

Entwicklung eines Personen-spezifischen Zellkultursystems zur Untersuchung von Hepatitis C Virus Infektionen

Dissertation
zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Diplom Biologin
Christina R. Hohn

Saarbrücken

2009

Tag des Kolloquiums: 27. Mai 2009

Dekan: Prof. Dr.-Ing. S. Diebels

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Meyerhans
Prof. Dr. E. Meese

Für meine Eltern

Was du weißt ist ein Tropfen,
was du nicht weißt ein Ozean.

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Manuskripte:

Hohn, C.R., Zeisel, M.B., Ehrhardt, M., Nüssler, A., Baumert, T.F.,
Meyerhans, A.

**Neohepatocytes: a person-specific cell culture system to study hepatitis C
virus infection**

(Journal of Clinical Investigation; Manuskript in Vorbereitung)

Koch, S., Fuss, M., **Hohn, C.R.**, Ehrhardt, M., Meyerhans, A.

Modulation of viral infection frequency by DEAE Dextran

(Manuskript in Vorbereitung)

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- 2006 10th Saar-Lor-Lux workshop on Virus research, Luxemburg
- 2006 CellPROM Meeting, Paris (France)
- 2007 Joint meeting of Neohepatocyte research groups, Konstanz
- 2007 CellPROM Meeting, Lübeck
- 2008 Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie", Heidelberg
- 2009 Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie", Leipzig

Im Laufe dieser Arbeit wurden praktisch betreut:

Michael Ehrhardt, Fortgeschrittenen-Praktikum und Diplomarbeit

Abkürzungsverzeichnis:

α CD81 (Bsp.)	anti-CD81 (gegen CD81 gerichtet)
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
CASY	”cell counter and analyser system”
CD	”cluster of differentiation”
CLDN-1 (Bsp.)	Claudin-1
CSF	”colony stimulating factor“
d0 (Bsp.)	”day 0“
	Tag Null
DCs	”dendritic cells”
	Dendritische Zellen
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	”enhanced green fluorescent protein”
	verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
FACS	”fluorescence activated cell sorting”
Fc	”fragment crystallisable”
Fc γ R	Fc γ Rezeptor
FGF-4	”fibroblast growth factor-4”
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GFP	”green fluorescent protein”
	grün fluoreszierendes Protein
g	”gravity”, Erdanziehungskraft
HBV	Hepatitis B Virus

HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	HCV “cell culture”
HCVpp	HCV “pseudo-particles”
HDL	“high density lipoprotein”
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	“human immunodeficiency virus” Humanes Immundefizienz Virus
HIVpp	HIV “pseudo-particles”
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iP/ml	infektiöse Partikel pro Milliliter
IU/ml	internationale Einheiten pro Milliliter
kDa	kilo Dalton
LB	“Lysogeny broth”
LDL	“low density lipoprotein”
LDL-R	LDL-Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	“lymphocyte separation medium”
M-CSF	“macrophages-colony stimulating factor”
MHC	“major histocompatibility complex” Haupthistokompatibilitätskomplex
MLV	murines Leukämievirus
mRNA	“messenger” Ribonukleinsäure
M-CSF	“macrophage-colony stimulating factor“
MOI	“multiplicity of infection”
NEAA	“non essential amino acids”
NK Zellen	”natural killer cells”
NOD	”non-obese diabetic”
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PBL	“peripheral blood lymphocytes” Lymphozyten des peripheren Blutes

PBMC	“peripheral blood mononuclear cells” mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	“phosphate buffered saline”
PCMO	“programmable cells of monocytic origin”
PCR	“polymerase chain reaction”
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin, kovalent mit Cyanin 5 verknüpft
PFA	Paraformaldehyd
pI	isoelektrischer Punkt
PSC	“pluripotent stem cell”
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	”rotations per minute”
SCID	”severe combined immunodeficiency”
SEVI	“semen derived enhancer of viral infectivity”
SDS	“sodium dodecyl sulfate”
SR-BI	“scavenger receptor class B type I”
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
EU	“european unit“, Einheit der (Enzym-)Aktivität, europäisch
U/IU	“international unit“, Einheit der (Enzym-)Aktivität, international
uPA	“urokinase-type-plasminogen-activator“, Gewebe-Typ Plasminogenaktivator
v/v	Volumen/Volumen
VLP	“virus like particle“
VSV	“vesicular stomatitis virus“
VSV-G	VSV-Glykoprotein G
VSVpp	VSV “pseudo-particles”
w/v	„weight“, Gewicht/Volumen

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	1
1.1.	Hepatitis C	1
1.2.	HCV-Prävalenz	1
1.3.	HCV-Infektion und Pathogenese	2
1.4.	Antivirale Therapie	3
1.5.	HCV-Genotypen und Virusdynamik	6
1.6.	Morphologie und Genomorganisation des HCV	6
1.6.1.	HCV-Strukturproteine	8
1.6.1.1.	Core	8
1.6.1.2.	E1/E2-Oberflächenproteine	9
1.6.1.3.	Das p7-Protein	10
1.6.2.	HCV-Nichtstrukturproteine	10
1.6.2.1.	NS2	10
1.6.2.2.	NS3	11
1.6.2.3.	NS4A/B	12
1.6.2.4.	NS5A	12
1.6.2.5.	NS5B	13
1.7.	Der virale Lebenszyklus von HCV	13
1.7.1.	Evolution der HCV-Modellsysteme	14
1.7.2.	Der HCV-Zelleintritt	17
1.7.3.	Die HCV-Replikation	20
1.7.3.1.	Regulation der HCV-Replikation durch miRNA	22
1.8.	Hepatozyten als Infektionssystem für HCV	23
1.9.	Neohepatozyten als Zellsystem für HCV-Studien	24
1.10.	Ziele der Arbeit	25
2.	Material und Methoden	27
2.1.	Chemikalien	27
2.2.	Antikörper	29
2.2.1.	Seren und humane Antikörper	31

2.3.	Plasmide	31
2.4.	Zellen und Bakterien	33
	2.4.1. Zelllinien	33
	2.4.2. Bakterien und Bakterien-Kultivierung	34
2.5.	Transformation von Bakterien	35
2.6.	Präparation von Plasmid-DNA	35
2.7.	Bestimmung der DNA-Konzentration	36
2.8.	Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
2.9.	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.10.	Zellkultur	39
	2.10.1. Puffer und Lösungen für die Zellkulturarbeit	39
	2.10.2. Zellkulturmedien	39
	2.10.3. Subkultivierung adhärenter Zellen	41
	2.10.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
	2.10.5. Mycoplasmentest	42
2.11.	Isolierung peripherer Blutzellen	43
	2.11.1. Blutspender	43
	2.11.2. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	43
	2.11.3. Adhärenz von Monozyten an Plastikoberflächen	45
2.12.	Charakterisierung und Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY®	46
2.13.	<i>In vitro</i> Differenzierung von Neohepatozyten	47
2.14.	Reifung humaner Blut-Monozyten zu Makrophagen	48
2.15.	miRNA-Analyse	49
2.16.	Herstellung viraler Pseudotypen	49
	2.16.1. Herstellung von HCV-Pseudotypen (HCVpp)	50
	2.16.2. Herstellung von VSV-Pseudotypen (VSVpp)	51
2.17.	Infektionsstudien unter Verwendung viraler Pseudotypen	52
	2.17.1. Titration viraler Pseudotypen	53
	2.17.2. Infektionsstudien mit viralen Pseudotypen	54
	2.17.3. Einfluss von humanem Serum auf die Pseudotyp-Infektion	55

2.17.4.	Einfluss von DEAE-Dextran auf die Pseudotyp-Infektion	55
2.17.5.	Neutralisation viraler Pseudotypen durch rezeptor-spezifische Antikörper	55
2.17.6.	Neutralisation viraler Pseudotypen durch HCV-spezifische Patienten-Antikörper	56
2.18.	HCVcc-Partikel	57
2.18.1.	HCVcc-Infektionsstudien	57
2.18.2.	Neutralisation der HCVcc-Infektion durch Rezeptor-spezifische Antikörper	58
2.18.3.	Hemmung der HCVcc-Replikation durch den Serin-Protease-Inhibitor BILN-2061	59
2.19.	Durchflusszytometrie	59
2.19.1.	Allgemeines zur Durchflusszytometrie	59
2.19.2.	Färbung von Oberflächen-Antigenen zum durchflusszytometrischen Nachweis	64
2.19.3.	Färbung von intrazellulären Antigenen zum durchflusszytometrischen Nachweis	65
2.20.	Lichtmikroskopische Aufnahmen	65
2.21.	Fluoreszenzmikroskopie	66
2.21.1.	Pseudotyp-Infektion mit fluoreszenzmikroskopischem Nachweis	66
2.21.2.	Färbung von intrazellulären Antigenen zum fluoreszenzmikroskopischem Nachweis	67
2.21.3.	Fluoreszenzmarkierung von Zellkernen	68
2.21.4.	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	68
2.22.	Anhang: klinische Daten HCV-positiver Blutspender	69
3.	Ergebnisse	70
3.1.	Humane Monozyten des peripheren Blutes lassen sich zu leberzellartigen Neohepatozyten differenzieren	70
3.1.1.	Morphologische Veränderungen bei der Differenzierung von Monozyten zu Neohepatozyten	70

3.1.2. Neohepatozyten exprimieren leberzellspezifische Markerproteine	73
3.1.3. miRNA-Expression in Neohepatozyten	75
3.2. Neohepatozyten sind effizient mit HCV-Pseudotypen infizierbar	76
3.2.1. HCVpp zeigen eine selektive Infektiosität gegenüber hepatischen Zellen	76
3.2.2. Neohepatozyten sind effizient mit HCVpp infizierbar	78
3.2.3. Die Infektionsfrequenz von HCVpp ist durch humanes Serum beeinflussbar	82
3.2.4. Die Infektionsfrequenz von HCVpp ist durch DEAE-Dextran beeinflussbar	84
3.2.5. Neutralisation der HCVpp-Infektion durch Rezeptor-spezifische Antikörper	86
3.2.6. Einfluss von Patienten-spezifischen α HCV- Antikörpern auf die HCVpp-Infektion	90
3.2.7. Differenzierung von Neohepatozyten aus HCV-positivem Patienten-Blut	93
3.2.7.1. Frischblut-Neohepatozyten sind mit HCV-Pseudotypen infizierbar	95
3.3. Neohepatozyten lassen sich nicht produktiv mit HCVcc infizieren	96
3.3.1. HCVcc-Infektion von Neohepatozyten	97
3.3.2. Die HCVcc-Infektion von Neohepatozyten ist nicht produktiv	98
4. Diskussion	101
4.1. Neohepatozyten als hepatisches Zellsystem	103
4.2. Neohepatozyten als Infektionssystem für HCV	105
4.3. Einfluss von humanem Serum auf die HCV-Infektion	107
4.4. Einfluss von DEAE-Dextran auf die Pseudotyp-Infektion	109
4.5. Antikörper-vermittelte Effekte auf die HCVpp-Infektion	110

4.6.	HCVcc-Infektion von Neohepatozyten	112
4.7.	Neohepatozyten als personalisiertes Infektionssystem	113
5.	Zusammenfassung	115
6.	Summary	116
7.	Literatur	117
	Danksagung	135
	Lebenslauf	136

1. *Einleitung*

1.1. **Hepatitis C**

Hepatitis C ist eine virale Infektion der Leber, die bis zur ihrer Entdeckung 1989 als parenteral übertragene Non-A-non-B-Hepatitis (NANBH) klassifiziert wurde (Choo *et al.*, 1989). Das Hepatitis-C-Virus (HCV) besitzt ein ca. 9,6 kb großes Einzelstrang-RNA-Genom in positiver Orientierung ((+)-ssRNA) und wird als eigenständiger Genus "Hepacivirus" den *Flaviviridae* zugeordnet.

Das Virus ist stark wirtsspezifisch und befällt lediglich Menschen und Schimpansen. Die besondere Gefahr der HCV-Infektion liegt in der Tatsache, dass bis zu 85 % der infizierten Personen eine chronische HCV-Infektion entwickeln. HCV ist damit das einzige bisher bekannte RNA-Virus, das ohne ein Retrovirus zu sein, eine chronische Infektionskrankheit verursachen kann. Durch das Fehlen eines geeigneten Zellkultur- bzw. Kleintiermodells für HCV war die Analyse des viralen Zellzyklus lange Jahre stark eingeschränkt. In den letzten Jahren wurden allerdings zahlreiche *in vitro* Systeme entwickelt, welche die Untersuchung des HCV-Lebenszyklus vorangetrieben haben. Ein geeigneter Impfstoff gegen HCV steht allerdings bisher noch nicht zur Verfügung.

1.2. **HCV-Prävalenz**

Nach Angaben der "world health organisation" (WHO) sind ca. 200 Millionen Menschen weltweit mit HCV infiziert. Dies entspricht etwa 3 % der Weltbevölkerung und macht HCV zu einem globalen Gesundheitsproblem. Jährlich kommen etwa drei bis vier Millionen Neuinfektionen dazu. Die Virusprävalenz beträgt dabei durchschnittlich 1 % in Europa (0,1 % in Deutschland), 1,8 % in den USA und bis zu 5,3 % auf dem afrikanischen Kontinent (WHO 2002). In einzelnen Ländern, wie z.B. Ägypten sind bis zu 18,1 % der Bevölkerung HCV-positiv (Abb.1.1).

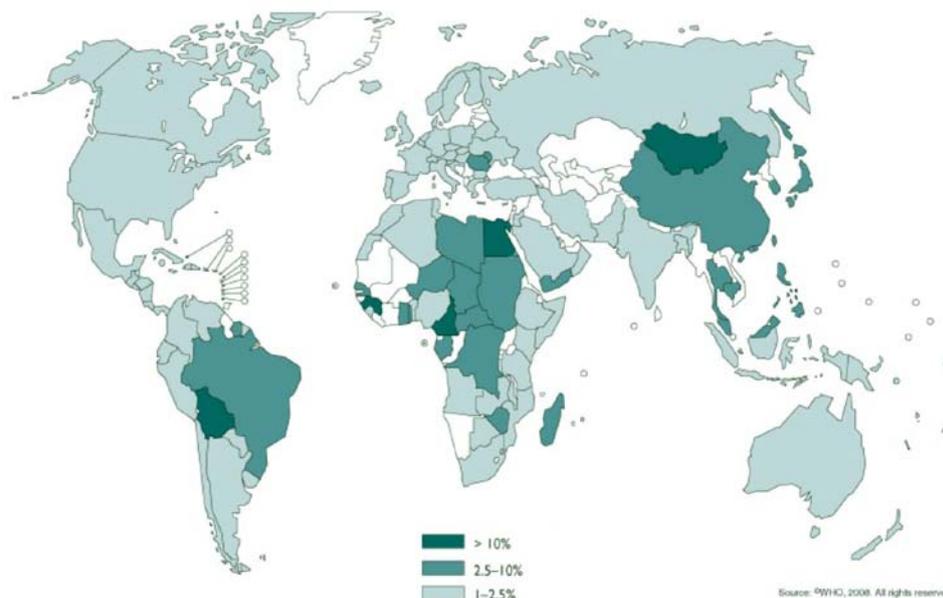


Abb. 1.1. Globale Prävalenz des Hepatitis-C-Virus (WHO 2008)

1.3. HCV-Infektion und Pathogenese

Die Übertragung des Hepatitis-C-Erregers erfolgt hauptsächlich auf parenteralem Weg, also durch direktes Einbringen des Erregers in die Blutbahn eines Empfängers. Zwar wurde virales Genmaterial bereits in Speichel, Schweiß, Tränen, Muttermilch und Samenflüssigkeit nachgewiesen, jedoch gilt die Virusübertragung durch diese Körperflüssigkeiten als nicht sehr wahrscheinlich. Ein Großteil der heutigen HCV-Patienten wurde vor der Etablierung geeigneter HCV-Nachweisverfahren durch kontaminierte Bluttransfusionen infiziert. Mittlerweile stellt der intravenöse Drogenmissbrauch die Hauptinfektionsquelle dar. Eine Übertragung auf sexuellem Wege ist genau wie die vertikale Mutter-Kind-Übertragung zwar ebenfalls möglich, tritt jedoch nur in Einzelfällen auf (Meisel *et al.*, 1995; Polywka *et al.*, 1997).

Die akute HCV Infektion verläuft meist asymptomatisch. Lediglich 25 % der Erkrankten zeigen grippeähnliche Symptome oder Gelbsucht (30 %). Eine spontane Ausheilung wird in ca. 25 % der Infizierten angenommen (CDC, 1998). Problematisch ist allerdings die hohe Chronifizierungsrate der viralen

Infektion. Bis zu 85 % der akut Infizierten entwickeln eine chronische HCV-Infektion. Über einen Zeitraum von 20-30 Jahren kommt es dann bei etwa 10-20 % der chronisch Erkrankten zu einer Leberzirrhose und bei 1-5 % zu einem hepatozellulären Karzinom. Die chronische HCV-Infektion wird als Hauptursache für Leberkrebs angegeben und stellt die höchste Indikation für eine Lebertransplantation dar (Montalbano & Neff, 2005). Die Pathogenese einer HCV-Infektion wird durch verschiedene virale sowie Wirtsfaktoren beeinflusst. Zu den entscheidendsten viralen Faktoren zählen vor allem der virale Genotyp, Viruslast und Variabilität der Quasispezies (siehe 1.5.). Auf Wirtsseite ist die initiale Immunantwort von zentraler Bedeutung, aber auch genetische Faktoren, die z.B. mit Rasse und Alter des Patienten zusammenhängen, können einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die antivirale Therapie nehmen (Hu *et al.*, 2001; Kau *et al.*, 2008; Mosley *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2004).

1.4. Antivirale Therapie

Der heutige Ansatzpunkt bei chronischen HCV-Infektionen umfasst eine Kombinationstherapie mit pegyliertem Interferon- α (PEG-IFN- α) und Ribavirin (Zeuzem *et al.*, 2004a; Zeuzem *et al.*, 2004b). Die Interferon-Monotherapie wurde bereits zu Beginn der achtziger Jahre zur Behandlung der HCV-Infektion eingesetzt (Hoofnagle *et al.*, 1986), zeigte allerdings nur mäßige Erfolge. Durch die Kombination mit dem Nukleosid-Analogon "Ribavirin" konnten die Therapieerfolge deutlich verbessert werden (Banner *et al.*, 1997). Die Kopplung von IFN- α an Polyethylenglykol (PEG) erhöht die Halbwertszeit des Wirkstoffs und ermöglicht eine seltenere Gabe des Medikamentes. Die Behandlung erfolgt in der Regel über einen Zeitraum von 48 Wochen, wird allerdings den prognostischen Parametern, insbesondere dem Status der Virämie und dem viralen Genotyp, angepasst (Berg *et al.*, 2001; Zeuzem *et al.*, 2004a; Zeuzem *et al.*, 2004b).

Das Therapieansprechen variiert dabei in Abhängigkeit verschiedener viraler sowie wirtsabhängiger Faktoren (Hu *et al.*, 2001) und wird dabei folgendermaßen definiert (Abb.1.2): bei Patienten, die auf die Therapie

ansprechen und das Virus nachhaltig eliminieren, spricht man von *sustained virological response* (SVR), bei Patienten, die nicht auf die Therapie ansprechen von *non-response* (NR). Waren die Patienten während der Therapie vorübergehend HCV-negativ, spricht man von *breakthrough* (BT) und bei Patienten, die erst nach der Therapie wieder HCV-positiv werden, von *relapse* (RL).

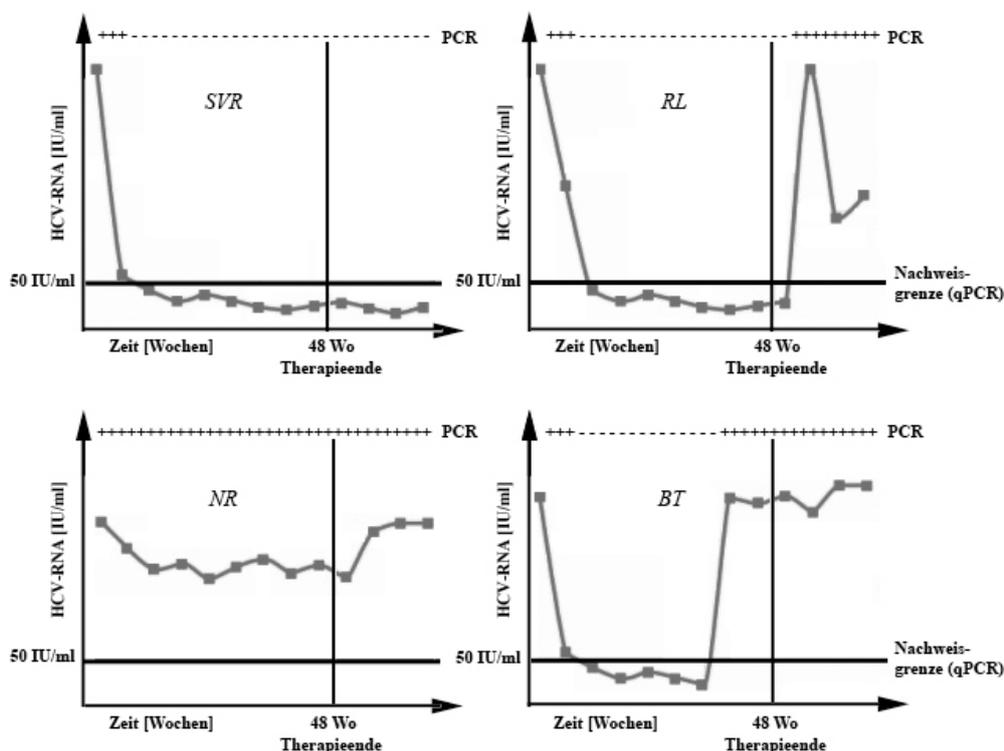


Abb. 1.2. Exemplarische Darstellung des Viruslast-Verlaufs bei Patienten mit chronischer Hepatitis C während und nach einer IFN- α /Ribavirin-Behandlung

Die Therapie umfasst generell einen Zeitraum von 48 Wochen sowie eine ~16-wöchige Beobachtungsphase. Die Analyse der Viruslast erfolgt mittels quantitativer PCR, wobei die Detektionsgrenze bei 50 IU/ml festgelegt wird. Das Therapieansprechen wird als SVR (*sustained virological response*), RL (*relapse*), NR (*non-response*) oder BT (*breakthrough*) definiert (Abb. modifiziert nach www.hepatitis-care.de).

Die genauen Ursachen des unterschiedlichen Therapieerfolgs sind nicht vollständig geklärt. Allerdings hängt der Erfolg der Therapie neben der Viruslast stark vom viralen Genotyp ab. Insbesondere der in Europa und USA weit verbreitete Genotyp 1 ist im Vergleich zu den Genotypen 2 und 3 schwer therapierbar (Zeuzem *et al.*, 2004b). Unter Kombinationstherapie liegt die SVR-Rate einer bei Genotyp-1-infizierten Patienten derzeit bei ca. 50 % (Pawlotsky, 2003), während sie bei den Genotypen 2 und 3 zwischen 70 und 80 % liegt (Mangia *et al.*, 2005).

Ein hoher Virustiter vor Therapiebeginn ist mit vermehrter NR assoziiert. Zusätzlich spielen Dauer und Status der Infektion eine Rolle: dabei ist eine akute HCV-Infektion grundsätzlich deutlich besser therapierbar, als eine chronische. Werden Patienten mit akuter HCV-Infektion innerhalb von 12 Wochen nach Diagnose-Stellung einer Standard-IFN-Therapie unterzogen, so liegt die SVR-Rate bei 80-90 % (Kamal *et al.*, 2006; Wiegand *et al.*, 2006). Dies legt nahe, dass virale sowie Wirtszell-Mechanismen, die zur Interferon-NR beitragen, eine gewisse Zeitspanne benötigen, um sich in der frühen Phase der HCV-Infektion zu etablieren. Im Zusammenhang mit dem Therapieerfolg sind auch eine Reihe von Wirtsfaktoren beschrieben worden, von denen viele mit der adaptiven Immunantwort assoziiert sind, wie die Induktion der T-Zell-Proliferation oder das Differenzierungspotential Dendritischer Zellen (He & Katze, 2002; Jung *et al.*, 1994; Luft, 2004; Mueller *et al.*, 2004). Zudem gibt es Studien, die eine NR während der HCV-Therapie mit dem Expressionsprofil bestimmter Gene innerhalb der Leber assoziieren (Cheng *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007; Sarasin-Filipowicz *et al.*, 2008).

Da viele Patienten nicht therapierbar sind und die IFN-Therapie starke Nebenwirkungen haben kann, ist die Entwicklung alternativer Therapieansätze von enormer Wichtigkeit. Vielversprechend sind dabei u.a. Protease-Inhibitoren, die in der Lage sind, die Prozessierung des HCV-Polyproteins zu hemmen. Dazu gehört z.B. der HCV-spezifische Serinprotease-Inhibitor BILN-2061 (Lamarre *et al.*, 2003). Die Entstehung von Resistenzen interferiert allerdings bisher mit einem möglichen therapeutischen Einsatz (Lin *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004).

Zudem befinden sich weitere Therapien in der Entwicklung, die an anderen Stellen des viralen Infektionszyklus angreifen, wie Polymerase-Inhibitoren (Chan *et al.*, 2004) oder Ionenkanalhemmer (Engler *et al.*, 2004; Pawlotsky *et al.*, 2007).

1.5. HCV-Genotypen und Virusdynamik

Weltweit sind mittlerweile mindestens sechs verschiedene HCV-Genotypen (HCV1-6) sowie mehr als 90 Subtypen (1a, 3b...) des Virus bekannt (Robertson *et al.*, 1998; Simmonds *et al.*, 1994). Durch die fehlende *proof reading*-Funktion der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) kommt es zu hohen Fehlerraten bei der HCV-Replikation. Durchschnittlich erfolgen dabei 10^{-4} bis 10^{-5} Nukleotidaustausche pro Replikationszyklus (Martell *et al.*, 1992). Der tägliche Umsatz von geklärten und neu generierten HCV-Partikeln beträgt etwa 10^{12} Virionen, bei einer durchschnittlichen Halbwertszeit von drei bis fünf Stunden (Neumann *et al.*, 1998; Zeuzem *et al.*, 1998). Aufgrund des hohen Umsatzes und der Fehlerrate der viralen RdRP kommt es innerhalb eines Patienten zu einer Vielzahl unterschiedlicher HCV-Varianten. Diese Population wird in ihrer Gesamtheit als "Quasispezies" bezeichnet (Martell *et al.*, 1992).

1.6. Morphologie und Genomorganisation des HCV

Das Hepatitis C Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 50 nm und besteht aus einem ikosaedrischen Nukleokapsid (Core), das von einer Virushülle umschlossen wird (Abb.1.3). Die Virushülle besteht aus einer Lipidmembran, die dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) des Wirtes entstammt und die glykosylierten Hüllproteine E1 und E2 enthält. Die Glykoproteine liegen dabei als Heterodimer vor und sind u.a. für den viralen Eintritt des HCV in die Wirtszelle verantwortlich. Im Inneren des Nukleokapsids befindet sich das (+)ssRNA-Genom, welches mit dem stark basischen Core-Protein in enger Wechselwirkung steht.

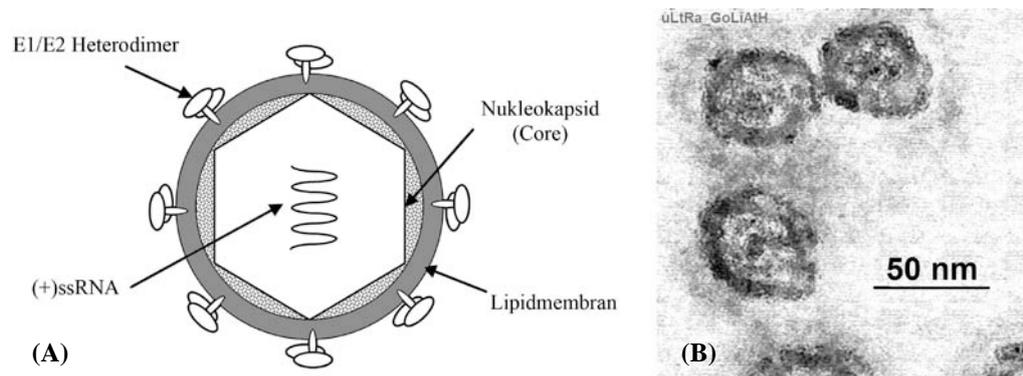


Abb. 1.3. (A) Schematischer Aufbau des HCV Partikels (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von HCV-Partikeln (Quelle: upload.wikimedia.org)

Das HCV-Genom besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül und umfasst eine Größe von etwa 9,6 kb. Durch seine Plusstrang-Orientierung kann die virale RNA direkt als Matrize für die Translation viraler Proteine dienen und ist *per se* infektiös. Der offene Leserahmen wird am 5'- und 3'-Ende von nicht-translatierten Regionen (UTR) flankiert (Abb.1.4). Die 5'-UTR enthält eine *internal ribosome entry site* (IRES), die eine Capping-unabhängige Translation der RNA ermöglicht. Zudem führt die Bindung der IRES-Sequenz an die Ribosomen zu einer Konformationsänderung der ribosomalen Untereinheiten und behindert somit die Translation zellulärer mRNA (Spahn *et al.*, 2001). Die 3'-UTR enthält neben einer variablen Poly-U-Sequenz einen hoch-konservierten *X-tail* aus drei *Stem-loop*-Strukturen. Diesem Bereich wird eine wichtige Rolle bei der Initiation der HCV-Replikation zugeschrieben (Shi & Lai, 2001).

Der offene Leserahmen kodiert für ein lineares Polyprotein von ca. 3000 Aminosäuren. Dieses Vorläuferprotein enthält alle HCV-Proteine und wird co- und posttranslational in seine Komponenten gespalten (Abb.1.4). Die drei Strukturproteine Core, E1 und E2 werden dabei von wirtseigenen, die Nichtstrukturproteine NS2-5 von viruscodierten Proteasen prozessiert (Lindenbach & Rice, 2005).

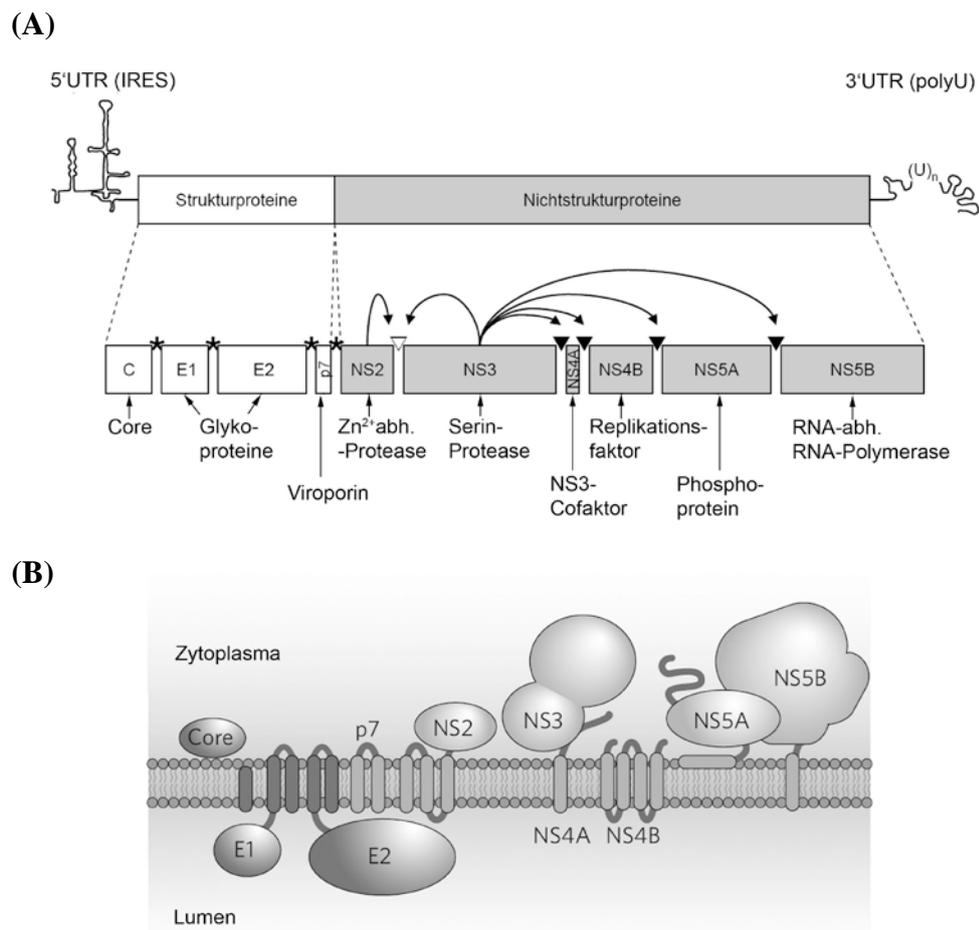


Abb. 1.4. Organisation der HCV-Proteine

(A) Genomorganisation und Schnittstellenverteilung bei der Prozessierung von HCV. Gekennzeichnet sind die Schnittstellen zellulärer Proteasen (*), der NS3-NS4A-Protease (▼) und die Stelle der autoproteolytischen NS2-NS3-Spaltung (▽) am HCV-Polyprotein. (B) Topologie der HCV-Proteine an der ER-Membran (modifiziert nach Lindenbach & Rice, 2005)

1.6.1. HCV-Strukturproteine

1.6.1.1. Core

Das HCV-Core-Protein ist für die Ausbildung des viralen Nukleokapsids verantwortlich. Durch seine RNA-Bindedomäne und seinen stark basischen Charakter kann das Protein das 5'-Ende des viralen RNA-Genoms binden (Santolini *et al.*, 1994). Seine beiden Homooligomerisierungsdomänen ermöglichen es ihm weiterhin, zu homologen Multimeren zu komplexieren und

so die virale RNA zu umschließen (Matsumoto *et al.*, 1996; Nolandt *et al.*, 1997).

Dem Core-Protein werden neben der Eigenschaft als Nukleokapsidbilder verschiedenste Funktionen zugeschrieben, die aber wahrscheinlich vom Virus-Genotyp und den untersuchten Zellen abhängen (Kato *et al.*, 2001). In Zellkultur beeinflusst das Core-Protein z.B. verschiedene Zelltod-regulierende Proteine, wie fas, c-myc, p53, p21 und TNF- α und wirkt damit anti-apoptotisch (Ghosh *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 1996). Gleichzeitig beeinflusst es die Genexpression konkurrierender Viren wie HBV und HIV, indem es deren Promotoraktivitäten hemmt (Okuda *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 1993; Srinivas *et al.*, 1996). Zudem wird dem Protein onkogenes Potential im Zusammenhang mit hepatozellulären Karzinomen zugeschrieben (Ray *et al.*, 1996).

1.6.1.2. E1/E2-Oberflächenproteine

Die Glykoproteine E1 und E2 sind in der Lipidmembran des Virus verankert und bilden die viralen Hüllproteine. Sie werden durch eine zelluläre Signalpeptidase aus dem HCV-Polyprotein herausgeschnitten und während der HCV-Replikation mit ihren hydrophoben C-terminalen Transmembrandomänen in der ER-Membran verankert (Ivashkina *et al.*, 2002; Lambot *et al.*, 2002). Ihre großen N-terminalen Ektodomänen werden im ER-Lumen stark glykosyliert (Cocquerel *et al.*, 2001; Goffard & Dubuisson, 2003). Mit Hilfe von Chaperonen des ER interagieren E1 und E2 zu einem nicht-kovalent gebundenen Heterodimer (Dubuisson & Rice, 1996; Ralston *et al.*, 1993). Als Oberflächenproteine sind die E1/E2-Heterodimere für die Wechselwirkung des Virus mit der Zielzelle verantwortlich (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Mittlerweile wurden dabei eine Reihe potentieller HCV-Rezeptoren identifiziert, die direkt oder indirekt mit den Glykoproteinen wechselwirken und somit den Zelleintritt vermitteln (siehe 1.7.2.).

Nach dem Zelleintritt ist das Virus gezwungen, den Reaktionen des Immunsystems zu entgehen. Man geht davon aus, dass HCV während der chronischen Infektion durch *Escape*-Mutationen neue Virusvarianten bildet und sich somit der Elimination durch das Immunsystem entzieht. Da das E2-Protein dem Immunsystem an der Oberfläche der HCV-Virionen präsentiert

wird, herrscht hier ein starker Selektionsdruck. Dieser konzentriert sich auf zwei Regionen, die verschiedene B- und T-Zell Epitope enthalten und die mit der Aktivierung der T-Helferzellantwort assoziiert sind (Del Porto *et al.*, 2000; Nakamoto *et al.*, 1996). Beide Regionen weisen im Vergleich zum viralen Restgenom sehr viel mehr Nukleotid austausche auf und wurden daher als hypervariable Regionen (HVR-1 und HVR-2) bezeichnet (Kato *et al.*, 1992). Neutralisierende Antikörper gegen HVR-1 und -2 sind beschrieben, vermitteln *in vivo* aber keine ausreichende protektive Immunität (Kaplan & Reddy, 2003; Kato *et al.*, 1992).

1.6.1.3. Das p7-Protein

Das p7-Protein besteht aus 67 Aminosäuren und ist stark hydrophob. Es besitzt zwei Transmembrandomänen, die durch eine zytoplasmatische Schleife miteinander verbunden sind (Carrere-Kremer *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass p7 zu hexameren Komplexen assoziiert und so in Membranen zur Ausbildung eines Ionenkanals führen kann (Griffin *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2003). Damit wird p7 allgemein zu den Viroporinen gezählt, einer Gruppe viraler Proteine, die beim Zusammenbau und Zellaustritt des viralen Partikels eine wichtige Rolle spielen (Carrasco, 1995; Harada *et al.*, 2000).

1.6.2. HCV-Nichtstrukturproteine

1.6.2.1. NS2

Das NS2-Protein ist ein hydrophobes Transmembranprotein. Es trägt zusammen mit dem N-terminalen Bereich des NS3-Proteins zur Bildung der Zink-abhängigen NS2-NS3-Protease bei, deren einzige bekannte Funktion die autoprotolytische Spaltung des HCV-Polyproteins am NS2-NS3-Übergang ist (Penin *et al.*, 2004).

1.6.2.2. NS3

Das NS3-Protein ist ein multifunktionelles Protein, für das Eigenschaften als Serin-Protease, NTPase und RNA-Helikase beschrieben wurden. Die Serin-Protease-Domäne liegt im N-terminalen Drittel des Proteins. Nach der autoproteolytischen Abspaltung vom HCV-Polyprotein wird der N-Terminus durch Assoziation mit NS4A stabilisiert (Kim *et al.*, 1996). Die NS3-NS4A-Protease ist anschließend an der Abspaltung aller anderen Nichtstrukturproteine beteiligt (Bartenschlager *et al.*, 1993; Major & Griffey, 2001). Die NTPase- und Helikase-Aktivitäten liegen im C-terminalen Bereich des NS3-Proteins. Dieser Domäne werden sowohl die RNA-Bindung als auch die Auflösung von komplexen RNA-Sekundärstrukturen zugeschrieben. Die dazu benötigte Energie bezieht das Enzym aus der Hydrolyse von ATP (Borowski *et al.*, 1999a). Neben den enzymatischen Aktivitäten wurden für das NS3-Protein zahlreiche Interaktionen mit zellulären Elementen wie dem Tumorsuppressor p53 (Ishido & Hotta, 1998) oder verschiedenen Proteinkinasen beschrieben (Borowski *et al.*, 1997; Borowski *et al.*, 1999b). Durch seine vielfältigen Funktionen nimmt das NS3-Protein eine zentrale Rolle im HCV-Replikationszyklus ein. Die hohe Konservierung des HCV-Proteins deutet darauf hin, dass sich Mutationen negativ auf die enzymatischen Funktionen auswirken würden. Aus diesem Grund stellt das NS3-Protein ein attraktives Ziel für die pharmakologische Wirkstoffentwicklung dar. Basierend auf der dreidimensionalen Raumstruktur des Proteins (Kim *et al.*, 1998) wurde u.a. der bereits erwähnte Protease-Inhibitor BILN-2061 entworfen. Er bindet an die katalytische Domäne des NS3-Proteins und inhibiert so die für das Virus essentielle Proteaseaktivität (Lamarre *et al.*, 2003).

1.6.2.3. NS4A/B

NS4A ist ein für das Virus essentieller Kofaktor der NS3-Protease (siehe 1.6.2.2). Der hydrophobe N-Terminus des Proteins scheint zudem ein Transmembran-Segment zu beinhalten, welches die Bindung von NS3 an die ER-Membran vermittelt (Bartenschlager *et al.*, 1995). Über das hydrophobe NS4B-Protein ist noch relativ wenig bekannt. Das Protein wird cotranslational in die ER-Membran eingelagert und ist in der Lage, die Bildung netzartiger Membranstrukturen zu induzieren (Egger *et al.*, 2002; Moradpour *et al.*, 2003). Daher nimmt man an, dass NS4B die ER-Membran so verändert, dass sie als Gerüst für den HCV-Replikationskomplex dienen kann (*membranous web*).

1.6.2.4. NS5A

Die Funktion des NS5A-Proteins ist noch immer nicht eindeutig geklärt. Trotz seiner funktionalen Kernlokalisationssequenz kommt NS5A hauptsächlich membranassoziiert im Zytoplasma vor (Ide *et al.*, 1996; Tu *et al.*, 1999). Die Komplexierung mit viralen Nichtstrukturproteinen am ER deutet auf einen Einfluss auf die RNA-Replikation hin, was zusätzlich dadurch gestützt wird, dass spezifische Mutationen der NS5A-Sequenz zu einer verstärkten Vermehrung des HCV-Replikons führten (Bartenschlager *et al.*, 2003). Zudem wurde NS5A kürzlich als Zink-bindendes Metalloprotein identifiziert. Mutagenese-Studien im Replikon-System zeigten dabei, dass die NS5A-vermittelte Zink-Koordination essentiell für die HCV-RNA-Replikation ist (Tellinghuisen *et al.*, 2004).

NS5A besitzt Zelltod-inhibierende und Wachstums-modulierende Eigenschaften, die sowohl mit der Chronifizierung der Infektion als auch mit der Entwicklung hepatozellulärer Karzinome assoziiert sind. Diese Funktionen stehen dabei im Zusammenhang mit der Inhibierung der Interferon-Antwort und der damit verbundenen Hemmung der Proteinkinase R (PKR). Durch Bindung von NS5A an das katalytische Zentrum der PKA, wird die Phosphorylierung von eIF2- α unterbunden, was u.a. eine Inhibierung der Apoptose zur Folge hat (Taylor *et al.*, 1999). Unter normalen Umständen, würde die aktivierte PKR den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF2- α

phosphorylieren und damit die Proteinbiosynthese und somit auch die Virusreplikation blockieren. Gleichzeitig inhibiert NS5A die Aktivierung der Caspase-3 durch PKR und verhindert somit die TNF- α -vermittelte Apoptose (Ghosh *et al.*, 2000; Majumder *et al.*, 2002).

1.6.2.5. NS5B

Das NS5B-Protein ist ein membranassoziertes Phosphoprotein und hat die Funktion einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP). Das Enzym ist C-terminal in der ER-Membran verankert, wobei die funktionelle Domäne ins Zytosol weist (Schmidt-Mende *et al.*, 2001). Die RNA-Replikation erfolgt durch eine von Primärstrukturen-unabhängige Initiation durch *de novo* Synthese (Butcher *et al.*, 2001). Die virale (+)ssRNA wird dabei zunächst als mRNA für die Translation der viralen RdRP verwendet, um dann als *template* von dieser in komplementäre (-)RNA umgeschrieben zu werden. Diese (-)RNA kann dann wiederum sehr effizient von der viralen RdRP in genomische (+)RNA umgeschrieben werden. Die RdRP besitzt dabei keine Korrekturleseaktivität, was zur Folge hat, dass Fehlpaarungen während der Replikation nicht korrigiert werden können. Dadurch können sich im HCV-Genom bis zu $1,5 \times 10^{-3}$ Basensubstitutionen pro Position und Jahr manifestieren (Major *et al.*, 1999).

1.7. Der virale Lebenszyklus von HCV

Viren sind als nichtzelluläre Parasiten auf die Stoffwechselaktivität der Wirtszelle angewiesen. Zur Replikation ihres Erbguts sind sie gezwungen, die Plasmamembran der Wirtszelle zu überwinden und zytosolische und/oder nukleäre Komponenten der Zelle für ihre Zwecke zu übernehmen. Um diese Situation *in vitro* nachzustellen, ist ein Zellkultur-Modell nötig, das den HCV-Zelleintritt, die virale Replikation und die Sezernierung infektiöser Partikel ermöglicht.

1.7.1. Evolution der HCV-Modellsysteme

Obwohl die erfolgreiche Klonierung des HCV-Genoms eine schnelle Analyse der Genomorganisation sowie eine biochemische Charakterisierung der HCV-Proteine ermöglichte, war die Analyse des HCV-Infektionszyklus über lange Jahre durch das Fehlen eines adäquaten Zellkultur-Modells eingeschränkt. Die Infektiosität der ersten RNA-Transkripte wurde daher *in vivo* durch intrahepatische Inokulation von Schimpansen getestet (Kolykhalov *et al.*, 1997). Der Versuch, die Replikation dieser RNA in Zellkultur nachzuweisen, scheiterte allerdings. Den ersten Durchbruch auf diesem Gebiet brachte die Entwicklung des HCV-Replikon-Systems (Lohmann *et al.*, 1999). Mit Hilfe eines subgenomischen Genotyp-1b-Isolats (Con1) konnte zum ersten Mal eine persistierende HCV-RNA-Replikation in Zellkultur nachgewiesen werden (Abb.1.5). Die bicistronische Replikon-RNA kodiert dabei für einen selektierbaren Marker (z.B. ein Neomycin-Resistenz-Gen) unter der Kontrolle der HCV-IRES sowie für die HCV-Nichtstrukturproteine (NS3-NS5B) unter der Kontrolle einer heterologen IRES (z.B. von EMCV). Dieses Konstrukt wird durch Elektroporation in Huh7-Zellen eingebracht. Die Replikation der RNA führt zur Produktion des Neomycin-Markergens und ermöglicht die Selektion Replikations-kompetenter Kolonien. Die Anwendbarkeit des Replikon-Systems wurde zunächst durch die fehlende Replikations-Effizienz der verwendeten Huh7-Zellen limitiert. Im Jahre 2002 wurden allerdings Subklone der Replikon-transduzierten Huh7-Zellen isoliert, die durch eine Behandlung mit IFN- α permissiver für die HCV-Replikation geworden waren (Blight *et al.*, 2002). Im bekanntesten dieser Subklone, den Huh7.5 Zellen, liegt eine Mutation im RIG-Gen vor, durch die die antivirale Immunantwort der Zellen unterdrückt wird (Sumpter *et al.*, 2005). Zusätzlich zeigte die Sequenzierung der HCV-RNA in Replikon-haltigen Zellklonen eine Reihe adaptiver Mutationen der NS-Proteine, die die virale RNA-Replikation zusätzlich verstärkt (Blight *et al.*, 2000). Mit Hilfe dieses Replikon-Systems war also eine effiziente HCV-Replikation detektierbar, aber eine Produktion infektiöser HCV-Partikel war nicht möglich (Blight *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2002).

Die Problematik, den kompletten HCV-Lebenszyklus nicht in Zellkultur reproduzieren zu können, führte allerdings zur Entwicklung zahlreicher Modellsysteme, die Teile der viralen Wechselwirkung mit der Zielzelle aufklärten. So konnten z.B. mit C-terminal-verkürzten, löslichen E2-Proteinen (sE2) Virus-Zell-Interaktionen nachgestellt und somit potentielle HCV-Rezeptoren identifiziert werden (Flint *et al.*, 1999; Michalak *et al.*, 1997; Pileri *et al.*, 1998; Scarselli *et al.*, 2002). Weitere Systeme, die die Funktion der Hüllproteine näher beleuchteten waren E1/E2-Liposomen (Cocquerel *et al.*, 2002), in Insektenzellen generierte Pseudopartikel (Wellnitz *et al.*, 2002) oder *Vesicular-Stomatitis-Viren* (VSV) mit chimären E1/E2-Glykoprotein-G-Oberflächenproteinen (Lagging *et al.*, 1998; Matsuura *et al.*, 2001). Diese Systeme waren zwar hilfreich, beinhalteten jedoch immer modifizierte Formen der E1/E2-Proteine.

Ein Meilenstein in der Erforschung des HCV-Zelleintritts war daher die Entwicklung retroviraler Pseudopartikel (HCVpp), die an ihrer Oberfläche unmodifizierte HCV-Glykoproteine tragen (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). Diese HCVpp werden durch Co-Transfektion von 293T-Zellen mit drei verschiedenen Expressionsvektoren generiert. Die Plasmide kodieren dabei für (a) die HCV Glykoproteine E1/E2, (b) die Gag-Pol-Proteine von MLV oder HIV und (c) ein retrovirales Genom, das ein Reportergen wie EGFP oder Luziferase enthält, um den viralen Zelleintritt effektiv nachweisen zu können (Abb.1.5).

Der Zelleintritt der Pseudopartikel erfolgt dabei HCV-Glykoprotein-vermittelt und entspricht dem Infektionsverhalten nativer HCV-Virionen (Bartosch & Cosset, 2006; Tellinghuisen *et al.*, 2007). Daher konnten mit Hilfe der HCVpp viele Informationen über den Eintritt von HCV in die Wirtszelle gewonnen werden. Trotz dieser Fortschritte in der *in vitro* Forschung war das HCV-Verständnis ohne die Möglichkeit eines Zellsystems, in dem sich infektiöse Partikel generieren lassen, unvollständig.

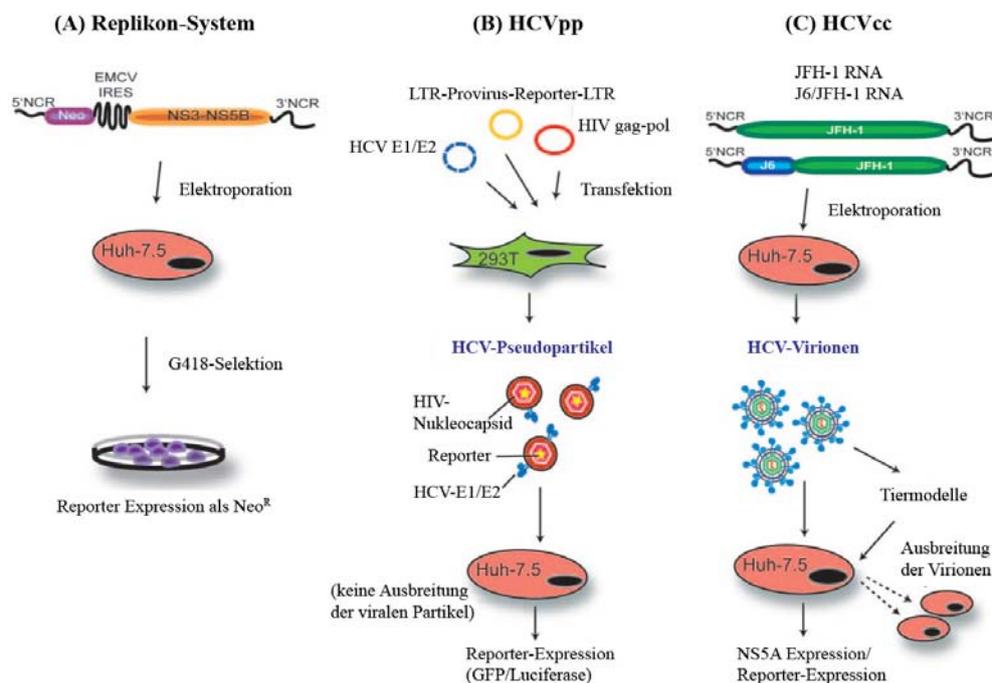


Abb. 1.5. Modellsysteme zur Analyse des HCV-Infektionszyklus

(A) Das Replikon-System. Die Elektroporation des RNA-Konstrukts ermöglicht das Studium der viralen RNA-Replikation in Zellkultur. Die Selektion erfolgt über die erworbene Neomycin-Resistenz (Neo^R). (B) HCV-Pseudopartikel (HCVpp) zur Analyse des viralen Zelleintritts. Infizierte Zellen werden mit Hilfe der Reportergen-Expression detektiert. (C) HCVcc-Virionen werden durch Elektroporation genomischer/chimärer RNA in Huh7.5-Zellen gewonnen. Die sezernierten Partikel sind infektiös für naive Zellen in Zellkultur sowie im Tiermodell. Infizierte Zellen können durch den Nachweis der NS5A-Expression, zusätzlich eingebrachte Reportergene oder den direkten Nachweis der HCV-RNA identifiziert werden. (modifiziert nach Tellinghuisen *et al.*, 2007).

Den Durchbruch brachte letztlich die Identifizierung eines HCV-Isolats, das ohne adaptive Mutationen in der Lage ist, effizient in verschiedenen Zellsystemen zu replizieren (Date *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2005). Dieses Genotyp-2a-Isolat stammt von einem japanischen Patienten mit akuter, fulminanter Hepatitis und wird als JFH-1 bezeichnet. Transfiziert man die Vollängen-JFH-1-RNA in Huh7-Zellen, produzieren diese virale Partikel (HCVcc, HCV cell culture), die in der Lage sind, naive Zellen zu reinfizieren (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Problematisch war zunächst, dass die JFH-1-RNA nur sehr geringe HCV-Titer

in Huh7-Zellen erzeugen konnte. Durch den Einsatz von Huh7.5-Zellen sowie abgeleiteter Zelllinien wie Huh7.5.1 konnte der Titer allerdings nachhaltig erhöht werden (Lindenbach *et al.*, 2006). Die Kinetik und Ausbeute der generierten HCVcc-Partikel konnte zudem durch die Entwicklung viraler Chimären verbessert werden. Die höchsten Titer wurden dabei durch Kombination von JFH-1 mit Teilen eines anderen Genotyp-2a-Isolats (J6) erzielt. Diese sogenannten JC1-Partikel entstehen dabei durch Fusion der C-NS2-Region von J6 mit dem Nichtstrukturprotein-Bereich von JFH-1 (Lindenbach & Rice, 2005; Pietschmann *et al.*, 2006). Die HCVcc-Partikel zeigen eine *in vivo* Infektiösität in Schimpansen und immundefizienten uPA-SCID-Mäusen, in die zuvor humane Hepatozyten transplantiert wurden (Lindenbach *et al.*, 2006; Wakita *et al.*, 2005). Zudem sind die sezernierten Partikel der infizierten Tiere in der Lage, naive Zellen in Zellkultur zu infizieren. HCVcc Partikel stellen damit das erste System dar, mit dem der HCV-Zelleintritt und die Virus-Neutralisation mit *in vivo* produzierten HCV-Partikeln untersucht werden könnte. Die Limitierung des Systems besteht allerdings in der Tatsache, dass die im Tiermodell produzierten Partikel eine sehr geringe Infektiösität aufweisen. Die in Zellkultur generierten, infektiösen HCVcc-Partikel weisen dagegen den Nachteil auf, dass sie nicht mit Lipoproteinen komplexiert sind, wie das im menschlichen Körper der Fall ist. Dieser Umstand bedingt, dass die *in vivo* Situation der HCV-Infektion durch HCVcc-Partikel nicht eins zu eins nachgestellt werden kann (Farquhar & McKeating, 2008).

1.7.2. Der HCV-Zelleintritt

Mit der Entwicklung des HCVpp-Systems wurde schnell deutlich, dass nur wenige humane Leberzelllinien die nötigen Eigenschaften besitzen, um als potentiell Infektionssystem für HCV-Studien zu dienen (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). Der Tropismus der HCV-Partikel zu bestimmten hepatischen Zellen ließ sich dabei u.a. durch das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Oberflächen-Rezeptoren erklären. Mindestens drei verschiedene Wirtszell-Molekülklassen sind am HCV-Eintritt beteiligt: das Tetraspanin CD81 (Pileri *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004), der Scavenger-Rezeptor BI

(Grove *et al.*, 2007; Scarselli *et al.*, 2002) sowie die *Tight junction*-Proteine Claudin (CLDN)-1, -6 und -9 (Evans *et al.*, 2007; Meertens *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007). Vor wenigen Wochen wurde zudem ein weiteres *Tight junction*-Protein, Occludin entdeckt, welches sich als essentiell für den HCV-Zelleintritt herausgestellt hat (Ploss *et al.*, 2009).

Andere Moleküle, die zwar nicht essentiell sind, aber mit dem viralen Zelleintritt in Verbindung gebracht werden, sind der LDL-Rezeptor (Agnello *et al.*, 1999; Wunschmann *et al.*, 2000), die Lipoprotein-Lipase (Andreo *et al.*, 2007), Heparin-Sulfat (Barth *et al.*, 2003; Germi *et al.*, 2002) sowie die Mannose-bindenden Lektine L-SIGN und DC-SIGN (Gardner *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2003). Vor einiger Zeit wurde zudem ein Cofaktor von CD81, EWI-2wint, mit dem hepatozellulären Tropismus von HCV in Verbindung gebracht (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). Die Expression dieses Faktors inhibiert die Interaktion der HCV-Partikel mit CD81 und verhindert so die Infektion von "Nicht-Leberzellen". Allerdings wird EWI-2wint unter normalen Umständen in Hepatozyten nicht exprimiert.

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen wird folgendes Modell für den Eintritt von HCV in die Wirtszelle angenommen (Abb.1.6). Die Molekülgruppe der Glykoaminoglykane (GAGs) und der LDL-Rezeptor erleichtern vermutlich den initialen Kontakt von HCV mit der Zielzelle (Germi *et al.*, 2002). Diese Interaktion wird dabei durch den Zusammenschluss von Lipoproteinen und HCV-Virionen vermittelt. Die Lipoproteine, die mit den viralen Partikeln assoziiert sind, erleichtern dabei den initialen Kontakt mit der Zielzelle. Der direkte Kontakt der HCV-Hüllproteine mit den zellulären Elementen kann allerdings ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Nach der initialen Bindung interagiert der HCV-Partikel dann mit CD81 und dem Scavenger-Rezeptor BI (SR-BI). Obwohl die genauen Bedingungen der Bindungsreaktion noch nicht restlos geklärt sind, kann man davon ausgehen, dass HCV zunächst mit SR-BI in Kontakt tritt, bevor die E2-vermittelte Wechselwirkung mit CD81 erfolgt. Die Interaktion mit SR-BI kann dabei sowohl direkt über die E2-Hüllproteine (Scarselli *et al.*, 2002), als auch indirekt durch HCV-assoziierte Lipoproteine erfolgen (Maillard *et al.*, 2006).

Von großer Bedeutung ist dabei, dass diese initialen Bindungsreaktionen von verschiedenen Komponenten des Serums beeinflusst werden können. So sind *High Density Lipoproteine* (HDL) z.B. in der Lage die HCV-Infektiösität zu erhöhen (Voisset *et al.*, 2005), während oxidierte *Low Density Lipoproteine* (LDL_{ox}) die Infektionsrate senken (von Hahn *et al.*, 2006).

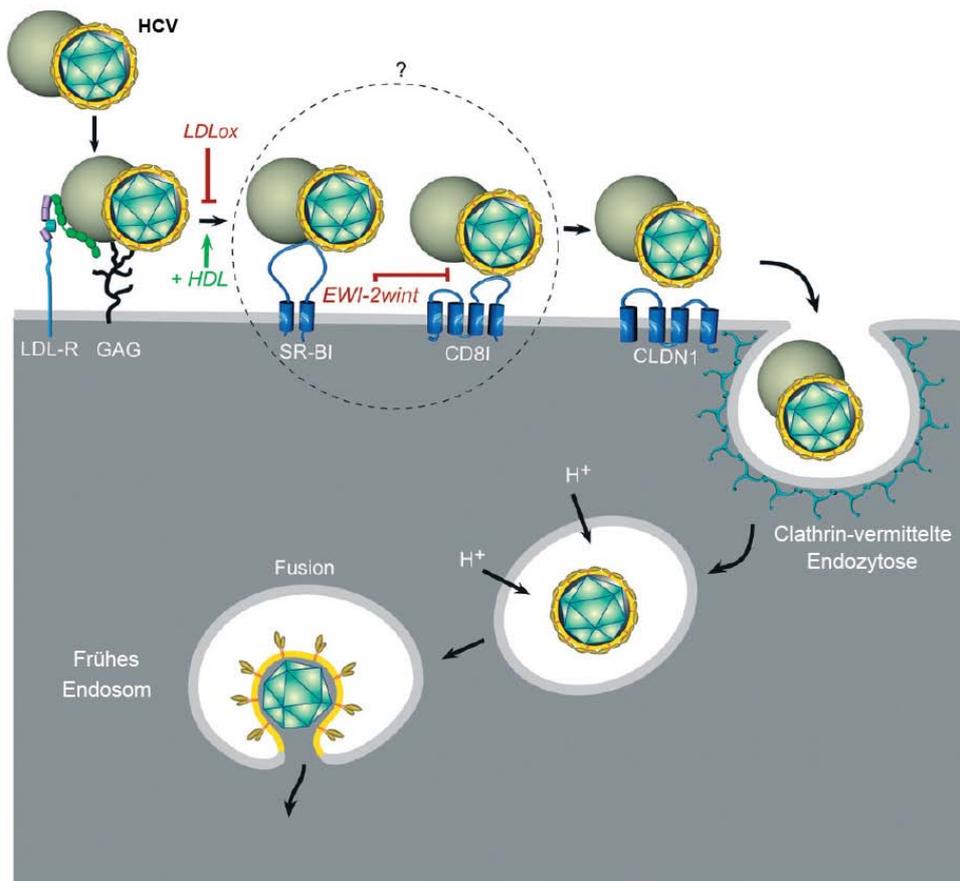


Abb. 1.6. Modell zum HCV-Eintritt in die Wirtszelle

HCV bindet mit Hilfe von Glykoaminoglykanen (GAG) und dem LDL-Rezeptor (LDL-R) an die Plasmamembran. Assoziierte Lipoproteine (grau) können an dieser Interaktion beteiligt sein. Anschließend kommt es zu einer Wechselwirkung mit SR-BI und CD81, bevor der HCV-Partikel mit dem *Tight junction*-Protein CLDN-1 wechselwirkt. Die Internalisierung erfolgt durch Clathrin-vermittelte Endozytose und ist pH-abhängig. Nach der Fusion mit frühen Endosomen wird die HCV-RNA ins Zytoplasma entlassen und die virale Replikation eingeleitet (modifiziert nach Helle & Dubuisson, 2008).

CLDN-1 interagiert erst im späteren Verlauf des Infektionsprozesses mit dem viralen Partikel, vermutlich nach einer lateralen Migration des Virus-Rezeptor-Komplexes zu den *Tight junctions* der Wirtszelle (Helle & Dubuisson, 2008). Die anschließende Internalisierung des HCV-Partikels erfolgt durch Clathrin-vermittelte Endozytose (Blanchard *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006) und ist pH-abhängig (Hsu *et al.*, 2003; Tscherne *et al.*, 2006). Nach der Fusion mit frühen Endosomen (Blanchard *et al.*, 2006) wird das Genom ins Zytoplasma entlassen, um die virale Replikation einzuleiten.

1.7.3. Die HCV-Replikation

Das als mRNA-lesbare HCV-Genom gelangt nach der Freisetzung ins Zytosol, zunächst zu den Ribosomen des rauen ER, wo eine erste Synthese der viralen Proteine stattfindet. Das virale Protein NS4B induziert daraufhin die Bildung netzartiger Membranstrukturen, den *membranous web*, die als Gerüst für die Bildung Membran-gebundener Replikationskomplexe dienen. Mit Hilfe der RdRP NS5B wird das virale (+)ssRNA-Genom innerhalb dieser Membran-Kompartimente amplifiziert. Dies geschieht über die Synthese eines komplementären Gegenstranges, der als Matrize für die folgende Synthese des HCV-Genoms dient. Die neu generierten (+)ssRNA-Genome können daraufhin wieder Teil neuer Replikationskomplexe werden und als Template für die Synthese neuer (-)RNA-Matrizen dienen bzw. für die Synthese neuer HCV-Polyprotein-Kopien eingesetzt werden. Darüberhinaus können neu-synthetisierte HCV-Genome mit Nukleokapsid-Proteinen verknüpft und zu viralen Partikeln zusammengebaut werden.

Zur Initiation der Translation an den Ribosomen nutzen eukaryotische mRNAs in der Regel eine Modifizierung des 5'-Endes, das sogenannte *Cap*. Die HCV-RNA besitzt durch die Faltung der 5'-UTR allerdings eine IRES und benötigt daher keine zellulären Faktoren zur Bindung an die Ribosomen und zum Start der Proteinbiosynthese. Noch während der Translation werden die Strukturproteine von zellulären Proteasen (Signalasen) vom entstehenden Polyproteinstrang abgeschnitten. Die Hüllproteine E1 und E2 gelangen in das Lumen des ER, lagern sich in die Membran ein und werden stark glykosyliert (siehe 1.6.1.2). Das Core-Protein lagert sich an die zytoplasmatische Seite der

ER-Membran an und bindet aufgrund seiner Ladungseigenschaften die virale (+)ssRNA. Anschließend kommt es zur Verpackung des Core-RNA-Komplexes und zur Abschnürung (*budding*) des HCV-Partikels in das Lumen des ER. Die neuen Virionen werden zum Golgi-Apparat geleitet und verlassen die infizierten Zellen durch zelluläre Sekretion. Der virale Lebenszyklus von HCV ist in Abb.1.7 nochmals zusammengefasst.

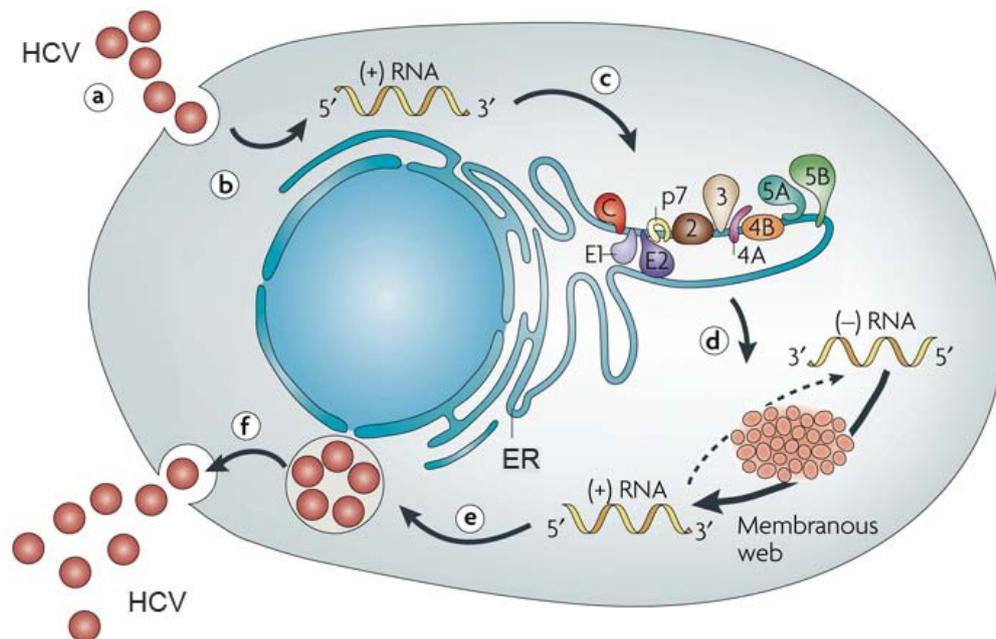


Abb. 1.7. Modell des HCV-Lebenszyklus

HCV bindet über verschiedene Rezeptoren an die Plasmamembran (a) und wird über Clathrin-vermittelte Endozytose (b) internalisiert. Nach der Fusion mit frühen Endosomen wird die HCV-RNA ins Zytoplasma entlassen, um die virale Replikation einzuleiten (c). Nach der initialen Translation der viralen RNA am rauen ER kommt es zur Bildung spezialisierter Membran-Kompartimente (*Membranous web*), an denen die weitere HCV-Replikation erfolgt (d). Die viralen Strukturproteine werden an der ER-Membran prozessiert und durch Verknüpfung mit der gebildeten HCV-RNA zu Virionen verpackt (e), die anschließend durch zelluläre Sekretion ausgeschleust werden (f). Abbildung modifiziert nach Moradpour *et al.*, 2007.

1.7.3.1. Regulation der HCV-Replikation durch miRNAs

Der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) wurde vor einigen Jahren als neuartige Methode entdeckt, um die zelluläre Gen-Expression Sequenz-spezifisch zu regulieren (Fire *et al.*, 1998). Als Schlüsselfaktoren stellten sich dabei 21-23 nt-lange, nicht-kodierende RNA-Moleküle heraus, die innerhalb bestimmter Proteinstrukturen für das Sequenz-spezifische *gene silencing* verantwortlich sind (Bartel, 2004). Mittlerweile sind im Menschen über 400 dieser endogenen RNA-Moleküle bekannt, die als microRNAs (miRNAs) bezeichnet werden (Pietschmann, 2009).

Nachdem nun schon länger bekannt war, dass diese miRNAs die Expression zellulärer mRNA regulieren, wird nun immer deutlicher, dass sie zudem in der Lage sind, die Replikation und Pathogenese von Viren zu beeinflussen (Gottwein & Cullen, 2008). Während allerdings verschiedene DNA-Viren, wie z.B. CMV virale miRNAs bilden, um die Bedingungen innerhalb der Wirtszelle so zu ändern, dass ihre Verbreitung optimiert wird (Stern-Ginossar *et al.*, 2007), nutzt HCV endogene miRNA, um die virale Replikation zu steigern (Chang *et al.*, 2008; Jopling *et al.*, 2005). Die Leber-spezifische miRNA122 bindet dabei z.B. an eine Tandem-Bindungsstelle innerhalb der 5'-UTR-Region des HCV-Genoms und wirkt damit positiv auf die virale Replikation (Jopling, 2008). Vor Kurzem wurde zudem eine endogene miRNA entdeckt, die negativ auf die HCV-Replikation wirkt (Murakami *et al.*, 2009). Diese als miR199* bezeichnete miRNA zeigt eine gewisse Komplementarität zu einem konservierten Bereich der 5'-UTR-Region von HCV und ist in der Lage, die HCV-Replikation zu senken. miR199* ist allerdings im Gegensatz zur miRNA122 nur sehr schwach in Hepatozyten exprimiert (Randall *et al.*, 2007) und beeinflusst die HCV-Replikation daher *in vivo* kaum.

Neben ihrer regulatorischen Funktion könnten miRNAs einen Einfluss auf den hepatischen Tropismus von HCV haben (Gottwein & Bukh, 2007; Pietschmann, 2009). Leber-spezifische miRNAs, wie z.B. die miRNA122 könnten das Virus dabei positiv beeinflussen und die Virusvermehrung innerhalb der Zielzelle fördern, während die Expression "Leber-fremder" miRNAs die virale Vermehrung hemmen könnte. Diese Hypothese wird z.B. durch die Tatsache erhärtet, dass eine ektopische Expression der Leber-

spezifischen miRNA122 in 293-Zellen die HCV-Replikation in der Nierenzelllinie steigert (Chang *et al.*, 2008). Wie stark der Einfluss der miRNAs auf die HCV-Replikation oder den hepatozellulären Tropismus ist, muss in weiteren Studien geklärt werden. Bemerkenswert scheint allerdings die Tatsache, dass sich HCV als persistierendes Virus damit nicht nur optimal an die spezifische Proteinzusammensetzung, sondern auch an die vorherrschenden miRNA-Verhältnisse der Leberzelle angepasst hat.

1.8. Hepatozyten als Infektionssystem für HCV

HCV ist ein hepatotropes Virus und Leberzellen sind daher die primären Zielzellen der viralen Infektion. Primäre humane Hepatozyten (PHH) liefern durch ihre *ex vivo* Situation zwar die optimalen Voraussetzungen, um physiologisch relevante Infektionsbedingungen zu schaffen, aber ihre Verfügbarkeit ist stark limitiert. Zudem sind die Etablierung und die Langzeitkultur von PHHs sehr schwierig. Bezogen auf die Infizierbarkeit mit HCV-Partikeln, stellen sie außerdem ein eher schlechtes zelluläres System dar, da die HCV-Replikation im Vergleich zu immortalisierten humanen Hepatozyten stark reduziert ist (Fournier *et al.*, 1998; Kanda *et al.*, 2006).

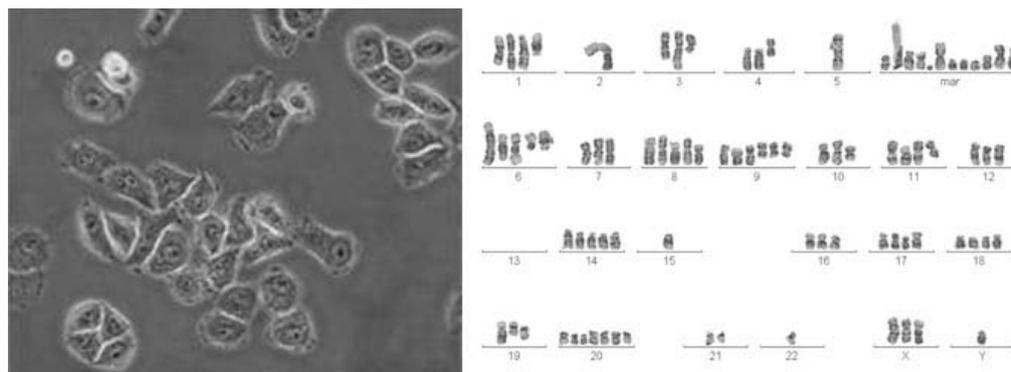


Abb. 1.8. Morphologie und Karyotyp der hepatischen Zelllinie Huh7

(A) Lichtmikroskopische Aufnahme von Huh7-Zellen in einer Dichte von etwa 50 % und (B) Karyogramm der Huh7-Zelllinie (freundlicherweise erstellt am Institut für Humangenetik der Uniklinik Homburg/Saar, AG Meese).

Aus diesem Grund basiert der Großteil der HCV-Studien auf Versuchen mit hepatischen Zelllinien. Nachteil dieser Zellen ist allerdings, dass ihr Genom durch die Immortalisierung und die hohe Passagenzahl stark degeneriert ist. Betrachtet man z.B. das Karyogramm der Huh7-Zellen, die standardmäßig für HCV-Versuche eingesetzt werden, so sind auf den ersten Blick zahlreiche Chromosomenaberrationen erkennbar (Abb.1.8). Zudem zeigen Huh7-Zellen, auch basierend auf ihrem Ursprung als Leberkarzinomzellen ein anormales Wachstumsverhalten, dysfunktionale Mitochondrien sowie abweichende Endozytose- und Signalkaskaden (Buck, 2008; Jones *et al.*, 1998; Kroemer & Jaattela, 2005; Nagao *et al.*, 2005). Immortalisierte Zellkulturen stellen also eher artifizielle Systeme dar und spiegeln damit keineswegs die *in vivo* Situation einer Leberzelle wieder. Aus dieser Situation heraus erwächst die Notwendigkeit eines alternativen Zellsystems für HCV-Studien.

1.9. Neohepatozyten als Zellkultursystem für HCV-Studien

Die HCV-Forschung legt aufgrund des hohen Bedarfs an Leberzellen für Medizin und Forschung seit einigen Jahren ihren Schwerpunkt auf die Entwicklung von Hepatozyten aus humanen Vorläuferzellen. Zahlreiche Studien haben dabei gezeigt, dass sich Stammzell-artige Zellen aus der fetalen humanen Leber oder dem Knochenmark zu Hepatozyten differenzieren lassen (Crosby & Strain, 2001; Malhi *et al.*, 2002). Diese Zellen exprimieren Hepatozyten-spezifische Gene, aber die zugrundeliegenden Entwicklungswege sind noch unklar. Zhao und Mitarbeiter berichteten im Jahre 2003 von der Entdeckung pluripotenter Stammzell-Populationen in humanen Monozyten des peripheren Blutes. Diese Zellen konnten mit Hilfe von hepatischen Wachstumsfaktoren zu Hepatozyten differenziert werden (Zhao *et al.*, 2003). Basierend auf diesen Erkenntnissen kam es im Jahre 2005 zur Entwicklung der sogenannten Neohepatozyten (Ruhnke *et al.*, 2005a; Ruhnke *et al.*, 2005b). Die Differenzierung dieser Zellen basiert auf der Reprogrammierung humaner CD14-positiver Blutmonozyten und umfasst eine zweistufige Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von M-CSF, IL-3 und FGF-4. Bekanntermaßen differenzieren humane Monozyten unter dem Einfluss von CSF-Molekülen und

anderen Zytokinen zu Makrophagen, myeloiden DCs und Osteoclasten. Die Kombination von M-CSF und IL-3 hat allerdings einen synergistischen Effekt auf die Plastizität der Monozyten, der bis dahin nicht beobachtet wurde. Als Reaktion auf die kombinierte Zytokin-Zusammensetzung unterlaufen die Monozyten eine partielle Dedifferenzierung, die dazu führt, dass Faktoren, die ihre terminale Differenzierung bedingen würden, herunterreguliert werden. Die resultierenden Zellen werden als PCMOs (*pluripotent cells of monocytic origin*) bezeichnet und lassen sich durch induktive Signale zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren (Dresske *et al.*, 2006; Ehnert *et al.*, 2008; Ruhnke *et al.*, 2005b). Die hepatische Entwicklung wird dabei durch eine zehntägige Kultivierung der PCMOs in FGF-4-haltigem Differenzierungsmedium erreicht. Die resultierenden Neohepatozyten zeigen viele Gemeinsamkeiten mit primären Hepatozyten in Bezug auf Zellmorphologie, Expression hepatischer Marker sowie spezifische metabolische Funktionen wie dem Harnstoffmetabolismus (Ruhnke *et al.*, 2005a; Ruhnke *et al.*, 2005b).

1.10. Ziele der Arbeit

Eine HCV-Infektion ist die häufigste Ursache chronischer Leberinfektionen. Die genaue Analyse des HCV-Lebenszyklus wird durch die hohe Spezifität des Virus für humane Zellen und das dadurch bedingte Fehlen eines Kleintiermodells erschwert. Primäre humane Hepatozyten können zwar für Infektionsexperimente eingesetzt werden, aber ihre Verfügbarkeit ist begrenzt und Langzeitkulturen sind sehr schwierig. Daher sind HCV-Untersuchungen bisher auf die hepatische Zelllinie Huh7 sowie deren Subklone begrenzt. Huh7-Zellen zeigen allerdings bedingt durch ihren Ursprung als Leberkarzinomzellen ein dereguliertes Wachstumsverhalten sowie abweichende Stoffwechselprozesse und spiegeln demnach die *in vivo* Situation einer Leberzelle nur bedingt wider. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Monozyten-basierte Neohepatozyten als alternatives Infektionssystem für HCV-Studien zu etablieren. Diese neohepatischen Zellen sollten zunächst auf ihre hepatischen Eigenschaften hin untersucht werden, um sie in einem zweiten Schritt für

Infektionsstudien mit HCV-Partikeln einzusetzen. Dabei sollten durch den Vergleich mit klassischen Huh7-Zellen mögliche Vor- und Nachteile eines alternativen Zellsystems herausgearbeitet werden. Zudem sollte durch Studien mit HCV-positiven Blutproben der Frage nachgegangen werden, ob Neohepatozyten zur Etablierung eines Patienten-spezifischen Zellsystems herangezogen werden können. Basierend auf einem personalisierten Infektionssystem könnte langfristig untersucht werden, inwiefern das Expressionsmuster der Wirtszelle Einfluss auf die Virus-Persistenz in einzelnen Patienten hat und welche Faktoren das Fortschreiten der HCV-Infektion begünstigen.

2. *Material und Methoden*

2.1. **Chemikalien**

AB-Serum, human	Cambrex, Oberhaching
	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Akkutase	PAA Laboratories, Cölbe
Agarose	SeaKem, Rockland
	Gibco BRL, Schottland
Ampicillin (Binotal™)	Bayer, Leverkusen
BILN-2061	Boeringer Ingelheim, Biberach
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	PAA Laboratories, Cölbe
Casyton	Schärfe, Reutlingen
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DEAE-Dextran	Amersham Bioscience, Freiburg
DMEM (1x) High Glucose	PAA Laboratories, Cölbe
DMSO	Merck, Darmstadt
	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
FGF-4	Eufets AG, Idar-Oberstein
FKS	GibcoBRL, Karlsruhe
	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
Glycerin	Cambrex, Oberhaching
HEPES	Merck, Darmstadt
IL-3	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Eufets AG, Idar-Oberstein
LB-Agar	Merck, Darmstadt
	Invitrogen, Karlsruhe

LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Lysing solution	BD Bioscience, Heidelberg
M-CSF	Eufets AG, Idar-Oberstein
β -Mercaptoethanol	Eufets AG, Idar-Oberstein
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
NEAA	PAA Laboratories, Cölbe
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
	Cambrex, Oberhaching
PFA	AppliChem, Darmstadt
Polybrene	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
RPMI-1640	Cambrex, Oberhaching
Saponin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Sucrose / D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
TRIS	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Cölbe

2.2. Antikörper

Tab. 2.1.: Verwendete Antikörper

[h], gegen humane Antigene gerichtet; [m], aus Maus gewonnen; [rb], aus Kaninchen gewonnen; [g], aus Ziege gewonnen; [r], aus Ratte gewonnen; [s], Serum; FITC, Fluoresceinisothiocyanat, PE, Phycoerythrin, PE-Cy5, "Tandem"-Farbstoff, bestehend aus Phycoerythrin kovalent mit Cyanin 5 verknüpft

Antigen bzw. Isotyp-Kontrolle	Klon	Konjugation	Isotyp	Hersteller
CD14 [h]	RMO52	FITC	IgG2a [m]	Immunotech
CD16 [h]	3G8	FITC	IgG1κ [m]	BioLegend
CD32 [h]	FUN-2	FITC	IgG2b [m]	BioLegend
CD64 [h]	10.1	FITC	IgG1 [m]	Leinco Technologies
CD81 [h]	JS-81	FITC	IgG1κ [m]	BD Pharmingen
CD81 [h]	JS-81	PE-Cy5	IgG1κ [m]	BD Pharmingen
CD81 [h]	JS-81	-	IgG1κ [m]	BD Pharmingen
Cytokeratin-18 [h]	2Q1021	FITC	IgG1 [m]	US Biological
Cytokeratin-19 [h]	KA4	PE	IgG1κ [m]	BD Pharmingen
CLDN-1 [h]	1C5-D9	-	IgG2 [m]	Abnova
CLDN-1 [h]	[s]	-	IgG [r]	*(1)
SR-BI [h]	polyklonal	-	IgG [rb]	Novus
SR-BI [h]	[s]	-	IgG [r]	*(1)

Tab. 2.1.: Verwendete Antikörper (Fortsetzung)

Antigen bzw. Isotyp-Kontrolle	Klon	Konjugation	Isotyp	Hersteller
Serum Albumin [h]	polyklonal	FITC	IgG [rb]	Rockland
Isotyp-Kontrolle	679.1Mc7	FITC	IgG1 [m]	Beckman Coulter
Isotyp-Kontrolle	679.1Mc7	PE	IgG1 [m]	Beckman Coulter
Isotyp-Kontrolle	679.1Mc7	PE-Cy5	IgG1 [m]	Beckman Coulter
Isotyp-Kontrolle	MOPC-21	-	IgG1 κ [m]	BD Pharmingen
Isotyp-Kontrolle	MOPC-21	PE	IgG1 κ [m]	BD Pharmingen
Isotyp-Kontrolle	HOPC-1	-	IgG2a [m]	Southern Biotech
Isotyp-Kontrolle	U7.27	FITC	IgG2a [m]	Immunotech
Isotyp-Kontrolle	MPC-11	FITC	IgG2b [m]	Biolegend
Isotyp-Kontrolle	polyklonal	-	IgG [rb]	Novus
Isotyp-Kontrolle	polyklonal	FITC	IgG [rb]	Rockland
Mouse-IgG [m]	polyklonal	PE	[g]	Beckman Coulter
Rabbit-IgG [rb]	polyklonal	FITC	[g]	Southern Biotech
Patienten α HCV#1-4 + Kontrolle	*	-	IgG [h]	*(1)

*(1) Antikörper bzw. Seren, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. T.F. Baumert, Inserm, U748, Louis Pasteur Universität, Strasbourg zur Verfügung gestellt wurden (siehe 2.2.1.)

2.2.1. Seren und humane Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tab. 2.1 zusammengefasst. Neben den kommerziell erworbenen Antikörpern wurden uns von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Baumert (Louis Pasteur Universität, Strasbourg) Antikörper gegen Oberflächendomänen der Proteine SR-BI und CLDN-1, sowie ein entsprechender Kontrollantikörper zur Verfügung gestellt. Diese Antikörper wurden durch genetische Immunisierung von Wistar Ratten generiert (Zeisel *et al.*, 2007) und als Serum-Verdünnungen für die Versuche eingesetzt. Zusätzlich wurden uns humane Antikörper gegen HCV (α HCV#1-4) zur Verfügung gestellt, die aus Serumproben chronisch kranker HCV-Patienten stammen. Die Isolierung der IgG Antikörper aus dem Serum erfolgte dabei mittels Protein G Antikörper-Affinitätschromatographie (Steinmann *et al.*, 2004). Die Detektion der anti-HCV-Antikörper erfolgte anschließend durch ein ARCHITECT Anti-HCV EIA Verfahren (Abbott laboratories). Die auf analoge Weise aufgereinigten Kontroll-IgG stammen von HCV-negativen Individuen.

2.3. Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M. von Laer zu Verfügung gestellt und der Stammsammlung des Georg Speyer Hauses (Frankfurt am Main) entnommen. Die Herkunft und die Eigenschaften dieser Plasmide sind in Tab. 2.2 aufgeführt und in Abb. 2.1 graphisch dargestellt. Das pVSV-G-Plasmid entspricht dabei dem pM480 Plasmid unter Ersatz der HCV-E1-E2 Gene durch das VSV-G-Gen.

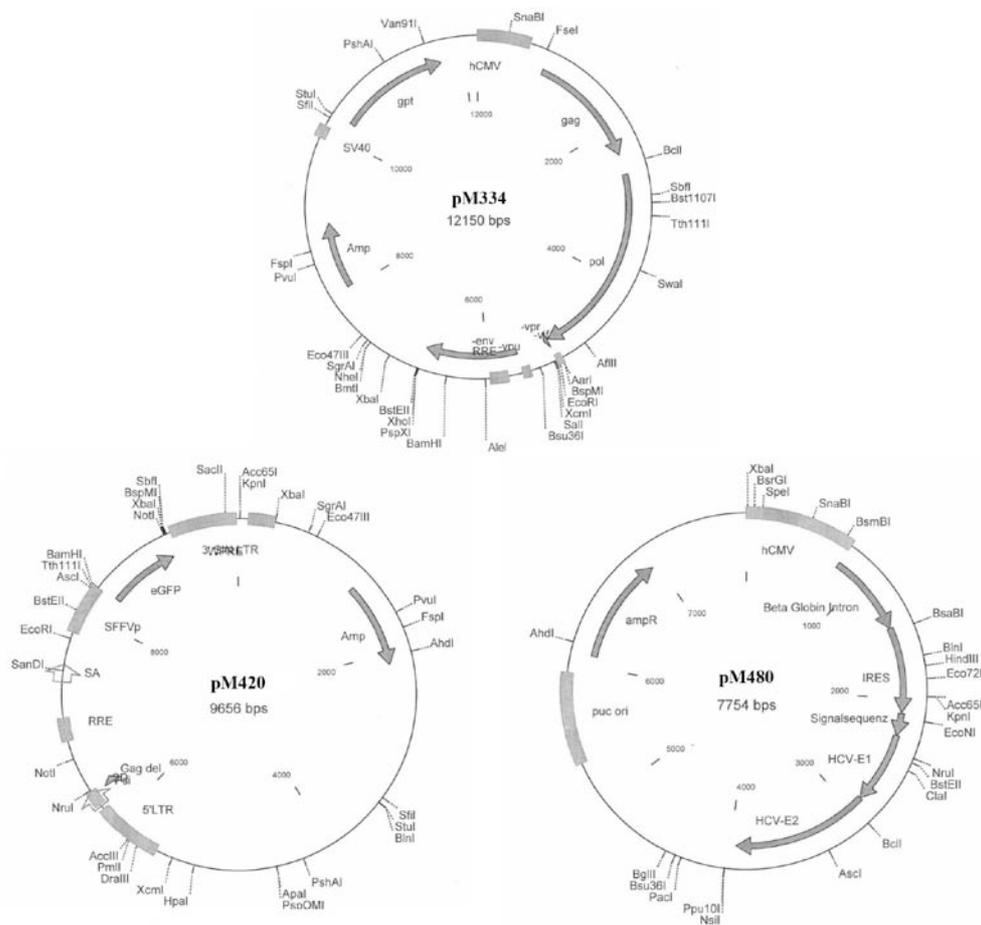


Abb. 2.1. Graphische Darstellung der in der Arbeit verwendeten Plasmide

Das Plasmid pM334 exprimiert unter Steuerung eines hCMV Promotors die Proteine des retroviralen HIV-cores, welches das Grundgerüst der späteren HCVpp bildet. Der Expressionsvektor pM420 codiert für das Markerprotein EGFP, während das Plasmid pM480 die beiden HCV-Oberflächenproteine E1 und E2 exprimiert. Das nicht gezeigte Expressionsplasmid pVSV-G entspricht in seinem Aufbau dem pM480 Vector, wobei die Gene für die Oberflächenproteine E1 und E2 durch das Gen für das VSV-Glykoprotein G ersetzt wurden.

Tab. 2.2: Herkunft und Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pM334	Expressionsvektor; HIV-core; "packaging"-Signal; hCMV Promotor	(1)
pM420	Expressionsvektor; EGFP-Gen; Integrations-Signal; kein Promotor	(1)
pM480	Expressionsvektor; HCV-E1 und -E2 Gen; hCMV Promotor	(1)
pVSV-G	Expressionsvektor; VSV-G-Gen; hCMV Promotor	(1)

(1) Der Stammsammlung des GSH (Frankfurt a.M) entnommene Plasmide

2.4. Zellen und Bakterien

2.4.1. Zelllinien

293T

Bei der Zelllinie 293T handelt es sich um eine permanente humane Zelllinie von primären, embryonalen Nierenzellen (auch bezeichnet als HEK-293T "Human Embryonic Kidney"). Die Zellen wurden mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transformiert und enthalten Sequenzen des Virusgenoms. 293T Zellen exprimieren zusätzlich das "SV40 large T-Antigen", welches die DNA Replikation von episomalen Plasmiden mit dem "SV40 origin of replication" ermöglicht. Somit lassen sich verschiedenste Viren u.a. Retro-, Lenti- und DNA-Viren in 293T-Zellen vermehren.

Huh7

Die Zelllinie Huh7 leitet sich von einem humanen hepatozellulären Karzinom ab. Sie wurde 1982 aus entarteten Leberzellen eines 57 Jahre alten männlichen Japaners generiert und ist seither eine der bedeutendsten permanenten Leberzellkulturen (Nakabayashi *et al.*, 1982).

Huh7.5

Huh7.5 bezeichnet einen Subklon der Huh7-Zelllinie. Diese Zellen enthielten ursprünglich ein selektierbares HCV-Replicon, wurden jedoch durch die Behandlung mit einem HCV-spezifischen Inhibitor "geheilt". Huh7.5-Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte Replikationsrate für HCV-RNA aus. Diese erhöhte Permissivität beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf einer Störung der zelleigenen Interferonantwort, die durch eine Mutation des *RIG-I*-Gens bedingt ist.

HeLa

HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms und die ersten humanen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde.

2.4.2. Bakterien und Bakterien-Kultivierung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterien wurden der Stammsammlung des Institutes für Virologie, der Universitätskliniken Homburg/Saar entnommen. Der eingesetzte Stamm sowie dessen genotypischer Hintergrund finden sich in Tabelle 2.3.

Tab. 2.3.: Herkunft und Eigenschaften des verwendeten *Escherichia coli*-Stamms

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ^{proAB} lacI ^{ZDM15} Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene

Der aus der Stammsammlung entnommene *E. coli* Stamm wurde in flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Einzelne Klone wurden gewonnen, indem Teile einer Kultur auf LB-Agarplatten ausgestrichen wurden. Mit Plasmiden transformierte *E. coli*-Kulturen wurden in LB-Medium kultiviert, dem Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt wurde.

2.5. Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterienzellen durch Hitzeschock beruht darauf, dass eine kurzfristige schnelle Erhöhung der Temperatur die Kompetenz der Bakterienzellen zur DNA-Aufnahme stark erhöht (Cohen *et al.*, 1972).

Dazu wurden zunächst 50 µl der hitzeschock-kompetenten *E.coli* Bakterien mit 1-2 µl des zu amplifizierenden Plasmids versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Induktion des Hitzeschocks wurde die Bakteriensuspension für 70 Sekunden bei 42°C inkubiert, bevor sie erneut fünf Minuten auf Eis gekühlt wurde. Zur Regeneration der Bakterienzellen wurden diese in 1 ml LB-Medium überführt und eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren der transformierten Zellen auf dem entsprechenden Selektionsmedium.

2.6. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung der in Bakterien vermehrten Plasmid-DNA müssen die Bakterien aufgeschlossen und die Plasmid-DNA von Zellbestandteilen und der genomischen Bakterien-DNA getrennt werden. Zur Isolation von hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der "QIAGEN Plasmid Maxi Kit" verwendet. Die Isolierung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers, wobei die durchgeführte Methode auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse basiert. Nach dem Entfernen der Zelltrümmer und denaturierten Proteine wurde die Plasmid-DNA auf "QIAGEN" Anionen-Austauschersäulen gegeben. Nach der Bindung der DNA an die Säulenmatrix wurden durch Waschen mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration RNA und Verunreinigungen mit niedermolekularen Komponenten entfernt. Durch Zugabe eines Puffers mit höherer Salzkonzentration wurde anschließend die Plasmid-DNA eluiert. Nach der Fällung der DNA mit Isopropanol und einmaligem Waschen mit 70%-igem Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und in Aqua_{bidest.} resuspendiert.

2.7. Bestimmen der DNA-Konzentration

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund ihrer Basenzusammensetzung Licht zwischen einer Wellenlänge von 250 und 270 nm. Proteine absorbieren hingegen aufgrund ihrer Tyrosin- und Tryptophanreste am stärksten bei 280 nm. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und des Grades der Verunreinigung mit Proteinen wurden sich diese Eigenschaften zu Nutzen gemacht.

Durchführung:

Die Messung der Absorption einer wässrigen DNA-Lösung gegen Aqua_{bide}st. erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm. Ein Maß für die Reinheit der DNA errechnet sich aus dem Quotient A_{260}/A_{280} , wobei ein Wert von 1,8 optimal ist. Werte kleiner als 1,8 weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, während Werte größer als 1,8 auf das Vorhandensein von RNA schließen lassen. Eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm einer Extinktion von 1, so dass sich die Konzentration der isolierten DNA nach folgender Formel errechnet:

$$A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times V = \text{DNA-Konzentration der Probe } [\mu\text{g/ml}]$$

A_{260} : Absorption bei 260 nm
V : Verdünnungsfaktor

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Photometer Ultraspec 3000 der Firma Pharmacia Biotech.

2.8. Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau der DNA erfolgte mittels Typ II Restriktionsendonukleasen, die in der Lage sind, in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen beide Stränge eines DNA-Doppelstranges an spezifischen Erkennungssequenzen so zu schneiden, dass entweder überstehende 5'- bzw. 3'-Enden ("sticky ends") oder glatte Enden ("blunt ends") entstehen. Die durch Restriktion erhaltenen DNA-Fragmente können dann anhand ihrer Größe im Agarose-Gel (siehe 2.9.) identifiziert werden.

Verwendete Lösungen:

"Blaumarker":

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Glycerin	50 % (v/v)
EDTA	0,05 M

Durchführung:

Zum Restriktionsverdau wurden jeweils 0,5 μg bis 1 μg der jeweiligen Plasmid-DNA, 1 U des entsprechenden Enzyms und 2 μl des vom Hersteller für die verwendeten Enzyme empfohlenen zehnfach konzentrierten Puffers eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua_{bidest.} auf 20 μl aufgefüllt und für maximal zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von 5 μl "Blaumarker" abgestoppt, indem das darin enthaltene EDTA die für die Restriktionsendonukleasen notwendigen Mg^{2+} -Ionen komplexiert.

2.9. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung geladener Moleküle im elektrischen Feld und basiert darauf, dass die DNA bei neutralem pH polyanionisch ist. Das Wanderungsverhalten ist dabei abhängig von der Nettoladung, der Größe und der Form der Nukleinsäuren, sowie von der Porengröße der verwendeten Matrix. Im Agarose-Gel wird die Porengröße durch die Menge an zugesetzter Agarose definiert und wirkt so als Molekularsieb.

Verwendete Lösungen:

50 x TAE-Puffer:

Tris/HCl (pH7,8)	2 M
NaAcetat	0,25 M
EDTA	0,5 M

Durchführung:

Zur Gelelektrophorese wurden standardmässig 1 %-ige Agarose-Gele in 1 x TAE-Puffer verwendet. Angefärbt wurde die DNA durch das in doppelsträngige DNA/RNA interkalierende Ethidiumbromid, welches mit einer Endkonzentration von 0,7 µg/ml der in 1 x TAE-Puffer gelösten Agarose zugesetzt wurde. Zur Markierung der Lauffront und Erhöhung der Dichte der DNA-Proben wurden diese mit 1/5 Volumen Blaumarker versetzt. Dabei entspricht das Wanderungsverhalten von Bromphenolblau einem doppelsträngigen linearisierten 300 bp-Fragment. Die Elektrophorese erfolgte bei 8 V/cm in 1 x TAE-Puffer. Die Anregung der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe erfolgte unter UV-Licht, dieser ist daraufhin Licht emittierend. Zur anschließenden fotografischen Detektion diente ein Bildverarbeitungssystem mit angeschlossenem Drucker Gel Print 2000i der Firma MWG Biotech.

2.10. Zellkultur

Die Kultivierung humaner Zellen erfolgte grundsätzlich bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 %.

2.10.1. Puffer und Lösungen für die Zellkulturarbeit

PBS

NaCl	8,0 g/l
KCl	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,9 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Für die Arbeit mit humanen Zellen muss grundsätzlich PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ verwendet werden, damit es beim Waschen zu keiner Vorstimulation der Zellen kommt.

2.10.2. Zellkulturmedien

Das Inaktivieren der den Medien zugesetzten Seren erfolgte grundsätzlich für zehn Minuten bei 40°C. Humanes AB-Serum wurde für eine Stunde bei 55°C inaktiviert.

Standard-Medium zur Kultivierung von adhärenenten Zellen

DMEM (1x) High Glucose	
hitzeinaktiviertes FKS	10 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Medium zur Kultivierung von Huh7-Zellen

DMEM (1x) High Glucose

hitzeinaktiviertes FKS	10 % (v/v)
NEAA	1 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Medium zur Makrophagenreifung

RPMI 1640

hitzeinaktiviertes FKS	20 % (v/v)
humanes AB-Serum	5 % (v/v)

Neohepatozyten-Medium I (SH-Medium)

RPMI 1640 (ohne Farbindikator)

hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum	10 % (v/v)
L-Glutamin	2 mM
β-Mercaptoethanol	0,1 mM
M-CSF	5 ng/ml
IL-3	0,4 ng/ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Neohepatozyten-Medium II (HA-Medium)

RPMI 1640 (ohne Farbindikator)

hitzeinaktiviertes FKS	10 % (v/v)
L-Glutamin	2 mM
FGF-4	3 ng/ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Einfriermedium

RPMI 1640 oder DMEM (1x) High Glucose	
FKS	30 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

2.10.3. Subkultivierung adhärenter Zellen

Adhärente Zelllinien wurden 80-90 % konfluent in Kultur gehalten. Dreimal pro Woche wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in frischem Kulturmedium aufgenommen und zur Stammhaltung 1:10 gesplittet. Die verwendeten Zellen wurden mit der VenorGem Mycoplasmen-PCR (siehe 2.10.5.) untersucht und waren Mycoplasmen-negativ.

2.10.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren

Die Zellen wurden in kaltem Einfriermedium in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen / ml aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Um ein langsames Absinken der Temperatur zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst einen Tag in einem Styroporbehälter bei -70°C , danach in der Gasphase über flüssigem Stickstoff auf Dauer gelagert.

Auftauen

Eingefrorene Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in warmes Medium überführt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml Medium in Kultur genommen.

2.10.5. Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind zellwandlose Parasiten, die in der Natur unter anderem als Kommensalen der Schleimhäute von Säugetieren auftreten. Kontaminationen stellen in kontinuierlichen Zellkulturen ein großes Problem dar. Als chronische Infektion beeinflussen sie auf vielfältige Weise die Funktionen von Zellen. Sie nehmen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen und verändern so deren Wachstumsverhalten, ihre immunologischen und biochemischen Eigenschaften, sowie deren Lebensfähigkeit. Die Infektion einer Zellkultur mit Mycoplasmen ist visuell oder lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. Zur Kontrolle der verwendeten Zelllinien wurde ein Kit der Firma Minerva Biolabs (VenorGem) eingesetzt. Der Nachweis erfolgte hierbei über eine Mycoplasmensequenz-spezifische PCR aus dem Überstand der Zellkulturen. Der Kit enthält PCR-Primer, die spezifisch für ein breites Spektrum von Mycoplasmen, einschließlich der Spezies *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hominis* und *Mycoplasma salivarium* sind. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei die Aufreinigung der Überstände von Suspensionszellen vor der Durchführung der PCR mit dem QIAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.11. Isolierung peripherer Blutzellen

2.11.1. Blutspender

Leukozyten-Konzentrate („buffy coats“) wurden von der Blutbank der Winterbergklinik in Saarbrücken zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden frische Blutproben von Mitarbeitern der Virologie (Uniklinik Homburg/Saar) für die Experimente verwendet. Die Blutspender waren HIV-1-, HIV-2- sowie Hepatitis B- und -C-Virus-negativ.

In Zusammenarbeit mit der Inneren Medizin (Uniklinik Homburg/Saar) wurden zusätzlich Blutproben chronisch kranker HCV-Patienten verwendet (siehe 2.22). Experimente mit Blutproben infizierter Spender sind in der Arbeit gesondert gekennzeichnet.

2.11.2. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, "peripheral blood mononuclear cells") wurden standardmäßig aus Leukozyten-Konzentraten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. "buffy coats" fallen bei der Herstellung von Blutkonserven durch Zentrifugation und Abnahme des Plasmas an und enthalten neben PBMC Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Die Konservenbeutel, in die das Blut abgenommen wird, enthalten Antikoagulantien, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern.

Einige Experimente wurden zusätzlich mit Frischblut-Präparaten durchgeführt. Um PBMC aus Frischblutproben zu isolieren, wurde den entsprechenden Probanden kurz vor Präparationsbeginn mittels TRO-VENOSET® Perfusionsbesteck (Trove Medical GmbH, Hamburg) 30-45 ml Blut entnommen. Die verwendeten Blutentnahme-Röhrchen (Monovette, Sarstedt), in die das Blut abgeleitet wurde, enthielten ebenfalls gerinnungshemmende Substanzen (Li Heparin-/ EDTA KE), um eine Verklumpung des Blutes zu vermeiden.

Durchführung:

Die Verarbeitung von Leukozyten-Konzentraten und Frischblut verlief größtenteils analog. Der Inhalt eines "buffy coat" wurde im Verhältnis 4:3 mit PBS verdünnt. Die Frischblutproben wurden mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 35 bzw. 70 ml aufgefüllt. 15 ml Lymphocyte Separation Medium (=Ficoll, Dichte $1,077 \pm 0,001$ g/ml) wurden in einem 50 ml-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 35 ml der verdünnten Suspension überschichtet. Um den Gradienten nicht zu zerstören, wurde 20 Minuten bei 1.800 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Dabei trennten sich die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte (Abb. 2.2). Die Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine hohe Dichte und sedimentieren während sich die PBMC in der Interphase zwischen Serum/PBS und Ficoll befinden. Da Thrombozyten die geringste Dichte besitzen sammeln sie sich im Überstand über der Zwischenschicht.

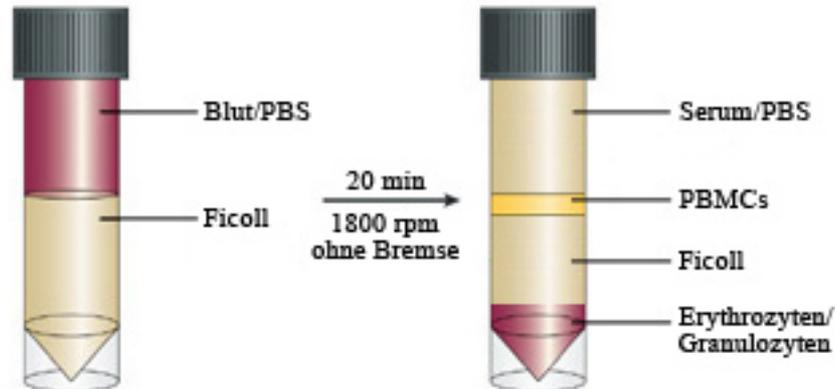


Abb. 2.2. Graphische Darstellung der Zell- und Flüssigkeitsschichten vor und nach der Dichtegradienten-Zentrifugation

Das Leukozyten-Konzentrat (Blut) wurde im Verhältnis 4:3 mit PBS verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Ficoll geschichtet. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 1800 rpm (ohne Bremse) trennten sich die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte in die dargestellten Schichten. Die PBMC sammeln sich dabei in einer Schicht zwischen Serum/PBS und Ficoll.

Die PBMC-enhaltende Zwischenschicht wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, um Ficoll-Rückstände zu entfernen. Verbleibende Erythrozyten wurden entfernt, indem die PBMC zwischen den Waschschrritten für ca. 15 Sekunden in 5 ml Aqua_{bidest.} resuspendiert und unmittelbar danach mit 45 ml PBS versetzt wurden. Diese Behandlung ermöglicht die selektive Lyse der Erythrozyten, während die PBMC intakt bleiben. Beim Aufnehmen der Zwischenschicht wird stets ein Teil des Überstandes mitüberführt, so dass die PBMC mit Thrombozyten verunreinigt sind. Um diese zu entfernen wurde am Ende ein Waschschrtritt mit 10-minütiger Zentrifugation bei 900 rpm durchgeführt. Das Pellet wurde in 30-50 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl im CASY[®] bestimmt (siehe 2.12.).

2.11.3. Adhärenz von Monozyten an Plastikoberflächen

Zur Differenzierung von Neohepatozyten sowie zur Ausreifung von Makrophagen musste die adhärenente Monozyten-Population aus den PBMC isoliert werden. Diese Trennung der unterschiedlichen Zellpopulationen erfolgte dabei mittels Adhärenz der Monozyten an Plastikoberflächen. Hierzu wurden die PBMC in dem entsprechenden Differenzierungsmedium (Makrophagen-Reifungsmedium / SH-Medium) aufgenommen und über zwei bis fünf Stunden bei 37°C inkubiert. Die nicht adhärenenten Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL, "peripheral blood lymphocytes") wurden abgenommen und verworfen. Die adhärenenten Monozyten wurden vorsichtig mit PBS bzw. Medium gewaschen und durch Zugaben von frischem Medium zu Makrophagen bzw. Neohepatozyten ausdifferenziert (siehe 2.13. und 2.14.).

2.12. Charakterisierung und Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY®

Die Zelldichte einer Kultur wurde routinemäßig im "cell counter and analyser system" CASY® (Schärfe, Reutlingen) bestimmt. Bei der Passage der Zellen durch eine Leitfähigkeitsmeßzelle bestimmt dieses Gerät die Änderung des Widerstandes in Abhängigkeit von der Zeit. Es verbindet computertechnisch die Widerstandsmessung mit der Signalauswertung über Pulsflächenanalyse. Bei der Messung ist die Fläche des gemessenen Impulses proportional zum Zellvolumen. Daher können gleichzeitig die Zelldichte und die Größenverteilung einer Zellpopulation analysiert werden.

Durchführung:

Zur Messung wurde eine Zellsuspension definierten Volumens 1:1000 oder 1:100 in der Elektrolytlösung (Casyton) verdünnt und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare bekannter Geometrie gesaugt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolatoren betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Unter der Voraussetzung, dass die Zellen die Kapillare einzeln passieren, ist diese Widerstandsänderung ein Maß für das Volumen der Zelle. Der Computer errechnet aus drei Messsignalen einen Mittelwert in Form eines Integrals, das dem Zelldurchmesser proportional ist. Das Ergebnis der Messung ergibt ein Histogramm, bei dem die relative Zellzahl gegen den Zelldurchmesser aufgetragen wird (Abb. 2.3). Diese Methode wurde für die Bestimmung der Zellzahl der PBMC nach der Isolierung eingesetzt. Weiterhin konnte der Erfolg der anschließend durchgeführten Adhärenz über die relative Zellgröße bestimmt werden, da Lymphozyten einen kleineren Zelldurchmesser besitzen als Monozyten. Darüber hinaus wurde die Zellzahl aller anderen im Verlaufe dieser Arbeit benutzten Zellen mit Hilfe des CASY® bestimmt.

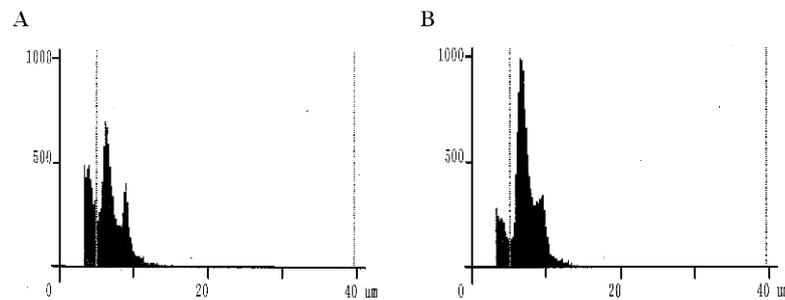


Abb. 2.3. Populationen der kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes nach Isolierung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (A) und anschließender Adhärenz (B)

Dargestellt sind die Histogramme (A) von PBMC nach der Isolierung über einen Ficoll-Gradienten und (B) von Zellen (PBL) der entsprechenden Suspension nach Adhärenz an Plastik. Die Histogramme zeigen eine Auftrennung dreier Populationen anhand der relativen Zellgröße. Die Population mit der geringsten Größe umfaßt die Thrombozyten und Zellbruchstücke. Die mittlere stellt die Lymphozyten- und die rechte die Monozyten-Population dar. Nach der Adhärenz hat sich das Verhältnis deutlich zu Gunsten der Lymphozyten verschoben. Die Messung und Auswertung wurde mit Hilfe des "cell counter and analyser system" CASY® (Schärfe) durchgeführt.

2.13. *In vitro* Differenzierung von Neohepatozyten

Neohepatozyten sind reprogrammierte, humane Blut-Monozyten, die unter Verwendung verschiedener Reifungsstimuli zu Leberzell-ähnlichen Zellen differenziert werden. Die Generation der Zellen basiert dabei auf einer modifizierten Methode nach Ruhnke *et al.*, (2005).

Durchführung:

Zur Differenzierung von Neohepatozyten wurden frisch isolierte PBMC (siehe 2.11.) in vorgewärmtes SH-Medium aufgenommen und in einer Dichte von $3 \times 10^6 / \text{cm}^2$ in Zellkulturgefäßen ausgesät. Aufgrund der Empfindlichkeit der resultierenden Neohepatozyten mussten hierfür speziell beschichtete *cell+*-Zellkulturgefäße der Firma Sarstedt verwendet werden. Nach einer Adhärenz von vier bis fünf Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die nicht adhären-

PBL vorsichtig abgenommen und verworfen (siehe 2.11.3.). Die adhärenenten Monozyten wurden vorsichtig mit SH-Medium gewaschen und in frischem, vorgewärmtem SH-Medium aufgenommen. Die Kultivierung in SH-Medium erfolgte für sechs Tage bei 37°C und 5 % CO₂. An Tag zwei und vier wurde das Medium abgenommen und durch frisches, vorgewärmtes SH-Medium ersetzt. An Tag sechs wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und in FGF-4-haltiges HA-Medium überführt. Die Ausdifferenzierung der Neohepatozyten erfolgte durch Kultivierung für weitere zehn Tage bei 37°C und 5 % CO₂, wobei an jedem zweiten Tag ein Mediumwechsel mit frischem HA-Medium erfolgte.

2.14. Reifung humaner Blut-Monozyten zu Makrophagen

Makrophagen sind als Leukozyten (“weiße Blutkörperchen“) wichtige Zellen des Immunsystems. Sie entwickeln sich *in vivo* aus Blutmonozyten, die unter Einfluss von Zytokinen und Erregersubstanzen zu Makrophagen differenzieren. Die Reifung humaner Monozyten zu Makrophagen kann *in vitro* durch Serum induziert werden. Dieser Differenzierungsprozess führt zu charakteristischen Veränderungen bezüglich der Antigen-Expression und Morphologie der Zellen.

Durchführung:

Frisch isolierte PBMC (siehe 2.11.) wurden in vorgewärmtes Makrophagen-Reifungs-Medium aufgenommen und in einer Dichte von 1×10^6 /ml in Zellkulturgefäßen ausgesät. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die nicht adhärenenten PBL vorsichtig abgenommen und verworfen (siehe 2.11.3.). Die adhärenenten Monozyten wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und in frischem, vorgewärmtem Makrophagen-Reifungs-Medium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte ohne Mediumwechsel für sechs Tage bei 37°C und 5 % CO₂.

2.15. miRNA-Analyse

Nicht-kodierende miRNA-Moleküle wirken nicht nur regulierend auf die Expression zellulärer RNA (Bartel, 2004), sondern können zudem die Replikation und Pathogenese von Viren beeinflussen (Gottwein & Cullen, 2008). Im Falle von HCV hat sich dabei vor allem die leberspezifische miRNA122 als bedeutsam für die virale Replikation herausgestellt.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. F. Lammert (Innere Medizin, Uniklinik Homburg/Saar) wurden Zellsuspensionen unterschiedlicher Neohepatozyten sowie analog behandelte Huh7-Zellen auf ihre miRNA-Expressionsprofile hin untersucht. Zur Isolation der miRNAs wurde der “mirVana™ miRNA Isolations Kit“ der Firma *Ambion* verwendet. Die Isolierung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Zur Quantifizierung der miRNA-Expression wurden die Isolate mittels RT-PCR analysiert. Dabei wurde ein “TaqMan® MicroRNA Assay“ der Firma Applied Biosystems sowie ein ABI Prism 7500 zur Analyse eingesetzt. Die miRNA-Isolation sowie die entsprechenden RT-PCR-Analysen wurden freundlicherweise von Dr. Vincent Zimmer am Institut für Innere Medizin der Uniklinik Homburg/Saar durchgeführt.

2.16. Herstellung viraler Pseudotypen

Unter Pseudotypen versteht man chimäre virale Partikel, die durch die Vereinigung retroviraler “core“-Bestandteile mit den Oberflächenproteinen anderer Viren entstehen. Die gleichzeitige Expression eines EGFP-Markerproteins gewährleistet die Visualisierung infizierter Zielzellen mittels FACS bzw. Fluoreszenzmikroskopie. Da sich das Integrations-Signal getrennt von dem retroviralen “core“ und dem Verpackungssignal auf dem EGFP-Expressionsplasmid befindet, sind die generierten Partikel zwar in der Lage Zielzellen zu infizieren, können sich aber innerhalb dieser Zellen nicht weiter vermehren.

2.16.1. Herstellung von HCV-Pseudotypen (HCVpp)

Bei den in dieser Arbeit generierten HCV-Pseudotypen (HCVpp, "HCV pseudo particles") handelt es sich um eine Kombination retroviraler HIV-1 "core"-Partikel mit den nativen HCV-Glykoproteinen E1 und E2 sowie dem Markerprotein EGFP.

Verwendete Lösungen:

Transfektions-Medium:

DMEM (1x) High Glucose

Chloroquin	25 μ M
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

CaCl₂ Lösung:

CaCl ₂ in Aqua _{bidest}	2,5 M
---	-------

HEPES-Puffer:

HEPES/NaOH (pH7)	50 mM
------------------	-------

Saccharose-Lösung:

D-Saccharose in PBS	20 % (w/v)
---------------------	------------

Durchführung:

Zur Herstellung der HCV-Pseudotypen wurden die Expressionsplasmide pM334, pM420 und pM480, welche für die einzelnen viralen Komponenten kodieren (Tab. 2.2), mittels CaCl₂ Transfektion in 293T Zellen eingebracht. Dazu wurden am Vortag der Transfektion 293T Zellen in einer Zelldichte von 9×10^4 / cm² in 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden definierte Mengen der einzelnen Expressionsplasmide (Tab. 2.4) mit Aqua_{bidest} und CaCl₂ Lösung zu einer 0,25 molaren Transfektionslösung

verdünnt und tropfenweise in das gleiche Volumen HEPES-Puffer eingebracht. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die verdünnte Plasmidlösung auf die 293T Zellen getropft, die vorher in Transfektions-Medium aufgenommen worden waren. Nach sechs Stunden wurde der Zellüberstand entfernt und durch Standard-Medium (siehe 2.10.2.) ersetzt. Die Ernte der sezernierten Pseudotypen erfolgte 24, 36 und 72 Stunden nach erfolgter Transfektion durch Abnahme der Zellüberstände und Lagerung bei 4 °C. Zur Entfernung möglicher Zellreste wurden die gepoolten Überstände zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, bevor die HCVpp-Lösung durch eine 0,45 µm-große Membran filtriert wurde. Die HCV-Pseudotypen wurden anschließend mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Dazu wurden jeweils 30 ml der HCVpp-Lösung mit 5 ml einer 20 %-igen Saccharose-Lösung unterschichtet und anschließend zwei Stunden bei 24000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Beckman, SW41 Rotor). Die HCVpp-Pellets wurden nach der Zentrifugation in jeweils 50 µl steriles PBS (siehe 2.10.1.) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die konzentrierten HCVpp-Lösungen wurden anschließend vereinigt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tab. 2.4.: Mengen der zur HCVpp-Herstellung verwendeten Plasmide

Plasmid	Plasmid-Menge/10 cm-Platte	Kurzbeschreibung
pM334	12,5 µg	HIV-core
pM420	7,5 µg	EGFP
pM480	4 µg	HCV-E1/E2

2.16.2. Herstellung von VSV-Pseudotypen (VSVpp)

Das “Vesicular stomatitis virus“ (VSV) ist ein aus der Familie der *Rhabdoviridae* stammendes Virus, das ein breites Spektrum tierischer und humaner Zielzellen aufweist. Die Infektion erfolgt unspezifisch über das virale Glykoprotein-G (VSV-G), welches sich an ubiquitär vorkommende Oberflächenrezeptoren anlagert und eine Internalisierung über Endozytose

ermöglicht. Diese Eigenschaft macht das VSV-Glykoprotein-G zu einem idealen Oberflächenprotein bei der Herstellung von unspezifisch agierenden Kontrollpseudotypen.

Die Herstellung der VSV-Pseudotypen (VSVpp) erfolgte analog zu 2.16.1. Dabei wurde lediglich das pM480 Plasmid durch das pVSV-G-Plasmid ersetzt (Tab.2.5).

Tab. 2.5: Mengen der zur VSVpp-Herstellung verwendeten Plasmide

Plasmid	Plasmid-Menge/10 cm-Platte	Kurzbeschreibung
pM334	12,5 µg	HIV-core
pM420	7,5 µg	EGFP
pVSV-G	1 µg	VSV-G

2.17. Infektionsstudien unter Verwendung viraler Pseudotypen

Virale Pseudotypen (siehe 2.16.) sind in der Lage durch Anlagerung ihrer Oberflächenproteine Rezeptor-spezifisch oder endozytotisch in ihre Zielzellen einzudringen. Die Detektion infizierter Zellpopulationen erfolgt durch den Nachweis des grün fluoreszierenden Markerproteins EGFP, das nach der Internalisierung der Pseudotypen in den Zielzellen exprimiert wird.

Der Großteil der in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsstudien wurde in 48- oder 96-Loch Gewebekulturplatten durchgeführt und mittels durchflusszytometrischer Analyse (2.19) ausgewertet. Wachstumsaktive Zelllinien (Huh7/HeLa) mussten dabei am Vortag der Infektion in den Gewebekulturplatten ausgesät werden, während die Neohepatozyten direkt in den entsprechenden Platten ausdifferenziert wurden.

2.17.1. Titration viraler Pseudotypen

Die Infektiösität der generierten Pseudotypen wurde ermittelt, indem Huh7-Zellen mit aufsteigenden Volumina der viralen Partikel versetzt und mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. Dazu wurden am Vortag der Infektion 2×10^4 Zellen pro Ansatz in 48 Lochplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Zellüberstand entfernt, die viralen Pseudotypen wurden in Zellkulturmedium gelöst und unter Zusatz von 4 µg/ml Polybrene zu den Huh7-Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte dabei grundsätzlich als Doppelansatz mit je 0, 5, 10, 15 bzw. 20 µl Pseudotyp pro Ansatz. Um die Bindung der viralen Partikel an die Oberfläche der Zielzellen zu erleichtern, wurden die Ansätze eine Stunde bei 2000 rpm und 31 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten in den Brutschrank transferiert, wo sie vier bis sechs Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden für weitere 72 Stunden in regulärem Huh7-Medium kultiviert. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in FACS-FIX (siehe 2.19.2.) aufgenommen und noch am gleichen Tag im Durchflusszytometer untersucht.

Der Infektionstiter wurde durch den prozentualen Anteil EGFP-positiver Zellen in Relation zur eingesetzten Pseudotyp Menge bestimmt. Als Maßeinheit ergibt sich die Anzahl infektiöser viraler Partikel pro Milliliter. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\% \text{ GFP+ Zellen}}{100} \times \text{Zellzahl/Ansatz} \times \frac{1000}{V_{pp}} = \text{Titer [iP/ml]}$$

% GFP+ : EGFP positive Zellen/Ansatz in %
 V_{pp} : Volumen Pseudotyp [µl]/Ansatz
 iP/ml : infektiöse Partikel/ml

2.17.2. Infektionsstudien mit viralen Pseudotypen

Die Infektion adhärenter Zellen erfolgte generell wie in 2.17.1 beschrieben. Das Volumen der eingesetzten Pseudotypen orientierte sich am Titer der eingesetzten Pseudotypen sowie an der Zellzahl der zu infizierenden Zellen. Die Berechnung des MOI Wertes („multiplicity of infection“) erfolgte gemäß nachfolgender Formel:

$$\text{MOI} = \frac{\text{Titer [iP/ml]} \times \text{Vpp [ml]}}{\text{Zellzahl/ Ansatz}}$$

MOI:	„multiplicity of infection“
iP/ml :	infektiöse Partikel/ml
Vpp:	Volumen Pseudotyp [ml]

Stellt man die Formel nach „Vpp“ um, ergibt sich das Pseudotyp Volumen, das pro Ansatz eingesetzt werden muss, um eine bestimmte MOI zu erreichen. Die Zellzahl in den zu infizierenden Ansätzen wurde am Tag der Infektion mittels CASY[®] bestimmt. Die entsprechenden Volumina des verwendeten Pseudotyps wurden in Zellkultur-Medium gelöst und unter Zusatz von 4 µg/ml Polybrene zu den Zielzellen gegeben. Um einen Einfluss von humanem oder fötalem Serum auf die Infektionsrate auszuschließen, wurden die Infektionen in serumfreien Zellkulturmedien durchgeführt. Die Anlagerung der viralen Partikel an die Oberfläche der Zielzellen wurde erleichtert, indem die Ansätze eine Stunde bei 2000 rpm und 31 °C zentrifugiert wurden. Nach einer 4- bis 6-stündigen Inkubation im Brutschrank wurde der infektiöse Überstand entfernt und die Zellen wurden für weitere 72 Stunden in regulärem Zellkultur-Medium kultiviert. Zur FACS-Analyse wurden die Huh7-Zellen mit Trypsin abgelöst, während die Neohepatozyten mit Akkutase von der Gewebekulturplatte entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen in FACS-FIX (siehe 2.19.2.) aufgenommen und noch am gleichen Tag im Durchflusszytometer untersucht.

2.17.3. Einfluss von humanem Serum auf die Pseudotyp-Infektion

Humanes AB-Serum ist nachweislich in der Lage die Infektionsrate von viralen Partikeln zu beeinflussen (Voisset *et al.*, 2005). Um diesen Einfluss in unserem System zu testen, wurden Infektionsexperimente unter Zugabe von humanem AB-Serum durchgeführt. Die Infektion der Zellen erfolgte generell wie in 2.17.2 beschrieben. Dabei wurden allerdings während der Infektion bis zu 50% des eingesetzten Zellkulturmediums durch humanes AB-Serum ersetzt.

2.17.4. Einfluss von DEAE-Dextran auf die Pseudotyp-Infektion

Vorausgehende Studien mit HIV Pseudotypen (HIVpp) haben ergeben, dass DEAE-Dextran die Infektiosität viraler Partikeln steigern kann (Meyerhans, *unveröffentlichte Daten*). Zur Untermauerung dieser Beobachtung wurden analoge Infektionsexperimente mit HCVpp und VSVpp durchgeführt. Die Infektion der Zellen erfolgte generell wie in 2.17.2 beschrieben. Dabei wurden den Infektionsansätzen allerdings DEAE-Dextran in folgenden Konzentrationen zugesetzt: 0, 5, 10 und 15 µg/ml.

2.17.5. Neutralisation viraler Pseudotypen durch rezeptor-spezifische Antikörper

HCV-Pseudotypen sollten aufgrund ihrer nativen E1/E2- Oberflächenproteine lediglich in Zellen eindringen können, die entsprechende "HCV-entry" Faktoren auf ihrer Oberfläche besitzen. Die bedeutendsten HCV-Rezeptoren zum Zeitpunkt unserer Analysen waren CD81 (Zhang *et al.*, 2004), SR-BI (Zeisel *et al.*, 2007) sowie CLDN-1 (Evans *et al.*, 2007). Die Spezifität des HCVpp-Eintritts wurde durch den Einsatz neutralisierender Antikörper überprüft, die in der Lage sein sollten durch Bindung der Oberflächenrezeptoren den HCVpp-Eintritt zu hemmen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Neutralisations-Experimente erfolgten dabei grundsätzlich in 96-Loch-Gewebekulturplatten.

Durchführung:

Die Infektion der Zellen wurde generell wie in 2.17.2 beschrieben durchgeführt. Die Ansätze wurden allerdings vor Zugabe der viralen Partikel mit Antikörpern gegen CD81 (50 - 100 µg/ml), SR-BI (αSR-BI Serum 1:50) und CLDN-1 (αCLDN-1 Serum 1:50) sowie mit den entsprechenden Kontroll-Antikörpern (IgGκ (50-100 µg/ml) und αRatten Serum 1:50) vorinkubiert. Dazu wurde der Zellüberstand abgenommen und durch je 50 µl der entsprechenden Antikörper-Verdünnung ersetzt. Die Vor-Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

2.17.6 Neutralisation viraler Pseudotypen durch HCV-spezifische Patienten-Antikörper

Bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion lassen sich Antikörper nachweisen, die gegen die Oberflächenproteine des Hepatitis C Virus gerichtet sind. Diese Antikörper haben in Abhängigkeit vom jeweiligen Patienten und dessen Krankheitsverlauf eine unterschiedlich stark neutralisierende Wirkung (Steinmann *et al.*, 2004). HCV-Pseudotypen sollten aufgrund ihrer nativen E1/E2-Oberflächenproteine von diesen Antikörpern erkannt und am Zelleintritt gehindert werden.

Durchführung:

Die Infektion der Zellen erfolgte generell wie in 2.17.2 beschrieben. Die HCV-Pseudotypen wurden allerdings mit HCV-spezifischen Patienten-Antikörpern (100 µg/ml) vorinkubiert, bevor die Infektion der Zielzellen erfolgte. Als Kontrollantikörper dienten IgG HCV-negativer Individuen (100 µg/ml). Die Vor-Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

2.18. HCVcc-Partikel

Lange Jahre gab es, bedingt durch die schlechte Replikationsfähigkeit von HCV in Zellkultur keine Möglichkeit den gesamten Replikationszyklus des Hepatitis C Virus zu untersuchen. Mit der molekulare Klonierung des “JFH-1“ Genoms eines japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis gelang allerdings ein Durchbruch in der HCV-Forschung (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Dieses Virus-Isolat ist nach der Transfektion in Huh7-Zellen in der Lage effizient zu replizieren und infektiöse Virus Partikel in den Überstand zu sezernieren. Aufgrund ihrer Produktion in Zellkultur werden diese viralen Partikel als HCVcc (“cell culture“ HCV) bezeichnet. Die Konstruktion von Hybrid-Genomen, die sich aus der JFH-1 Replicase und den “core-to-NS2“ Regionen anderer Virusisolate zusammensetzen, haben das HCVcc-Forschungsspektrum noch erweitert. Auf diese Weise wurden virale Partikel entwickelt, die stärker infektiös bzw. besser an die Zellkultur angepasst sind (Lindenbach *et al.*, 2005; Pietschmann *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden für die HCVcc-Infektionen neben JFH-1 Partikeln auch JC-1 Partikel eingesetzt, welche sich aus Regionen des JFH-1 und Teilen des J6CF Genoms zusammensetzen. Zusätzlich wurden zur Kontrolle HCVcc-Partikel verwendet, in denen die Bereiche der Strukturproteine E1 und E2 deletiert worden waren (DeltaE1E2).

2.18.1. HCVcc-Infektionsstudien

Die in dieser Arbeit verwendeten HCVcc-Partikel wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. T. Baumert (Louis Pasteur Universität, Strasbourg) zur Verfügung gestellt.

Am Vortag der Infektion wurden Huh7.5-Zellen mit 5×10^4 Zellen pro Ansatz in 24 Loch-Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die 24 Loch-Platten der entsprechenden Neohepatozyten wurden mit frischem Zellkultur-Medium versetzt. Am nächsten Tag wurde der Zellüberstand entfernt und die Zellen wurden mit gleichen Mengen der HCVcc-Partikeln versetzt. Dabei erfolgte die Infektion der 24 Loch-Platten grundsätzlich mit

200 µl HCVcc pro Ansatz. Anschließend wurden die Platten in den Brutschrank transferiert, wo sie vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit je 500 µl frischem Medium versetzt und erneut in den Brutschrank überführt. Am nächsten Morgen wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden für weitere 48 Stunden in regulärem Medium kultiviert. Drei Tage nach der HCVcc-Infektion wurde der Zellüberstand entfernt und die Zellen wurden durch Zugabe von jeweils 350 µl RLT-Puffer (RNeasy Kit, QIAGEN) lysiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA sowie die entsprechenden RT-PCR Analysen zur Detektion der HCV-RNA wurden freundlicherweise von Frau Dr. Mirjam Zeisel (Louis Pasteur Universität, Strasbourg) durchgeführt.

2.18.2. Neutralisation der HCVcc-Infektion durch Rezeptor-spezifische Antikörper

Die Spezifität des HCVcc-Eintritts wurde wie schon in 2.17.5. beschrieben, durch den Einsatz neutralisierender Antikörper überprüft. Diese sollten in der Lage sein, durch Bindung der Oberflächenrezeptoren den HCVcc-Eintritt in die Zelle zu hemmen. Die HCVcc-Neutralisations-Experimente erfolgten dabei in 24-Loch-Gewebekulturplatten.

Durchführung:

Die Infektion der Zellen wurde generell wie in 2.18.1. beschrieben durchgeführt. Die Ansätze wurden allerdings vor Zugabe der viralen Partikel mit Antikörpern gegen CD81 (100 µg/ml) sowie mit den entsprechenden Kontroll-Antikörpern (IgGκ (100 µg/ml)) versetzt. Dazu wurde der Zellüberstand abgenommen und durch jeweils 150 µl der entsprechenden Antikörper-Verdünnung ersetzt. Die Vor-Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

2.18.3. Hemmung der HCVcc-Replikation durch den Serin-Protease-Inhibitor BILN-2061

Die Replikation der HCV-RNA hängt unter anderem stark von der Aktivität der viralen NS3-Serin-Protease ab. Vor einigen Jahren wurde ein spezifischer Protease-Inhibitor entdeckt, der in der Lage ist, die HCV-Replikation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu hemmen (Hinrichsen *et al.*, 2004; Lamarre *et al.*, 2003). Dieser als BILN-2061 (Boeringer Ingelheim) bezeichnete Hemmstoff wirkt peptidomimetisch und setzt schon in geringen Dosen die Replikationsfähigkeit der HCV-RNA herab.

Durchführung:

Die Infektion der Zellen wurde generell wie in 2.18.1. beschrieben durchgeführt. Den Ansätzen wurde allerdings in DMSO gelöstes BILN in einer Endkonzentration von 2 μ M zugesetzt. Dazu wurde die Stammlösung 1:10000 in PBS verdünnt. Zur Kontrolle wurde reines DMSO ebenfalls 1: 10000 verdünnt und parallelen Ansätzen zugesetzt. Um während des gesamten Experimentes eine konstante Hemmstoff-Konzentration beizubehalten, wurde die BILN/DMSO Zugabe mit jedem Mediumwechsel wiederholt. Die Volumina aller Ansätze wurden gleichgehalten, indem den Positiv-Kontrollen mit jeder Zugabe des Hemmstoffs die gleiche Menge steriles PBS zugesetzt wurde.

2.19. Durchflusszytometrie

2.19.1. Allgemeines zur Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder „fluorescence activated cell sorting“ FACS-Analyse stellt eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften dar. Während des Meßvorgangs werden die Zellen durch Überdruck stark beschleunigt, so dass sie beim

Eintreten in die Meßkammer vereinzelt und am Meßpunkt fokussiert werden (hydrodynamische Fokussierung). Durch gleichzeitige Messung des Vorwärts- und des 90°-Seitwärtsstreulichtes wird die relative Zellgröße beziehungsweise die relative Zellgranularität von Einzelzellen bestimmt, wobei sowohl die Granularität als auch die Größe direkt mit der Lichtintensität korreliert sind (Abb. 2.5). Die Einheit der FACS-Analyse ist somit die relative Lichtintensität. Diese Darstellung erfolgt mit Hilfe eines sogenannten Punktwolkendiagramms, „dot blot“, bei dem die beiden Werte gegeneinander aufgetragen werden. Mit Hilfe eines „gates“ ist es weiter möglich, die zu analysierende Zellpopulation weiter einzugrenzen (Abb. 2.5).

Die zu untersuchenden Zellen werden entweder direkt mit spezifischen monoklonalen mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörpern oder mit spezifischen Antikörpern, gefolgt von fluoreszenzgekoppelten Anti-Immunglobulinen, markiert. Mit Hilfe eines Argon-Lasers, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm generiert, werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und das jeweils emittierte Licht schließlich über ein optisches System gemessen. Der Meßbereich in der FACS-Analyse gliedert sich in 1024 Kanäle, in welche die Zellen nach unterschiedlicher Expression der Oberflächenantigene, die sich in der Intensität der Fluoreszenz widerspiegelt, eingeteilt werden. Die Ergebnisse der Messungen wurden durch Erstellen von Histogrammen beziehungsweise Punktwolkendiagrammen der Fluoreszenz 1 für FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) und „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP), Fluoreszenz 2 für PE (Phycoerythrin) und Fluoreszenz 3 für PE-Cy5 (Phycoerythrin mit kovalent gebundenem Cyanin 5) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein FACScan der Firma Becton Dickinson benutzt. Die Messung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des CellQuestTM Programms Version Mac App^R 3.0.1.

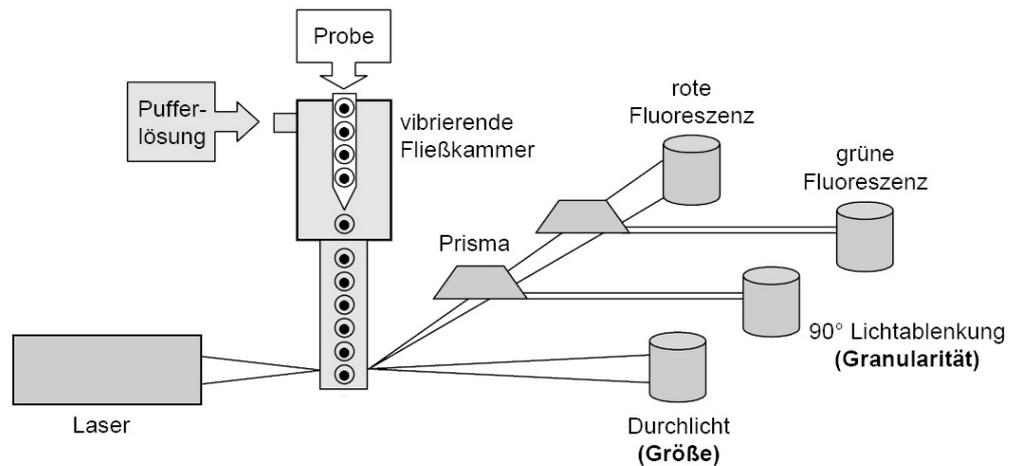


Abb. 2.4.: Schematischer Aufbau eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (“fluorescence activated cell sorter“ (FACS))

Zur durchflusszytometrischen Messung werden die Zellen der Probe zunächst mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Anschließend werden sie durch Überdruck stark beschleunigt, so dass die Zellen beim Eintreten in die Meßkammer vereinzelt und am Meßpunkt fokussiert werden. Die gleichzeitige Messung des Vorwärts- und des 90°-Seitwärtsstreulichtes ermöglicht dabei die Bestimmung der relative Zellgröße sowie der relativen Zellgranularität. Durch den enthaltenen Argon-Laser werden zudem die an die Antikörper gebundenen Fluorochrome zur Lichtemission angeregt.

Die Analyse der einzelnen Zellpopulationen erfolgte, indem die Größe (Vorwärtsstreulicht) gegen die Granularität (90°-Seitwärtsstreulicht) aufgetragen und ein “gate“ über die Population der lebenden Zellen gesetzt wurde (Abb. 2.5.(A)). Die Expression der verschiedenen Antigene wurde mit direkt bzw. indirekt markierten Antikörpern untersucht (Tab.2.1.). Die Darstellung erfolgte in einem Histogramm. Zusätzlich wurden unmarkierte Zellen als Negativkontrolle über das eigentliche Histogramm gelegt, um die Zellen eindeutig als positiv identifizieren zu können (Abb. 2.5.(B)). Durch das Setzen eines "Markers" lässt sich dann eine Statistik bezüglich des prozentualen Anteils und der Fluoreszenzintensität der Population berechnen. Zur Auswertung der Histogramme wurde der prozentuale Anteil an Oberflächenantigen-positiven Zellen innerhalb des gesetzten “gates“ benutzt. Gezählt wurden in der Regel 30.000 Ereignisse, mindestens jedoch 5.000.

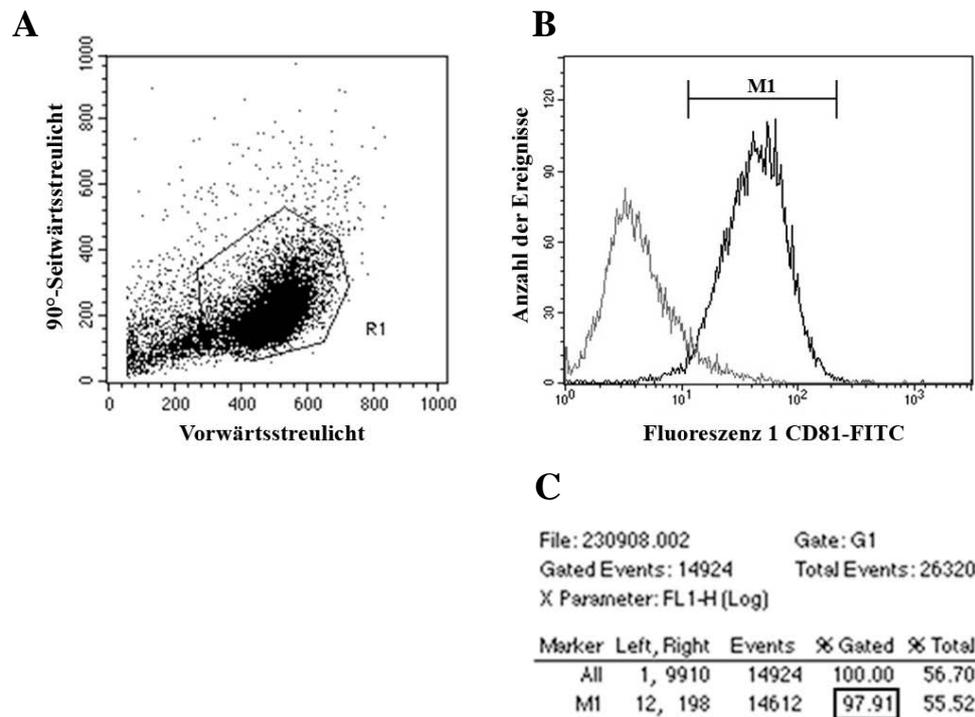


Abb. 2.5.: Darstellung der Größe und Granularität von Huh7-Zellen (A), der Expression von CD81 innerhalb der Zell-Population (B) und der statistischen Auswertung (C)

Bei der Darstellung der Größe gegen die Granularität können mit Hilfe eines “gates“ nur die lebenden Zellen in die Messung eingeschlossen werden (A). Innerhalb der Population wurden als Histogramm die CD81-positiven Zellen dargestellt, zusätzlich wurde als Negativkontrolle das Histogramm von unmarkierten Zellen darüber gelegt (B). Durch das Setzen eines Markers (M1) lässt sich eine Statistik bezüglich des prozentualen Anteils der CD81-positiven Population berechnen (C). In diesem Fall sind 97,91% der Huh7-Zellen CD81 positiv. Nach Subtraktion des Wertes an ungefärbten Zellen innerhalb des Markerbereichs (15,11%) ergibt sich eine Population von 82,8%, die CD81 positiv sind.

Neben der Antigen-Expression wurde die FACS-Analyse zusätzlich zur Detektion des fluoreszierenden Markerproteins EGFP verwendet (2.16). Die Darstellung erfolgte dabei mit Hilfe eines Punktwolkendiagramms, bei dem die EGFP-Fluoreszenz gegen die Zellgröße aufgetragen wurde (Abb.2.6).

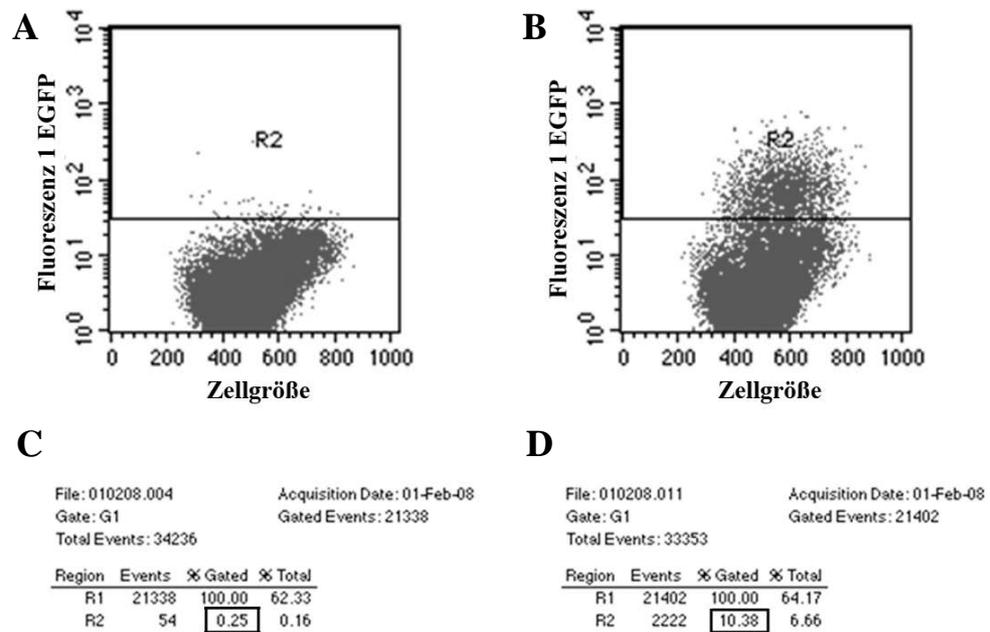


Abb. 2.6.: Analyse der EGFP-Expression in HCVpp-infizierten Huh7-Zellen mittels Punktwolken-Diagramm

Nach Selektion der lebenden Zell-Population (Abb.2x.(A)) wurde ein Ansatz nicht-infizierter Huh7-Zellen (A) einer HCVpp-infizierten Probe (B) gegenübergestellt. Durch das Setzen eines regionalen Markers (R2) lässt sich eine Statistik bezüglich des prozentualen Anteils der EGFP-positiven Population berechnen (D). In diesem Fall sind 10,38% der Huh7-Zellen EGFP positiv. Nach Subtraktion des Wertes an nicht-infizierten Zellen (C) innerhalb des Markerbereichs (0,25%) ergibt sich eine infizierte Population von 10,13%, was einer MOI von 0,1 entspricht.

Die Selektion der zu untersuchenden Zellpopulation erfolgte auch hier, indem zunächst die Größe (Vorwärtsstreulicht) gegen die Granularität (90°-Seitwärtsstreulicht) aufgetragen und ein “gate“ über die Population der lebenden Zellen gesetzt wurde (Abb. 2.5 (A)). Innerhalb dieser Population wurde dann durch Setzen eines regionalen “Markers“ (R2) der prozentuale Anteil EGFP positiver Zellen ermittelt. Als Referenzwert diente dabei ein “dot blot“ nichtinfizierter Zellen (Abb. 2.6 (A) und (C)). Gezählt wurden in der Regel 15.000 Ereignisse, mindestens jedoch 5.000. Zur Auswertung der Diagramme wurde der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb des gesetzten “gates“ benutzt (Abb. 2.6 (B) und (D)).

2.19.2. Färbung von Oberflächen-Antigenen zum durchflusszytometrischen Nachweis

Um Proteine an der Zelloberfläche nachweisen zu können, können Zellen direkt lebend mit Protein-spezifischen Antikörpern gefärbt werden. Alternativ kann allerdings ebenfalls ein Nachweis auf fixierten Zellen erfolgen.

Verwendete Lösungen:

FACS-Puffer

PBS (siehe 2.10.1)

FKS 2 % (v/v)

Fixierlösung (FACS-FIX)

NaCl 8,5 g/l

Paraformaldehyd (1 %) 10 g/l

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Durchführung:

5×10^5 bis 1×10^6 der zu untersuchenden Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und einmal mit PBS sowie zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen, und die Zellen wurden in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die benötigten Mengen an Antikörpern wurden in Vorexperimenten durch Titration bestimmt. Nach Zugabe der erforderlichen Antikörper wurde der Ansatz gründlich gemischt und 30 bis 60 Minuten lang auf Eis im Dunkeln inkubiert. Bei fixierten Zellen erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Wurde während des ersten Färbeschrittes ein unmarkierter Antikörper verwendet, so folgte nun eine weitere Inkubation mit einem markierten Zweitantikörper. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden diese in 100 μ l Fixierlösung aufgenommen. Die fixierten Zellen konnten bis zur FACS-Analyse für mehrere Tage im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt werden.

2.19.3. Färbung von intrazellulären Antigenen zum durchflusszytometrischen Nachweis

Um intrazelluläre Proteine nachweisen zu können, ist eine Permeabilisierung der Zellmembran fixierter Zellen notwendig, die dem Antikörper den Eintritt in die Zelle ermöglicht. Hierzu wurde Saponin, ein aus der Rinde des Baumes *Quillaya saponaria* stammendes Protein, verwendet, welches in der Lage ist, die Zellmembran zu permeabilisieren ohne die Morphologie der Zellen zu beeinflussen (Jacob *et al.*, 1991).

Durchführung:

Zunächst wurden 5×10^5 bis 1×10^6 der zu untersuchenden Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur durch 10-minütige Inkubation mit 1 ml BD Lysing Solution. Nach erneutem Waschen in FACS-Puffer wurden die fixierten Zellen in 2 ml FACS-Puffer mit 0,1 % Saponin resuspendiert und genau 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz sechs Minuten lang bei 1.600 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Antikörper wurden direkt in die verbleibende Flüssigkeit pipettiert, und die nachfolgende Färbung wurde, wie unter 2.19.2. beschrieben, durchgeführt. Zentrifugationsschritte mit fixierten Zellen wurden grundsätzlich bei 1.600 rpm durchgeführt.

2.20. Lichtmikroskopische Aufnahmen

Die morphologische Kontrolle der Zellen wurde mit einem Olympus CK X31 Forschungsmikroskop (Institut für Virologie, Universitätskliniken Homburg/Saar) durchgeführt. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einem Leica DM-IRB Mikroskop (Institut für Virologie, Universitätskliniken Homburg/Saar) mit einer Digitalkamera AxioCam Color der Firma Zeiss. Die Auswertung der Bilder erfolgte weiterhin mittels AxioVision 3.0 Dokumentations-Software der Firma Zeiss.

2.21. Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine mikroskopische Untersuchung, bei der die Fluoreszenzeigenschaft vieler organischer Stoffe zur Visualisierung von Zellen oder Zellbestandteilen ausgenutzt wird. Das fluoreszierende Agens ist dabei von Natur aus in der Zelle vorhanden ("Autofluoreszenz") oder wird von außen in die Zelle eingebracht.

2.21.1. Pseudotyp-Infektion mit fluoreszenzmikroskopischem Nachweis

Die starke Fluoreszenz des EGFP Markerproteins ermöglicht es, infizierte Zellpopulationen nach einer Pseudotyp Infektion (siehe 2.17.) im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

Verwendete Lösungen:

Fixierlösung

Paraformaldehyd (4 %) 40 g/l
in PBS (siehe 2.10.1)

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Durchführung:

Die Zellen wurden am Vortag der Infektion auf Objektträger adhärirt. Nach einmaligem Waschen wurden die Ansätze wie in 2.17.2. beschrieben mit den viralen Partikeln infiziert und für 4 - 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden für weitere 72 Stunden in regulärem Zellkultur-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und in der Fixierlösung bei 4 °C für 30 Minuten fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen durch eine jeweils 3 minütige Inkubation in 70%, dann 80% und schließlich 100% Ethanol in H₂O dehydratisiert. Daraufhin erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne (siehe 2.21.3.).

2.21.2. Färbung von intrazellulären Antigenen zum fluoreszenz-mikroskopischen Nachweis

Bei der von Weller und Coons entwickelten Methode wird die Nachweisempfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden mit der strengen Spezifität einer Antikörperbindung verbunden (Weller & Coons, 1954). Somit lassen sich Antigene intrazellulär lokalisieren. Zur Detektion wird das Antigen durch einen spezifischer Antikörper gebunden, der durch seine Fluoreszenzmarkierung mikroskopisch nachgewiesen werden kann.

Verwendete Lösungen:

Fixierlösung

Paraformaldehyd (4 %) 40 g/l

in PBS (siehe 2.10.1)

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Permeabilisierungslösung

Triton X 100 0,2 % (v/v)

in PBS (siehe 2.10.1)

Blockierlösung

FKS 10 % (v/v)

in PBS (siehe 2.10.1)

Durchführung:

Die Zellen wurden am Vortag auf Objektträger adhärirt. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in der Fixierlösung für 20 Minuten fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Ansätze dann für 20 Minuten mit der Permeabilisierungslösung auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte nach erneutem Waschen das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen innerhalb der Zellen. Für diesen Schritt wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 37 °C in der Blockierlösung inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem

fluoreszenzmarkierten Primärantikörper in Blockierlösung für eine Stunde bei 37 °C. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch jeweils 3- minütige Inkubation in 70%, dann 80% und schließlich 100% Ethanol in H₂O dehydratisiert. Daraufhin erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne (siehe 2.21.3.).

2.21.3. Fluoreszenzmarkierung von Zellkernen

Zum Markieren der Zellkerne von fixierten Zellen wurde „VECTASHIELD[®] mounting medium with DAPI“ der Firma Vector Laboratories verwendet. Das darin enthaltene Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) besitzt eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren und ist in der Lage, die Zellmembranen zu durchdringen. Die durch Immunfluoreszenz gefärbten (siehe 2.21.2.) oder durch Pseudotyp Behandlung infizierten (siehe 2.21.1.) Zellen wurden mit einem Tropfen des “VECTASHIELD[®] mounting medium with DAPI“ überschichtet. Zur Versiegelung wurden die Zellen mit dem Deckgläschen bedeckt. Die so behandelten Zellen konnten bis zur Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop bei 4°C gelagert werden.

2.21.4. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Olympus AX70 Mikroskop (Institut für Humangenetik, Universitätskliniken Homburg/Saar) mit einer Quecksilberlampe (HG100) als Lichtquelle durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera der Firma Hamamatsu (DC C4742-95). Als Verarbeitungssystem wurde das Metasystem ISIS verwendet.

2.22. Anhang: klinische Daten HCV-positiver Blutspender

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Lammert (Innere Medizin, Uniklinik Homburg/Saar) wurden Blutproben chronisch kranker HCV-Patienten zur Differenzierung von Neohepatozyten (2.13) verwendet. Die wichtigsten klinischen Daten dieser Spender sind in Tab.2.6 zusammengefasst.

Tab. 2.6.: Klinische Daten HCV-positiver Spender (Stand 06.04.09; Dr. V. Zimmer)

	Alter	Geschlecht	HCV-RNA [IU/ml]	HCV-Genotyp	ALAT [U/l]	γ GT [U/l]	Klinik
Normalwerte	-	-	<15	-	10-35	<40	-
HCV(+) Do1	39	♂	6.500.000	1b	63	108	iF
HCV(+) Do2	55	♂	360.000	1b	286	146	LZ; HZK
HCV(+) Do3	78	♀	7.600	1b	15	150	LZ
HCV(+) Do4	57	♂	130	1a	32	180	LZ; HZK

[IU/ml] = internationale Einheiten pro Milliliter; Maßeinheit der Viruslast

[U/l] = Einheiten/Liter; Maßeinheit der Enzymaktivität

ALAT = Alanin-Amino-Transferase

γ GT = gamma-Glutamyl-Transferase

iF = initiale Fibrose

LZ = Leberzirrhose

HZK = Hepatozelluläres Karzinom

3. Ergebnisse

3.1. Humane Monozyten des peripheren Blutes lassen sich zu leberzellartigen Neohepatozyten differenzieren

Die Differenzierung von leberzellartigen Zellen aus adulten Stammzellen ist seit einigen Jahren neuer Ansatzpunkt verschiedener hepatischer Forschungen. Die in dieser Arbeit etablierte Differenzierungsmethode basiert auf einer modifizierten Methode nach Ruhnke *et al.*, 2005.

3.1.1 Morphologische Veränderungen bei der Differenzierung von Monozyten zu Neohepatozyten

Humane Monozyten des peripheren Blutes wurden aus PBMC gesunder Donoren isoliert und über sechs Tage in Anwesenheit von M-CSF, IL-3 und humanem Serum zu PCMO Zellen (“programmable cells of monocytic origin“) differenziert (Abb. 3.1.1).

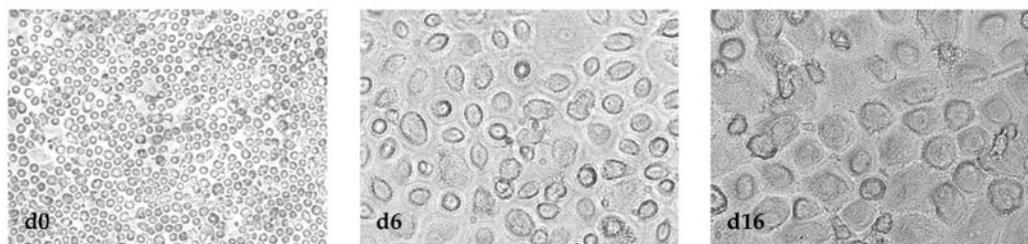


Abb. 3.1.1. Morphologie der Neohepatozyten und der entsprechenden Vorläuferzellen während des Differenzierungsprozesses

Humane Monozyten des peripheren Blutes (d0) wurden mittels Adhärenz von der PBL-Population getrennt und für sechs Tage in Zytokin-haltigem SH-Medium kultiviert. Die daraus resultierenden PCMOs (d6) wurden anschließend für weitere zehn Tage in FGF-4-haltigem HA-Medium inkubiert, um die leberzellartigen Neohepatozyten (d16) zu erhalten. Dargestellt sind die jeweiligen Zellpopulationen in 20facher Vergrößerung.

Alle 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, durch den nicht-adhärenente sowie abgestorbene Zellen aus dem Ansatz entfernt wurden. Unter optimalen Differenzierungsbedingungen bildeten die Zellen zwischen Tag 5 und 6 einen konfluenten Zellrasen aus, der sowohl auf einer erfolgten Zellteilung (Zunahme der Zellzahl), als auch auf einer Zunahme der Zellgröße basierte. An Tag 6 wurden die PCMO Zellen für weitere zehn Tage in FGF-4-haltiges HA-Medium überführt, um die hepatische Differenzierung zu Neohepatozyten einzuleiten (Abb. 3.1.1).

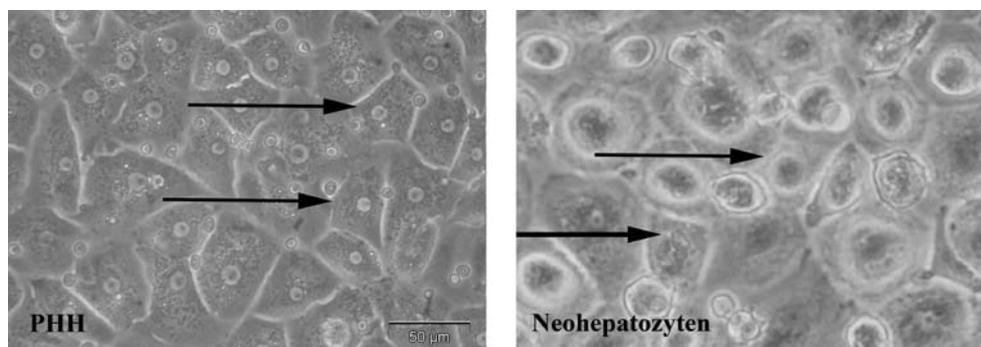


Abb. 3.1.2. Morphologie primärer humaner Hepatozyten (PHH) und ausgereifter Neohepatozyten

Dargestellt sind primäre humane Hepatozyten (PHH, Prof. Dr. J. Hengstler, Universität Leipzig) im Vergleich zu Neohepatozyten (d20) in 40facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Die Pfeile markieren morphologisch ähnliche Zellen beider Zellpopulationen.

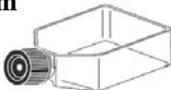
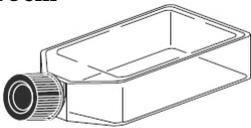
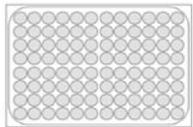
Auch in dieser zweiten Differenzierungs-Phase musste der Mediumwechsel im Zwei-Tages-Rhythmus erfolgen, um eine optimale Entwicklung der Zellen zu gewährleisten. Nach einer Gesamtdauer von 16 Tagen zeigten die resultierenden Neohepatozyten eine hexagonale Morphologie und wuchsen in konfluenten Zellrasen, die große Ähnlichkeit zu Kulturen primärer humaner Hepatozyten hatten (Abb.3.1.2).

Die Neohepatozyten zeigten im end-differenzierten Zustand eine sehr starke Adhärenz zur Plastikoberfläche ihres Zellkultur-Gefäßes und konnten nur durch längere Inkubation mit Akkutase schonend gelöst und im Anschluss untersucht werden. Wie in Tab.3.1.1 zu sehen, war die resultierende

Neohepatozyten-Zahl in der Regel nicht direkt proportional zur eingesetzten PBMC- bzw. Monozyten-Anzahl an Tag 0. Dabei ist zu beachten, dass die ausgesäte PBMC-Menge an Tag 0 mit einer Dichte von 3×10^6 Zellen pro cm^2 festgelegt war, während der entsprechende Anteil an Monozyten in Abhängigkeit vom Donor große Unterschiede aufweisen konnte.

Tab. 3.1.1 Ausbeute an Neohepatozyten im Vergleich zur eingesetzten PBMC- und Monozyten-Zellzahl

Angegeben sind jeweils die eingesetzten bzw. resultierenden Zellzahlen pro Flasche bzw. pro Loch der Mehrlochplatte. Die PBMCs wurden immer in einer Dichte von $3 \times 10^6/\text{cm}^2$ ausgesät. Die entsprechende Monozyten-Dichte sowie die resultierende Neohepatozyten-Anzahl waren dagegen Donor-abhängig.

	PBMC (d0)	Monozyten (d0)	Neohepatozyten (d16)
25cm² 	7×10^7	$2,3 - 3,6 \times 10^7$ (Ø $2,6 \times 10^7$)	$2,2 - 5 \times 10^6$ (Ø 4×10^6)
75cm² 	2×10^8	$6,3 - 9,5 \times 10^7$ (Ø $8,2 \times 10^7$)	$0,6 - 1,7 \times 10^7$ (Ø 1×10^7)
24-Loch-Platte 	5×10^6	$1,2 - 3 \times 10^6$ (Ø 2×10^6)	$0,5 - 2 \times 10^6$ (Ø 1×10^6)
96-Loch-Platte 	$1,25 \times 10^6$	$4 - 6,5 \times 10^5$ (Ø $4,8 \times 10^5$)	$1,2 - 3,2 \times 10^5$ (Ø 3×10^5)

Die Quantität der Monozyten korrelierte dabei allerdings nicht mit der Quantität bzw. der Qualität der resultierenden Neohepatozyten. Ein Donor mit hohem Monozyten-Anteil in der PBMC Population brachte demnach nicht automatisch eine größere Anzahl optimal differenzierter Neohepatozyten

hervor. Die in Tabelle 3.1.1 dargestellten Werte repräsentieren Durchschnittswerte, die bei einigen Donoren deutliche Abweichungen zeigten. Der Großteil der Donoren wies allerdings Zellzahlen auf, die sich um diese Durchschnittswerte bewegten.

3.1.2 Neohepatozyten exprimieren leberzellspezifische Markerproteine

Mit dem Ziel, die Neohepatozyten als effizientes Zellsystem für HCV-Infektionen zu nutzen, wurden die Zellen bezüglich ihrer Expression an leberzellspezifischen Marker-Proteinen untersucht. Neben Albumin, dem bedeutendsten Plasmaprotein, das von Hepatozyten sekretiert wird, wurden auch die epithelialen Marker Cytokeratin-18 und -19 mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Zusätzlich wurde die Expression der drei wichtigsten HCV-Rezeptoren, CD81, SR-BI sowie CLDN-1 mittels FACS analysiert (Abb. 3.1.3). Neben der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Albumin-Produktion in Neohepatozyten zusätzlich immunhistochemisch untersucht (Abb. 3.1.4). Wie in beiden Abbildungen zu sehen, reagieren die Neohepatozyten eindeutig positiv mit Antikörpern, die gegen das Plasmaprotein Albumin gerichtet sind. Darüberhinaus zeigt die FACS-Analyse (Abb. 3.1.3) im direkten Vergleich mit Huh7-Zellen, dass Neohepatozyten alle untersuchten Faktoren in vergleichbarem Maße wie die hepatische Zelllinie exprimieren.

Die detektierte Albumin-Synthese sowie die Cytokeratin-18 Expression bestätigen dabei lediglich die in der Literatur gemachten Aussagen zum hepatischen Charakter der Neohepatozyten (Ruhnke *et al.*, 2005a; Ruhnke *et al.*, 2005b). Die fehlende Expression von Cytokeratin-19 belegt jedoch zusätzlich, dass die Leberzell-ähnlichen Neohepatozyten Charakteristika reifer Hepatozyten aufweisen. Gleichzeitig konnte mittels FACS-Analyse gezeigt werden, dass die Neohepatozyten alle relevanten Rezeptoren exprimieren, die für eine HCV-Infektion nötig sind (Abb. 3.1.3 (B)). Diese Analogie bezüglich der HCV-Zelleintrittsfaktoren untermauerte die Vermutung, dass Neohepatozyten ein potentielles Zellsystem für HCV-Infektionsstudien darstellen könnten.

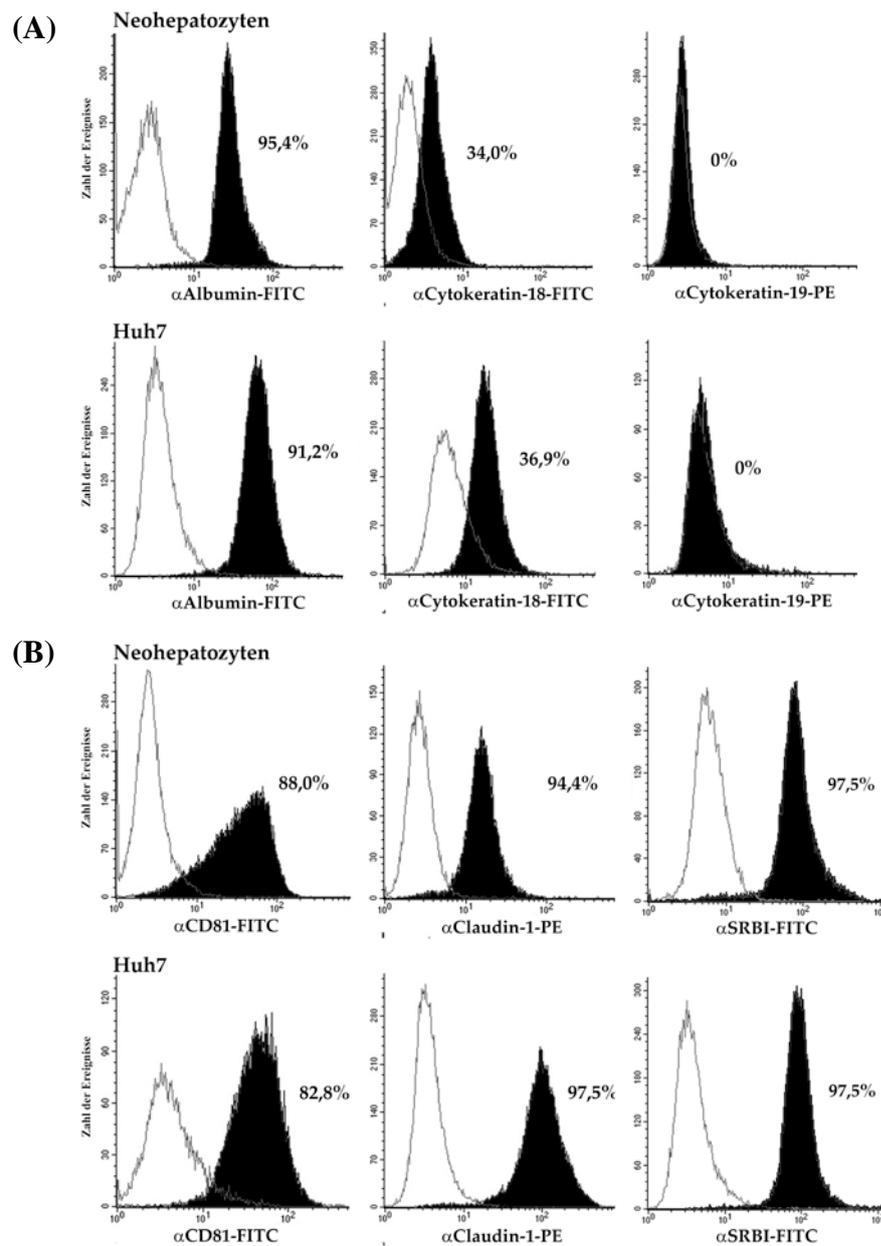


Abb. 3.1.3. FACS-Analyse zur Expression Hepatozyten-spezifischer Markerproteine in Neohepatozyten und Huh7-Zellen

Die Färbung der Oberflächen-Antigene erfolgte direkt auf den lebenden Zellen durch Zugabe der Protein-spezifischen Antikörper. Die intrazellulären Antigene wurden nach Fixierung der Zellen und Permealisierung mittels Saponin angefärbt. Als Referenz wurde die hepatische Zelllinie Huh7 verwendet. Unspezifische Signale wurden durch den Einsatz spezifischer Isotyp-Kontroll-Antikörper ausgeschlossen. Dargestellt ist die FACS-Analyse eines repräsentativen Donors. (A) Expressionsstärke des Hepatozyten-spezifischen Proteins Albumin sowie des epithelialen Markers Cytokeratin-18. Zusätzlich ist die fehlende Expression von Cytokeratin-19 dargestellt, einem Protein, das lediglich in unreifen Hepatozyten exprimiert wird. (B) Expression der drei wichtigsten Zell-Eintrittsfaktoren des Hepatitis C Virus: CD81, SR-BI und Claudin-1.

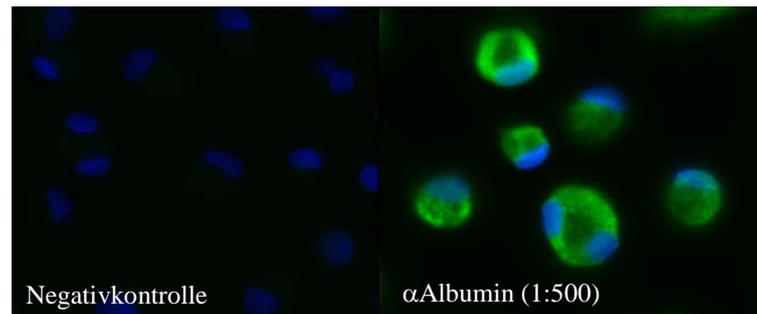


Abb. 3.1.4. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Albumin-Expression in Neohepatozyten

Die Neohepatozyten wurden auf Objektträger adhärert und intrazellulär mit FITC-gekoppelten α Albumin-Antikörpern angefärbt. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI markiert und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Negativkontrolle zeigt Neohepatozyten des gleichen Donors, die mit entsprechenden Kontroll-Antikörpern (α IgG-FITC) angefärbt wurden. Die Analyse wurde mit acht unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Donors.

3.1.3 miRNA-Expression in Neohepatozyten

Da die nicht-kodierende miRNA122 einen Einfluss auf den viralen Lebenszyklus von HCV haben kann (Jopling, 2008), wurden die Neohepatozyten bezüglich ihres miRNA-Expressionsprofils untersucht. Die quantitative miRNA-Analyse erfolgte dabei mittels RT-PCR am Institut für Innere Medizin, Homburg/Saar. Erste Untersuchungen ergaben dabei, dass die Leberzell-spezifische miRNA122 in Neohepatozyten exprimiert wird. Vergleichende Analysen mit Huh7-Zellen zeigten im weiteren Verlauf allerdings, dass die Expressionsstärke in Neohepatozyten im Vergleich zur hepatischen Zelllinie deutlich reduziert ist (persönliche Mitteilung, Dr. Vincent Zimmer, Innere Medizin, Homburg/Saar). Die genauen Daten zur quantitativen Auswertung standen bis zur Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht zur Verfügung. Zudem wären für genauere Interpretationen zusätzliche Analysen nötig, die belegen, in wie weit sich die Expressionsprofile von Neohepatozyten, PHH und weiteren hepatischen Zelllinien unterscheiden.

3.2. Neohepatozyten sind effizient mit HCV-Pseudotypen infizierbar

Die Untersuchung des HCV-Eintritts in hepatische Zellen schien aufgrund des fehlenden Infektionssystems lange Zeit eine nicht zu überwindende Hürde in der HCV-Forschung darzustellen. Erst die Entwicklung sogenannter HCV-Pseudotypen (HCVpp) machte eine effiziente Untersuchung des Zelleintritts möglich (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003).

3.2.1 HCVpp zeigen eine selektive Infektiösität gegenüber hepatischen Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten HCV-Pseudotypen wurden durch Co-Expression dreier Plasmide (HIV Δ env, HCV E1-E2 sowie EGFP) in 293T Zellen hergestellt. Die HCVpp enthaltenden Zell-Überstände wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert und nach erfolgter Titration für die Infektionsexperimente eingesetzt.

Die Titration der HCVpp erfolgte durch eine serielle Infektion von Huh7-Zellen mit aufsteigenden Mengen der zu testenden Pseudotypen. Die resultierende EGFP-Expression der infizierten Zellen wurde 72 Stunden nach der Infektion mittels FACS-Analyse detektiert. VSV-G-exprimierende Kontrollpseudotypen (VSVpp) wurden in analoger Weise hergestellt, nur dass bei der Transfektion der 293T Zellen das HCV-E1-E2 Plasmid durch ein Plasmid ersetzt wurde, welches die Expression des VSV-G-Proteins bewirkt. VSV-Pseudotypen infizieren Zielzellen ohne spezifische Rezeptor- und Zelltyp-Bindung, wohingegen HCV-Pseudotypen, wie native Hepatitis C-Viren, in ihrer Infektionsfähigkeit auf hepatische Zellen begrenzt sind. Um diese Spezifität zu testen, wurden neben Huh7-Zellen auch HeLa-Zellen mit aufsteigenden Volumina der generierten HCVpp infiziert. Wie in Abbildung 3.2.1 zu sehen, war im Fall der HeLa-Zellen keine Infektion mit HCVpp zu detektieren. Die Huh7-Zellen zeigen im Gegensatz dazu bei zunehmender HCVpp-Menge einen proportionalen Anstieg EGFP-positiver Zellen.

Basierend auf diesen Titrationsversuchen wurde der Titer der einzelnen HCVpp-Präparationen berechnet und für weitere Infektionsversuche eingesetzt.

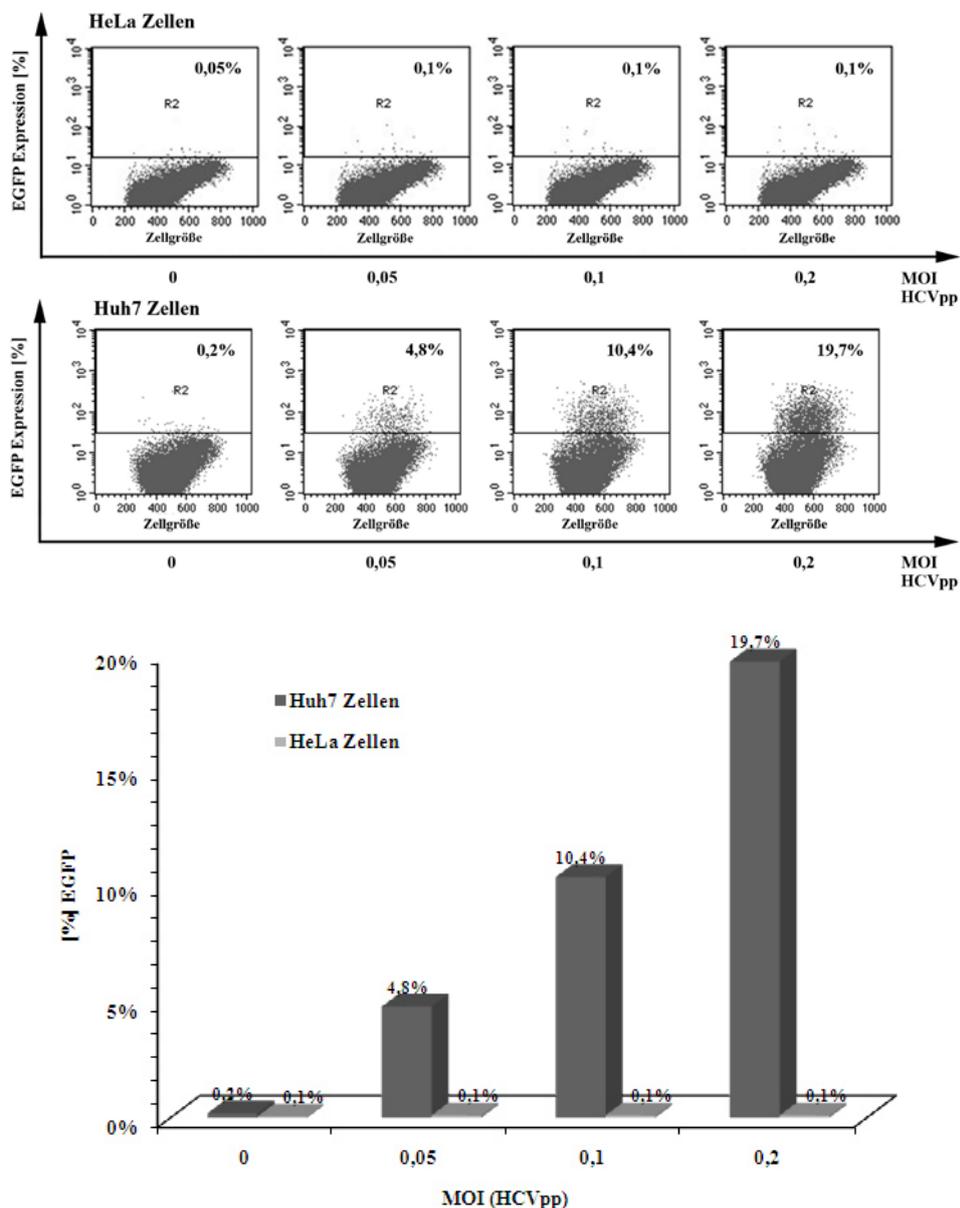


Abb. 3.2.1. Infektion von Huh7- und HeLa-Zellen mit EGFP-markierten HCVpp in aufsteigender MOI

Die entsprechenden Zellen wurden am Vortag der Infektion in 48-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag in Abhängigkeit der erreichten Zelldichte mit HCVpp infiziert. Nach drei Tagen wurden die Überstände entfernt und die Zellen mittels FACS analysiert. Dargestellt ist der durchschnittliche Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der Gesamtpopulation. (A) Punkt-Wolken-Diagramm (B) Säulendiagramm. Die Zugänglichkeit der HeLa-Zellen wurde in drei unabhängigen Infektionsversuchen untersucht, während die Infizierbarkeit der Huh7-Zellen im Zuge jeder HCVpp-Titration getestet wurde. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Infektionsexperiments.

3.2.2 Neohepatozyten sind effizient mit HCVpp infizierbar

Die Infizierbarkeit von Neohepatozyten mit HCVpp wurde sowohl durchflusszytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Zellen auf Objektträger überführt bzw. direkt in der 96-Loch-Platte mit HCVpp infiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und mittels durchflusszytometrischer Analyse bzw. Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Wie in Abb. 3.2.2 zu erkennen, war die Infektion mit den HCV-Pseudotypen eindeutig detektierbar. Der gezeigte Bildausschnitt fokussiert dabei einen Bereich des Objektträgers, in dem ein Großteil der Zellen infiziert ist. Da jedoch lediglich mit einer MOI von 0,1 infiziert wurde, gab es auf dem Objektträger auch Bereiche, die eine geringere Dichte infizierter Zellen aufwiesen. Wie spätere Abbildungen zeigen werden, war die Infizierbarkeit der Neohepatozyten auch in der FACS-Analyse eindeutig nachweisbar (siehe Abb.3.2.3 und 3.2.5).

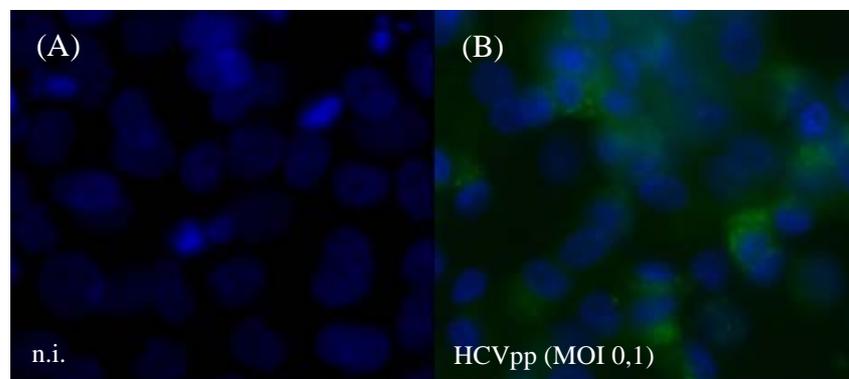


Abb. 3.2.2. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der HCVpp-Infektion in Neohepatozyten

Die Neohepatozyten wurden auf Objektträger adhärirt und mit HCVpp in einer MOI von 0,1 infiziert. Nach 3-tägiger Inkubation wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. (A) nicht infizierte (n.i.) Neohepatozyten, (B) mit HCVpp-infizierte Neohepatozyten (MOI 0,1). Die Analyse wurde mit acht unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Donors.

Auch im Fall der Neohepatozyten sollte die Begrenzung auf hepatische Zellen untersucht werden. Die Generation von Neohepatozyten basiert auf der Annahme, dass Monozyten des peripheren Blutes durch einen zweigliedrigen Prozess zu Hepatozyten-ähnlichen Neohepatozyten umprogrammiert werden können. Dabei werden die Monozyten zunächst durch Zytokin-haltiges SH-Kulturmedium zu sogenannten PCMO Zellen dedifferenziert. Diese Zellen gelten als Vorläuferzellen der Neohepatozyten und sollen durch ihren "dedifferenzierten" Zustand in der Lage sein, verschiedene Entwicklungswege einzuschlagen. In einem zweiten Schritt werden diese PCMO-Zellen anschließend durch das FGF-4-haltige HA-Medium dazu stimuliert, zu den Leberzell-ähnlichen Neohepatozyten heranzureifen. Die hepatischen Eigenschaften der Neohepatozyten sollten demnach erst in ihrem enddifferenzierten Zustand (>d16) zum Tragen kommen. Im Rückschluss sollten HCV-Pseudotypen demnach lediglich in der Lage sein, die Leberzell-ähnlichen Neohepatozyten zu infizieren. Um diese These zu belegen, wurden Monozyten des gleichen Donors gleichzeitig zu Makrophagen, PCMO-Zellen und Neohepatozyten differenziert und anschließend mit der gleichen MOI infektiöser HCVpp inkubiert. Wie in Abb. 3.2.3 zu erkennen, waren die HCV-Pseudotypen tatsächlich nur in der Lage enddifferenzierte Neohepatozyten zu infizieren. Die entsprechenden PCMO-Vorläuferzellen zeigten genauso wie die Makrophagen der gleichen Ursprungspopulation keine Infizierbarkeit mit den verwendeten HCVpp.

Bemerkenswerterweise zeigte die Infizierbarkeit der Neohepatozyten aber eine starke Donor-abhängige Variabilität. Während 20 – 25 % der getesteten Neohepatozyten nicht oder nur in sehr geringem Maße mit HCVpp infizierbar waren, ließen auch die Zellen infizierbarer Donoren Unterschiede innerhalb ihrer jeweiligen Zellpopulation erkennen. Betrachtet man die Darstellung der Zellgröße in Relation zur Zellgranularität, so lassen sich beim Großteil der analysierten Neohepatozyten zwei verschiedene Subpopulationen erkennen (Abb. 3.2.4). Durchflusszytometrische Analysen zeigten dabei in beiden Subpopulationen vergleichbar starke Expressionen der getesteten Marker-Proteine und identifizierten die jeweiligen Subpopulationen demnach als Neohepatozyten. Was die unterschiedlichen Zell-Morphologien bedingt und weshalb Donor-spezifisch Subpopulationen auftreten, konnte im Rahmen

dieser Arbeit nicht geklärt werden. Das Auftreten könnte dabei sowohl unterschiedliche Differenzierungszustände, als auch verschiedene monozytäre Subpopulationen als Ursache haben.

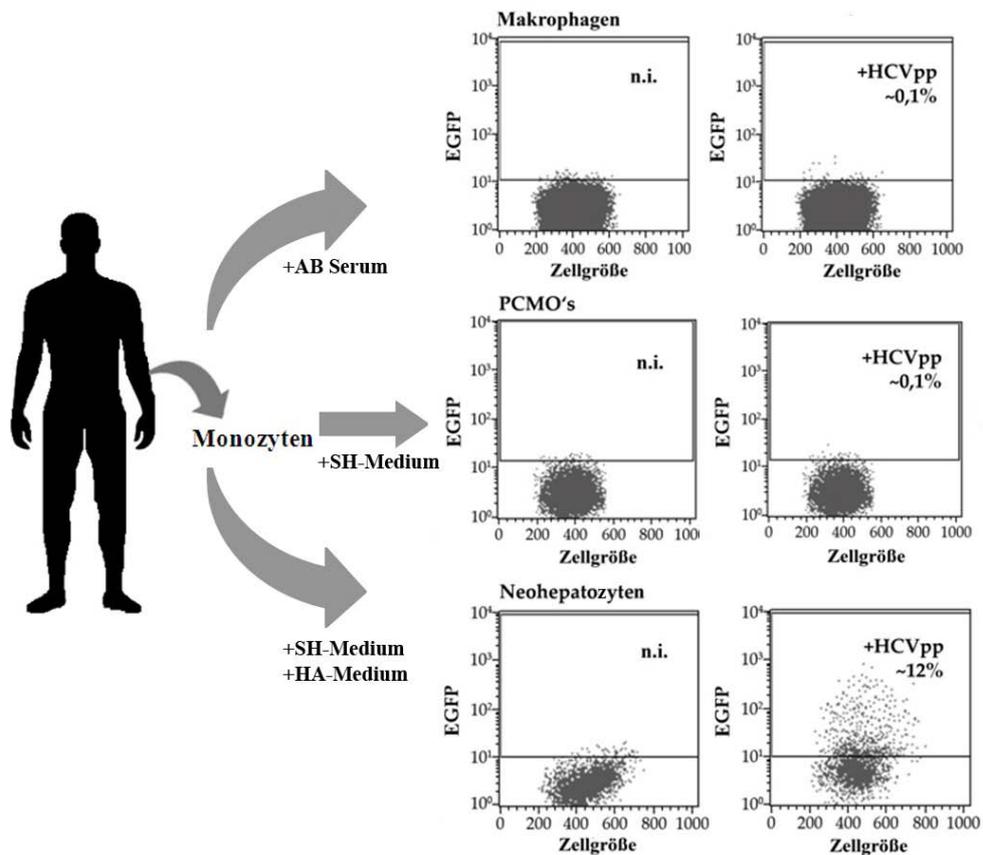


Abb. 3.2.3. Vergleichende HCVpp-Infektion von Makrophagen, PCMO und Neohepatozyten mit gleichem genetischen Hintergrund

Monozyten des peripheren Blutes wurden aus PBMC gesunder Donoren isoliert und durch Stimulation mit unterschiedlichen Agenzien zu Makrophagen, PCMO sowie Neohepatozyten differenziert. Anschließend wurden die Zellen mit der gleichen MOI infektiöser HCVpp inkubiert und nach drei Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Verglichen wurden dabei die resultierenden Zellpopulationen des gleichen Blutspenders. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der jeweiligen Zellpopulation. Die Analyse wurde mit sechs unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Donors.

Wählt man nun bei der Analyse der HCVpp-Infektion zunächst die Gesamtpopulation vitaler Zellen (R1) und anschließend beide Subpopulationen (R2/R3) aus, so lassen sich deutliche Unterschiede in Bezug auf die jeweilige Infizierbarkeit erkennen (Abb.3.2.4). Während die Subpopulation R2 meist sehr gut infizierbar ist, zeigt die Subpopulation R3 deutlich geringere Infektionsfrequenzen, die meist maximal so groß sind wie der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen in der Gesamtpopulation R1 (Tab.3.2.1). Da jedoch nicht alle Neohepatozyten diese deutliche Unterscheidung der einzelnen Subpopulationen erkennen ließen und die Daten vergleichbar bleiben sollten, wurde bei den nachfolgenden Experimenten immer die Gesamtpopulation R1 zur Auswertung herangezogen.

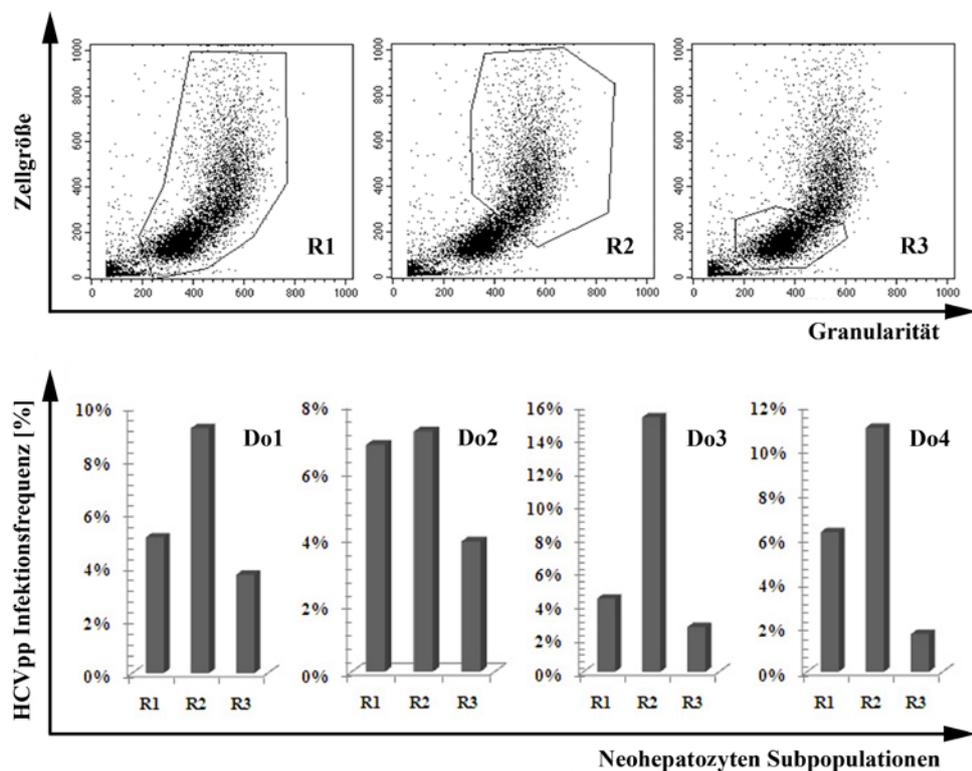


Abb. 3.2.4. Infektion neohepatischer Zellpopulationen mit HCV-Pseudotypen

(A) Darstellung der Größe und Granularität von Neohepatozyten mit Selektion der Gesamtpopulation an lebenden Zellen (R1) sowie der Unterteilung der Zellen in die Subpopulationen R2 und R3. (B) Vergleich der HCVpp-Infektiosität der unterschiedlichen Neohepatozyten Zellpopulationen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der jeweiligen Zellpopulation. Die Ergebnisse von vier repräsentativen Donoren sind angegeben.

Tab. 3.2.1 Vergleich der HCVpp-Infektion neohepatischer Zellpopulationen

Neohepatozyten verschiedener gesunder Donoren wurden mit HCVpp in einer MOI von 0,1 - 0,2 infiziert und nach dreitägiger Inkubationsdauer durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden die Proben als Gesamtpopulation der lebenden Zellen (R1) selektiert bzw. in eine der beiden Subpopulationen (R2/R3) unterteilt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der jeweiligen Zellpopulation.

HCVpp-Infektiösität							
	R1	R2	R3		R1	R2	R3
Do 1	5,1 %	9,2 %	3,7 %	Do 6	4,8 %	14 %	4,4 %
Do2	6,8 %	7,2 %	3,9 %	Do 7	9,3 %	6,2 %	10,1 %
Do3	4,4 %	15,3 %	2,7%	Do 8	5,5 %	11 %	1,0 %
Do4	6,3 %	11 %	2,0 %	Do9	0,7 %	1,0 %	0,4 %
Do 5	0,2 %	0,6 %	0,2 %	Do10	2,4 %	6,9 %	0,3 %

3.2.3 Die Infektionsfrequenz von HCVpp ist durch humanes Serum beeinflussbar

Während der Etablierung des HCVpp-Infektionssystems als Werkzeug zur HCV-Analyse wurde herausgefunden, dass Lipide einen positiven Einfluss auf die HCVpp-Infektion haben können (Voisset *et al.*, 2005). Durch Zugabe von humanem Serum konnte beispielsweise die Infektionsfrequenz in Huh7-Zellen um den Faktor 3 gesteigert werden. Verantwortlich hierfür war vornehmlich das im Serum enthaltene HDL, der natürliche Ligand des SR-BI Rezeptors (Voisset *et al.*, 2005). Zur Überprüfung dieses Effektes im Neohepatozyten-Zellsystem wurden auch hier HCVpp-Infektionen unter Zugabe von humanem AB-Serum durchgeführt. Wie in Abbildung 3.2.5 zu erkennen, führte das Serum auch im Falle der Neohepatozyten zu einer Erhöhung der Infektionsfrequenz. Die Zunahme war dabei allerdings sowohl Donor- als auch Serum-abhängig. Während beispielweise im Falle von Donor 1 eine Steigerung

um den Faktor 3 erreicht wurde, konnte bei Donor 2 nur eine Erhöhung um den Faktor 1,5 beobachtet werden. Im Rahmen dieser Infektionsstudien wurden Experimente mit verschiedensten Seren (kommerziell erworben bzw. autolog) und zahlreichen Donoren durchgeführt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich humanes Serum immer auf die Infektionsfrequenz auswirkt, wenn auch nicht immer positiv. Manche neohepatische Zellpopulationen wurden durch die Zugabe von humanem Serum in ihrer Infizierbarkeit sogar eher gehemmt. Ähnliche Beobachtungen wurden bei HCVpp-Infektionsexperimenten mit PHH gemacht (persönliche Mitteilung, Dr. M. Zeisel, Universität Strasbourg).

Dieses Ergebnis führte letztlich dazu, dass die nachfolgenden Infektionsexperimente immer in Zellkulturmedien durchgeführt wurden, denen weder humanes noch fötales Serum zugesetzt worden war. So konnten Serumbedingte Einflüsse auf die Infektionsrate ausgeschlossen werden.

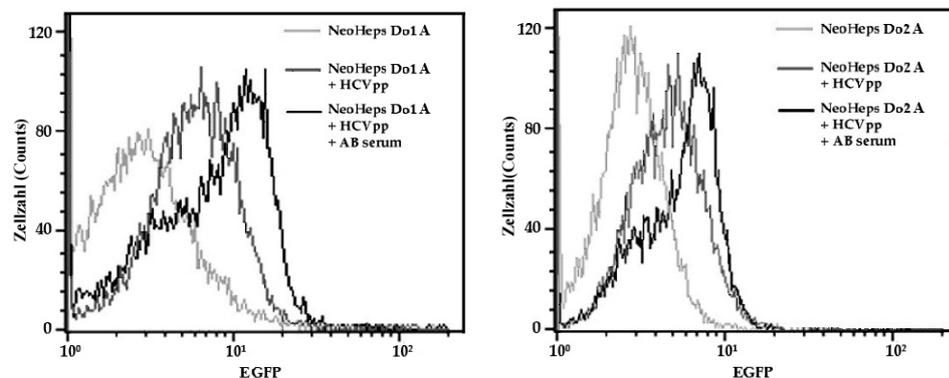


Abb. 3.2.5. Einfluss von humanem AB-Serum auf die HCVpp-Infektionsfrequenz in Neohepatozyten

Neohepatozyten verschiedener gesunder Donoren wurden mit HCVpp in einer MOI von 0,1 infiziert. Dem Infektionsansatz wurde hitzeinaktiviertes, humanes AB-Serum (PAN Biotech) zugesetzt. Die Analyse der Pseudotyp Infektion erfolgte nach drei Tagen mittels FACS. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der jeweiligen Gesamtzellpopulation. Die Analyse wurde mit zehn unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Dargestellt ist das Ergebnis von zwei repräsentativen Donoren.

3.2.4 Die Infektionsfrequenz von HCVpp ist durch DEAE-Dextran beeinflussbar

Vorhergehende Studien mit HIVpp haben gezeigt, dass sich das Polysaccharid DEAE-Dextran positiv auf die Pseudotyp-Infektion auswirken kann (Meyerhans, *unveröffentlichte Daten*). Um diesen Einfluss in unserem System zu validieren, wurden Infektionsstudien unter Zugabe verschiedener Dextran Konzentrationen durchgeführt. Das DEAE-Dextran wurde den Zellen dabei zeitgleich mit den HCV- bzw. VSV-Pseudotypen zugesetzt. Um eine Erhöhung der Eigenfluoreszenz durch das Polysaccharid auszuschließen, wurden die Zellen in einem parallelen Ansatz zusätzlich mit den verschiedenen Dextran Konzentrationen, aber ohne Pseudotyp versetzt. Dabei konnte allerdings in keiner der getesteten DEAE-Dextran-Konzentrationen eine Erhöhung der Eigenfluoreszenz beobachtet werden. Wie in Abb. 3.2.6 zu erkennen, führte das DEAE-Dextran im HCVpp-Infektionssystem aber zu einer deutlichen Steigerung der Infektionsfrequenz. Sowohl Huh7-Zellen, als auch Neohepatozyten zeigten eine erhöhte Rate EGFP-positiver Zellen, wenn die Infektion in Anwesenheit von DEAE-Dextran durchgeführt wurde (Abb. 3.2.6). Im Falle der Huh7-Zellen konnte mit steigender DEAE-Dextran-Konzentration eine kontinuierliche Erhöhung der HCVpp-Infektionsfrequenz beobachtet werden. Die Neohepatozyten erreichten dagegen durchgehend das Infektionsmaximum schon bei einer DEAE-Dextran-Konzentration von 5 µg/ml. Wurde die Polysaccharid-Konzentration im Infektionsansatz der Neohepatozyten weiter erhöht (10 - 15 µg/ml) sank die HCVpp-Infektionsfrequenz wieder ab, allerdings nie unter den Referenzwert bei 0 µg/ml. Der Grad der Infektionssteigerung lag im Falle der Neohepatozyten deutlich höher als in den Huh7-Zellen. Während die HCVpp-Infektionsfrequenz in den Huh7-Zellen maximal um den Faktor 2,3 erhöht wurde, erreichten einige Neohepatozyten eine Steigerung um den Faktor 4. Betrachtet man im Vergleich dazu den Einfluss von DEAE-Dextran auf die Infektion mit VSVpp, so wird deutlich, dass sich das Polysaccharid nicht merklich auf die VSVpp-Infektion auswirkt (Abb. 3.2.6). Auffällig war lediglich, dass die DEAE-Dextran-Konzentration einen Einfluss auf die Morphologie der Zellen im

VSVpp-System hatte. Auf was sich dieser Umstand zurückführen lässt, bleibt allerdings Gegenstand zukünftiger Studien.

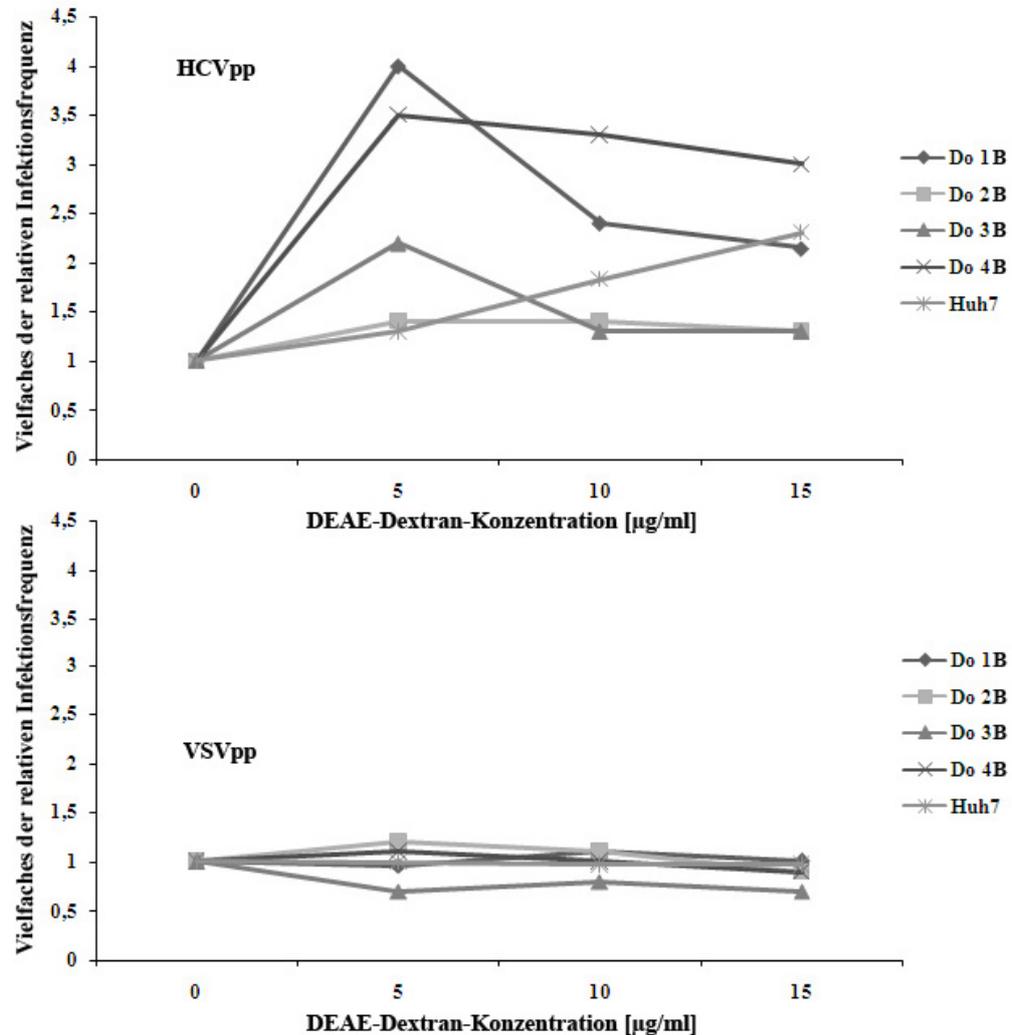


Abb. 3.2.6. Einfluss von DEAE-Dextran auf die Infektionsfrequenz von HCVpp und VSVpp in Neohepatozyten und Huh7-Zellen

Neohepatozyten und Huh7-Zellen wurden parallel mit HCVpp bzw. VSVpp in einer MOI von 0,1 - 0,2 infiziert. Den Infektionsansätzen wurde dabei DEAE-Dextran in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Die Analyse der Pseudotyp-Infektion erfolgte nach 3 Tagen mittels FACS. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der lebenden Gesamt-Zellpopulation. Die Abbildung fasst das repräsentable Ergebnis von 4 Donoren und einer Huh7-Infektion zusammen. Die Infektions-Steigerung ist dabei jeweils bezogen auf die Infektionsfrequenz ohne DEAE-Dextran-Zugabe.

3.2.5 Neutralisation der HCVpp-Infektion durch Rezeptor-spezifische Antikörper

HCV-Pseudotypen sind nachweislich in der Lage, humane hepatische Zelllinien sowie primäre Hepatozyten Rezeptor-vermittelt zu binden und über Oberflächenrezeptoren spezifisch in diese Zellen einzudringen (Bartosch & Cosset, 2006). Diese Eigenschaft macht HCVpp zu einem wirkungsvollen Instrument, um den Zelleintritt des Hepatitis C-Virus sowie die Antikörper-vermittelte Neutralisation des Virus zu untersuchen.

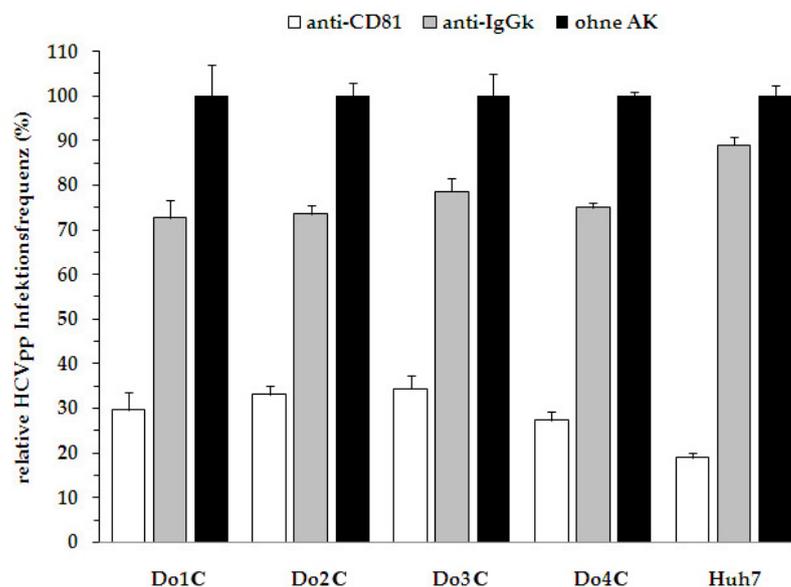


Abb. 3.2.7. Spezifische Hemmung der HCVpp-Infektion von Neohepatozyten und Huh7-Zellen durch anti-CD81 Antikörper

Neohepatozyten und Huh7-Zellen wurden in 96-Loch-Platten kultiviert und eine Stunde vor Zugabe des Infektionsansatzes mit Antikörpern gegen CD81 bzw. den entsprechenden Kontroll-IgG versetzt (100 µg/ml). Anschließend wurden die Ansätze mit HCVpp in einer MOI von 0,1 infiziert. Die Analyse der Pseudotyp-Infektion erfolgte nach drei Tagen mittels FACS. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der lebenden Gesamtpopulation. Die Analyse wurde mit Neohepatozyten von zwölf unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Dargestellt ist das Ergebnis vier repräsentativer Donoren. Die Standardabweichungen wurden aus dem Mittelwert der jeweiligen Doppelansätze berechnet.

Um die Abhängigkeit der HCVpp-Infektion von den vorhandenen Oberflächenrezeptoren zu testen, wurden Infektionsexperimente in An- und Abwesenheit neutralisierender Antikörper durchgeführt. Dazu wurden in einem ersten Experiment Antikörper eingesetzt, die spezifisch an den CD81-Rezeptor binden. Diese wurden, ebenso wie die entsprechenden Kontrollantikörper (IgGκ) auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt und eine Stunde mit den Zellen vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit den HCV- bzw. VSV-Pseudotypen. Wie in Abb. 3.2.7 zu erkennen, waren die CD81-Antikörper in der Lage, die HCVpp-Infektion in den Neohepatozyten im Vergleich zu Ansätzen ohne Antikörper um bis zu 75 % zu senken. Im Falle der Huh7-Zellen war sogar eine Reduktion um bis zu 85 % möglich. Zwar ist in den Kontrollansätzen unter Zugabe der IgGκ-Antikörpern ebenfalls eine Abnahme der Infektionsfrequenz erkennbar, diese beläuft sich aber auf maximal 25 % und lässt sich durch die relativ hohe Konzentration der eingesetzten Antikörper erklären. Bei Versuchen mit höheren Verdünnungsstufen war keinerlei Einfluss der Kontrollantikörper zu sehen, allerdings war auch die Wirkung der neutralisierenden Antikörper weniger deutlich.

Betrachtet man das analoge Kontrollexperiment mit VSVpp (Abb. 3.2.8) so lässt sich erkennen, dass weder die HCV-spezifischen CD81-Antikörper noch die entsprechenden Kontrollantikörper einen signifikanten Einfluss auf die VSVpp-Infektion haben. Zwar sind leichte Schwankungen der Infektionsfrequenz erkennbar und bei den Neohepatozyten ist eine geringe Abnahme durch die CD81-Antikörper detektierbar, allerdings ist der Effekt noch geringer als die Auswirkung der Kontrollantikörper im HCVpp-Infektionssystem und daher nicht signifikant.

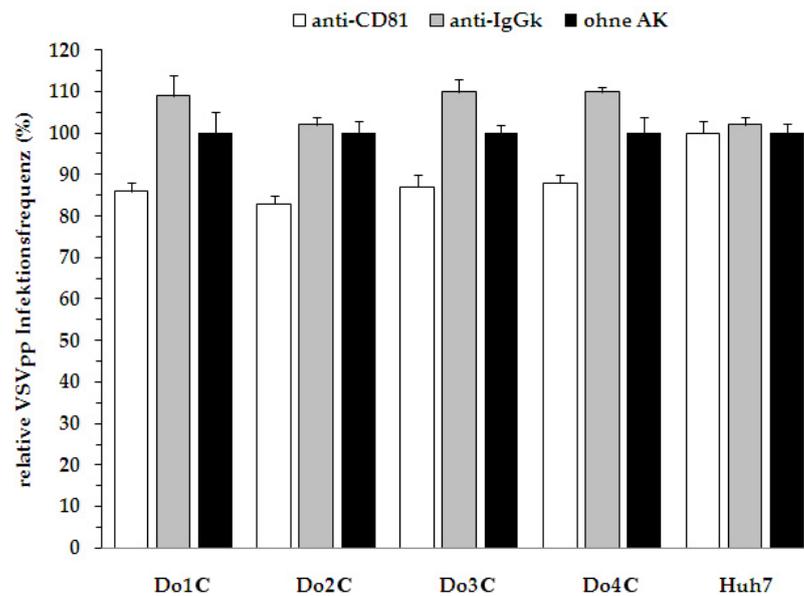


Abb. 3.2.8. Einfluss von anti-CD81 Antikörpern auf die VSVpp-Infektion von Neohepatozyten und Huh7-Zellen

Neohepatozyten und Huh7-Zellen wurden in 96-Loch-Platten kultiviert und eine Stunde vor Zugabe des Infektionsansatzes mit Antikörpern gegen CD81 bzw. den entsprechenden Kontroll-IgG versetzt (100 µg/ml). Anschließend wurden die Ansätze mit VSVpp in einer MOI von 0,1 infiziert. Die Analyse der Pseudotyp-Infektion erfolgte nach drei Tagen mittels FACS. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der lebenden Gesamtpopulation. Die Analyse wurde mit acht unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Dargestellt ist das Ergebnis von vier repräsentativen Donoren. Die Standardabweichungen wurden aus dem Mittelwert der jeweiligen Doppelansätze berechnet.

In einem zweiten Experiment wurde in gleicher Weise der neutralisierende Einfluss von α SR-BI- und α CLDN-1-Antikörpern auf die HCVpp-Infektion untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Ratten-Seren vorinkubiert, die Antikörper gegen die extrazellulären Domänen von SR-BI und CLDN-1 enthielten. Diese Seren wurden ebenso wie das entsprechende Kontrollserum 1:50 verdünnt und eine Stunde vor der eigentlichen HCVpp-Infektion zu den Zellen gegeben. Wie in Abb. 3.2.9 zu erkennen, wirken die α SR-BI- und α CLDN-1-Antikörper wie schon die α CD81-Antikörper neutralisierend auf die HCVpp-Infektion. Die Stärke der Antikörper-bedingten Hemmung zeigt zwar Donor-abhängige Unterschiede, aber die Tendenz ist in Huh7-Zellen und Neohepatozyten die gleiche. Während die α CLDN-1-Antikörper die HCVpp-Infektion in Neohepatozyten im Vergleich zum Ansatz ohne Antikörper um bis

zu 75 % senken, bewirken sie in den Huh7-Zellen eine Senkung um etwa 55 %. Die α SR-BI-Antikörper neutralisieren die HCVpp-Infektion im Vergleich zum Ansatz ohne Antikörper um bis zu 76 % in Neohepatozyten und um etwa 70 % in den Huh7-Zellen. Auch hier ist im Fall der verwendeten Kontrollantikörper ein Rückgang um etwa 20 % zu erkennen. Dieser ist im Vergleich zur spezifischen Hemmung aber nicht signifikant. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die neutralisierende Wirkung der getesteten Antikörper in Neohepatozyten und Huh7-Zellen einen vergleichbaren Effekt hatte. Dies belegt zum einen den Rezeptor-vermittelten Zelleintritt der HCVpp und untermauert nochmals die Vergleichbarkeit der Neohepatozyten mit einem hepatischen Zellsystem.

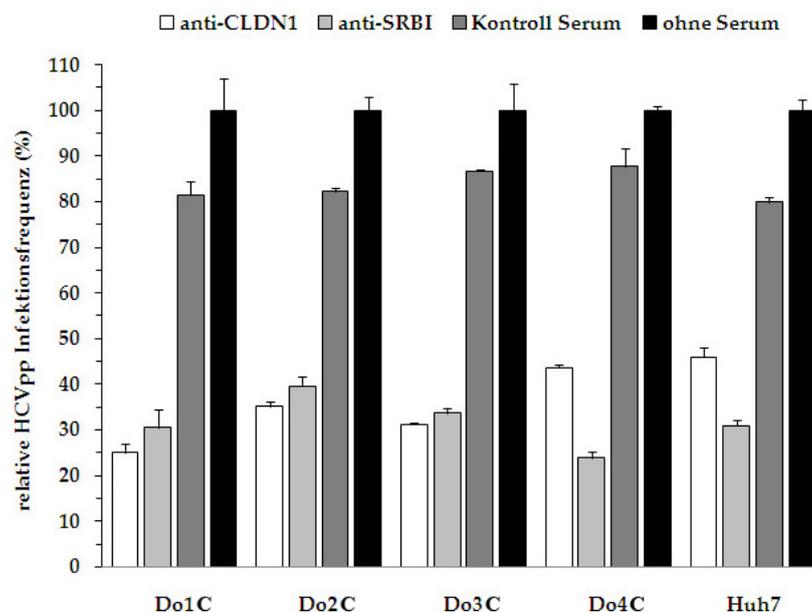


Abb. 3.2.9. Neutralisation der HCVpp-Infektion in Neohepatozyten und Huh7-Zellen durch Antikörper gegen SR-BI und CLDN-1

Neohepatozyten und Huh7-Zellen wurden in 96-Loch-Platten kultiviert und eine Stunde vor Zugabe des Infektionsansatzes mit Antikörper-Seren gegen SR-BI, CLDN-1 bzw. einem unspezifischen Kontroll-Serum versetzt (1:50). Anschließend wurden die Ansätze mit HCVpp in einer MOI von 0,1 infiziert. Die Analyse der Pseudotyp-Infektion erfolgte nach drei Tagen mittels FACS. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der lebenden Gesamtpopulation. Die Analyse wurde mit acht unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Dargestellt ist das Ergebnis von vier repräsentativen Donoren. Die Standardabweichungen wurden aus dem Mittelwert der jeweiligen Doppelansätze berechnet.

3.2.6 Einfluss von Patienten-spezifischen α HCV-Antikörpern auf die HCVpp-Infektion

Obwohl die Rolle der humoralen Immunantwort im Falle von HCV nicht genau definiert ist, sind im Serum bzw. Plasma chronisch infizierter HCV-Patienten neutralisierende Antikörper gegen das Virus detektierbar (Yu *et al.*, 2004). Diese Antikörper richten sich gegen unterschiedliche Epitope der HCV-Oberflächenproteine E1/E2 und sind nachweislich in der Lage, eine Infektion mit HCVpp im Huh7-Zellsystem zu neutralisieren (Haberstroh *et al.*, 2008; Pestka *et al.*, 2007).

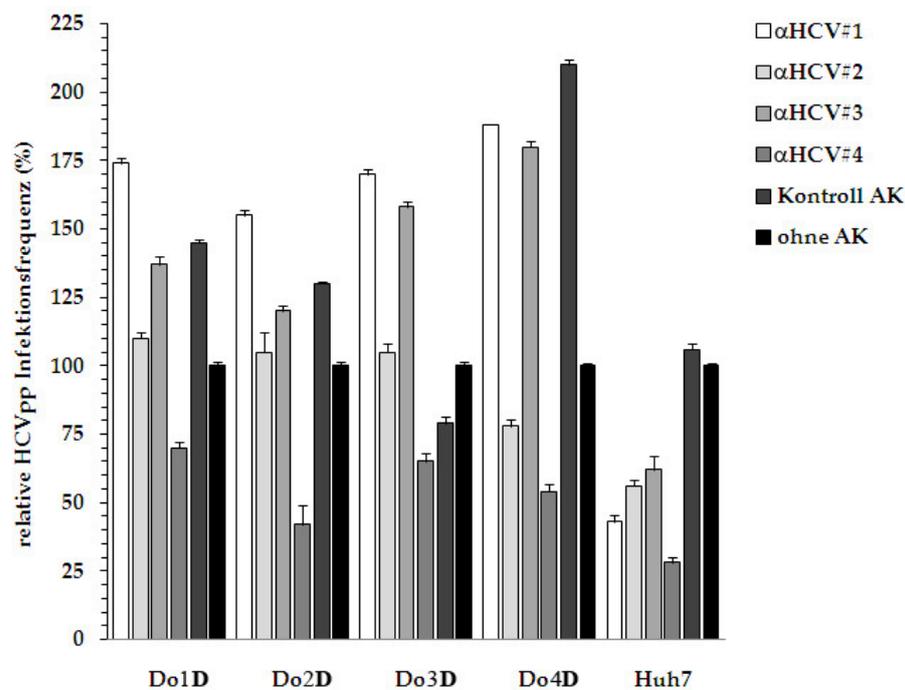


Abb. 3.2.10. Einfluss Patienten-spezifischer α HCV-Antikörper auf die HCVpp-Infektion in Neohepatozyten und Huh7-Zellen

Neohepatozyten und Huh7-Zellen wurden in 96-Loch-Platten kultiviert. Die HCV-Pseudotypen wurden eine Stunde vor Zugabe des Infektionsansatzes mit affinitätsgereinigten antiE1E2-Antikörpern verschiedener Patienten versetzt (100 μ g/ml) und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert. Die Analyse der Pseudotyp-Infektion erfolgte nach drei Tagen mittels FACS. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der lebenden Gesamtpopulation. Die Analyse wurde mit acht unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Dargestellt ist das Ergebnis von vier repräsentativen Donoren. Die Standardabweichungen wurden aus dem Mittelwert der jeweiligen Doppelansätze berechnet.

Um den Einfluss auf die HCVpp-Infektion von Neohepatozyten zu testen, wurden Infektionsexperimente in Anwesenheit Patienten-spezifischer α HCV-Antikörper durchgeführt. Dazu wurden α E1E2-Antikörper aus Serumproben chronisch kranker HCV-Patienten isoliert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt (Dr. M. Zeisel, Universität Strasbourg). Die Kontrollantikörper wurden aus HCV-negativen Serumproben gewonnen und analog behandelt. Die infektiösen HCVpp wurden 90 Minuten mit den Antikörper-Verdünnungen (100 μ g/ml) inkubiert, bevor die Infektion der Zellen erfolgte. Das Ergebnis der Infektionsexperimente ist in Abb. 3.2.10 zusammengefasst. Wie erwartet waren alle α HCV-Antikörper in der Lage, die HCVpp-Infektion im Huh7-Zellsystem um bis zu 70 % (α HCV#4) zu inhibieren. Überraschenderweise hatten die gleichen Antikörper in Neohepatozyten sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Infektionsfrequenz. Während der α HCV#4-Antikörper die HCVpp-Infektionsfrequenz aller Donoren um bis zu 55% reduzieren konnte, führten alle anderen Antikörper zu einem mehr oder minder starken Anstieg der Infektionsfrequenz. Prozentual beliefen sich die Zunahmen in Relation zum Antikörper-freien Ansatz auf +20 % bis +100 % (Abb.3.2.10). Selbst die Kontrollantikörper wirkten mit Ausnahme von Donor 3D stimulierend auf die HCVpp-Infektion und erhöhten die Infektionsfrequenz um bis zu 120 % (Donor 4D). Dieser unterschiedliche Effekt wirft die Frage auf, ob im Falle der Neohepatozyten weitere wirtsspezifische Faktoren Einfluss auf die HCVpp-Infektion haben könnten, die in der permanenten Huh7-Zellkultur keine Rolle spielen.

Antikörper-bedingte Steigerungen der HCV-Infektion ließen sich allerdings schon im Vorfeld in hepatischen Zelllinien nachweisen (Meyer *et al.*, 2008). Dabei waren neutralisierende α HCV-Antikörper in der Lage, die HCVpp-Infektion in Huh7-Zellen zu steigern, wenn sie dem Infektionsansatz in sehr hohen Verdünnungen zugesetzt wurden. Aus diesem Grund wurden die verwendeten α HCV-Antikörper in einer Dosis-Wirkungskurve mit vier unterschiedlichen Konzentrationen (0, 25, 50, 100 und 200 μ g/ml) getestet, um mögliche Auswirkungen der Antikörper-Konzentration auf die Neutralisationsfähigkeit zu untersuchen. Die bisherigen Versuche lieferten allerdings kein

zufriedenstellendes Ergebnis und müssen mit weiteren Donoren und höheren Verdünnungsstufen wiederholt werden.

Die Untersuchungen von Meyer *et al.* ergaben jedoch zudem, dass die Antikörper-vermittelte Steigerung der HCVpp-Infektion mit der Expression von Fc γ -Rezeptoren in Zusammenhang steht (Meyer *et al.*, 2008). Durch den Einsatz von α Fc γ R-spezifischen Antikörperfragmenten war in dem von ihnen untersuchten Infektionssystem der Effekt der Antikörper-vermittelten Infektionssteigerung inhibierbar. Dabei spielten v.a. Antikörper gegen Fc γ RI (CD64) und Fc γ RII (CD32) eine Rolle. Entsprechende Antikörper gegen Fc γ RIII (CD16) waren dagegen von geringerer Bedeutung. Um mögliche Zusammenhänge zwischen dieser Beobachtung und der Infektionssteigerung in unserem Zellsystem zu untersuchen, wurde die Expression der drei Fc - Rezeptoren (CD16, CD32, CD64) in Neohepatozyten und in den von uns verwendeten Huh7-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 3.2.11 zu erkennen, ließen sich alle drei Formen der Fc γ -Rezeptoren in Neohepatozyten und Huh7-Zellen nachweisen. Die Expressionsfrequenz lag dabei im Fall von CD16 (Fc γ -RIII) und CD32 (Fc γ -RII) mit 50 % und 72 % in Neohepatozyten aber deutlich höher als die entsprechende Ausprägung in den getesteten Huh7-Zellen (15 % und 20 %). Die Expression von CD64 (Fc γ -RI) war mit 85 % in den Huh7 Zellen zwar geringfügig höher als in den getesteten Neohepatozyten (70 %), aber da diesem Rezeptor eine untergeordnete Rolle bei der Antikörper-vermittelten Infektionssteigerung zugeschrieben wird, ist die CD64-Expression eher zu vernachlässigen. Da jedoch keine Angaben über entsprechende Expressionsfrequenzen in den Huh7-Zellen der Literaturquelle vorliegt, können keine Rückschlüsse auf die Vergleichbarkeit der Systeme gemacht werden. Nachfolgende Experimente müssten untersuchen, ob die Antikörper-vermittelte Steigerung in Neohepatozyten ebenfalls durch neutralisierende Antikörperfragmente inhibierbar ist. Diese Fragestellung bleibt Gegenstand weiterer Forschungen.

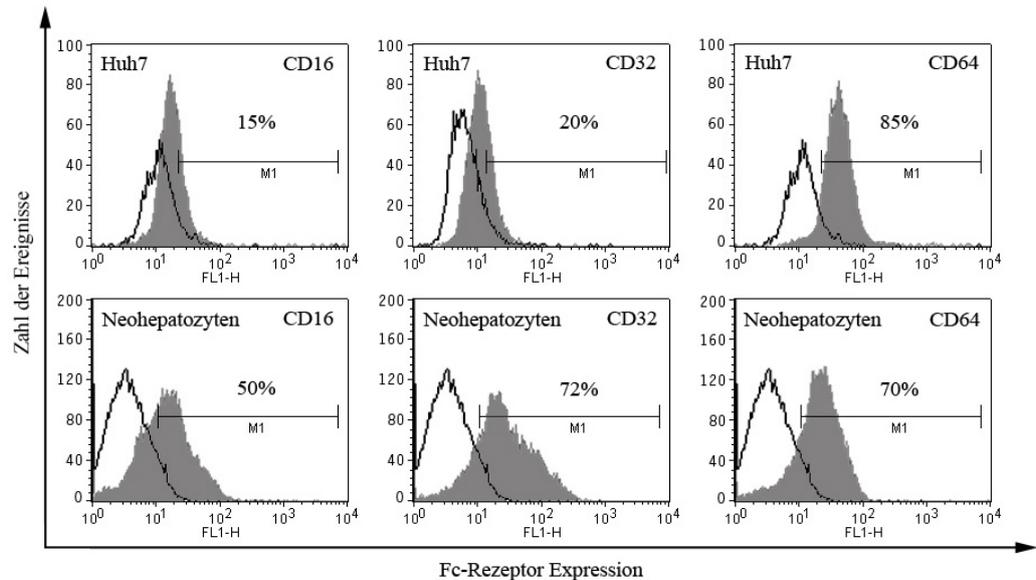


Abb. 3.2.11. FACS-Analyse zur Expression von Fc γ -Rezeptoren in Neohepatozyten und Huh7-Zellen

Der Nachweis der Antigene erfolgte mittels FITC-markierten Primärantikörpern für die Fc γ -Rezeptor-Strukturformen CD16 (Fc γ RIII), CD32 (Fc γ RII) sowie CD64 (Fc γ RI). Dargestellt ist die Reaktion der spezifischen Antikörper (grau) in Relation zur Bindung unspezifischer Isotyp-Kontrollantikörper. Als Referenz wurde die hepatische Zelllinie Huh7 verwendet. Dargestellt ist die FACS-Analyse von Zellen eines repräsentativen Donors von insgesamt vier getesteten Neohepatozyten-Präparationen.

3.2.7 Differenzierung von Neohepatozyten aus HCV-positivem Patientenblut

Mit dem Ziel ein Patienten-spezifisches Zellsystem zu etablieren, musste im Vorfeld geklärt werden, ob Neohepatozyten aus Frischblutproben HCV-positiver Patienten generiert werden können. Dazu wurden zunächst PBMC aus Blutproben chronisch infizierter HCV-Patienten sowie aus Kontrollproben HCV-negativer Donoren präpariert. Dabei fiel die Zellzahl isolierter PBMC in den HCV-positiven Blutproben deutlich geringer aus als in den Kontrollansätzen. Durchschnittlich konnten aus 1 ml Blut gesunder Donoren $\sim 9 \times 10^5$ PBMC isoliert werden, während die gleiche Menge HCV-positives Blut lediglich $\sim 6 \times 10^5$ Zellen lieferte. Dieser Umstand resultiert u.a. aus der Tatsache, dass die HCV-positiven PBMC stark mit Erythrozyten kontaminiert

waren und daher doppelt so oft mit PBS gewaschen werden mussten. Die letztlich resultierenden PBMC-Mengen wurden in gleicher Dichte gemäß Protokoll ausgesät und über 16 Tage in Neohepatozyten-Reifungsmedium kultiviert. Anschließend wurde die Expression der bedeutendsten Zellmarker (CD81, Albumin) sowie die Zugänglichkeit für HCV-Pseudotypen kontrolliert.

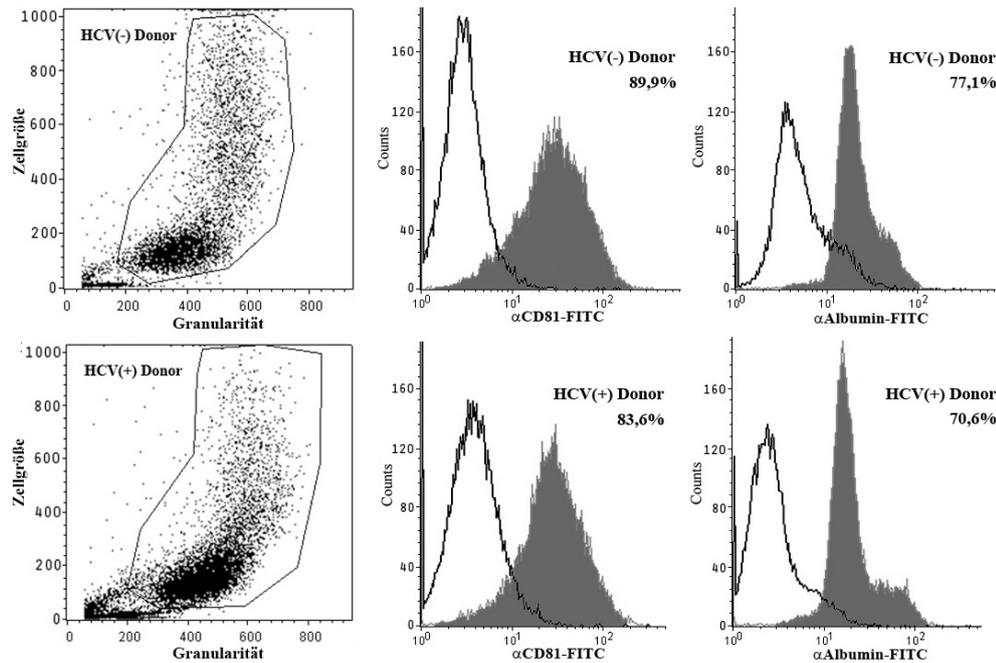


Abb. 3.2.12. Detektion der Expression hepatischer Markerproteine in Neohepatozyten aus HCV-negativen sowie HCV-positiven Blutproben

Durchflusszytometrische Analyse der Größe und Granularität der Neohepatozyten sowie der Expression von CD81 und Albumin. Die CD81-Färbung erfolgte direkt auf den lebenden Zellen durch Zugabe eines FITC-markierten Primärantikörpers. Albumin wurde intrazellulär nach Fixierung der Zellen und Permealisation mittels Saponin angefärbt. Der Nachweis erfolgte dabei ebenfalls mit Hilfe eines FITC-markierten Antikörpers. Dargestellt ist die Reaktion der spezifischen Antikörper (grau) in Relation zur Bindung unspezifischer IgG-FITC-Antikörper. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis jeweils eines HCV-negativen sowie eines HCV-positiven Donors aus insgesamt sieben Frischblut-Präparationen.

Wie in Abbildung 3.2.12 zu erkennen, zeigten die aus Frischblut generierten Neohepatozyten in der Darstellung von Größe gegen Granularität der Zellen das gleiche Bild wie die standardmäßig aus Leukozyten-Konzentraten hergestellten Neohepatozyten. Sowohl bei den HCV-negativen Kontrollzellen,

als auch im Fall der HCV-positiven Patientenproben ließen sich die beiden charakteristischen Subpopulationen erkennen (Abb. 3.2.12). Im Vergleich der CD81-Expression zu der in “Standard-Neohepatozyten“ und Huh7-Zellen (Abb. 3.1.3), war kein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke feststellbar. In der Albumin-Expression waren dagegen geringe Abweichungen erkennbar: während in “Standard-Neohepatozyten“ und Huh7-Zellen nahezu alle Zellen Albumin-positiv waren (Abb. 3.1.3), lag die Expressionsstärke der “Frischblut-Neohepatozyten“ lediglich zwischen 70 % und 77 % (Abb.3.2.12). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Frischblut-Ansätze eine verstärkte Reaktivität gegenüber dem Kontroll-Antikörper zeigten. In nachfolgenden Experimenten muss eine Kreuzreaktivität mit zelleigenen Strukturen ausgeschlossen werden und gegebenenfalls ein anderer Antikörper zum Albumin-Nachweis eingesetzt werden. Generell kann jedoch gesagt werden, dass die Differenzierung aus Frischblut-Proben HCV-positiver Patienten erfolgreich verlaufen ist.

3.2.7.1. Frischblut-Neohepatozyten sind mit HCV-Pseudotypen infizierbar

Neben der analogen Differenzierbarkeit der Neohepatozyten aus Frischblutproben musste ihre Infizierbarkeit mit HCV-Pseudotypen überprüft werden. Dazu wurden Infektionsexperimente mit Neohepatozyten aus HCV-negativem und HCV-positivem Blut durchgeführt. Die Infektion erfolgte in 96-Loch-Platten und wurde durchflusszytometrisch ausgewertet. Wie in Abb. 3.2.13 eindeutig erkennbar, zeigten sowohl Neohepatozyten aus HCV-positivem Blut als auch die entsprechenden Kontrollzellen eine Zugänglichkeit für HCVpp. Durch den Einsatz einer hoch konzentrierten HCVpp-Suspension ($1,5 \times 10^7$ iP/ml) konnten fast 58 % der Zellen mit HCVpp infiziert werden. Dieses Ergebnis unterstreicht nochmals, dass Neohepatozyten sowohl aus Leukozyten-Konzentraten, als auch aus Frischblutproben differenzierbar sind und dass eine chronische HCV-Infektion der Donoren die Differenzierung zu Leberzell-ähnlichen Zellen nicht behindert.

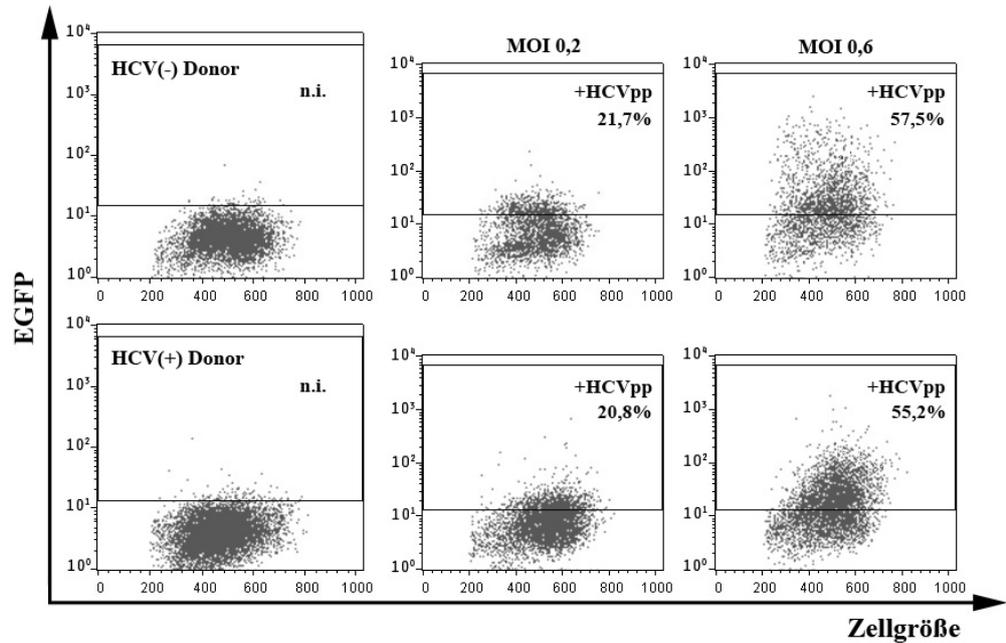


Abb. 3.2.13. Infektion von Neohepatozyten aus HCV-negativen sowie HCV-positiven Blutproben mit EGFP-markierten HCVpp

Die Zellen wurden mit der gleichen MOI (0,2 bzw. 0,6) infektiöser HCVpp inkubiert und nach drei Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen innerhalb der jeweiligen Zellpopulation. Dabei wurden die Daten von insgesamt acht Frischblut-Proben analysiert. Dargestellt ist das repräsentable Ergebnis jeweils eines HCV-negativen sowie eines HCV-positiven Donors.

3.3. Neohepatozyten lassen sich nicht produktiv mit HCVcc infizieren

Die Analyse der HCV-Replikation war lange Zeit durch die verminderte Replikationsfähigkeit des Virus in Zellkultur blockiert. Erst die Entwicklung infektiöser HCVcc-Partikel lieferte ein effektives Werkzeug zur Untersuchung des viralen Replikationszyklus (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005).

3.3.1 HCVcc-Infektion von Neohepatozyten

Neohepatozyten weisen durch ihre nachgewiesenen Leberzell-ähnlichen Eigenschaften optimale Voraussetzungen auf, um als Wirtszellen für eine HCVcc-Infektion zu dienen. Um die Zugänglichkeit der Neohepatozyten für die viralen Partikel zu testen, wurden die Zellen zunächst mit HCVcc unterschiedlicher RNA-Isolate (JFH-1, JC1) infiziert. Gleichzeitig erfolgte eine Kontroll-Infektion mit viralen Partikeln, die in analoger Weise, aber ohne die HCV-Oberflächenproteine E1 und E2 generiert wurden (DeltaE1E2). Der Nachweis der HCV-RNA erfolgte mittels RT-PCR. Zur Festlegung der Detektionsgrenze wurde eine Standardkurve mit H₂O und definierten Mengen an HCV-RNA erstellt. Bei der anschließenden Analyse wurden nur Signale berücksichtigt, die innerhalb der gemessenen Richtwerte lagen. Wie in Abb. 3.3.1 zu sehen, waren beide HCVcc-Genotypen in der Lage, sowohl die Huh7.5-Zellen als auch die Neohepatozyten zu infizieren. Die DeltaE1E2-Partikel waren dagegen innerhalb der Detektionsgrenze ($<1 \times 10^4$ RNA-Kopien pro ml) nicht nachweisbar. Im Falle der JFH-1-Partikel war die Infektionsstärke in Neohepatozyten und Huh7.5-Zellen vergleichbar hoch. Bei dem Neohepatozyten-Donor 1E waren 3×10^4 und bei Donor 2E 7×10^4 RNA-Kopien pro ml detektierbar. Der Wert der Huh7.5-Zellen lag mit 5×10^4 RNA-Kopien pro ml zwischen dem der beiden Neohepatozyten. Die JC1-Partikel zeigten im Gegensatz dazu eine deutlich höhere Zugänglichkeit für die Huh7.5-Zellen (1×10^6 RNA-Kopien pro ml), während die detektierte RNA-Menge im Fall der Neohepatozyten vergleichbar hoch blieb ($5-6 \times 10^4$ RNA-Kopien pro ml). Die Stärke der Infektion wich im Fall von JC1 in Huh7.5-Zellen demnach um mehr als eine ganze Logarithmus-Stufe von der in den Neohepatozyten ab. Um in den nachfolgenden Experimenten vergleichbare Ergebnisse in Neohepatozyten und Huh7.5-Zellen erzielen zu können, wurden die weiteren Experimente mit JFH1-HCVcc-Partikeln durchgeführt.

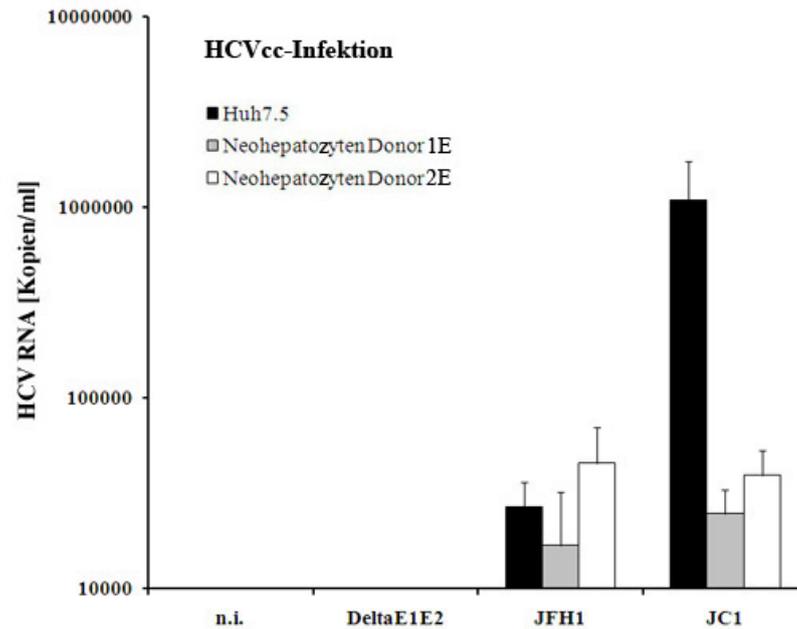


Abb. 3.3.1. RT-PCR Analyse einer HCVcc-Infektion von Neohepatocyten und Huh7.5-Zellen

Neohepatocyten und Huh7.5-Zellen wurden mit den gleichen Mengen (200µl) infektiöser HCVcc-Partikel (JFH1, JC1) bzw. den entsprechenden Kontrollpartikeln (DeltaE1E2) versetzt und 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels RT-PCR analysiert. Dargestellt ist die Anzahl der HCV-RNA-Kopien pro ml in logarithmischer Auftragung plus Standardabweichung. Als Kontrolle sind zusätzlich die Signale nicht infizierter Ansätze gezeigt (n.i.). Die Abbildung zeigt das repräsentable Ergebnis zweier Neohepatocyten sowie der Huh7-Zellen. Alle Reaktionen wurden dabei als Duplikat durchgeführt.

3.3.2 Die HCVcc-Infektion von Neohepatocyten ist nicht produktiv

Die Spezifität der HCVcc-Infektion musste in einem weiteren Schritt durch den Einsatz verschiedener Kontrollsubstanzen validiert werden. Dabei wurden wie schon im Falle der HCVpp-Infektion neutralisierende α CD81-Antikörper eingesetzt, um die Infektion Rezeptor-spezifisch zu hemmen. Desweiteren wurde ein HCV-spezifischer Protease-Inhibitor (BILN-2061) eingesetzt, um die Replikation der HCV-RNA in der Zelle zu unterbinden. Die verwendete Serin-Protease lag dabei in DMSO gelöst vor, was zur Folge hatte, dass eine zusätzliche Kontrollinfektion mit DMSO durchgeführt wurde.

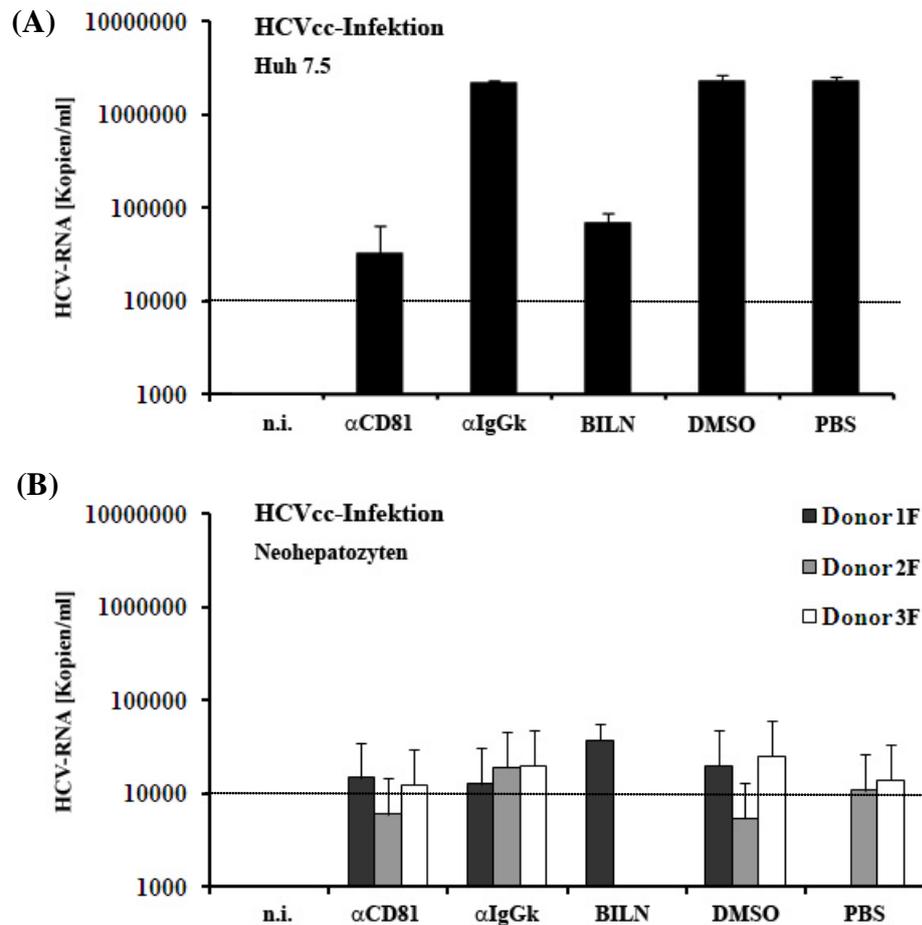


Abb. 3.3.2. RT-PCR Analyse einer HCVcc-Infektion von Huh7.5-Zellen (A) und Neohepatozyten unter Zugabe verschiedener Hemmstoffe

Neohepatozyten und Huh7.5-Zellen wurden eine Stunde vor Infektionsbeginn mit Verdünnungen der jeweiligen Antikörper (100 µg/ml) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den gleichen Mengen (200µl) infektiöser HCVcc-Partikel (JFH1) und den entsprechenden Zusatzstoffen (BILN-2061 (1:30000), DMSO (1:30000), PBS) versetzt und 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Zell-Lyse wurden die Ansätze mittels RT-PCR analysiert. Dargestellt ist die Anzahl der HCV-RNA-Kopien pro ml in logarithmischer Auftragung plus Standardabweichung. Als Kontrolle sind zusätzlich die Signale nicht infizierter Ansätze gezeigt (n.i.). Alle Reaktionen wurden als Duplikat durchgeführt. Dabei wurden die Daten von insgesamt acht verschiedenen Donoren analysiert. Dargestellt ist das repräsentable Ergebnis dreier Neohepatozyten sowie der Huh7-Zellen. Die eigentliche Detektionsgrenze der RT-PCR ist durch eine gestrichelte Linie markiert.

Wie in Abb. 3.3.2 zu erkennen, konnte durch den Einsatz verschiedener Kontrollsubstanzen gezeigt werden, dass die HCVcc-Infektion von Neohepatozyten nicht effizient erfolgen kann. Während im Falle der Huh7.5-Zellen eine klare HCVcc-Infektion und Replikation detektierbar war, überschritt das Signal der Neohepatozyten nur knapp die Detektionsgrenze der RT-PCR ($<1 \times 10^4$ RNA-Kopien pro ml). Zudem konnte im Gegensatz zum Huh7-Zellsystem keine gezielte Hemmung durch die CD81-Antikörper oder den Protease-Inhibitor BILN nachgewiesen werden. Demnach scheinen einige HCVcc-Partikel in die Zellen eindringen zu können, eine produktive Infektion mit viraler Replikation und Partikel-Neubildung kann nach ersten Erkenntnissen allerdings ausgeschlossen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden in HCVcc-Experimenten mit primären Hepatozyten erzielt (Baumert, *unveröffentlichte Daten*). Die Vergleichbarkeit von primären Hepatozyten und Neohepatozyten deutet darauf hin, dass *ex vivo* präparierte Zellen deutliche Unterschiede in der HCV Permissivität aufweisen. Huh7-Zellen sind demnach zwar als artifizielles Infektionssystem für HCV einsetzbar, die Ergebnisse spiegeln aber wahrscheinlich nicht die Gegebenheiten einer *in vivo* Situation wider.

4. Diskussion

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist neben dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) einer der weltweit bedeutendsten viralen Infektionserreger des Menschen. Während HIV als Retrovirus sein Genom in das Erbgut der Wirtszelle integriert und dadurch persistiert, ist HCV als einziges RNA-Virus in der Lage, ohne retrovirale Eigenschaften eine chronische Infektionskrankheit zu verursachen. Infolge seiner hohen Mutationsrate während des Replikationsprozesses weist HCV eine ausgeprägte genetische Variabilität auf. Diese genetische Vielfalt steht der Entwicklung eines präventiven oder therapeutischen Impfstoffes entgegen und macht HCV zu einem globalen Gesundheitsproblem.

Bei etwa 75 % der Betroffenen verläuft die HCV-Infektion ohne auffällige klinische Symptomatik, während etwa 25 % der Infizierten eine akute, zumeist milde Hepatitis entwickeln. Fulminante Verläufe sind sehr selten. Eine akute HCV-Infektion kann durch eine frühzeitige IFN-Monotherapie in nahezu allen Fällen geheilt werden. Da die akute Phase allerdings größtenteils asymptomatisch verläuft, bleibt die Infektion häufig unerkannt und kann unwissentlich weitergegeben werden. Problematisch ist, dass bis zu 85 % der HCV-Infektionen in eine chronische Form übergehen. Im Falle einer chronischen Infektion basiert die momentane Therapie auf einer kombinierten Gabe von PEG-IFN- α und Ribavirin (Zeuzem *et al.*, 2004a; Zeuzem *et al.*, 2004b). Durch die Kombinationstherapie konnte das dauerhafte Ansprechen (*sustained virological response*) von Patienten, die mit verschiedenen HCV-Genotypen infiziert waren, im Vergleich zur IFN-Monotherapie gesteigert werden. Während allerdings Patienten mit Genotyp 2 oder 3 in über 80 % der Fälle geheilt werden können, sprechen bei chronisch-infizierten Patienten mit Genotyp 1 lediglich 50 % auf die Medikation an (Feld & Hoofnagle, 2005). Die genauen Faktoren, die den Therapieerfolg bedingen, sind dabei noch weitgehend ungeklärt. Die Identifikation viraler und Wirtszell-bedingter Faktoren, die einen Einfluss auf das unterschiedliche Ansprechen der Patienten

im Laufe einer HCV-Infektion haben, stellt daher eine große Herausforderung der HCV-Forschung dar.

Die Analyse des gesamten HCV-Lebenszyklus war lange Zeit durch das Fehlen eines geeigneten Zellkultur- oder Kleintiermodells eingeschränkt. HCV-Partikel aus dem Serum HCV-infizierter Patienten zeigen nur geringe Infektiosität in humanen, hepatischen Zellkulturen und Hepatozyten anderer Säugetiere, wie Leberzellen der Maus sind für eine HCV-Infektion nicht zugänglich (Flint *et al.*, 2006). Daher konnten lediglich Schimpansen für grundlegende HCV-Studien herangezogen werden. Experimente mit Primaten werfen allerdings schwerwiegende ethische Fragen auf und sind sehr zeit- und kostenintensiv. Diese Limitierung warf die HCV-Forschung daher lange Zeit zurück und wurde erst in den letzten Jahren durch die Entwicklung verschiedener *in vitro* Modelle überwunden.

Die Entwicklung retroviraler HCV-Pseudopartikel machte dabei zum ersten Mal klar, dass die Zugänglichkeit hepatischer Zellen für eine HCV-Infektion an das Vorhandensein bestimmter zellulärer Faktoren gebunden ist (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). Die Gesamtheit dieser Faktoren ist auch jetzt noch nicht lückenlos geklärt, aber im Laufe der letzten Jahre konnten zahlreiche Proteine identifiziert werden, die als HCV-Eintrittsfaktoren unabdingbar sind. Dazu gehören CD81, SR-BI und einige *Tight junction*-Proteine, wie CLDN-1 und das erst kürzlich identifizierte Occludin. Die hepatische Zelllinie Huh7, sowie abgeleitete Subklone dieser Leberzelllinie, exprimieren all diese Faktoren und werden durch ihre HCV-Zugänglichkeit als "klassische Infektionssysteme" für HCV-Studien verwendet. Die Immortalisierung der Zellen führte allerdings, ebenso wie die Langzeitkultur, zu einer immer stärkeren Degeneration des Huh7-Genoms (siehe Abb.1.8.). Zudem kam es durch die Selektion bestimmter Zellklone mit erhöhter HCV-Permissivität (z.B. Huh7.5) zu einer immer stärkeren Entfernung von den Bedingungen, die *in vivo* während einer Leberzellinfektion vorliegen. Der Anspruch HCV-Studien in einem physiologisch-relevanten Kontext durchzuführen, ist demnach an die Entwicklung eines alternativen Zellsystems gekoppelt.

4.1. Neohepatozyten als hepatisches Zellsystem

Die Notwendigkeit eines alternativen Systems für HCV-Infektionen bildet die Basis der vorliegenden Arbeit. Primäre humane Hepatozyten (PHH) stellen zwar die optimalen Zielzellen für HCV-Experimente dar, aber ihre Verfügbarkeit ist stark limitiert. Zudem sind die Etablierung und die Langzeitkultur von PHHs sehr schwierig und die Zugänglichkeit für HCV-Infektionen ist *in vitro* stark eingeschränkt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher in der Etablierung und Analyse eines Monozyten-basierten Infektionssystems für HCV. Die dabei angewandte Differenzierung von peripheren Blutmonozyten zu Leberzell-artigen Neohepatozyten beruht auf einer modifizierten Methode nach Ruhnke *et al.*, (2005). Im Vorfeld konnte dabei bereits gezeigt werden, dass Neohepatozyten große Ähnlichkeiten mit primären Hepatozyten aufweisen, was Morphologie der Zellen, Expression hepatischer Marker sowie verschiedene metabolische und sekretorische Funktionen betrifft (Ruhnke *et al.*, 2005a; Ruhnke *et al.*, 2005b).

Die morphologischen Ähnlichkeiten zu PHHs konnten in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe 3.1.1). Neohepatozyten zeigen im lichtmikroskopischen Bild eine hexagonale Morphologie und bilden konfluente Zellrasen, die in ihrem Aussehen stark an Leberzell-Kulturen erinnern. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen konnten die hepatischen Eigenschaften der Neohepatozyten zudem weiter bekräftigt werden (siehe 3.1.2). Den wichtigsten Anhaltspunkt für die Ähnlichkeit zu Leberzellen liefert dabei die starke Albumin-Expression der neohepatischen Zellen. Albumin ist das bedeutendste Plasma-Protein, das von Hepatozyten sekretiert wird und ist im menschlichen Körper für die Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks verantwortlich. Die Bildung und Sekretion des Proteins ist dabei auf Leberzellen begrenzt. In Analogie zu den Studien von Ruhnke *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Albumin-Expression in Neohepatozyten verstärkt nachweisbar ist. Die Expressionsstärke überschreitet dabei z.T. sogar den Wert in Huh7-Zellen. Das Parenchym der Leber besteht aus hepatischen Epithelzellen. Die detektierte Expression von Cytokeratin-18, einem Bestandteil des zellulären Zytoskellets weist den epithelialen Charakter hepatischer Zellen auch in den untersuchten

Neohepatozyten nach. Die fehlende Expression von Cytokeratin-19 legt zudem nahe, dass es sich bei Neohepatozyten um Zellen mit dem Expressionsprofil reifer Hepatozyten handelt. Neben diesen grundlegenden Faktoren konnte zudem gezeigt werden, dass Neohepatozyten alle *bis dato* essentiellen Rezeptoren exprimieren, die eine effektive HCV-Infektion bedingen. So konnte neben dem Tetraspanin CD81 und dem Lipoprotein-Rezeptor SR-BI auch das *Tight junction*-Protein CLDN-1 in Neohepatozyten nachgewiesen werden (siehe 3.1.2). Der hepatische Charakter der Neohepatozyten konnte zudem durch den Nachweis der Leberzell-spezifischen miRNA122 belegt werden (siehe 3.1.3). Die Expression dieser miRNA ist auf Hepatozyten beschränkt und funktionell für die RNA-Replikation von Bedeutung (Jopling, 2008). Der Umfang der miRNA-Expression ist zwar im Vergleich zu Huh7-Zellen reduziert, aber das Vorhandensein der Leberzell-spezifischen miRNA in diesem neuen Zellsystem unterstreicht nochmals die hepatischen Eigenschaften der Neohepatozyten. Zusammenfassend ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit also gelungen, humane Monozyten des peripheren Blutes durch spezifische Wachstumsfaktoren zu Leberzell-artigen Zellen zu differenzieren.

Die genauen Mechanismen, die der Programmierung der Blutmonozyten zugrunde liegen, sind bisher nicht genau geklärt. Die Heterogenität von Monozyten als Vorläufer von Makrophagen und DCs ist zwar keine Unbekannte, aber das Verlassen des hämatopoetischen Entwicklungswegs war *bis dato* nicht belegt. Reife Monozyten entstehen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks (Volkman & Gowans, 1965) und zeigen im peripheren Blut unterschiedliche Morphologien (Gordon & Taylor, 2005). Die Zellen variieren dabei sowohl in Größe, als auch in Granularität und erinnern damit an die unterschiedlichen neohepatischen Zellpopulationen, die in der FACS-Analyse erkennbar sind (siehe 3.2.4). Zwar treten diese Subpopulationen nicht in allen Neohepatozyten auf, aber der Großteil der getesteten Spender zeigt neohepatische Zellen, die sich in Größe und Granularität unterscheiden. Ob diesen morphologischen Unterschieden verschiedene Reifungszustände oder sogar unterschiedliche monozytäre Vorläuferzellen zugrunde liegen, müssen künftige Experimente klären. Der Umstand, dass die Gesamtzellzahl der eingesetzten Monozyten nicht direkt mit der Zellzahl und der Qualität der

resultierenden Neohepatozyten korreliert (Tab.3.2.1.), lässt allerdings die Vermutung zu, dass bestimmte Monozyten-Subpopulationen für die Differenzierung der Neohepatozyten verantwortlich sind. Für die Heterogenität des monozytären Phänotyps wird ebenfalls angenommen, dass dieser die Spezialisierung bestimmter Zellpopulationen in unterschiedlichem physiologischem Kontext widerspiegelt (Gordon & Taylor, 2005). Dies lässt vermuten, dass der Bedarf an Leberzellen und das Vorhandensein entsprechender Stimuli die Entwicklung von Neohepatozyten auch *in vivo* zulassen könnte. Diese Vermutung wird durch Transplantations-Studien mit immundefizienten SCID/NOD-Mäusen gestützt, die zeigten, dass Neohepatozyten *in vivo* die Mäuseleber repopulieren und humanes Albumin produzieren können (Ruhnke *et al.*, 2005a). Ein funktioneller Ersatz von Hepatozyten konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden.

4.2. Neohepatozyten als Infektionssystem für HCV

Die Analogien von Neohepatozyten und Huh7-Zellen in Bezug auf die Expression hepatischer Marker ließ auf die Zugänglichkeit der Zellen für HCV-Infektionen schließen. Mit Hilfe von EGFP-markierten HCV-Pseudotypen konnte die Infizierbarkeit der Neohepatozyten schließlich belegt werden (siehe 3.2.2). Die Spezifität der verwendeten HCVpp für hepatische Zellen wurde durch vergleichende Infektionsexperimente an Huh7- und HeLa-Zellen dokumentiert (siehe 3.2.1). Während die Huh7-Zellen, als hepatisches System, das Markerprotein EGFP in Abhängigkeit der HCVpp-Dosis exprimierten, zeigten die getesteten HeLa-Zellen keine Zugänglichkeit für eine HCVpp-Infektion. Die Beschränkung auf hepatische Zellen zeigte sich ebenso durch komparative Infektionsexperimente mit Makrophagen, PCMO-Zellen und Neohepatozyten (siehe 3.2.3). Während die enddifferenzierten Neohepatozyten durch ihre Leberzell-Eigenschaften mit HCVpp-Partikeln infizierbar waren, konnten weder Makrophagen noch die entsprechenden PCMO-Zellen des gleichen Donors mit HCVpp infiziert werden. Die unterschiedlichen Stimuli führten demnach in der gleichen Monozyten-Population nachweislich zu unterschiedlichen Entwicklungszuständen. Die PCMO-Zellen stellen dabei zwar die direkten Vorläufer der Neohepatozyten

dar, weisen aber im dedifferenzierten Zustand an Tag sechs keine Zugänglichkeit für HCVpp-Infektionen auf. Erst die zehntägige Differenzierungsphase unter Zugabe von FGF-4 induziert demnach die hepatische Entwicklung der Vorläuferzellen. Der genaue Status der hepatischen Differenzierung könnte dabei in künftigen Experimenten durch Expressions-Kinetiken untersucht werden. Dabei könnte der Level der Albumin-Expression und das Signal der Leberzell-spezifischen RNA als Maßstab für den Entwicklungsstatus herangezogen werden. In diesem Kontext wäre es zudem interessant zu erfahren, ob exogene miRNA122 die hepatische Differenzierung sowie die Zugänglichkeit für HCV-Partikel verbessern könnte.

Bemerkenswerterweise zeigen die Neohepatozyten im enddifferenzierten Zustand eine Donor-abhängige Variabilität der Infektionsfrequenz (siehe 3.2.2). Während 20-25% der Donoren insgesamt nicht oder nur sehr schwach mit HCVpp infizierbar waren, konnten im Fall der infizierbaren Neohepatozyten ebenfalls Unterschiede in der Infektionsfrequenz der bestehenden Subpopulationen detektiert werden (siehe Tab.3.2.1). Da allerdings nicht alle Neohepatozyten eine derartige Unterteilung in zwei Subpopulationen erkennen ließen, kann man davon ausgehen, dass die unterschiedliche Infizierbarkeit auf unterschiedliche Entwicklungszustände der Neohepatozyten zurückzuführen ist. Die Expression der untersuchten hepatischen Marker zeigte zwar keine bemerkenswerten Unterschiede in den nicht-infizierbaren Zellpopulationen, aber die Zugänglichkeit für die HCV-Partikel könnte z.B. durch die Expression von Faktoren bedingt sein, die nicht Gegenstand unserer Untersuchungen waren. So wurde vor Kurzem ein weiteres Protein entdeckt, das unter Umständen den Schlüsselfaktor für den HCV-Eintritt in die Zelle darstellt (Ploss *et al.*, 2009). Das beschriebene Protein Occludin ist wie Claudin-1, Bestandteil der *Tight junctions*. Diese Protein-Strukturen bilden eigentlich eine Diffusionsbarriere zwischen verschiedenen Zellen und kontrollieren dadurch den Fluss von Molekülen über das Epithel (Abb. 4.1). Neueste Analysen haben allerdings gezeigt, dass genau diese Faktoren essentiell sind, um den HCV-Eintritt in die Zelle zu gewährleisten (Evans *et al.*, 2007; Meertens *et al.*, 2008; Ploss *et al.*, 2009). HCV verwendet zwar die zuvor beschriebenen Rezeptoren CD81 und SR-BI zur initialen

Bindung an die Zelle, der spätere Kontakt mit CLDN-1 und Occludin scheint allerdings den essentiellen Schritt für den viralen Zelleintritt darzustellen (Pietschmann, 2009). Die Expression von Occludin wurde in Neohepatozyten bislang nicht getestet. Da dieser Faktor allerdings essentiell für den HCV-Eintritt ist, kann man davon ausgehen, dass permissive Neohepatozyten Occludin exprimieren. Im Falle der nicht-infizierbaren Neohepatozyten sowie der weniger zugänglichen Subpopulationen könnte eine verminderte oder fehlende Expression dieses Faktors eine Rolle spielen. Dies scheint v.a. daher wahrscheinlich, da alle bisher getesteten Zelltypen, die CD81, SR-BI, CLDN-1 und Occludin coexprimieren, permissiv für eine HCV-Infektion waren (Ploss *et al.*, 2009).

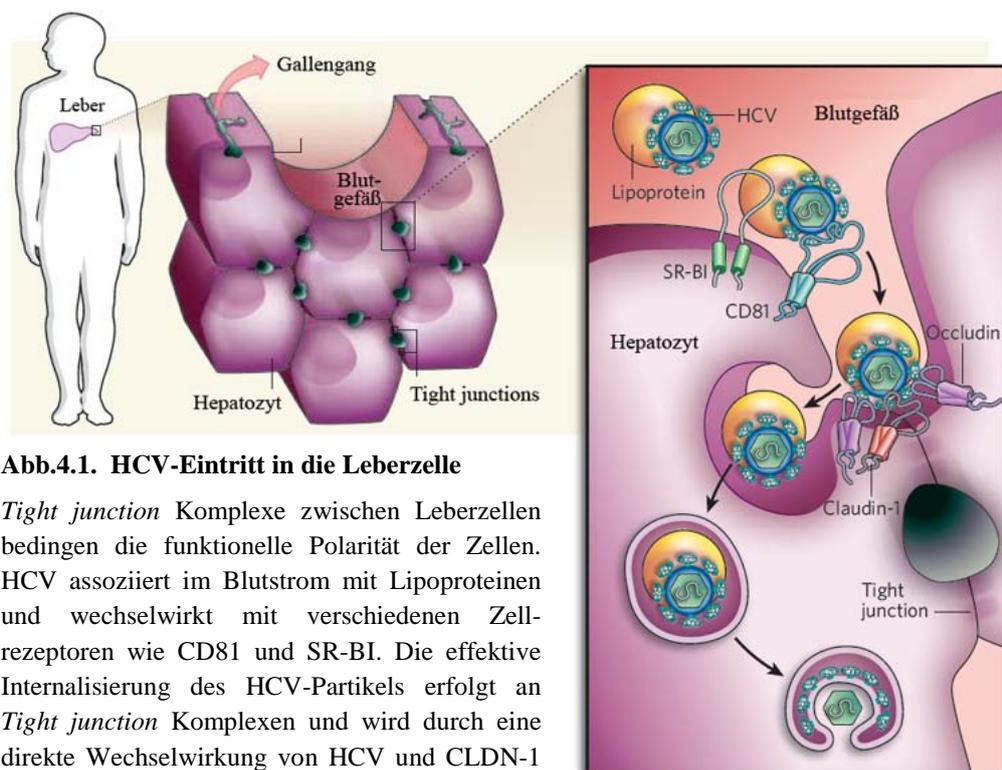


Abb.4.1. HCV-Eintritt in die Leberzelle

Tight junction Komplexe zwischen Leberzellen bedingen die funktionelle Polarität der Zellen. HCV assoziiert im Blutstrom mit Lipoproteinen und wechselwirkt mit verschiedenen Zellrezeptoren wie CD81 und SR-BI. Die effektive Internalisierung des HCV-Partikels erfolgt an *Tight junction* Komplexen und wird durch eine direkte Wechselwirkung von HCV und CLDN-1 und/oder Occludin vermittelt (modifiziert nach Pietschmann, 2009).

4.3. Einfluss von humanem Serum auf die HCV-Infektion

HCV steht durch seine Interaktion mit dem LDL-Rezeptor und SR-BI nachweislich mit Faktoren des Lipidstoffwechsels in Wechselwirkung (Agnello *et al.*, 1999; Voisset *et al.*, 2005). Der LDL-Rezeptor ist dabei nicht

essentiell für den HCV-Eintritt und scheint lediglich die Bindung von HCV an die Zelle zu erleichtern, während SR-BI aktiv und unabdingbar am Zelleintritt des viralen Partikels beteiligt ist (Dreux *et al.*, 2009; Regeard *et al.*, 2008; Zeisel *et al.*, 2008). SR-BI ist ein physiologisch relevanter Lipoprotein-Rezeptor, der für den Lipid-Austausch an der Membran verantwortlich ist (Kozarsky *et al.*, 1997; Rigotti *et al.*, 1997). Seine Expression ist dabei auf die Leber sowie steroidogene Gewebe begrenzt (Connelly & Williams, 2004).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass HCV-Partikel aus Patientenisolaten mit Lipoproteinen wie HDL oder LDL komplexiert sein können (Agnello *et al.*, 1999; Andre *et al.*, 2002). Dies legt nahe, dass HCV *in vivo* mit Lipoproteinen in Verbindung steht. Infektionsstudien, die sich mit diesem Thema befassten, konnten belegen, dass Bestandteile des humanen Serums in der Lage sind, die HCV-Infektion zu beeinflussen (Lavillette *et al.*, 2005; Voisset *et al.*, 2005). HDL, der natürliche Ligand von SR-BI ist dabei nachweislich in der Lage, den HCV-Eintritt in hepatische Zellen zu erleichtern, während oxidiertes LDL (LDL_{ox}) eine inhibierende Wirkung auf den HCV-Eintritt hat. Die unterschiedlichen Auswirkungen von humanem Serum konnten in der vorliegenden Arbeit für das Neohepatozyten-Zellsystem bestätigt werden (siehe 3.2.3). Während einige humane Seren dabei Donor-abhängig die HCV-Infektion bis um den Faktor 3 steigerten, hatten andere Seren einen eher negativen Einfluss auf die HCV-Infektion. Genau dieser gegensätzliche Effekt von humanem Serum konnte im Vorfeld auch in Huh7-Zellen gezeigt werden (Lavillette *et al.*, 2005) und untermauert nochmals die Vergleichbarkeit der beiden Zellsysteme.

Die Wechselwirkung von HCV mit Serum-Komponenten wie HDL könnte *in vivo* unterschiedliche Wirkungen haben: zum einen könnte die über HDL vermittelte Interaktion mit Lipid-Rezeptoren die Bindung an die Zielzelle und damit den HCV-Eintritt erleichtern, zum anderen könnten Lipide die virale Oberfläche "maskieren" und so dazu beitragen, dass HCV der Immunantwort des Wirtes entgeht (Pumeechockchai *et al.*, 2002; Thomssen *et al.*, 1993).

4.4. Einfluss von DEAE-Dextran auf die Pseudotyp-Infektion

Die Steigerung der viralen Infektionsfrequenz ist im Falle von HCV von grundlegender Bedeutung. *In vitro* Versuche mit Patienten-Isolaten sind bis heute durch die geringe Infektiosität der viralen RNA im Zellkulturmodell sehr schwierig (Fournier *et al.*, 1998; Kanda *et al.*, 2006). Lediglich das RNA-Isolat JFH-1, das auf den Erreger einer fulminanten Hepatitis zurückgeht, zeigt detektierbare Ergebnisse und wird für die HCVcc-Produktion eingesetzt (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005).

Infektionsexperimente mit HIVpp haben vor kurzem gezeigt, dass das Polysaccharid DEAE-Dextran die Infektionsfrequenz viraler Partikel beeinflussen kann (Meyerhans, *unveröffentlichte Daten*). Der beschriebene Einfluss von DEAE-Dextran auf die Infektionsfrequenz von Viren wurde bereits 1969 beschrieben (Fiala & Saltzman, 1969), aber für HCV nicht näher untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DEAE-Dextran infektionssteigernd im HCVpp-System wirkt (siehe 3.2.4). Während die Infektionsfrequenz in einem Kontrollexperiment mit VSVpp-Partikeln nicht nachhaltig beeinflusst werden konnte, wurde die Infektion von HCVpp sowohl in Huh7-Zellen als auch in Neohepatozyten gesteigert. Im Falle der Huh7-Zellen konnte mit steigender DEAE-Konzentration eine kontinuierliche Erhöhung der HCVpp-Infektionsfrequenz beobachtet werden. In Neohepatozyten wurde das Infektionsmaximum dagegen schon bei einer Konzentration von 5 µg/ml DEAE-Dextran erreicht (siehe Abb.3.2.6). Der Grad der Infektionssteigerung lag dafür im Fall der Neohepatozyten bei einem Faktor von maximal 4, während die Infektionsfrequenz in den Huh7-Zellen lediglich um den Faktor 2,3 erhöht werden konnte. Eine weitere Erhöhung der Polysaccharid-Konzentration führte zu immer stärkeren, morphologischen Veränderungen der Zellen und letztlich zum vermehrten Zelltod. Die Frequenz der VSVpp-Infektion wurde im Gegensatz zu HCVpp und HIVpp weder in Huh7-Zellen noch in Neohepatozyten durch DEAE-Dextran beeinflusst. Der Unterschied könnte dabei im Zelleintritts-Mechanismus der viralen Partikel liegen. Während HCVpp- und HIVpp-Partikel spezifisch und Rezeptor-vermittelt in die Zielzellen eindringen, infiziert VSVpp durch die Anlagerung

an ubiquitär vorkommende Oberflächenproteine. Der unterschiedliche Effekt von DEAE-Dextran lässt demnach darauf schließen, dass das Polysaccharid die Wechselwirkung zwischen den Oberflächenproteinen des Virus und bestimmten Wirtszell-Rezeptoren beeinflusst. Dabei könnte die positive Ladung von DEAE-Dextran die Virusbindung an die Zellen verstärken und damit den viralen Eintritt in die Zelle erhöhen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass DEAE-Dextran durch Ladungseffekte oder Wechselwirkungen mit bestimmten Proteinen intrazelluläre Signalkaskaden auslösen könnte, die eine erhöhte Internalisierung des Virus bewirken. Die Unterschiede zwischen HCVpp/HIVpp und den VSVpp-Partikeln könnte dabei in der Oberflächenladung der entsprechenden Glykoproteine liegen. Während das E1/E2-Heteromer der HCVpp sowie das GP120 der HIVpp bedingt durch ihre Aminosäuren-Zusammensetzung eine positive Ladung aufweisen, ist das Protein-G der VSVpp-Partikel negativ geladen. Diese gegensätzlich geladenen Oberflächenmoleküle könnten demnach in unterschiedlicher Weise mit dem positiv-geladenen DEAE-Dextran wechselwirken und so den viralen Eintritt in verschiedene Richtungen beeinflussen. Die genauen Ursachen des beobachteten Effektes zu ermitteln, bleibt allerdings Gegenstand zukünftiger Forschungen.

4.5. Antikörper-vermittelte Effekte auf die HCVpp-Infektion

Die infektionshemmende Wirkung von Antikörpern, die gegen die Oberflächenrezeptoren von HCV gerichtet sind, konnte in zahlreichen Studien belegt werden (Cormier *et al.*, 2004; Meertens *et al.*, 2008; Meuleman *et al.*, 2008; Zeisel *et al.*, 2007). Diese Studien dienten im Vorfeld dazu, die Spezifität des HCV-Eintritts über bestimmte Oberflächenmoleküle nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe spezifischer Antikörper, die gegen die extrazellulären Domänen von CD81, SR-BI und CLDN-1 gerichtet waren, gezeigt werden, dass der HCVpp-Eintritt in Neohepatozyten über die gleichen Rezeptoren vermittelt wird, wie in Huh7-Zellen (siehe 3.2.5). Kontrollexperimente mit VSVpp belegten zudem, dass nur spezifische, Rezeptor-vermittelte virale Effekte über die Antikörper inhibierbar waren. Der Eintrittsmechanismus der HCV-Pseudotypen scheint in

Neohepatozyten demnach in Bezug auf die verwendeten Rezeptoren dem in Hepatozyten zu entsprechen und macht die Neohepatozyten zu einem möglichen, Personen-spezifischen Infektionssystem für HCV-Studien.

Aktive und/oder passive Immunprophylaxe gegen HCV bleibt bisher ein unerreichtes Ziel der viralen Forschung. Immunglobuline, die aus Patienten mit chronischer HCV-Infektion isoliert wurden, konnten in einigen Fällen allerdings eine HCV-Infektion verhindern, wenn sie den gesunden Empfängern vor der Exposition mit dem Virus verabreicht wurden (Farci *et al.*, 1994; Knodell *et al.*, 1976; Piazza *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen legten nahe, dass in chronisch erkrankten HCV-Patienten Antikörper existieren, die gegen die Oberflächenproteine von HCV gerichtet sind und neutralisierend auf eine HCVpp-Infektion wirken müssten (Yu *et al.*, 2004). Diese Antikörper wurden erfolgreich im HCVpp-System getestet und zeigten je nach HCV-Genotyp und Subtyp unterschiedliche Neutralisationseffekte (Lavillette *et al.*, 2005; Logvinoff *et al.*, 2004; Meunier *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten-Antikörper getestet, die nachweislich in der Lage sind, eine HCVpp-Infektion in Huh7-Zellen zu neutralisieren (Haberstroh *et al.*, 2008; Pestka *et al.*, 2007). Überraschenderweise zeigten diese Antikörper im Neohepatozyten-System einen eher gegensätzlichen Effekt (siehe 3.2.6). Während die HCVpp-Infektionsfrequenz durch die α HCV-Antikörper in Huh7-Zellen gegenüber dem Antikörper-freien Ansatz deutlich gesenkt wurde, hatten die Antikörper in den parallelen Ansätzen der Neohepatozyten fast durchgehend eine infektions-steigernde Wirkung. Das Auftreten von Virus-spezifischen Antikörpern, die zur Steigerung der viralen Infektiosität führen, ist schon länger bekannt (Hawkes & Lafferty, 1967) und konnten kürzlich auch für HCV belegt werden (Meyer *et al.*, 2008). Ein solch konträrer Effekt in hepatischen und Leberzell-artigen Zellen ist unter analogen Versuchsbedingungen allerdings bemerkenswert. Diese Unterschiede könnten dabei auf Personen-spezifische Faktoren hindeuten, die im Huh7-Zellsystem verloren gegangen, aber für die HCV-Infektion primärer Zellen von Bedeutung sind.

Für Viren unterschiedlicher Familien ist belegt, dass sie Antikörper zur Infektionssteigerung benutzen, indem der Virus-Antikörper-Komplex an zelluläre Fc-Rezeptoren bindet (Halstead, 1979; Porterfield, 1986; Robinson *et al.*, 1988). Dieser Effekt wurde kürzlich auch im Kontext von α HCV-Antikörpern gezeigt (Meyer *et al.*, 2008). Die Konzentration der verwendeten Antikörper war in diesem Fall von entscheidender Bedeutung für die Infektionssteigerung. Antikörper, die unverdünnt neutralisierend auf die HCVpp-Infektion in Huh7-Zellen wirkten, konnten bei hoher Verdünnung einen infektionssteigernden Effekt induzieren. Auch in diesem Fall wurde der Effekt mit zellulären Fc-Rezeptoren in Verbindung gebracht, wobei v.a. CD64 (FcRI) und CD32 (FcRII) eine entscheidende Rolle spielten. Durch FACS-Analysen konnte das Vorhandensein von Fc-Rezeptoren auch im Neohepatozyten-System belegt werden (siehe Abb. 3.2.11). Da Fc-Rezeptoren *in vivo* vornehmlich in Monozyten und Makrophagen von Bedeutung sind, könnte der monozytäre Ursprung der Neohepatozyten die unterschiedlichen Effekte der Antikörper erklären. Neohepatozyten reagieren als primäre Zellen wahrscheinlich verstärkt auf das Auftreten von Fc-Rezeptor-spezifischen Antikörper-Komplexen und zeigen damit unabhängig von der eingesetzten AK-Konzentration infektionssteigernde Effekte. Inwieweit die Infektionssteigerung allerdings genau mit der Antikörper-Konzentration verknüpft ist und ob Fc-Rezeptor-spezifische Antikörper diesen Effekt aufheben können, müssen künftige Experimente zeigen.

4.6. HCVcc-Infektion von Neohepatozyten

Die genauen Mechanismen, die während der HCV-Replikation in der Leber ablaufen, sind bisher nur teilweise verstanden. Die liegt u.a. daran, dass primäre Hepatozyten-Kulturen nicht oder nur sehr ineffizient mit Direkt-Isolaten aus Patienten infizierbar sind (Williams & Sen, 2003). Erst die Entwicklung der Zellkultur-basierten HCVcc-Partikel machte genauere Replikationsstudien möglich. HCVcc-Partikel sind infektiös gegenüber Huh7-Zellen (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005), Schimpansen (Lindenbach *et al.*, 2006; Wakita *et al.*, 2005) und Mäusen mit menschlichen Leberzell-Transplantaten (Lindenbach *et al.*, 2006). HCVcc-

Infektionen mit primären, humanen Hepatozyten zeigten dagegen nur unzureichende Ergebnisse (Baumert, *unveröffentlichte Daten*). Ebenso konnte im Neohepatozyten-System keine produktive HCVcc-Infektion nachgewiesen werden (siehe 3.3). Die viralen Partikel konnten zwar zum Teil in die Zellen eindringen und das z.T. in vergleichbarer Effizienz wie in Huh7-Zellen (siehe 3.3.1), aber die HCVcc-Infektion war in Neohepatozyten über α CD81-Antikörper nicht effektiv inhibierbar (siehe 3.3.2). Dies belegt, dass der Eintritt der HCVcc-Partikel nicht Rezeptor-vermittelt erfolgt. Zudem zeigt die fehlende Wirksamkeit des HCV-spezifischen Protease-Inhibitors BILN-2061, dass keine effektive Replikation der viralen RNA in Neohepatozyten erfolgt (siehe 3.3.2). Die vergleichbaren Daten von Neohepatozyten und PHH weisen darauf hin, dass Neohepatozyten dem *in vivo*-Status einer Leberzelle ähnlicher sind als Huh7-Zellen. Allerdings macht die fehlende Anwendbarkeit von HCVcc-Partikeln deutlich, dass Neohepatozyten zwar als Modellsystem für den HCV-Eintritt verwendet werden können, als Replikations-Modell hingegen nicht dienlich sind. In diesem Kontext sollten künftige Studien die miRNA122-Expression in Neohepatozyten und PHH näher untersuchen. Die Leberzell-spezifische miRNA122 ist nachweislich unabdingbar für eine effektive HCV-Replikation. Im Rahmen dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass miR122 zwar in Neohepatozyten exprimiert ist, die Stärke der Expression allerdings im Vergleich zu Huh7-Zellen deutlich reduziert ist. Sollte sich herausstellen, dass Neohepatozyten und PHH vergleichbare miRNA-Profile aufweisen, könnte unter Umständen eine Modulation durch exogene miRNA122 die HCV-Replikations-Effizienz in beiden Zellsystemen verbessern und damit eine HCVcc-Infektion ermöglichen.

4.7. Neohepatozyten als personalisiertes Infektionssystem

Betrachtet man die Anwendungsperspektiven der neohepatischen Zellen, so könnte der Aspekt der fehlenden HCV-Replikation allerdings auch von Vorteil sein. HCV ist eine Hauptursache für Lebertransplantationen. Durch die hohe Inzidenz von Lebererkrankungen sind immer mehr Menschen auf Spenderorgane angewiesen. Der medizinische Bedarf kann allerdings aufgrund der hohen Nachfrage nicht gedeckt werden. Aus diesem Grund wurde in den

letzten Jahren immer mehr an der Möglichkeit von Leber- und Stammzell-Transplantationen geforscht (Ruhnke *et al.*, 2005a; Wagers & Weissman, 2004). Die Transplantation gesunder Organe oder Leberzellen birgt immer die Gefahr einer Reinfektion mit zirkulierenden HCV-Partikeln. Neohepatozyten hätten somit zahlreiche Vorteile gegenüber transplantierten Hepatozyten. Zum einen könnten die hepatischen “Ersatzzellen“ aus autologen Körperzellen gewonnen werden und so eine Abstoßungsreaktion verhindert werden und zum anderen würden die Neohepatozyten die Leberzellen nicht nur partiell funktionell ersetzen, sondern zudem einer wiederholten Infektion mit HCV resistent gegenüberstehen.

Die generelle Anwendbarkeit von Neohepatozyten als Patienten-spezifisches Zellsystem konnte in der vorliegenden Arbeit bereits durch die Generation von Neohepatozyten aus HCV-positivem Patientenblut belegt werden (siehe 3.2.7). Wäre es möglich Patienten-Neohepatozyten ins Kleintiermodell (z.B. in immundefiziente Mäuse) zu transplantieren, so könnten *in vivo* Erkenntnisse zum HCV-Lebenszyklus gewonnen werden. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Neohepatozyten im physiologischen Kontext, ebenso wie primäre Hepatozyten, eine HCV-Replikation erlauben. Dies würde zwar die Vorteile nicht-infizierbarer Leberzell-Transplantate aufheben, aber im Gegenzug die Entwicklung personalisierter Infektionsmodelle ermöglichen. Mit Hilfe dieser Zellsysteme könnte untersucht werden, in welchem Umfang das Expressionsmuster der Wirtszelle Einfluss auf die Virus-Persistenz in einzelnen Patienten hat und welche Faktoren das Fortschreiten der HCV-Infektion begünstigen.

5. Zusammenfassung

Basierend auf der Notwendigkeit eines alternativen Zellsystems für HCV-Studien wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Monozyten-basierte Neohepatozyten als Personen-spezifisches Infektionssystem eingesetzt werden können. Dabei konnte gezeigt werden, dass Neohepatozyten neben Albumin und den *bis dato* bekannten HCV-Rezeptoren zudem die Leberzell-spezifische miRNA122 exprimieren. Infektionsexperimente mit HCVpp konnten belegen, dass der Großteil der Neohepatozyten für die virale Infektion zugänglich ist. Humanes AB-Serum war dabei ebenso wie das Polysaccharid DEAE-Dextran in der Lage, die HCVpp-Infektionsfrequenz positiv zu beeinflussen. Die Neutralisation der HCVpp-Infektion durch α CD81-, α SR-BI- und α CLDN1-Antikörper zeigte zudem, dass die HCVpp-Infektion in Neohepatozyten über die gleichen Rezeptoren vermittelt wird wie in Hepatozyten. Neutralisierende α E1E2-Antikörper aus HCV-Patienten hatten in Neohepatozyten und Huh7-Zellen gegensätzliche Effekte. Während die Infektions-Frequenz in Huh7-Zellen in Anwesenheit der Antikörper gesenkt wurde, hatten die Patienten-Antikörper in Neohepatozyten einen infektionssteigernden Effekt. Replikationsstudien mit HCVcc-Partikeln waren bislang nicht möglich. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Neohepatozyten ein effizientes System darstellen, um den HCV-Zelleintritt Patienten-spezifisch zu untersuchen.

6. *Summary*

A full understanding of the pathogenesis of HCV requires a tissue culture model that allows studies in a physiological context. According to previous studies we generated a hepatocyte-like cell system (termed Neohepatocytes) from peripheral blood monocytes and investigated, whether these cells can be used as a person-specific cell system for HCV infection studies. First experiments showed that Neohepatocytes express hepatocyte-specific markers like albumin as well as the essential HCV receptors CD81, SR-BI and CLDN-1. Additionally the liver-specific miRNA122 was detectable within these cells. Furthermore, the majority of Neohepatocytes was infectable with hepatotropic HCV pseudotypes and antibodies against the known HCV host cell entry factors CD81, SR-BI and CLDN-1 were able to neutralize HCVpp infection. The frequency of HCVpp infection could be enhanced by human sera and DEAE-Dextran. Neutralizing antibodies derived from chronically infected HCV patients appeared to show a different pattern of neutralization in Neohepatocytes compared to Huh7 cells. While anti-HCV antibodies neutralized HCVpp infection in the Huh7 cell system, nearly all patient-derived IgGs increased the infection rate of HCVpp in Neohepatocytes. According to PHH effective HCVcc infection was not detectable. Taken together, the here established infection system may represent a valuable tool to analyze patient-specific virus-host interactions during HCV cell entry.

7. Literatur

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12766-12771.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S. & other authors (2002).** Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of virology* **76**, 6919-6928.
- Andreo, U., Maillard, P., Kalinina, O., Walic, M., Meurs, E., Martinot, M., Marcellin, P. & Budkowska, A. (2007).** Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cellular microbiology* **9**, 2445-2456.
- Banner, B. F., Allan, C., Savas, L., Baker, S., Barnard, G. & Bonkovsky, H. L. (1997).** Inflammatory markers in chronic hepatitis C. *Virchows Arch* **431**, 181-187.
- Bartel, D. P. (2004).** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.
- Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. & Jacobsen, H. (1993).** Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *Journal of virology* **67**, 3835-3844.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T. & Koch, J. O. (1995).** Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *Journal of virology* **69**, 7519-7528.
- Bartenschlager, R., Kaul, A. & Sparacio, S. (2003).** Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral research* **60**, 91-102.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I. & other authors (2003).** Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry* **278**, 41003-41012.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F. L. (2003).** Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of experimental medicine* **197**, 633-642.
- Bartosch, B. & Cosset, F. L. (2006).** Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* **348**, 1-12.

Berg, T., Naumann, U., Wiedenmann, B. & Hopf, U. (2001). Pilot study of interferon-alpha high-dose induction therapy in combination with ribavirin plus amantadine for nonresponder patients with chronic hepatitis C. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **39**, 145-151.

Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology* **80**, 6964-6972.

Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science (New York, NY)* **290**, 1972-1974.

Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology* **76**, 13001-13014.

Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2003). Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *Journal of virology* **77**, 3181-3190.

Borowski, P., Oehlmann, K., Heiland, M. & Laufs, R. (1997). Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of virology* **71**, 2838-2843.

Borowski, P., Kuehl, R., Mueller, O., Hwang, L. H., Schulze Zur Wiesch, J. & Schmitz, H. (1999a). Biochemical properties of a minimal functional domain with ATP-binding activity of the NTPase/helicase of hepatitis C virus. *European journal of biochemistry / FEBS* **266**, 715-723.

Borowski, P., Schulze zur Wiesch, J., Resch, K., Feucht, H., Laufs, R. & Schmitz, H. (1999b). Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus. *The Journal of biological chemistry* **274**, 30722-30728.

Buck, M. (2008). Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures. *PLoS ONE* **3**, e2660.

Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H. & Stuart, D. I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* **410**, 235-240.

Carrasco, L. (1995). Modification of membrane permeability by animal viruses. *Advances in virus research* **45**, 61-112.

Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F. & Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of virology* **76**, 3720-3730.

- Chan, L., Das, S. K., Reddy, T. J. & other authors (2004).** Discovery of thiophene-2-carboxylic acids as potent inhibitors of HCV NS5B polymerase and HCV subgenomic RNA replication. Part 1: Sulfonamides. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **14**, 793-796.
- Chang, J., Guo, J. T., Jiang, D., Guo, H., Taylor, J. M. & Block, T. M. (2008).** Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *Journal of virology* **82**, 8215-8223.
- Cheng, Y., Dharancy, S., Malapel, M. & Desreumaux, P. (2005).** Hepatitis C virus infection down-regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and carnitine palmitoyl acyl-CoA transferase 1A. *World J Gastroenterol* **11**, 7591-7596.
- 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 (New York, NY)* **244**, 359-362.
- Cocquerel, L., Meunier, J. C., Op de Beeck, A., Bonte, D., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (2001).** Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves the stability of membrane insertion of E2. *The Journal of general virology* **82**, 1629-1635.
- Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F. & Dubuisson, J. (2002).** Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *The EMBO journal* **21**, 2893-2902.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 2110-2114.
- Connelly, M. A. & Williams, D. L. (2004).** Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Current opinion in lipidology* **15**, 287-295.
- Cormier, E. G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R. J., Gardner, J. P. & Dragic, T. (2004).** CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7270-7274.
- Crosby, H. A. & Strain, A. J. (2001).** Adult liver stem cells: bone marrow, blood, or liver derived? *Gut* **48**, 153-154.
- Date, T., Kato, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Yasui, K., Mizokami, M. & Wakita, T. (2004).** Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *The Journal of biological chemistry* **279**, 22371-22376.

Del Porto, P., Puntoriero, G., Scotta, C., Nicosia, A. & Piccolella, E. (2000). High prevalence of hypervariable region 1-specific and -cross-reactive CD4(+) T cells in HCV-infected individuals responsive to IFN-alpha treatment. *Virology* **269**, 313-324.

Dresske, B., El Mokhtari, N. E., Ungefroren, H. & other authors (2006). Multipotent cells of monocytic origin improve damaged heart function. *Am J Transplant* **6**, 947-958.

Dreux, M., Dao Thi, V. L., Fresquet, J. & other authors (2009). Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS pathogens* **5**, e1000310.

Dubuisson, J. & Rice, C. M. (1996). Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *Journal of virology* **70**, 778-786.

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. *Journal of virology* **76**, 5974-5984.

Ehnert, S., Nussler, A. K., Lehmann, A. & Dooley, S. (2008). Blood monocyte-derived neohepatocytes as in vitro test system for drug metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **36**, 1922-1929.

Engler, S., Flechtenmacher, C., Wiedemann, K. H., Gugler, R., Stremmel, W. & Kallinowski, B. (2004). Interferon alfa2a induction therapy in combination with ribavirin and amantadine for the treatment of naive patients with chronic HCV infection. *Journal of viral hepatitis* **11**, 60-68.

Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M. & other authors (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801-805.

Farci, P., Alter, H. J., Wong, D. C., Miller, R. H., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M. & Purcell, R. H. (1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 7792-7796.

Farquhar, M. J. & McKeating, J. A. (2008). Primary hepatocytes as targets for hepatitis C virus replication. *Journal of viral hepatitis* **15**, 849-854.

Feld, J. J. & Hoofnagle, J. H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**, 967-972.

- Fiala, M. & Saltzman, B. (1969).** Enhancement of the infectivity of rhinovirus ribonucleic acid by diethylaminoethyl dextran. *Applied microbiology* **17**, 190-191.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Flint, M., Thomas, J. M., Maidens, C. M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. S. & McKeating, J. A. (1999).** Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of virology* **73**, 6782-6790.
- Flint, M., von Hahn, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C. T., Balfe, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2006).** Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *Journal of virology* **80**, 11331-11342.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J. & Maurel, P. (1998).** In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *The Journal of general virology* **79** (Pt 10), 2367-2374.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4498-4503.
- Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W., Zarski, J. P. & Drouet, E. (2002).** Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *Journal of medical virology* **68**, 206-215.
- Ghosh, A. K., Majumder, M., Steele, R., Meyer, K., Ray, R. & Ray, R. B. (2000).** Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death. *Virus research* **67**, 173-178.
- Goffard, A. & Dubuisson, J. (2003).** Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* **85**, 295-301.
- Gordon, S. & Taylor, P. R. (2005).** Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953-964.
- Gottwein, E. & Cullen, B. R. (2008).** Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell host & microbe* **3**, 375-387.
- Gottwein, J. M. & Bukh, J. (2007).** Hepatitis C virus host cell interactions uncovered. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13215-13216.

- Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. & Rowlands, D. J. (2003).** The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS letters* **535**, 34-38.
- Grove, J., Huby, T., Stamataki, Z. & other authors (2007).** Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *Journal of virology* **81**, 3162-3169.
- Haberstroh, A., Schnober, E. K., Zeisel, M. B. & other authors (2008).** Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* **135**, 1719-1728 e1711.
- Halstead, S. B. (1979).** In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *The Journal of infectious diseases* **140**, 527-533.
- Harada, T., Tautz, N. & Thiel, H. J. (2000).** E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *Journal of virology* **74**, 9498-9506.
- Hawkes, R. A. & Lafferty, K. J. (1967).** The enhancement of virus infectivity by antibody. *Virology* **33**, 250-261.
- He, Y. & Katze, M. G. (2002).** To interfere and to anti-interfere: the interplay between hepatitis C virus and interferon. *Viral immunology* **15**, 95-119.
- Helle, F. & Dubuisson, J. (2008).** Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* **65**, 100-112.
- Hinrichsen, H., Benhamou, Y., Wedemeyer, H. & other authors (2004).** Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology* **127**, 1347-1355.
- Hoofnagle, J. H., Mullen, K. D., Jones, D. B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J. G., Park, Y. & Jones, E. A. (1986).** Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *The New England journal of medicine* **315**, 1575-1578.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003).** Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7271-7276.
- Hu, K. Q., Vierling, J. M. & Redeker, A. G. (2001).** Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection. *Journal of viral hepatitis* **8**, 1-18.

- Huang, Y., Feld, J. J., Sapp, R. K., Nanda, S., Lin, J. H., Blatt, L. M., Fried, M. W., Murthy, K. & Liang, T. J. (2007).** Defective hepatic response to interferon and activation of suppressor of cytokine signaling 3 in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **132**, 733-744.
- Ide, Y., Zhang, L., Chen, M., Inchauspe, G., Bahl, C., Sasaguri, Y. & Padmanabhan, R. (1996).** Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* **182**, 203-211.
- Ikeda, M., Yi, M., Li, K. & Lemon, S. M. (2002).** Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *Journal of virology* **76**, 2997-3006.
- Ishido, S. & Hotta, H. (1998).** Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *FEBS letters* **438**, 258-262.
- Ivashkina, N., Wolk, B., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2002).** The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *Journal of virology* **76**, 13088-13093.
- Jacob, M. C., Favre, M. & Bensa, J. C. (1991).** Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry* **12**, 550-558.
- Jones, R. A., Johnson, V. L., Buck, N. R., Dobrota, M., Hinton, R. H., Chow, S. C. & Kass, G. E. (1998).** Fas-mediated apoptosis in mouse hepatocytes involves the processing and activation of caspases. *Hepatology (Baltimore, Md)* **27**, 1632-1642.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. (2005).** Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science (New York, NY)* **309**, 1577-1581.
- Jopling, C. L. (2008).** Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochemical Society transactions* **36**, 1220-1223.
- Jung, M. C., Diepolder, H. M. & Pape, G. R. (1994).** T cell recognition of hepatitis B and C viral antigens. *European journal of clinical investigation* **24**, 641-650.
- Kamal, S. M., Fouly, A. E., Kamel, R. R. & other authors (2006).** Peginterferon alfa-2b therapy in acute hepatitis C: impact of onset of therapy on sustained virologic response. *Gastroenterology* **130**, 632-638.

Kanda, T., Basu, A., Steele, R., Wakita, T., Ryerse, J. S., Ray, R. & Ray, R. B. (2006). Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *Journal of virology* **80**, 4633-4639.

Kaplan, D. E. & Reddy, K. R. (2003). Rising incidence of hepatocellular carcinoma: the role of hepatitis B and C; the impact on transplantation and outcomes. *Clinics in liver disease* **7**, 683-714.

Kato, N., Ootsuyama, Y., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Sekiya, H., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (1992). Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochemical and biophysical research communications* **189**, 119-127.

Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T. & Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *Journal of medical virology* **64**, 334-339.

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. & Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**, 1808-1817.

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Mizokami, M. & Wakita, T. (2005). Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *Journal of virology* **79**, 592-596.

Kau, A., Vermehren, J. & Sarrazin, C. (2008). Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *Journal of hepatology* **49**, 634-651.

Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Lin, C. & other authors (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* **87**, 343-355.

Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C. & Caron, P. R. (1998). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* **6**, 89-100.

Knodell, R. G., Conrad, M. E., Ginsberg, A. L. & Bell, C. J. (1976). Efficacy of prophylactic gamma-globulin in preventing non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet* **1**, 557-561.

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 (New York, NY)* **277**, 570-574.

- Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Rigotti, A., Iqbal, S. N., Edelman, E. R. & Krieger, M. (1997).** Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* **387**, 414-417.
- Kroemer, G. & Jaattela, M. (2005).** Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature reviews* **5**, 886-897.
- Lagging, L. M., Meyer, K., Owens, R. J. & Ray, R. (1998).** Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *Journal of virology* **72**, 3539-3546.
- Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M. & other authors (2003).** An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* **426**, 186-189.
- Lambot, M., Fretier, S., Op De Beeck, A., Quatannens, B., Lestavel, S., Clavey, V. & Dubuisson, J. (2002).** Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment. *The Journal of biological chemistry* **277**, 20625-20630.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G. & other authors (2005).** Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *Journal of virology* **79**, 6023-6034.
- Lin, C., Lin, K., Luong, Y. P. & other authors (2004).** In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **279**, 17508-17514.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J. & other authors (2005).** Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science (New York, NY)* **309**, 623-626.
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2005).** Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* **436**, 933-938.
- Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A. & other authors (2006).** Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3805-3809.
- Logvinoff, C., Major, M. E., Oldach, D. & other authors (2004).** Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10149-10154.
- 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 (New York, NY)* **285**, 110-113.

- Lozach, P. Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A. & other authors (2003).** DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *The Journal of biological chemistry* **278**, 20358-20366.
- Lu, L., Pilot-Matias, T. J., Stewart, K. D. & other authors (2004).** Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 2260-2266.
- Luft, F. C. (2004).** Liver stage antigen and malaria. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **82**, 555-557.
- Maillard, P., Huby, T., Andreo, U., Moreau, M., Chapman, J. & Budkowska, A. (2006).** The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *Faseb J* **20**, 735-737.
- Major, F. & Griffey, R. (2001).** Computational methods for RNA structure determination. *Current opinion in structural biology* **11**, 282-286.
- Major, M. E., Mihalik, K., Fernandez, J., Seidman, J., Kleiner, D., Kolykhalov, A. A., Rice, C. M. & Feinstone, S. M. (1999).** Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *Journal of virology* **73**, 3317-3325.
- Majumder, M., Ghosh, A. K., Steele, R., Zhou, X. Y., Phillips, N. J., Ray, R. & Ray, R. B. (2002).** Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice. *Virology* **294**, 94-105.
- Malhi, H., Irani, A. N., Gagandeep, S. & Gupta, S. (2002).** Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. *Journal of cell science* **115**, 2679-2688.
- Mangia, A., Santoro, R., Minerva, N. & other authors (2005).** Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *The New England journal of medicine* **352**, 2609-2617.
- Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J. & Gomez, J. (1992).** Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of virology* **66**, 3225-3229.
- Matsumoto, M., Hwang, S. B., Jeng, K. S., Zhu, N. & Lai, M. M. (1996).** Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* **218**, 43-51.

- Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K. & other authors (2001).** Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* **286**, 263-275.
- Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. (2006).** Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *Journal of virology* **80**, 11571-11578.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F. L. & Dragic, T. (2008).** The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *Journal of virology* **82**, 3555-3560.
- Meisel, H., Reip, A., Faltus, B., Lu, M., Porst, H., Wiese, M., Roggendorf, M. & Kruger, D. H. (1995).** Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet* **345**, 1209-1211.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H. & Leroux-Roels, G. (2008).** Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology (Baltimore, Md)* **48**, 1761-1768.
- Meunier, J. C., Engle, R. E., Faulk, K. & other authors (2005).** Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4560-4565.
- Meyer, K., Ait-Goughoulte, M., Keck, Z. Y., Foung, S. & Ray, R. (2008).** Antibody-dependent enhancement of hepatitis C virus infection. *Journal of virology* **82**, 2140-2149.
- 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. *The Journal of general virology* **78 (Pt 9)**, 2299-2306.
- Montalbano, M. & Neff, G. W. (2005).** An update in liver transplantation in patients with hepatitis B and hepatitis C. *Minerva gastroenterologica e dietologica* **51**, 109-126.
- 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 research* **60**, 103-109.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. (2007).** Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**, 453-463.

Mosley, J. W., Operskalski, E. A., Tobler, L. H., Andrews, W. W., Phelps, B., Dockter, J., Giachetti, C. & Busch, M. P. (2005). Viral and host factors in early hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* **42**, 86-92.

Mueller, T., Mas-Marques, A., Sarrazin, C. & other authors (2004). Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology* **41**, 652-658.

Murakami, Y., Aly, H. H., Tajima, A., Inoue, I. & Shimotohno, K. (2009). Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *Journal of hepatology* **50**, 453-460.

Nagao, Y., Kawaguchi, T., Tanaka, K., Kumashiro, R. & Sata, M. (2005). Extrahepatic manifestations and insulin resistance in an HCV hyperendemic area. *International journal of molecular medicine* **16**, 291-296.

Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* **42**, 3858-3863.

Nakamoto, Y., Kaneko, S., Ohno, H., Honda, M., Unoura, M., Murakami, S. & Kobayashi, K. (1996). B-cell epitopes in hypervariable region 1 of hepatitis C virus obtained from patients with chronic persistent hepatitis. *Journal of medical virology* **50**, 35-41.

Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J. & Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science (New York, NY)* **282**, 103-107.

Nolandt, O., Kern, V., Muller, H., Pfaff, E., Theilmann, L., Welker, R. & Krausslich, H. G. (1997). Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains. *The Journal of general virology* **78 (Pt 6)**, 1331-1340.

Okuda, M., Hino, K., Korenaga, M., Yamaguchi, Y., Katoh, Y. & Okita, K. (1999). Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. *Hepatology (Baltimore, Md)* **29**, 217-222.

Pavlovic, D., Neville, D. C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B. & Zitzmann, N. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6104-6108.

Pawlotsky, J. M. (2003). Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral research* **59**, 1-11.

Pawlotsky, J. M., Chevaliez, S. & McHutchison, J. G. (2007). The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* **132**, 1979-1998.

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D. & Pawlotsky, J. M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology (Baltimore, Md)* **39**, 5-19.

Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Blaser, E. & other authors (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 6025-6030.

Piazza, M., Saggiocca, L., Tosone, G. & other authors (1997). Sexual transmission of the hepatitis C virus and efficacy of prophylaxis with intramuscular immune serum globulin. A randomized controlled trial. *Archives of internal medicine* **157**, 1537-1544.

Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G. & other authors (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7408-7413.

Pietschmann, T. (2009a). Virology: Final entry key for hepatitis C. *Nature* **457**, 797-798.

Pietschmann, T. (2009b). Regulation of hepatitis C virus replication by microRNAs. *Journal of hepatology* **50**, 441-444.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S. & other authors (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science (New York, NY)* **282**, 938-941.

Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. & Rice, C. M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882-886.

Polywka, S., Feucht, H., Zollner, B. & Laufs, R. (1997). Hepatitis C virus infection in pregnancy and the risk of mother-to-child transmission. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**, 121-124.

Porterfield, J. S. (1986). Antibody-dependent enhancement of viral infectivity. *Advances in virus research* **31**, 335-355.

Pumeechockchai, W., Bevitt, D., Agarwal, K., Petropoulou, T., Langer, B. C., Belohradsky, B., Bassendine, M. F. & Toms, G. L. (2002). Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody. *Journal of medical virology* **68**, 335-342.

- Ralston, R., Thudium, K., Berger, K. & other authors (1993).** Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *Journal of virology* **67**, 6753-6761.
- Randall, G., Panis, M., Cooper, J. D. & other authors (2007).** Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12884-12889.
- Ray, R. B., Meyer, K. & Ray, R. (1996).** Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* **226**, 176-182.
- Regeard, M., Trotard, M., Lepere, C., Gripon, P. & Le Seyec, J. (2008).** Entry of pseudotyped hepatitis C virus into primary human hepatocytes depends on the scavenger class B type I receptor. *Journal of viral hepatitis* **15**, 865-870.
- Rigotti, A., Trigatti, B., Babitt, J., Penman, M., Xu, S. & Krieger, M. (1997).** Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Current opinion in lipidology* **8**, 181-188.
- Robertson, B., Myers, G., Howard, C. & other authors (1998).** Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Archives of virology* **143**, 2493-2503.
- Robinson, W. E., Jr., Montefiori, D. C. & Mitchell, W. M. (1988).** Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Lancet* **1**, 790-794.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D. & other authors (2008).** The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* **3**, e1866.
- Ruhnke, M., Nussler, A. K., Ungefroren, H., Hengstler, J. G., Kremer, B., Hoeckh, W., Gottwald, T., Heeckt, P. & Fandrich, F. (2005a).** Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation* **79**, 1097-1103.
- Ruhnke, M., Ungefroren, H., Nussler, A. & other authors (2005b).** Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* **128**, 1774-1786.
- Santolini, E., Migliaccio, G. & La Monica, N. (1994).** Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of virology* **68**, 3631-3641.

Sarasin-Filipowicz, M., Oakeley, E. J., Duong, F. H., Christen, V., Terracciano, L., Filipowicz, W. & Heim, M. H. (2008). Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7034-7039.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R. & other authors (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO journal* **21**, 5017-5025.

Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001). Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* **276**, 44052-44063.

Shi, S. T. & Lai, M. M. (2001). Hepatitis C viral RNA: challenges and promises. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1276-1295.

Shih, C. M., Lo, S. J., Miyamura, T., Chen, S. Y. & Lee, Y. H. (1993). Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *Journal of virology* **67**, 5823-5832.

Simmonds, P., Smith, D. B., McOmish, F., Yap, P. L., Kolberg, J., Urdea, M. S. & Holmes, E. C. (1994). Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *The Journal of general virology* **75** (Pt 5), 1053-1061.

Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A. & Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science (New York, NY)* **291**, 1959-1962.

Srinivas, R. V., Ray, R. B., Meyer, K. & Ray, R. (1996). Hepatitis C virus core protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. *Virus research* **45**, 87-92.

Steinmann, D., Barth, H., Gissler, B. & other authors (2004). Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *Journal of virology* **78**, 9030-9040.

Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A. & other authors (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science (New York, NY)* **317**, 376-381.

Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. & Gale, M., Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *Journal of virology* **79**, 2689-2699.

- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N. & Lai, M. M. (1999).** Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science (New York, NY)* **285**, 107-110.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. (2004).** The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *The Journal of biological chemistry* **279**, 48576-48587.
- Tellinghuisen, T. L., Evans, M. J., von Hahn, T., You, S. & Rice, C. M. (2007).** Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *Journal of virology* **81**, 8853-8867.
- Thomssen, R., Bonk, S. & Thiele, A. (1993).** Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Medical microbiology and immunology* **182**, 329-334.
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2006).** Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of virology* **80**, 1734-1741.
- Tu, H., Gao, L., Shi, S. T. & other authors (1999).** Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* **263**, 30-41.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J. & Vu-Dac, N. (2005).** High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *The Journal of biological chemistry* **280**, 7793-7799.
- Volkman, A. & Gowans, J. L. (1965).** The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *British journal of experimental pathology* **46**, 62-70.
- von Hahn, T., Lindenbach, B. D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2006).** Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* **43**, 932-942.
- Wagers, A. J. & Weissman, I. L. (2004).** Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**, 639-648.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T. & other authors (2005).** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine* **11**, 791-796.
- Weller, T. H. & Coons, A. H. (1954).** Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **86**, 789-794.

Wellnitz, S., Klumpp, B., Barth, H., Ito, S., Depla, E., Dubuisson, J., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2002). Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *Journal of virology* **76**, 1181-1193.

Wiegand, J., Buggisch, P., Boecher, W. & other authors (2006). Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: the HEP-NET acute-HCV-II study. *Hepatology (Baltimore, Md)* **43**, 250-256.

Williams, B. R. & Sen, G. C. (2003). Immunology. A viral on/off switch for interferon. *Science (New York, NY)* **300**, 1100-1101.

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. *Journal of virology* **74**, 10055-10062.

Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S. C., Montelaro, R. C., Coyne, C. B. & Wang, T. (2008). Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *The Journal of biological chemistry* **283**, 8643-8653.

Yu, M. Y., Bartosch, B., Zhang, P. & other authors (2004). Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7705-7710.

Zeisel, M. B., Koutsoudakis, G., Schnober, E. K. & other authors (2007). Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology (Baltimore, Md)* **46**, 1722-1731.

Zeisel, M. B., Cosset, F. L. & Baumert, T. F. (2008). Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* **48**, 299-307.

Zeuzem, S., Schmidt, J. M., Lee, J. H., von Wagner, M., Teuber, G. & Roth, W. K. (1998). Hepatitis C virus dynamics in vivo: effect of ribavirin and interferon alfa on viral turnover. *Hepatology (Baltimore, Md)* **28**, 245-252.

Zeuzem, S., Diago, M., Gane, E. & other authors (2004a). Peginterferon alfa-2a (40 kilodaltons) and ribavirin in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* **127**, 1724-1732.

Zeuzem, S., Hultcrantz, R., Bourliere, M. & other authors (2004b). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *Journal of hepatology* **40**, 993-999.

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. *Journal of virology* **78**, 1448-1455.

Zhao, Y., Glesne, D. & Huberman, E. (2003). A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2426-2431.

Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M. & Deng, H. (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *Journal of virology* **81**, 12465-12471.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G. & other authors (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9294-9299.

Danksagung

Danke an meinen Doktorvater Prof. Andreas Meyerhans, der mich durch seine Beharrlichkeit zu Bestleistungen angespornt hat und mir dabei geholfen hat, eine selbstständige Wissenschaftlerin zu werden.

Ebenso danke ich Prof. Eckart Meese für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine Mitwirkung an der terminlichen Realisierung dieser Arbeit.

Danke auch an die Blutspender und Mitarbeiter der Blutspende-Zentrale der Winterbergkliniken Saarbrücken. Ohne ihre Mitwirkung wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen. Danke auch an Dr. Andreas Nüssler und Antje Lehmann für das NeoHep-Medium. Ebenso danke ich Dr. Vincent Zimmer für die miRNA-Analysen und die Bereitstellung der HCV-positiven Patienten-Proben. Prof. Thomas Baumert und Dr. Mirjam Zeisel danke ich für viele anregende Diskussionen, die HCV-spezifischen Antikörper und die tolle Zusammenarbeit bei den HCVcc-Analysen.

Besonderer Dank gebührt allerdings meinen Arbeitskollegen, die mir nicht nur ihr Blut gespendet haben, sondern mich Tag für Tag unterstützt und motiviert haben. Ich hätte mir keine bessere Arbeitsatmosphäre vorstellen können: danke Anke, Tanja B., Tanja T., Martina, Angela, Steffi, Tim, Michael, Javier, Rui, Leo und Jochen. Und natürlich danke liebe Birgit...nicht nur für deine großartige technische Unterstützung, sondern auch für deine Freundschaft und mein süßes Patenkind.

Außerdem danke ich Steffi, Jörg, Uwe, Marco, Claudi, Sandra und meinen anderen Freunden für ihre fortwährende Unterstützung und Freundschaft sowie für ihre Bereitschaft mich ab jetzt "Frau Doktor" zu nennen.

Danke auch an Familie Heinisch und alle "abgeleiteten Familienzweige" für ihren Beistand und ihre engagierte Hilfe bei der Arbeitsplatzsuche.

Worte sind zu schwach um auszudrücken, wie dankbar ich meinen Eltern und meinem Freund Christian bin. Ohne ihre Kraft, Unterstützung und Liebe wäre ich nie soweit gekommen. Ich danke euch aus tiefstem Herzen.

Dedicată din tot sufletul pentru iubiții mei părinți.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christina Ramona Hohn
Geburtstag: 26.10.1980
Geburtsort: Arad (Rumänien)

Schulische Ausbildung:

1987-1991: Arnulf-Grundschule Saarbrücken
1991-2000: Marienschule Saarbrücken
Abschluss: Abitur (Note: 1,2)

Studium:

Oktober 2000-Juli 2005: Studium der Human- und
Molekularbiologie
(Universität des Saarlandes)
Oktober 2002: Diplom-Vorprüfung (Note: 1,3)
Juli 2005: Abschluss: Diplom (mit Auszeichnung)

Wissenschaftlicher Werdegang:

ab August 2005: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Institut für Mikrobiologie und Hygiene,
Abteilung Virologie, Uniklinik
Homburg/Saar

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, April 2009

(Christina R. Hohn)