infektion lysiert wurden, war hier der Gedanke, dass die erhaltenen Ergebnisse die Ereignisse des Entry zeitnah widerspiegeln.

4.3.2 Eine neue Rolle für IFN- α in der HCV Abwehr?

Die Behandlung der Huh-7 Zellen mit IFN- α führte zu einer verringerten Detektion an LTRs, was in dieser Arbeit mit verringerter HCVpp Aufnahme gleichgesetzt wurde. Bei diesem Resultat lag die Vermutung nahe, dass IFN- α möglicherweise auch Moleküle beeinflusst, die sich auf der Zelloberfläche befinden und an der Aufnahme von HCVpp in die Zelle beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Tetraspanninmolekül CD81, das tight junction Molekül Claudin-1 und der Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) untersucht. Tatsächlich bewirkt IFN- α eine starke Abnahme der Expression von Claudin-1 sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf Proteinebene. CD81 veränderte sich nur unwesentlich durch IFN- α in seiner Expression. Bei SR-BI gestaltete sich die Auswertung der Ergebnisse schwierig, da entweder keine Veränderung zu sehen war oder sich die Expression zu bestimmten Zeitpunkten innerhalb einer Messreihe veränderte. Vor allem auf Genexpressionsebene, die mit Realtime PCR ausgewertet wurde, ergaben drei voneinander unabhängige Messungen drei verschiedene Ergebnisse. Entweder eine leichte Zunahme der Expression bis zur Verdopplung oder keine Veränderung oder eine Abnahme der Expression. Da tendenziell eher „keine Veränderung“ zutraf, wurden diese Daten für den Ergebnisteil ausgewählt. Die Expression von SR-BI könnte möglicherweise abhängig von der Passage der Zellen oder der Konfluenz sein.

Die reduzierte Expression eines wichtigen Rezeptormoleküls für HCV könnte also eine neu entdeckte Ursache für die Wirkung von IFN- α sein. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass IFN- α wahrscheinlich auch die neue Infektion von Zielzellen unterdrückt oder zumindest verringert. Die Entdeckung, dass die Expression von Claudin-1 unter IFN- α abnimmt könnte ein wichtiger Faktor in der Wirkungsweise von IFN- α sein. Bisher wurden nur die antiviralen Mechanismen von IFN- α innerhalb der Zelle untersucht und auf welche Weise HCV den IFN Signalweg unterbricht.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang, wie sich die Claudin-1 Expression in Leberzellen von Patienten mit gutem Therapieerfolg (responder) und Patienten mit schlechtem Therapieerfolg (non-responder) verhält. Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt wäre, Huh-7 mit IFN- α zu stimulieren und anschließend mit dem kürzlich entwickelten Zellkultursystem (HCVcc) zu infizieren.

Es wurde versucht einen Bindungsassay zu etablieren, der die Charakterisierung der initialen Bindung unter IFN- α (und auch den anderen Zytokinen, siehe unten) ermöglichen sollte. Es konnte aber kein verwertbares Ergebnis erzielt werden. Bei dem auf WB basierendem Assay

konnte kein HCV E1 oder E2 Protein nachgewiesen werden, selbst bei einer maximal eingesetzten Proteinmenge von 55 – 60 µg. Vermutlich sind die HCV E2 Proteinmengen in den Pseudopartikeln so gering, dass sie im WB nicht detektierbar sind. Es wurde auch versucht, die Pseudopartikel in der Immunfluoreszenz 4 Stunden nach Infektion anzufärben. Auch hier war kein HCV E2 nachweisbar, was vermutlich ebenfalls auf eine zu geringe Proteinmenge zurückzuführen ist.

4.3.3 Indirekte Regulation der Claudin-1 Genexpression durch IFN- α

Durch quantitative Realtime PCR konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von Claudin-1 bei Stimulation mit IFN- α bereits nach 6 Stunden Stimulation um etwa 50 Prozent abnimmt. Diese verringerte Expression bleibt auch bei verlängerter Stimulation erhalten. Da bereits die Genexpression betroffen ist, lässt dies auf eine direkte Einflussnahme von IFN- α auf die Genregulation von Claudin-1 schließen. Möglich wäre auch eine indirekte Beeinflussung über den Faktor oder Signalweg, der an der Genregulation von Claudin-1 beteiligt ist. In einer systematischen Proteomanalyse, bei der die IFN-Antwort in humanen Leberzellen untersucht wurde, fiel auf, dass WNT9A, ein Molekül im Wnt Signalweg, eine 3,2 fach erniedrigte Expression nach IFN- α Stimulation zeigte (Yan *et al.* 2004). Für Claudin-1 wiederum konnte gezeigt werden, dass seine Genexpression durch den Wnt-Signalweg reguliert wird (Hillenbrand 2005). Dies könnte also ein potentieller indirekter Regulationsweg für die Claudin-1 Expression unter IFN- α sein.

4.3.4 Die CD81 Expression verändert sich in Huh-7 Zellen durch IFN- α nicht

CD81 ist ein wichtiges Molekül für die Infektion mit HCV. Es ist das erste Molekül, für das eine Interaktion mit HCV E2 gezeigt werden konnte (Pileri *et al.* 1998). CD81 gehört zur Familie der Tetraspanninmoleküle, deren Mitglieder verschiedene zelluläre Funktionen ausüben, wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung (Levy & Shoham 2005). In der vorliegenden Arbeit veränderte sich sowohl auf der Zelloberfläche von den Huh-7 Zellen als auch auf mRNA Ebene, die CD81 Expression nicht signifikant. In einer Veröffentlichung von Kronenberger *et al.* (2001) konnte dagegen bei primären Hepatozyten und PBMNCs gezeigt werden, dass die CD81 Expression auf der Zelloberfläche bei Stimulation mit IFN- α herunter reguliert wird. Die mRNA Expression dagegen stieg an. Dies wurde damit begründet, dass die Herunter-Regulation des CD81 Proteins erst auf posttranskriptionaler bzw. translationaler

Ebene stattfindet (Kronenberger *et al.* 2001). Auch für B-Zellen konnte eine verminderte CD81 Expression auf der Zelloberfläche beobachtet werden (Chang *et al.* 2007). Bei allen untersuchten Zellen handelt es sich allerdings um Primärzellen im Gegensatz zu Huh-7 Zellen, die eine Hepatomzelllinie darstellt. In Huh-7 Zellen kann der Mechanismus, der in den Primärzellen dafür verantwortlich ist, dass die Zelloberflächen assoziierte Expression von CD81 verringert wird, gestört sein. Auch ein Anstieg der mRNA konnte nicht gemessen werden, was vermutlich auch an den veränderten Eigenschaften der Tumorzelllinie liegt.

In Anbetracht der Tatsache, dass CD81 offensichtlich nicht nur im Zusammenhang mit der HCV Infektion ein wichtiges Rezeptormolekül repräsentiert sondern auch in die Interaktionen zwischen Wirt und HCV involviert ist, wäre es dringend notwendig die Experimente, die in parallel mit Claudin-1 und SR-BI gelaufen sind, mit primären Hepatozyten zu wiederholen. Interessant wäre auch, wie sich diese Moleküle auf bereits infizierten Zellen verhalten. Für solche Untersuchungen würde sich das neue Zellkultursystem (HCVcc) eignen.

4.3.5 IL-10 und TGF- β verstärken die Infektion mit HCVpp

Die exakten Mechanismen, wie HCV seine Persistenz etabliert und aufrechterhält, was wiederum Leberschädigungen und Modulationen der Immunantwort zur Folge hat, sind bisher nur unzureichend untersucht. Mögliche Ursachen für eine chronisch verlaufende Infektion sind das geringe Vorhandensein von HCV spezifischen T-Zellen (Lechner *et al.* 2000a; Wedemeyer *et al.* 2002) und die Unterdrückung von IFN- γ sekretierenden natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) durch IL-10 (Moore *et al.* 2001) oder auch TGF- β (Rook *et al.* 1986). Dagegen geht eine Viruselimination (viral clearance) bei akuter Hepatitis C mit einer erhöhten Population an CD8⁺ als auch CD4⁺ T Lymphozyten (Diepolder *et al.* 1995; Gerlach *et al.* 1999) einher. Für eine effiziente Viruselimination ist außerdem die Produktion von IFN- γ ein entscheidender Faktor (Su *et al.* 2002). IFN- γ wird von NK-Zellen produziert und ihre Proliferation und Zytotoxizität ist ein kritischer Faktor für die Viruselimination (Biron *et al.* 1999). Aufgrund der Tatsache, dass IL-10 (Moore *et al.* 1993) und auch TGF- β (Rook *et al.* 1986) beide die Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen inhibieren können wurde postuliert, dass diese Unterdrückung der Zytotoxizität von NK-Zellen zu einer persistierenden HCV Infektion beiträgt (Kimura *et al.* 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob IL-10 und TGF- β auch bei den initialen Schritten der HCV Infektion eine Rolle spielen, indem sie Einfluss auf die Zielzelle nehmen. Eine Analyse in dieser Art, bei welcher der direkte Einfluss von IL-10 und TGF- β auf HCVpp

(und auch HCV_{cc}) infizierbare Zellen untersucht wird, ist in dieser Form noch nicht veröffentlicht worden. Wichtig war es herauszufinden, ob diese Zytokine zur Aufrechterhaltung der Infektion beitragen, indem sie „nur“ die Immunantwort modulieren oder ob sie auch die Infektion der Zielzelle begünstigen, indem sie die Zelloberflächenrezeptoren, die an der Aufnahme von HCV beteiligt sind, verändern. Bisher erhaltene Daten zur Funktion von IL-10 und TGF- β stammen beispielsweise aus Leberbiopsien oder PBMNCs chronisch erkrankter Patienten.

In der vorliegenden Arbeit führte eine Stimulation der Huh-7 Zellen sowohl mit IL-10 als auch mit TGF- β zu einer vermehrten Detektion an HCVpp in den Zellen. Auch die Aufnahme der VSV-Gpp erhöhte sich, wenn auch nicht so stark, wie die der HCVpp. Genauso wie bei den Experimenten mit IFN- α wurde hier untersucht, ob IL-10 oder TGF- β die Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI veränderten. IL-10 hatte keinen Einfluss auf eines der Moleküle. TGF- β hatte in einigen Versuchen die Expression von SR-BI ansteigen lassen. Dies könnte ein möglicher Faktor für die verstärkte Infektion mit HCVpp sein. Die Expression eines wichtigen Rezeptormoleküls steigt an und somit verbessert sich auch die Infektion. Die erhöhte TGF- β Expression würde nicht nur eine anhaltende HCV Infektion durch Modulation der Immunantwort fördern, sondern auch die Virusvermehrung durch eine erleichterte Zielzellinfektion.

4.3.6 Lücken und Tücken: HCVpp und Huh-7 Zellen (Limitationen des verwendeten Modellsystems)

Ein nicht zu vernachlässigender Punkt ist, dass es sich bei den Huh-7 Zellen um eine Hepatomzelllinie, also eine Tumorzelllinie handelt. Inwieweit diese tatsächlich eine native Leberzelle widerspiegelt, bleibt fraglich. Durch die Entartung können auch entscheidende Signaltransduktionswege gestört oder verändert sein. Ein guter Ansatzpunkt wäre, humane primäre Hepatozyten oder auch andere humane Primärzellen aus der Leber auf eine vorhandene und möglicherweise auch aufgrund von Zytokin-Einfluss veränderte Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI zu untersuchen.

Zudem darf nicht vergessen werden, dass es sich bei den HCVpp um ein Modellsystem handelt, bei welchem die einzige Komponente, die von HCV stammt das HCV Glykoprotein ist, das die Infektion vermittelt. Alle weiteren Prozesse in der Zelle, die Freisetzung des Inhalts der Partikel, die reverse Transkription und die Integration der Luziferase-Sequenz, mit Hilfe der LTRs beruhen auf den retroviralen Komponenten des Pseudopartikels. Zwar wurden

die Zellen bereits vier Stunden nach Kontakt mit den Pseudopartikeln lysiert, jedoch reichte diese Zeit vermutlich aus, damit die durch INF- α angeschalteten, antiviralen Mechanismen auf die in der Zelle freigesetzte RNA Einfluss nehmen konnten. Somit könnten die beobachteten Effekte nicht allein auf eine verringerte Aufnahme der Partikel zurückzuführen sein, sondern auch andere Effekte beteiligt sein.

4.4 CEACAM1 als potentieller Rezeptor von Hepatitis C

CEACAM1 ist ein homophiles, multifunktionales Zelladhäsionsmolekül, das in eine Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen, wie beispielsweise Proliferation (Singer *et al.* 2000), Tumorwachstum (Kunath *et al.* 1995) oder der Aktivierung von B-Zellen (Greicius *et al.* 2003) im menschlichen Körper involviert ist. Einigen Pathogenen dient CEACAM1 als Rezeptormolekül, um Zellen zu befallen. Bei Menschen handelt es sich hierbei um verschiedene Bakterien, wie *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria spec*, *Haemophilus influenzae* (Singer 2005). In Mäusen ist CEACAM1 als entscheidender Rezeptor für das Maus Hepatitis Virus (MHV) identifiziert worden (Dveksler *et al.* 1991). Eine Kreuzreaktion der jeweiligen Pathogene wurde ausgeschlossen.

Da CEACAM1 ein Zelloberflächenmolekül darstellt und bekannt ist, dass es für das murine Hepatitis Virus den entscheidenden Rezeptor darstellt, lag der Gedanke nahe, dass CEACAM1 auch bei den ersten Schritten der HCV Infektion möglicherweise eine Rolle spielt. Als Modellsystem für die Untersuchungen des HCV Eintritts in die Zelle (*HCV Entry*) wurden HCV Pseudopartikel verwendet. Die Quantifizierung der Infektion erfolgte entweder durch Luziferase Assay oder mit dem PCR basierten Assay.

4.4.1 CEACAM1 Expression auf Huh-7 Zellen, HepG2 Zellen und primären Hepatozyten

CEACAM1 wird im adulten Organismus auf verschiedenen Epithelien unterschiedlicher Organe exprimiert (Prall *et al.* 1996). Auch Zellen des Immunsystems exprimieren CEACAM1 (Greicius *et al.* 2003; Kammerer *et al.* 2001; Moller *et al.* 1996). Da über das Expressionsprofil von CEACAM1 und anderer CEACAMs auf Leberzellen nichts bekannt war, wurden Huh-7 Zellen, HepG2 Zellen und auch primäre Hepatozyten bezüglich ihrer CEACAM Expression charakterisiert. Alle drei Zellarten exprimieren ausschließlich CEACAM1. CEACAM1 konnte sowohl auf der Zelloberfläche (Durchflusszytometrie), als auch auf Gesamtproteinebene (Western Blot) nachgewiesen werden. Da das Hauptaugenmerk

auf den initialen Schritten der HCV Infektion lag, wurden alle weiteren Experimente zunächst nur auf Huh-7 Zellen beschränkt und nicht noch in parallel mit den HepG2 Zellen oder primären Hepatozyten durchgeführt. HepG2 sind weder durch die HCV Pseudopartikel noch durch HCVcc infizierbar. Ihnen fehlt CD81, ein wichtiges Molekül für die Infektion mit HCV. Mit primären Hepatozyten wurde nicht weiter gearbeitet, da sie nur extrem limitiert zur Verfügung standen.

4.4.2 CEACAM1 als IFN- α reguliertes Gen

Durch IFN- α wurde sowohl die Expression von CEACAM1 auf der Zelloberfläche als auch die mRNA Expression deutlich gesteigert. Dabei war die induzierte CEACAM1 Expression auf der Zelloberfläche nach 48 Stunden am größten. Die Expression der mRNA stieg dagegen bereits nach 6 Stunden IFN- α Stimulation an und blieb danach in ihrer Expression konstant. Dies deutet darauf hin, dass die Translation und das „an die Oberfläche bringen“ von CEACAM1 in den Huh-7 Zellen ein relativ langsamer Prozess ist. Aufgrund der Tatsache, dass bereits nach 6 Stunden die mRNA Expression 2,5 fach verstärkt ist, beeinflusst IFN- α direkt oder über einen indirekten Faktor die Transkription von CEACAM1.

4.4.3 Die Rolle von CEACAM1 bei der HCV Infektion

Mit Hilfe von siRNA Transfektion konnte die CEACAM1 Expression bis zu einem gewissen Grad inhibiert werden. Dies führte dazu, dass die Infektion mit den HCVpp um ein etwa dreifaches verstärkt werden konnte. CEACAM1 könnte also ein wichtiger Faktor bei der initialen Abwehr der Infektion spielen. Dies passt auch zu der Beobachtung, dass bei einer Inkubation der Huh-7 Zellen mit IFN- α über 48 Stunden, die Infektion mit den HCVpp supremiert wird. Denn nach 48 Stunden war auch die CEACAM1 Expression auf der Zelloberfläche signifikant angestiegen.

Interessanterweise wurde von Blanchard *et al.* (2006) berichtet, dass die Infektion mit HCVpp etwa dreimal höher in PLC/PRF/5 Zellen war als in Huh-7 Zellen. Diese PLC/PRF/5 Zellen wiederum exprimieren, zumindest auf ihrer Oberfläche; kein CEACAM1 (Hokari *et al.* 2007). Diese Tatsachen unterstützen die Hypothese, dass CEACAM1 an der Abwehr der HCV Infektion beteiligt ist. Man könnte also zu folgender Aussage kommen: viel CEACAM1 auf der Zelloberfläche bewirkt eine verringerte Infektion mit HCVpp, wenig bzw. kein CEACAM1 auf der Zelloberfläche verstärkt die Infektion mit HCVpp.

Möglicherweise moduliert CEACAM1 die Zusammensetzung der Plasmamembran zu einem Status der sich ungünstig auf die Infektion mit HCV auswirkt. Oder CEACAM1 geht eine Verbindung mit anderen für die Infektion mit HCV wichtigen Molekülen ein und vernetzt auf diese Weise Strukturen, die für die Anheftung des Virus an die Zelle notwendig sind und macht sie auf diese Weise für das Virus schlecht oder gar nicht zugänglich.

Mit Hilfe verschiedener Versuchsansätze wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, eine direkte Interaktion von CEACAM1 und HCV E1E2 Heterodimer zu zeigen. Jedoch konnte in keinem der Experimente eine direkte Interaktion zwischen dem HCV Glykoprotein und CEACAM1 nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob CEACAM1 einen Bindungspartner von HCV E1E2 darstellt, ist eine Immunpräzipitation durchgeführt worden. HCV E2 wurde durch CEACAM1 nicht präzipitiert. Allerdings konnte für SR-BI und HCV bis jetzt auch keine direkte Interaktion gezeigt werden, obwohl SR-BI nachweislich in die Aufnahme von HCV in die Zelle involviert ist. In diesem Fall wurde ebenfalls die Immunpräzipitation gewählt. Das Ergebnis wurde unter anderen darauf zurückgeführt, dass SR-BI möglicherweise in Anwesenheit von Detergenz in einer Konformation vorliegt, die nicht mit der E2 Bindung kompatibel ist (Cocquerel *et al.* 2006). Dieser Fall wäre für CEACAM1 und HCVpp auch denkbar. Das negative Ergebnis der Immunpräzipitation schließt also eine Interaktion nicht kategorisch aus. Aber auch die anderen Versuche, die zur Analyse der Funktion von CEACAM1 für die HCV Infektion dienen sollten, erzielten keine eindeutigen bzw. widersprüchliche Ergebnisse.

Eine Blockierung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche von Huh-7 Zellen sollte das durch den Gen Knock-down erzielte Ergebnis bestätigen. Durch die Vor-Blockierung von CEACAM1 konnte eine erhöhte Infektion mit den VSV-Gpp erzielt werden, unabhängig von der Art der Blockierung, was das Ergebnis aus dem Gen Knock-down bestätigte. Die Inkubation mit den HCVpp nach Antikörper-Blockierung führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Blockierung der C-Domäne mit dem anti -B3 Antikörper hatte keinen Effekt auf die Infektion. Dies könnte darauf hindeuten, dass die C-Domäne des Moleküls für die Funktion gegenüber HCV nicht von Bedeutung ist, zumal alle bisher bekannten Interaktionen von CEACAMs mit Liganden durch die N-Domäne vermittelt wird. Die Inkubation mit einem polyklonalem Antikörper gegen CEACAM1 hingegen führte zu einer verringerten Detektion an HCVpp von über 50 Prozent. Auch die Inkubation mit dem CEACAM8-Fc Konstrukt als natürlichem Liganden von CEACAM1 führte zu einer geringeren Detektion an HCVpp. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den mit Gen Knock-down erzielten Daten. Im Unterschied zum CEACAM1 Gen Knock-down, der auch zu einer verringerten Expression

von CEACAM1 auf der Zelloberfläche führte, ist bei der Blockierung nicht weniger CEACAM1 auf der Zelloberfläche. Möglicherweise bewirkt die Verbindung von Antikörper mit CEACAM1 eine Vernetzung von Strukturen oder anderen Interaktionspartnern von CEACAM1 auf der Zelloberfläche, die die Anheftung der HCVpp oder deren Eintritt in die Zelle verschlechtert. Die Zugabe von Antikörper könnte eine Reorganisation und Klusterbildung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche hervorrufen, die die Anheftung und den Eintritt der HCVpp negativ beeinflussen. Als Folge der Antikörperbindung könnte sich auch das Verhältnis der beiden Isoformen 1-4L (4L= vier extrazelluläre, Ig-artige Domänen, Transmembrandomäne plus langer zytoplasmatischer Anteil) und 1-4S (4S= vier extrazelluläre, Ig-artige Domänen, Transmembrandomäne plus kurzer (short) zytoplasmatischer Anteil) (Abb. 4.1) ändern, was wiederum die Signalweiterleitung in der Zelle verändern könnte. Die jeweilige vorherrschende Isoform kann für bestimmte regulatorische Funktionen in der Zellen ausschlaggebend sein (Singer *et al.* 2000).

4.4.4 Überexpression von CEACAM1 in Huh-7 Zellen

Durch die Transfektion von einem für CEACAM1 codierenden Plasmid in Huh-7 Zellen sollte eine Überexpression von CEACAM1 vor allem auf der Zelloberfläche erreicht werden. Leider konnte keine vermehrte Expression von CEACAM1 auf der Zelloberfläche erzielt werden, obwohl die Expression von CEACAM1 innerhalb der Zelle sehr stark anstieg, was im Western Blot gezeigt werden konnte. Auch eine Inkubation mit PMA führte nicht zur Expressionssteigerung an der Zelloberfläche. Möglicherweise tolerieren Huh-7 Zellen nur eine definierte Anzahl an CEACAM1 Molekülen auf ihrer Oberfläche. Eine andere Ursache könnte ein gestörter Transportweg der in Granula vorliegenden (über)exprimierten CEACAM1 Moleküle sein, so dass die Moleküle nicht an die Zelloberfläche gelangen konnten. Schon allein die Tatsache, dass es sich um eine Hepatomzelllinie und damit um eine entartete Zelllinie handelt, kann einen inhibierten Transportweg zur Folge haben. Zwar nimmt die CEACAM1 Expression durch IFN- α auch an der Oberfläche zu, jedoch nicht in einer so großen Menge, wie es die Überexpression bewirkt hätte. Zudem hat es sich bei der IFN- α um einen physiologischen Stimulus gehalten, der den gesamten Status der Zelle verändert.

Ein weiteres Problem bei diesem Experiment zeigte sich anhand der Mock-Transfektion. Der in der Realtime PCR gemessene Wert war in allen durchgeführten Experimenten fast identisch mit dem der CEACAM1 transfizierten Zellen. Sowohl die Mock-Transfektion als auch die Transfektion mit dem CEACAM1 Plasmid führte zu einer starken Erhöhung der

Infektion. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich also keine Aussage über die Auswirkung einer erhöhten CEACAM1 Expression treffen. Erstens war die Expression an der Oberfläche nicht erhöht und zweitens scheint die Transfektion als solche bzw. die Expression eines Plasmids ohne spezielles Insert („Mock-Plasmid“) schon starke Effekte auf die Infektion mit den Pseudopartikeln zu haben.

Der Effekt von vermehrten CEACAM1 Molekülen auf der Zelloberfläche kann folglich nicht allein für die erhöhte Infektionsrate verantwortlich sein. Durch IFN- α Stimulation über 48 Stunden nimmt die Expression an CEACAM1 Molekülen auf der Oberfläche der Huh-7 Zellen zu. Eine 48 stündige Inkubation der Huh-7 Zellen mit IFN- α führt auch zu einer Reduktion der Aufnahme der HCVpp. Hieraus könnte man indirekt schließen, dass CEACAM1 an der Abwehr des HCVpp Eintritts in die Zelle beteiligt ist.

Eine gesteigerte Expression der CEACAM1 Moleküle an der Zelloberfläche hätte den Vorteil gehabt, dass man selektiv den Einfluss von CEACAM1 auf die Infektion hätte untersuchen können. Durch die IFN- α Stimulation werden schließlich eine Vielzahl von Genen in ihrer Expression induziert.

Eine Möglichkeit wäre die Zellen stabil zu transfizieren und so mögliche Nebeneffekte des Transfektionsvorgangs zu eliminieren. Aber auch bei einer stabilen Transfektion ist zu befürchten, dass diese nicht unbedingt eine vermehrte Anzahl an CEACAM1 Molekülen auf der Zelloberfläche zur Folge hätte.

4.4.5 CEACAM1 kämpft nicht nur außen sondern auch innen

Zusammengefasst deuten die präsentierten Daten darauf hin, dass CEACAM1 für Hepatitis C zwar keinen Rezeptormolekül darstellt, dass am Eintritt des Virus in die Zelle involviert ist, CEACAM1 könnte aber an der Abwehr der HCV Infektion beteiligt sein. Die vorliegenden Daten deuten auf einen Zusammenhang von CEACAM1 und der IFN- α Antwort der Zelle hin. IFN- α führt zu einer gesteigerten CEACAM1 Expression sowohl innerhalb der Zelle als auch auf der Zelloberfläche. Die durch IFN- α erhöhte Expression korreliert sowohl mit einem Rückgang der Replikation des HCV Replikons Con1 (Huh-7 Zelllinie stabil transfiziert mit einem Genotyp 1b HCV Replikon) (persönliche Mitteilung PD Dr. Philip Hilgard), als auch mit dem „early viral drop“. Zudem verringerte sich bei IFN- α gesteigertem CEACAM1 die Aufnahme an HCVpp. CEACAM1 scheint also zum einen die Virusreplikation zu inhibieren und außerdem die Re-Infektion der Zelle durch neue Viruspartikel zu verhindern. Somit

könnte CEACAM1 ein Faktor bei der IFN- α Therapie sein, der sowohl die Entstehung von neuen Virionen als auch die Infektion neuer Zellen durch das HCV verhindert.

4.4.6 CEACAM1 als neuer Rezeptor des Vesikular Stomatitis Virus

Das Vesikular Stomatitis Virus (VSV) gehört zur Familie der Rhabdoviridae und besitzt ein RNA Genom in Negativstrangorientierung. Es infiziert eine Reihe von Tierarten wie Schweine, Rinder, Pferde und auch den Menschen. Sein Hüllprotein (G) wird für Gentransfer und Gentherapie eingesetzt. Sein Glykoprotein wird gerne mit Proteinen anderer, nicht verwandter Viren kombiniert, so dass man Pseudopartikel erhält.

In der vorliegenden Arbeit wurden als Positiv-Kontrolle für die Infektion mit den HCVpp Pseudopartikel eingesetzt, bei denen anstelle des HCV Glykoproteins, das Glykoprotein vom Vesikular Stomatitis Virus inkorporiert wurde (VSV-Gpp). Diese Pseudopartikel haben die Eigenschaft, eine Vielzahl von Zellen zu infizieren. Das Vesikular Stomatitis Virus als solches, infiziert jede bisher getestete Zelle (Coil & Miller 2004). Dieser Pantropismus hat es bisher erschwert, Rezeptoren für diesen Virus zu identifizieren. Offensichtlich ist es bezüglich der Moleküle, die das Virus für den Eintritt in die Zelle benötigt nicht restringiert bzw. benutzt Strukturen, die ubiquitär vorkommen. Zufällig wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Beobachtung gemacht, dass HeLa Zellen, die CEACAM1 exprimieren, etwa 10 fach höher durch VSV-Gpp infizierbar sind als für CEACAM1 negative Wildtyp HeLa Zellen. Auch bei den folgenden Experimenten, in denen HeLa Zellen benutzt wurden, die andere CEACAMs exprimieren (CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8), wurde jeweils eine verbesserte Infektion gegenüber Wildtyp HeLa Zellen verzeichnet. Hierbei konnte zudem festgestellt werden, dass es entscheidend ist, welches CEACAM auf der Zelloberfläche ist. Das Maß an Infektion war je nach CEACAM unterschiedlich hoch. Insgesamt stellte sich heraus, dass die VSV-Gpp zu CEACAM1 und CEACAM3 die größte Affinität haben.

Somit stellen die präsentierten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal eine entscheidende Bedeutung für humanes CEACAM bei der Infektion mit einem Virus dar. Abb. 4.1 zeigt eine Übersicht über den Aufbau und die Eigenschaften der verschiedenen CEACAM Moleküle.

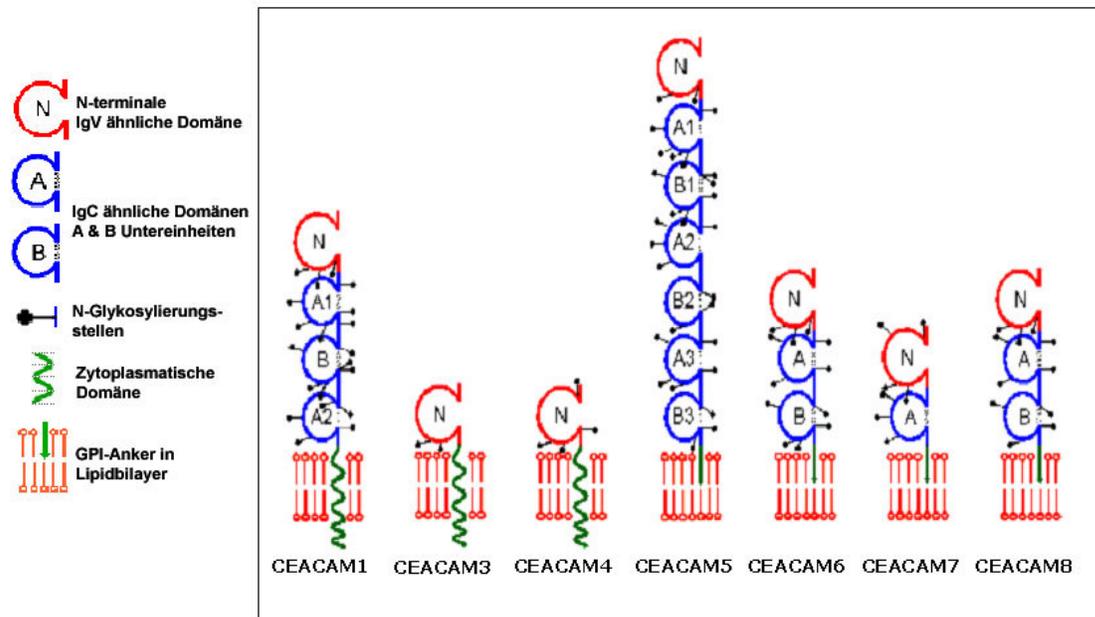


Abb. 4.1: Schematische Darstellung verschiedener Proteine der CEA-Familie im Menschen. Bei CEAACAM1, -3 und -4 handelt es sich um Transmembranproteine, wohingegen CEAACAM5, -6, -7 und CEAACAM8 GPI verankert vorliegen. CEAACAM1, -3 und -4 weisen zudem zytoplasmatische Domänen auf.

Eine durch siRNA Transfektion erzielte, verminderte Expression von endogen exprimiertem CEAACAM1 auf Huh-7 Zellen hatte hingegen den entgegengesetzten Effekt. Hier führte die verminderte Expression nicht zu einer verschlechterten Aufnahme der Pseudopartikel sondern verstärkte diese. Allerdings handelt es sich bei Huh-7 Zellen um eine Hepatomzelllinie und bei den HeLa Zellen um eine Zervixkarzinom Zelllinie. Es sind also Zelllinien aus völlig unterschiedlichen humanen Organen. Ein wichtiger Unterschied besteht z.B. darin, dass Huh-7 Zellen und auch primäre Hepatozyten CEAACAM1 endogen exprimieren, wohingegen HeLa Zellen für keines der untersuchten CEAACAMs natürlicherweise positiv ist. Zudem handelt es sich bei den in HeLa Zellen exprimierten CEAACAMs lediglich um die 1-L Isoform. Die in Hepatozyten co-exprimierte CEAACAM 1-S Isoform fehlt diesen Zellen. Somit eignen sich die artifiziell CEAACAM exprimierenden HeLa Zellen eignen sich daher gut für die hier beschriebene Bindungsstudie, für funktionale Untersuchungen dagegen sind sie nicht ausreichend. In einigen publizierten Arbeiten konnte nämlich gezeigt werden, dass die lange und kurze Isoformen zusammen und das Mengenverhältnis von 1-L und 1-S für verschiedene physiologische Wechselwirkungen von zentraler Bedeutung sind (Singer *et al.* 2000; Öbrink *et al.* 2002). Des Weiteren kann es sein, dass das endogen exprimierte CEAACAM1 auf Huh-7 Dimere bilden kann, die laut Literatur von funktioneller Bedeutung zu sein scheinen, wohingegen das in den HeLa Zellen transfizierte CEAACAM1 mit großer Wahrscheinlichkeit

eher als Monomer vorliegt. CEACAM1 könnte in Leberzellen also eine wichtige Funktion erfüllen. Denkbar wäre, dass CEACAM1 als Ligand für das VSV zwar fungiert, aber nicht generell, sondern nur in bestimmten Zellen. Bei den Huh-7 Zellen dagegen könnte CEACAM1 an der Abwehr von Viren beteiligt sein, wie schon für HCV erläutert.

5 Zusammenfassung

Die Untersuchung der initialen Schritte der Hepatitis C Virusinfektion waren lange aufgrund fehlender Modellsysteme nicht möglich. Daher wurden im ersten Teil der Arbeit Modellsysteme zur Identifizierung neuer Rezeptormoleküle für das Hepatitis C Virus (HCV) entwickelt. Das erste, ein chimäres Konstrukt bestehend aus den Strukturgenen von HCV und den Nichtstrukturgenen des Dengue Virus (DEN), konnte erfolgreich kloniert werden. Jedoch führte dieses Konstrukt nicht zur Bildung chimärer Viruspartikel. Das zweite Modellsystem ermöglichte, nach erfolgreicher Klonierung, die Expression von rekombinantem HCV E1E2 Glykoprotein in 293HEK Zellen. Obwohl hierbei tatsächlich natives HCV E1E2 Glykoprotein als Heterodimer exprimiert wurde, war die Ausbeute und Reinheit nach der Aufreinigung über den fusionierten His-Tag nicht ausreichend, um es für die vorgesehenen Experimente zu verwenden.

Aus diesem Grund wurden im zweiten Teil der Arbeit für die weitere Evaluation der initialen Schritte der HCV Infektion das kürzlich etablierte HCV Pseudopartikelsystem (HCVpp) verwendet. Damit wurden die Auswirkungen des antiviralen Zytokins Interferon- α (IFN- α) und der anti-inflammatorischen Zytokine Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und Interleukin-10 (IL-10) auf die Bindung und Aufnahme des Virus in Leberzellen untersucht. Die Stimulation der Hepatomzelllinie Huh-7 mit IFN- α resultierte in einer signifikant reduzierten Aufnahme der HCVpp, wohingegen die Inkubation sowohl mit TGF- β als auch mit IL-10 die Aufnahme der HCVpp verstärkten. Um die zugrunde liegenden möglichen Mechanismen zu untersuchen, wurden die bereits identifizierten potentiellen Rezeptormoleküle für HCV bezüglich ihrer Expression unter Einfluss von IFN- α bzw. TGF- β charakterisiert. Hierbei handelte es sich um das Tetraspanninmolekül CD81, den Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) und das *tight junction* Molekül Claudin-1. Die Stimulation der Huh-7 Zellen mit IFN- α führte zu einer Reduktion der Claudin-1 Expression sowohl auf der Zelloberfläche als auch auf Genexpressionsebene. Die Expression von CD81 und SR-BI blieb jedoch konstant. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass IFN- α seine antivirale Aktivität nicht nur durch Inhibition der HCV Replikation ausübt, sondern auch eine Neu- bzw. Reinfektion von Zellen reduziert, indem es die Expression eines wichtigen Rezeptormoleküls modifiziert.

Eine Stimulation mit TGF- β steigerte die Expression von SR-BI. Die beiden anderen Rezeptormoleküle zeigten keine Reaktion auf TGF- β . Somit trägt dieses Zytokin nicht nur

durch Veränderung der Immunantwort, sondern auch durch Modulation von Zelloberflächenmolekülen möglicherweise zur Etablierung einer persistierenden HCV Infektion bei.

Genexpressionsanalysen bei Patienten mit einer HCV Infektion haben zur Identifizierung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1, als ein für das Ansprechen auf Interferon möglicherweise essentielles Protein, geführt. Daher beschäftigte sich der dritte Teil der Arbeit mit CEACAM1 und seiner Rolle bei der HCV Infektion. Hier lag der Fokus einerseits auf der Charakterisierung von CEACAM1 auf Leberzellen (Huh-7, HepG2 und primäre Hepatozyten), sowohl in An- als auch in Abwesenheit von IFN- α , und andererseits auf seiner Rolle als potentieller Rezeptor für HCV. Die CEACAM1 Genexpression stieg nach Stimulation mit IFN- α an, was auch zu einer erhöhten CEACAM1 Expression auf der Zelloberfläche führt. Eine durch Gen Knock-down verringerte CEACAM1 Expression führte zu einer verstärkten Aufnahme sowohl von HCVpp als auch VSV-Gpp. Da zumindest für HCVpp keine direkte Interaktion mit CEACAM1 gezeigt werden konnte, deuten die Ergebnisse auf eine Abwehrfunktion bei der Virusaufnahme hin. Eine direkte Interaktion konnte nur zwischen CEACAM1 und den VSV-Gpp gezeigt werden. Zudem wurde die Infektion mit VSV-Gpp auf CEACAM exprimierenden HeLa Zellen verstärkt, abhängig von der CEACAM Art. CEACAMs könnten also als potentielle Rezeptormoleküle für das Vesikular Stomatitis Virus (VSV) dienen. Damit wäre das VSV das erste human pathogene Virus, für das CEACAM als Rezeptormolekül identifiziert wurde.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des Hepatitis C Virus.	12
Abb. 1.2: Rezeptormoleküle für HCV.	16
Abb. 1.3: Aktuelles Modell für den HCV Eintritt in die Zelle.	18
Abb. 1.4: Lebenszyklus des Hepatitis C Virus.	19
Abb. 1.5: Virologische Antwort (response) auf die HCV Therapie.	23
Abb. 2.1: Produktion von HCV Pseudopartikeln.	34
Abb. 2.2: Beispiel für den Verlauf einer Realtime PCR.	44
Abb. 3.1: Klonierungsschema zur Generierung des chimären Konstruktes.	68
Abb. 3.2: Ausschnitt der Sequenzierung von pASV.	69
Abb. 3.3: Analytische Restriktion der Subklonierung der Fragmente 1,2 und 3 in pASV.	70
Abb. 3.4: Optimierung der 8 kb Fragment PCR.	71
Abb. 3.5: Analytische Restriktion des fertig klonierten chimären Konstruktes.	72
Abb. 3.6: Erfolgreiche In vitro Transkription des chimären Konstruktes.	73
Abb. 3.7: RT-PCR zur Detektion von HCV E2 in Huh-7 Zellen, die mit dem chimären Konstrukt transfiziert wurden.	74
Abb. 3.8: Immunfluoreszenz von 293HEK Zellen transfiziert mit TOPO E1E2-His Plasmid (Kap.3.2.2)	75
Abb. 3.9: Immunfluoreszenz von Huh-7 Zellen, transfiziert mit TOPO E1E2-His Plasmid (linke Abbildung) und nicht-transfizierte Huh-7 Zellen (rechte Abbildung).	76
Abb. 3.10: Asymmetrische Restriktion des HCV E1E2 Fragments in pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Vektor.	78
Abb. 3.11: Vektorkarte des TOPO-E1E2-His Vektors.	79
Abb. 3.12: Immunpräzipitation von HCV E2 mit konformations-sensitivem CBH-2 Antikörper.	80
Abb. 3.13: Eluate der His-Tag Aufreinigung (Gradient).	82
Abb. 3.14: Eluate der His-Tag Aufreinigung. Detektion mit anti HCV E2 Antikörper.	82
Abb. 3.15: His-Tag Aufreinigung von HCV E1E2 aus 293HEK Zellen, Coomassie gefärbt.	83
Abb. 3.16 His-Tag Aufreinigung mit Ni-NTA Agarose von Qiagen.	85
Abb. 3.17 Luziferase Expression von HCVpp infizierten Huh-7 Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Dosen IFN- α	87
Abb. 3.18: Luziferase Assay von Huh-7 Zellen, transfiziert mit dem Luziferase codierendem Plasmid.	88
Abb. 3.19: Real time PCR zur Erstellung einer IFN- α Zeitkinetik (A) und Dosis- Wirkungskurve (B).	89
Abb. 3.20: Durchflusszytometrie IFN- α stimulierter Zellen.	91
Abb. 3.21: Western Blot mit Zelllysaten IFN- α stimulierter Huh-7 Zellen.	92
Abb. 3.22: mRNA Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI unter IFN- α in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation.	93
Abb. 3.23: Auswirkung der Stimulation mit TGF- β und IL-10 auf die Infektion mit HCVpp.	94
Abb. 3.24: Dosis-Wirkungskurve TGF- β für die Infektion mit HCVpp.	95
Abb. 3.25: Durchflusszytometrie TGF- β stimulierter Huh-7 Zellen.	96
Abb. 3.26: mRNA Expression von CD81, Claudin-1 und SR-BI unter TGF- β in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation.	97

Abb. 3.27: Western Blot mit Gesamtproteinlysaten von TGF- β stimulierten Huh-7 Zellen.	98
Abb. 3.28: Basale Expression von CEACAM1 auf humanen Leberzellen.	100
Abb. 3.29: Western Blot der CEACAM1 Expression in humanen Leberzellen.....	100
Abb. 3.30: CEACAM1 Expression in Huh-7 Zellen nach IFN- α Stimulation.....	101
Abb. 3.31: Realtime PCR zur Quantifizierung der Infektion von Pseudopartikeln nach Blockierung von CEACAM1 auf der Oberfläche von Huh-7 Zellen.	103
Abb. 3.32: Western Blot zur CEACAM1 Expression in Huh-7 Zellen 48 Stunden nach Transfektion.....	104
Abb. 3.33: Durchflusszytometrie von CEACAM1 auf Huh-7 Zellen nach Transfektion mit CEACAM1.....	104
Abb. 3.34: Realtime PCR zur Quantifizierung der Infektion von CEACAM1 transfizierten Huh-7 Zellen mit Pseudopartikeln.....	105
Abb. 3.35: Realtime PCR zur Quantifizierung der Infektion von Huh-7 Zellen mit Pseudopartikeln nach CEACAM1 Knock-down durch siRNA.	107
Abb. 3.36: Knock-down Kontrollen zu CEACAM1 siRNA Knock-down.	107
Abb. 3.37: Western Blot der Immunpräzipitation von CEACAM1 mit HCVpp /VSV-Gpp.....	109
Abb. 3.38: Luziferase Assay zur Quantifizierung der Infektion von CEACAM1 exprimierenden HeLa Zellen mit HCVpp.....	110
Abb. 3.39: Infektion von CEACAM exprimierenden HeLa Zellen mit VSV-Gpp und Quantifizierung der CEACAM Moleküle auf den HeLa Zellen.	111
Abb. 3.40: Bindungsquotient VSV-Gpp zu verschiedenen CEACAMs.	112
Abb. 4.1: Schematische Darstellung verschiedener Proteine der CEA-Familie im Menschen.	132

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme.....	30
Tabelle 2.2: Verwendete Zelllinien.....	31
Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide.....	35
Tabelle 2.4: Auflistung der eingesetzten Oligonukleotide.....	42
Tabelle 2.5: Primer Sequenzen für Real-time Primer.....	46
Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper.....	53
Tabelle 2.7: Verwendete Computerprogramme.....	66

8 Literaturverzeichnis

Reference List

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. & Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271, 518-520.
- Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F. & Krieger, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J.Biol.Chem.*, 269, 21003-21009.
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282, 615-616.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 12766-12771.
- Akazawa, D., Date, T., Morikawa, K., Murayama, A., Miyamoto, M., Kaga, M., Barth, H., Baumert, T. F., Dubuisson, J. & Wakita, T. (2007). CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J.Virol.*, 81, 5036-5045.
- Alatrakchi, N., Graham, C. S., van, d., V, Sherman, K. E., Exley, M. A. & Koziel, M. J. (2007). Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses. *J.Virol.*, 81, 5882-5892.
- Ando, K., Hiroishi, K., Kaneko, T., Moriyama, T., Muto, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K. & Imawari, M. (1997). Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *J.Immunol.*, 158, 5283-5291.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G. & Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J.Virol.*, 76, 6919-6928.
- Appel, N., Schaller, T., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2006). From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J.Biol.Chem.*, 281, 9833-9836.
- Bacon, B. R. & McHutchison, J. G. (2007). Into the light: strategies for battling hepatitis C. *Am.J.Manag.Care*, 13 Suppl 12, S319-S326.
- Bartenschlager, R. (2005). The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application. *J.Hepatol.*, 43, 210-216.
- Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2000). Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.*, 14, 241-254.

- Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H., Depla, E., Von, W. F., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J.Biol.Chem.*, 278, 41003-41012.
- Bartosch, B. & Cosset, F. L. (2006). Cell entry of hepatitis C virus. *Virology*, 348, 1-12.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F. L. (2003a). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J.Exp.Med.*, 197, 633-642.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. & Cosset, F. L. (2003b). Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J.Biol.Chem.*, 278, 41624-41630.
- Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T. & Liang, T. J. (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J.Virol.*, 72, 3827-3836.
- Bekisz, J., Schmeisser, H., Hernandez, J., Goldman, N. D. & Zoon, K. C. (2004). Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors*, 22, 243-251.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu.Rev.Immunol.*, 17, 189-220.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J.Virol.*, 80, 6964-6972.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, 290, 1972-1974.
- Bochkov, Y. A. & Palmenberg, A. C. (2006). Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques*, 41, 283-4, 286, 288.
- Borman, A. M., Le, M. P., Girard, M. & Kean, K. M. (1997). Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res.*, 25, 925-932.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. & Lavergne, J. P. (2005). Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J.Virol.*, 79, 11353-11365.
- Chambers, T. J., Nestorowicz, A., Mason, P. W. & Rice, C. M. (1999). Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. *J.Virol.*, 73, 3095-3101.
- Chan-Fook, C., Jiang, W. R., Clarke, B. E., Zitzmann, N., Maidens, C., McKeating, J. A. & Jones, I. M. (2000). Hepatitis C virus glycoprotein E2 binding to CD81: the role of E1E2 cleavage and protein glycosylation in bioactivity. *Virology*, 273, 60-66.

Chang, L. L., Cheng, P. N., Chen, J. S. & Young, K. C. (2007). CD81 down-regulation on B cells is associated with the response to interferon-alpha-based treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Res.*, 75, 43-51.

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

Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359-362.

Cocquerel, L., Kuo, C. C., Dubuisson, J. & Levy, S. (2003a). CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *J.Virol.*, 77, 10677-10683.

Cocquerel, L., Quinn, E. R., Flint, M., Hadlock, K. G., Fong, S. K. & Levy, S. (2003b). Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody. *J.Virol.*, 77, 1604-1609.

Cocquerel, L., Voisset, C. & Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J.Gen.Virol.*, 87, 1075-1084.

Coil, D. A. & Miller, A. D. (2004). Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J.Virol.*, 78, 10920-10926.

Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J.Virol.*, 71, 697-704.

Diepolder, H. M., Zachoval, R., Hoffmann, R. M., Wierenga, E. A., Santantonio, T., Jung, M. C., Eichenlaub, D. & Pape, G. R. (1995). Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet*, 346, 1006-1007.

Dreux, M. & Cosset, F. L. (2006). HCV and lipoproteins: is oxLDL an Achilles' heel of the Trojan horse? *Hepatology*, 43, 903-905.

Drummer, H. E., Maerz, A. & Pountourios, P. (2003). Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett.*, 546, 385-390.

Drummer, H. E., Wilson, K. A. & Pountourios, P. (2002). Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J.Virol.*, 76, 11143-11147.

DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. & Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol.Cell Biol.*, 7, 379-387.

Dveksler, G. S., Pensiero, M. N., Cardellicchio, C. B., Williams, R. K., Jiang, G. S., Holmes, K. V. & Dieffenbach, C. W. (1991). Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J.Virol.*, 65, 6881-6891.

- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J.Virol.*, 76, 5974-5984.
- Falgout, B., Chanock, R. & Lai, C. J. (1989). Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J.Virol.*, 63, 1852-1860.
- Feld, J. J. & Hoofnagle, J. H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, 436, 967-972.
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S. & McKeating, J. A. (1999). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J.Virol.*, 73, 6235-6244.
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P. M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. & Gale, M., Jr. (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102, 2986-2991.
- Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S. M. & Gale, M., Jr. (2003). Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, 300, 1145-1148.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T. & Olson, W. C. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100, 4498-4503.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C. A., Santantonio, T. & Pape, G. R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, 117, 933-941.
- Glue, P., Fang, J. W., Rouzier-Panis, R., Raffanel, C., Sabo, R., Gupta, S. K., Salfi, M. & Jacobs, S. (2000). Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 68, 556-567.
- Goff, S. P. Retroviridae: The retrovirus and their replication. 2, 1871-1940. 2001. Philadelphia, PA, D.M. Knipe and Howley(ed), Fields virology, 4th ed., Lippincott, Williams & Wilkins.
Ref Type: Generic
- Goffard, A. & Dubuisson, J. (2003). Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie*, 85, 295-301.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. & Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J.Virol.*, 77, 5487-5492.
- Graham, F. L., Abrahams, P. J., Mulder, C., Heijneker, H. L., Warnaar, S. O., De Vries, F. A., Fiers, W. & Van Der Eb, A. J. (1975). Studies on in vitro transformation by DNA and DNA

fragments of human adenoviruses and simian virus 40. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 39 Pt 1, 637-650.

Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90, 10583-10587.

Gramenzi, A., Andreone, P., Loggi, E., Foschi, F. G., Cursaro, C., Margotti, M., Biselli, M. & Bernardi, M. (2005). Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. *J.Viral Hepat.*, 12, 525-530.

Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Obrink, B. & Singer, B. B. (2003). CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J.Leukoc.Biol.*, 74, 126-134.

Gremion, C., Grabscheid, B., Wolk, B., Moradpour, D., Reichen, J., Pichler, W. & Cerny, A. (2004). Cytotoxic T lymphocytes derived from patients with chronic hepatitis C virus infection kill bystander cells via Fas-FasL interaction. *J.Virol.*, 78, 2152-2157.

Griffin, S. D., Harvey, R., Clarke, D. S., Barclay, W. S., Harris, M. & Rowlands, D. J. (2004). A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J.Gen.Virol.*, 85, 451-461.

Guirakhoo, F., Weltzin, R., Chambers, T. J., Zhang, Z. X., Soike, K., Ratterree, M., Arroyo, J., Georgakopoulos, K., Catalan, J. & Monath, T. P. (2000). Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J.Virol.*, 74, 5477-5485.

Helle, F. & Dubuisson, J. (2007). Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol.Life Sci.*

Hennig, B. J., Frodsham, A. J., Hellier, S., Knapp, S., Yee, L. J., Wright, M., Zhang, L., Thomas, H. C., Thursz, M. & Hill, A. V. (2007). Influence of IL-10RA and IL-22 polymorphisms on outcome of hepatitis C virus infection. *Liver Int.*, 27, 1134-1143.

Higginbottom, A., Quinn, E. R., Kuo, C. C., Flint, M., Wilson, L. H., Bianchi, E., Nicosia, A., Monk, P. N., McKeating, J. A. & Levy, S. (2000). Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J.Virol.*, 74, 3642-3649.

Hilgard, P. & Stockert, R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology*, 32, 1069-1077.

Hill, D. J., Toleman, M. A., Evans, D. J., Villullas, S., Van, A. L. & Virji, M. (2001). The variable P5 proteins of typeable and non-typeable Haemophilus influenzae target human CEACAM1. *Mol.Microbiol.*, 39, 850-862.

Hill, D. J. & Virji, M. (2003). A novel cell-binding mechanism of Moraxella catarrhalis ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol.Microbiol.*, 48, 117-129.

Hillenbrand, B. Transkriptionelle Regulation der Genexpression der Tight junction-Proteine Claudin-1 und Claudin-2 durch den Wnt-Signalweg. 2005.

Ref Type: Generic

Hokari, M., Matsuda, Y., Wakai, T., Shirai, Y., Sato, M., Tsuchiya, A., Takamura, M., Yamagiwa, S., Suzuki, K., Ohkoshi, S., Ichida, T., Kawachi, H. & Aoyagi, Y. (2007). Tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 potentiates the anchorage-independent growth of human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.*, 81, 336-345.

Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*, 284, 70-81.

Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J. & Rice, C. M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J.Virol.*, 81, 8374-8383.

Kammerer, R., Stober, D., Singer, B. B., Obrink, B. & Reimann, J. (2001). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *J.Immunol.*, 166, 6537-6544.

Kanto, T. & Hayashi, N. (2007). Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatol.Res.*, 37 Suppl 3, S319-S326.

Kimura, T., Saito, T., Yoshimura, M., Yixuan, S., Baba, M., Ji, G., Muramatsu, M. & Kawata, S. (2006). Association of transforming growth factor-beta 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. *J.Infect.Dis.*, 193, 1371-1374.

Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, 277, 570-574.

Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J.Virol.*, 74, 2046-2051.

Kronenberger, B., Ruster, B., Elez, R., Weber, S., Piiper, A., Lee, J. H., Roth, W. K. & Zeuzem, S. (2001). Interferon alfa down-regulates CD81 in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 33, 1518-1526.

Kunath, T., Ordonez-Garcia, C., Turbide, C. & Beauchemin, N. (1995). Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene*, 11, 2375-2382.

Landschulz, K. T., Pathak, R. K., Rigotti, A., Krieger, M. & Hobbs, H. H. (1996). Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J.Clin.Invest*, 98, 984-995.

Lechner, F., Sullivan, J., Spiegel, H., Nixon, D. F., Ferrari, B., Davis, A., Borkowsky, B., Pollack, H., Barnes, E., Dusheiko, G. & Klenerman, P. (2000a). Why do cytotoxic T lymphocytes fail to eliminate hepatitis C virus? Lessons from studies using major

histocompatibility complex class I peptide tetramers. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 355, 1085-1092.

Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P. & Walker, B. D. (2000b). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J.Exp.Med.*, 191, 1499-1512.

Levy, S. & Shoham, T. (2005). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat.Rev.Immunol.*, 5, 136-148.

Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr. & Lemon, S. M. (2005a). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102, 2992-2997.

Li, X. D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G. & Chen, Z. J. (2005b). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102, 17717-17722.

Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., McCourt, D. W. & Rice, C. M. (1994). Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J.Virol.*, 68, 5063-5073.

Lin, R., Lacoste, J., Nakhaei, P., Sun, Q., Yang, L., Paz, S., Wilkinson, P., Julkunen, I., Vitour, D., Meurs, E. & Hiscott, J. (2006). Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J.Virol.*, 80, 6072-6083.

Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 309, 623-626.

Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 436, 933-938.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25, 402-408.

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

Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285, 110-113.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, 193, 265-275.

Lozach, P. Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J. L., renzana-Seisdedos, F., Cosset, F. L. & Altmeyer, R. (2004). C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J.Biol.Chem.*, 279, 32035-32045.

- Lozach, P. Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de, L. A., Staropoli, I., Foung, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J. L., renzana-Seisdedos, F. & Altmeyer, R. (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J.Biol.Chem.*, 278, 20358-20366.
- Luik, A., Knapp, S., Thursz, M., Thomas, H. C. & Schlaak, J. F. (2004). Autoregulatory role of interleukin-10 in hepatitis C patients treated with IFN-alpha. *J.Interferon Cytokine Res.*, 24, 585-593.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437, 1167-1172.
- Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997). Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J.Gen.Virol.*, 78 (Pt 9), 2299-2306.
- Molenkamp, R., Kooi, E. A., Lucassen, M. A., Greve, S., Thijssen, J. C., Spaan, W. J. & Bredenbeek, P. J. (2003). Yellow fever virus replicons as an expression system for hepatitis C virus structural proteins. *J.Virol.*, 77, 1644-1648.
- Moller, M. J., Kammerer, R., Grunert, F. & von, K. S. (1996). Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. *Int.J.Cancer*, 65, 740-745.
- Moore, K. W., de Waal, M. R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.*, 19, 683-765.
- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal, M. R., Vieira, P. & Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annu.Rev.Immunol.*, 11, 165-190.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H. E. & Bienz, K. (2003). Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res.*, 60, 103-109.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. (2007a). Replication of hepatitis C virus. *Nat.Rev.Microbiol.*, 5, 453-463.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. (2007b). Replication of hepatitis C virus. *Nat.Rev.Microbiol.*, 5, 453-463.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Yamane, T., Miyazaki, M., Miyano, K. & Sato, J. (1984). Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. *Gann*, 75, 151-158.
- Negre, D., Duisit, G., Mangeot, P. E., Moullier, P., Darlix, J. L. & Cosset, F. L. (2002). Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 261, 53-74.
- Öbrink, B., Sawa, H., Scheffrahn, I., Singer, B. B., Sigmundsson, K., Sundberg, U., Heymann, R., Beauchemin, N., Weng, G., Ram, P. & Iyengar, R. (2002). Computational analysis of isoform-specific signal regulation by CEACAM1-A cell adhesion molecule expressed in PC12 cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 971, 597-607.

- Op de, B. A., Cocquerel, L. & Dubuisson, J. (2001). Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J.Gen.Virol.*, 82, 2589-2595.
- Patel, A. H., Wood, J., Penin, F., Dubuisson, J. & McKeating, J. A. (2000). Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. *J.Gen.Virol.*, 81, 2873-2883.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L. & Bartenschlager, R. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 103, 7408-7413.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282, 938-941.
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R. W., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J.Virol.*, 77, 4070-4080.
- Polo, S., Ketner, G., Levis, R. & Falgout, B. (1997). Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J.Virol.*, 71, 5366-5374.
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H. D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Loning, T. & Wagener, C. (1996). CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J.Histochem.Cytochem.*, 44, 35-41.
- Puri, B., Polo, S., Hayes, C. G. & Falgout, B. (2000). Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific,74 strain. *Virus Genes*, 20, 57-63.
- Ray, S., Broor, S. L., Vaishnav, Y., Sarkar, C., Girish, R., Dar, L., Seth, P. & Broor, S. (2003). Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro findings. *J.Gastroenterol.Hepatol.*, 18, 393-403.
- Reyes-Del, V. J., Chavez-Salinas, S., Medina, F. & Del Angel, R. M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J.Virol.*, 79, 4557-4567.
- Rhains, D. & Brissette, L. (2004b). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 36, 39-77.
- Rhains, D. & Brissette, L. (2004a). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 36, 39-77.
- Rigotti, A., Trigatti, B., Babitt, J., Penman, M., Xu, S. & Krieger, M. (1997). Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr.Opin.Lipidol.*, 8, 181-188.
- Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B. B., McKeating, J., Yagnik, A., Lahm, A., Tramontano, A., Cortese, R. & Nicosia, A. (2003). Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is

modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J.Virol.*, 77, 1856-1867.

Rook, A. H., Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Burlington, D. B., Lane, H. C. & Fauci, A. S. (1986). Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J.Immunol.*, 136, 3916-3920.

Ruggli, N., Tratschin, J. D., Mittelholzer, C. & Hofmann, M. A. (1996). Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J.Virol.*, 70, 3478-3487.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T . Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd Edition. 1989. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.

Ref Type: Generic

Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin.Microbiol.Rev.*, 14, 778-809, table.

Sandrin, V., Bosen, B., Salmon, P., Gay, W., Negre, D., Le, G. R., Trono, D. & Cosset, F. L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood*, 100, 823-832.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.*, 21, 5017-5025.

Sen, G. C. (2001). Viruses and interferons. *Annu.Rev.Microbiol.*, 55, 255-281.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J. & Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42, 962-973.

Singer, B. B., Klaile, E., Scheffrahn, I., Muller, M. M., Kammerer, R., Reutter, W., Obrink, B. & Lucka, L. (2005). CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur.J.Immunol.*, 35, 1949-1959.

Singer, B. B., Scheffrahn, I. & Obrink, B. (2000). The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res.*, 60, 1236-1244.

Singer, B. CEACAM1. Lucka LK. 2005. *UCSD-Nature Molecule Pages* (doi:10. 1038/mp.a003597. 01).

Ref Type: Generic

Sobue, S., Nomura, T., Ishikawa, T., Ito, S., Saso, K., Ohara, H., Joh, T., Itoh, M. & Kakumu, S. (2001). Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J.Gastroenterol.*, 36, 544-551.

- Spengler, U. & Nattermann, J. (2007). Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clin.Sci.(Lond)*, 112, 141-155.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS.Pathog.*, 3, e103.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R. H., Schultz, P. G. & Chisari, F. V. (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99, 15669-15674.
- Tan, K., Zelus, B. D., Meijers, R., Liu, J. H., Bergelson, J. M., Duke, N., Zhang, R., Joachimiak, A., Holmes, K. V. & Wang, J. H. (2002). Crystal structure of murine sCEACAM1a[1,4]: a coronavirus receptor in the CEA family. *EMBO J.*, 21, 2076-2086.
- Tan, S. L. & Katze, M. G. (2001). How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology*, 284, 1-12.
- Tilg, H. (1997). New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology*, 112, 1017-1021.
- Tsai, J. C., Zelus, B. D., Holmes, K. V. & Weiss, S. R. (2003). The N-terminal domain of the murine coronavirus spike glycoprotein determines the CEACAM1 receptor specificity of the virus strain. *J.Virol.*, 77, 841-850.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J.Virol.*, 66, 1476-1483.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op de, B. A., Dubuisson, J. & Vu-Dac, N. (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J.Biol.Chem.*, 280, 7793-7799.
- Voisset, C. & Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol.Cell*, 96, 413-420.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. & Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat.Med.*, 11, 791-796.
- Wedemeyer, H., He, X. S., Nascimbeni, M., Davis, A. R., Greenberg, H. B., Hoofnagle, J. H., Liang, T. J., Alter, H. & Rehermann, B. (2002). Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J.Immunol.*, 169, 3447-3458.
- Weiner, A. J., Brauer, M. J., Rosenblatt, J., Richman, K. H., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q. L., Houghton, M. & . (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology*, 180, 842-848.

- Westaway, E. G., Brinton, M. A., Gaidamovich, S. Y., Horzinek, M. C., Igarashi, A., Kaariainen, L., Lvov, D. K., Porterfield, J. S., Russell, P. K. & Trent, D. W. (1985). Flaviviridae. *Intervirology*, 24, 183-192.
- Wunschmann, S., Medh, J. D., Klinzmann, D., Schmidt, W. N. & Stapleton, J. T. (2000). Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J.Virol.*, 74, 10055-10062.
- Yan, W., Lee, H., Yi, E. C., Reiss, D., Shannon, P., Kwieciszewski, B. K., Coito, C., Li, X. J., Keller, A., Eng, J., Galitski, T., Goodlett, D. R., Aebersold, R. & Katze, M. G. (2004). System-based proteomic analysis of the interferon response in human liver cells. *Genome Biol.*, 5, R54.
- Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S. I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J. R. & Kohara, M. (1998). The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J.Virol.*, 72, 6048-6055.
- Zeuzem, S., Feinman, S. V., Rasenack, J., Heathcote, E. J., Lai, M. Y., Gane, E., O'Grady, J., Reichen, J., Diago, M., Lin, A., Hoffman, J. & Brunda, M. J. (2000). Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N.Engl.J.Med.*, 343, 1666-1672.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J.Virol.*, 78, 1448-1455.

9 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A.bidest	Aqua bidest
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid = Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleotid
E	Einheit (deutsch für Unit → U)
g	Gramm
h	Hours (Stunden)
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar
min.	Minuten
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMA	Phorbol Myristat Acetat
RFE	Relative Fluoreszenzeinheiten
RFU	Relative Fluorescence Units
RNA	Ribonucleic acid = Nukleinsäure
rpm	Rotations per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sog.	So genannt
U	Unit
u.a.	unter anderem
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

Publikationen im Rahmen der Promotion:

Vortrag:

Anna G. Tietjens, Philip Hilgard, Jean Dubuisson, Guido Gerken, Jörg F. Schlaak:

“IFN- α , IL-10 and TGF- β modulate the cellular uptake of the hepatitis C virus” (Kongress: American Association for the Study of Liver Diseases in Boston, 2007)

Poster:

Anna G. Tietjens, Philip Hilgard, Jean Dubuisson, Jörg F. Schlaak:

“IFN- α does not modulate the uptake of HCV pseudoparticles” (Kongress: Third European Congress of Virology, 2007)

Anna G. Tietjens, Bernhard B. Singer, Süleyman Ergün, Jörg F. Schlaak:

“CEACAM1 as a receptor candidate for Hepatitis C” (Kongress: Third European Congress of Virology, 2007)

Anna G. Tietjens, Philip Hilgard, Jean Dubuisson, Jörg F. Schlaak:

“Modulation of the cellular uptake of HCV by pro-and anti-inflammatory cytokines” (Kongress: German Association for the Study of the Liver, 2008)

Anna G. Tietjens, Philip Hilgard, Jean Dubuisson, Guido Gerken, Jörg F. Schlaak:

“Pro-and anti-inflammatory cytokines modulate the cellular uptake of Hepatitis C” (Kongress: European Association for the study of the liver, 2008)

Publikationen in Vorbereitung:

- 1) **Anna G. Tietjens, Philip Hilgard, Eva Benedetto-Castro, Sabrina Driftmann, Guido Gerken, Jörg F. Schlaak:**
“IFN- α and the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β modulate the cellular uptake of the hepatitis C virus”
- 2) **Anna G. Tietjens, Philip Hilgard, Jörg F. Schlaak, Süleyman Ergün, Jean Dubuisson, Guido Gerken, Bernhard B. Singer:**
“CEACAM1-a novel receptor candidate for Vesicular Stomatitis Virus”

Danksagung

Als erstes möchte ich meinen Eltern danken, die mich durch alle Höhen und Tiefen des Biologiestudiums begleitet haben und mich in jeder Hinsicht stets unterstützt haben.

Herrn Prof. Gerken danke ich für Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn PD Dr. Philip Hilgard danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung meiner Arbeit und die anregenden Diskussionen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schlaak ebenfalls für die fortgesetzte Betreuung meiner Arbeit und die kreativen Ratschläge.

Herrn Prof. Schade danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit und die motivierende Unterstützung.

Herrn Dr. Bernhard Singer danke ich für die hervorragende Hilfestellung in experimentellen Fragen rund um CEACAM1 und die hilfreichen Ideen und Ratschläge. Weiterhin möchte ich ihm für die Bereitstellung zahlreicher, wertvoller Antikörper danken.

Bei Eva-Maria Benedetto Castro und bei Sabrina Driftmann bedanke ich mich für die sensationelle technische Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Ruth Bröring, Jan Sowa, Martin Trippler, Anne Achterfeld und Barbara Emons für die freundschaftliche Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima bedanken.

Ansonsten danke ich natürlich auch allen anderen (auch Ehemaligen) Angehörigen des Gastrolabors in der IGI für die Hilfsbereitschaft.

Frau PD Dr. Elke Cario danke ich besonders für die motivierende Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge.

Ich danke Jörg Bangen für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und die nie enden wollende Motivation.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Jean Dubuisson und den Mitarbeitern in seinem Labor, von denen ich viel gelernt habe. Hier danke ich vor allem Muriel Lavie und Cecile Voisset.

Mein größtes Dankeschön geht an meinen Freund Jens Henning, der immer an mich geglaubt und mich liebevoll unterstützt hat.

Lebenslauf

Name Anna Genevieve Tietjens
Adresse Rauendahlstr. 21, 45529 Hattingen
Geburtsdatum 13. Juni 1976
Geburtsort Bayreuth

Promotion

seit 12/2003 Naturwissenschaftliche Doktorandin am Institut für experimentelle Gastroenterologie, Universitätsklinikum Essen. Thema der Arbeit: Entwicklung von Modellsystemen zur Untersuchung der initialen Schritte der HCV Infektion unter Einfluss von Interferon- α und anti-inflammatorischen Zytokinen

09/2006 3-wöchiger Aufenthalt am Institut de Biologie de Lille in Frankreich im Rahmen einer Kooperation

04/2003 – 11/ 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Köln

Studium

10/1995 – 10/2002 Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
Abschluss: Diplom
Abschlussnote: 1,2
Thema der Diplomarbeit:
Untersuchungen zur Rolle von Pigmenten im cyanobakteriellen Cytochrom b_6f -Komplex

Schulausbildung

08/1989 – 06/1995 Hildegardis-Schule in Hagen
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

08/1987 – 07/1989 Friedrich-Hakort Gymnasium in Herdecke

Hattingen, 02.04.2008

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Initiale Schritte der Hepatitis C Virus Infektion: Evaluation mit verschiedenen Modellsystemen*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Anna G. Tietjens* befürworte.

Essen, den _____
Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds
der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Unterschrift der Doktorandin

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Unterschrift der Doktorandin