

Hepatitis C Virus-Infektionsstudien an primären Zellen monozytärer Herkunft

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-Biologe
Michael Ehrhardt

Saarbrücken 2011

Tag des Kolloquiums: 26. März 2012

Dekan: Prof. Dr. W. Maier

Prüfungsausschuss:

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Meyerhans

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Meese

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. U. Müller

Akademischer Mitarbeiter: Dr. F. Breinig

Für meine Familie

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.“

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929)

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Manuskripte

Ehrhardt M, Leidinger P, Keller A, Baumert T, Díez J, Meese E, Meyerhans A

Profound differences of microRNA expression patterns in hepatocytes and hepatoma cell lines commonly used in hepatitis C virus studies.

Hepatology, 2011 Apr 18

Hohn C, Ehrhardt M, Zeisel M, Baumert T, Meyerhans A

Neohepatocytes, a patient specific cell culture system for the study of hepatitis C virus infection

(Manuskript in Vorbereitung)

Ehrhardt M, Leidinger P, Zeisel M, Wagner M, Baumert T, Meese E, Meyerhans A

Neohepatocytes, a macrophage subpopulation susceptible for hepatitis C virus entry.

(Manuskript in Vorbereitung)

Ehrhardt M, Leidinger P, Meese E, Meyerhans A

miRNA pattern allows grouping of monocytes, macrophages and dendritic cells.

(Manuskript in Vorbereitung)

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt

- 2009 PhD workshop der klinischen Forschungsgruppe 129, Lamprecht
- 2010 UGR-meeting on virus research, Homburg
- 2010 BSRT PhD Symposium on Stem Cells: Hopes, Fears and Reality, Berlin
- 2011 Jährliches Treffen der „Gesellschaft für Virologie“, Freiburg

Inhaltsverzeichnis

A	Abkürzungsverzeichnis.....	v
B	Abbildungsverzeichnis.....	x
C	Tabellenverzeichnis.....	xiv
1	Einleitung.....	1
1.1	Hepatitis C.....	1
1.2	Das Hepatitis C-Virus.....	3
1.2.1	Genomorganisation.....	4
1.2.2	Strukturproteine.....	4
1.2.3	Nicht-Strukturproteine.....	7
1.3	Der HCV-Zelleintritt.....	9
1.4	HCV-Replikation.....	12
1.4.1	Antivirale Therapie.....	14
1.5	HCV Infektionssysteme.....	15
1.5.1	HCV-Modellsysteme.....	15
1.5.2	Zellsysteme für HCV-Infektionen.....	18
1.6	Monozyten und Zellen monozytärer Herkunft.....	19
1.6.1	Monozyten.....	19
1.6.2	Makrophagen.....	20
1.6.3	Dendritische Zellen.....	21
1.6.4	Neohepatozyten.....	21
1.7	microRNA.....	23
1.8	Ziele der Arbeit.....	25
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Chemikalien.....	27
2.2	Antikörper.....	29
2.3	Plasmide.....	30
2.4	Bakterien und Bakterienkultur.....	32

2.4.1	Erzeugung kompetenter Bakterien.....	32
2.4.2	Transformation von Bakterien.....	34
2.4.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	34
2.4.4	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	35
2.4.5	Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktions- endonukleasen.....	36
2.4.6	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.5	Zellkultur.....	38
2.5.1	Zelllinien.....	39
2.5.2	Puffer und Lösungen für die Zellkulturarbeit.....	40
2.5.3	Zellkulturmedien.....	40
2.5.4	Subkultivierung adhärenter Zellen.....	44
2.5.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	44
2.5.6	Mycoplasmentest.....	45
2.6	Isolierung von peripheren Blutzellen.....	46
2.6.1	Isolierung mononukleärer Zellen der peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	46
2.6.2	Adhärenz von Monozyten an Plastikoberflächen....	48
2.6.3	Isolation von Monozyten aus PBMC mit magnetischen Kügelchen.....	49
2.6.4	Charakterisierung und Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY.....	50
2.7	<i>In vitro</i> Differenzierung in Neohepatozyten.....	52
2.8	<i>In vitro</i> Differenzierung humaner Blut-Monozyten in Makrophagen.....	53
2.8.1	Differenzierung in AB-Makrophagen.....	53
2.8.2	Differenzierung in M-CSF-Makrophagen.....	54
2.8.3	Differenzierung in GM-CSF-Makrophagen.....	54
2.9	<i>In vitro</i> Differenzierung humaner Blut-Monozyten in Dendritischen Zellen.....	55
2.10	Isolation von primären humanen Hepatozyten aus Lebergewebe.....	56

2.11	miRNA-Analyse.....	56
2.11.1	Isolation der Total-RNA inklusive miRNA.....	56
2.11.2	Qualitätsüberprüfung der Total-RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	58
2.11.3	miRNA-Microarrayanalyse.....	59
2.12	Immunzytochemische und immunhistochemische Färbungen.....	60
2.13	Herstellung viraler Pseudotypen.....	62
2.13.1	Herstellung von HCV-Pseudotypen (HIV-HCVpp)	63
2.14	Infektionsstudien unter Verwendung viraler Pseudotypen.	65
2.14.1	Titration viraler Pseudotypen.....	65
2.14.2	Infektionsstudien mit viralen Pseudotypen.....	66
2.15	Durchflusszytometrie.....	67
2.15.1	Allgemeines zur Durchflusszytometrie.....	67
2.15.2	Färbung von Oberflächen-Antigenen zum durchflusszytometrischen Nachweis.....	71
2.15.3	Färbung von intrazellulären Antigenen zum durchflusszytometrischen Nachweis.....	73
3	Ergebnisse.....	75
3.1	Unterschiede zwischen Huh7-Zellen und primären Hepatozyten.....	75
3.1.1	Immunzytochemische und immunhistochemische Untersuchungen an Huh7-Zellen und primären Hepatozyten.....	75
3.1.2	miRNA-Analysen an Huh7-Zellen und primären Hepatozyten.....	77
3.2	Neohepatozyten sind effizient mit HIV-HCVpp infizierbar	78
3.2.1	Neohepatozyten sind die einzigen mit HIV- HCVpp infizierbaren Zellen monozytärer Herkunft.....	78
3.2.2	Neohepatozyten zeigen donorspezifische Unterschiede in ihrer Infizierbarkeit mit HIV- HCVpp.....	84

3.2.3	Patientenseren können sowohl steigernden als auch hemmenden Einfluss auf die Infektionsfrequenzen von HIV-HCVpp infizierten Neohepatozyten haben.....	85
3.2.4	Neohepatozyten lassen sich ohne Einschränkungen aus Nabelschnurblut differenzieren.....	91
3.3	Charakterisierung von Neohepatozyten und Vergleich mit anderen Zellen monozytärer Herkunft.....	94
3.3.1	Immunzytochemische Charakterisierung von Neohepatozyten.....	94
3.3.2	miRNA-Analysen an Neohepatozyten, Monozyten und Makrophagen von mehreren Donoren sowie primären Hepatozyten und hepatozytären Zelllinien.....	96
3.4	Charakterisierung von sich im Reifungsstimulus unterscheidenden Makrophagen und Dendritischen Zellen.....	100
4	Diskussion.....	107
4.1	Huh7-Zellen als Infektionssystem für HCV.....	107
4.2	Neohepatozyten sind ein valides und patientenspezifisches Infektionssystem für HCV.....	112
4.3	Neohepatozyten sind eine spezielle Makrophagen Subpopulation mit hepatischen Eigenschaften.....	120
4.4	Intradifferenzielle Unterschiede von Makrophagen und Dendritischen Zellen zeigen sich nicht auf miRNA-Ebene..	123
5	Zusammenfassung.....	127
6	Summary.....	129
7	Abstract	131
8	Literaturverzeichnis.....	133
	Danksagung.....	150
	Lebenslauf.....	151
	Eidesstattliche Versicherung.....	152

A. Abkürzungsverzeichnis

AB	Adultes Blut
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CASY	Cell counter and analyser system
CASY	„cell counter and analyser system“
CD81 (Bsp.)	Cluster of Differentiation 81
CK-18 (Bsp.)	Cytokeratin-18
cLD	„Cytosolic lipid droplets“ cytosolische Lipidtropfen
CLDN	Claudin-1
d1	„Day 1“, Tag 1
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DI	Domäne I
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Do 1	Donor 1
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EMCV	Encephalomyocarditisvirus
env	„envelope“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fc	„fragment crystallisable“
Fc γ -RI	Fc γ -Rezeptor I
FGF-4	„fibroblast growth factor-4“

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FL1	Fluoreszenz 1
g	„gravity“, Erdanziehungskraft
G1	„Gate 1“
GLB	„Gel-loading“, Gelladepuffer
GM-CSF	„Granulocyte macrophages-colony stimulating factor“
HBV	Hepatitis B Virus
hCMV	Humanes Zytomegalievirus
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	HCV „cell culture“
HDL	„high density lipoprotein“
Hep Par 1	„hepatocyte paraffin 1“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	„human immunodeficiency virus“ Humanes Immundefizienz Virus
HIV-HCVpp	HIV-HCV „pseudo-particles“
HLA-I	humanes Leukozytenantigen I
HS	Heparinsulfat
hsa-miRNA	Homo sapiens miRNA
iDC	„immature DC“, unreife DC
IgG	Immunglobulin G
IL-3 (Bsp.)	Interleukin-3
iP/ml	infektiöse Partikel/ml
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L-SIGN	„Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin“
LB	„Lysogeny broth“

LDL	“low density lipoprotein”
LDL-R	LDL-Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	“macrophages-colony stimulating factor”
M1	Marker 1
mDC	„mature DC“, reife DC
MHC-I	“major histocompatibility complex I” Haupthistokompatibilitätskomplex I
miRNA, miR	microRNA
Mo	Monozyten
MOI	„multiplicity of infection“
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
M ϕ	Makrophagen
NCR	„non coding region“
ND	neutral density
NEAA	„non essential amino acids“
Neo ^R	Neomycin-Resistenzgen
NF κ B	„nuclear factor κ B“
NS	Nabelschnurblut
NS2	„non-structure“
nt	Nukleotide
OCLN	Occludin
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
oxLDL	oxidiertes LDL
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
PEG	Polyethylen glykol
PFA	Paraformaldehyd
PHH	primäre humane Hepatozyten
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
pol	Polymerase
R1	Regionaler Marker 1
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RISC	“RNA-induced silencing complex 2”
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	“rotations per minute”, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium, das am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde
RT	Raumtemperatur
SCID	„severe combined immunodeficiency“
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
SP	Signalpeptidase
SPP	Signalpeptidpeptidase
SRBI	Scavenger Receptor Class B Type I
ss	„single stranded“, einzelsträngig
SV40	Simian virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose-Faktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„unit“
uPA	“urokinase-type-plasminogen-activator“, Gewebe-Typ Plasminogenaktivator
UV	Ultraviolettes Licht

v/v	Volumen/Volumen
VK	Viruskontrolle
VLDL	„very low density lipoprotein“
w/v	„weight“, Gewicht/Volumen
WHO	„World Health Organisation“, Weltgesundheitsorganisation
Δ env	Deletion im env-Gen

B. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Globale Prävalenz für Hepatitis C 2007.....	2
Abb. 2	HCV-Genomstruktur und Funktion viraler Proteine.....	5
Abb. 3	Molekulare Mechanismen beim HCV-Eintritt in einen Hepatozyten.....	10
Abb. 4	Modell des HCV-Lebenszyklus.....	13
Abb. 5	Modellsysteme zur Erforschung des HCV- Infektionszyklus.....	17
Abb. 6	Morphologie und Karyotyp der Hepatokarzinom- zelllinie Huh7.....	19
Abb. 7	Morphologie von Monozyten, PCMO und Neohepatozyten während des Differenzierungs- prozesses (A) im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten (B).....	23
Abb. 8	Graphische Darstellung der in der Arbeit verwendeten Plasmide.....	31
Abb. 9	Graphische Darstellung der Zell- und Flüssigkeits- schichten vor und nach der Dichtegradienten- Zentrifugation.....	48
Abb. 10	Populationen der kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes nach Isolierung mittels Dichtegradienten- Zentrifugation (A) und anschließender Adhärenz (B)....	51
Abb. 11	Prinzip des „microfluidic primer extension assays“ MPEA.....	58
Abb. 12	Schematischer Aufbau der immunzytochemischen und immunhistochemischen Färbungen.....	61
Abb. 13	Schematische Darstellung der HIV-HCVpp.....	62
Abb. 14	Schematischer Aufbau eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (“fluorescence activated cell sorter“ FACS)...	70
Abb. 15	Darstellung der Größe und Granularität von Huh7- Zellen, der Expression von CD81 innerhalb der Zell- Population und der statistischen Auswertung.....	71

Abb. 16	Analyse der EGFP-Expression in HIV-HCVpp-infizierten Huh7-Zellen mittels Punktwolkendiagramm.....	72
Abb. 17	Immunzytochemische bzw. immunhistochemische Färbung von Huh7-Zellen und Leberschnitten mit zwei verschieden CD68-Antikörpern und einem Antikörper gegen das hepatozytäre Antigen.....	76
Abb. 18	miRNA-Charakteristika von primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.....	78
Abb. 19	Infektionsfrequenz von HIV-HCVpp-infizierten Monozyten, Makrophagen, PCMO und Neohepatozyten von einem Donor.....	80
Abb. 20	Expressionsmuster hepatischer Marker und der HCV-Eintrittsfaktoren auf Neohepatozyten eines repräsentativen Donors und Huh7-Zellen.....	81
Abb. 21	Expressionsmuster der vier HCV Eintrittsfaktoren auf Monozyten, Makrophagen, Neohepatozyten, primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.....	83
Abb. 22	Infektionsfrequenz von HIV-HCVpp-infizierten Neohepatozyten aus drei Preparationen von je zwei Donoren.....	85
Abb. 23	Einfluss von Hepatitis C-Patientenseren auf die HIV-HCVpp- Infektion von Neohepatozyten und Huh7-Zellen.....	86
Abb. 24	Einfluss von humanem AB-serum auf die Infektionsfrequenzen HIV-HCVpp-infizierter Neohepatozyten.....	88
Abb. 25	Expressionsmuster der Fc γ -Rezeptoren I-III auf Monozyten, Makrophagen, Neohepatozyten, primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.....	90
Abb. 26	Expressionsmuster der hepatischen Marker Albumin, CD81, SRBI, CLDN1 und OCLN auf Neohepatozyten von fünf Donoren Nabelschnurblut mit (NS1-3) und ohne CD34+Stammzellen (NS4 und 5) und einem repräsentativen Donor adultem Blut (AB).....	92

Abb. 27 Immunzytochemische Färbung von Monozyten, Makrophagen und Neohepatozyten eines Donors und PHH mit zwei verschiedenen Klonen von CD68-Antikörpern und einem Antikörper gegen das hepatozytäre Antigen.....	95
Abb. 28 miRNA-Charakteristika von Monozyten (Mo), Makrophagen (M ϕ), Neohepatozyten und der Makrophagenzelllinie U937 sowie primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.....	97
Abb. 29 Farbcodierte Korrelationsmatrix der miRNA-Expressionsmuster von Monozyten und Makrophagen zu verschiedenen Differenzierungszeiten, PCMO, Neohepatozyten, induzierten U937-Zellen, primären Hepatozyten und drei hepatischen Zelllinien.....	98
Abb. 30 Stammbaum der verwendeten Monozyten und Makrophagen zu verschiedenen Differenzierungszeiten, PCMO, Neohepatozyten, induzierten U937-Zellen, primären Hepatozyten und drei hepatischen Zelllinien.....	99
Abb. 31 Mikroskopische Aufnahmen von Zellen monozytärer Herkunft eines repräsentativen Donors.....	101
Abb. 32 Quantifizierung der Ausreifung humaner iDC zu mDC durch LPS und TNF- α anhand der Expression kostimulatorischer Oberflächenproteine und HLA-Moleküle.....	102
Abb. 33 miRNA-Charakteristika von Monozyten, mit M-CSF und GM-CSF stimulierten Makrophagen (M ϕ), unreifen Dendritischen Zellen (iDC) und mit LPS und TNF- α gereiften mDC.....	103
Abb. 34 Farbcodierte Korrelationsmatrix der miRNA-Expressionsmuster von Monozyten, M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen (M ϕ), iDC und mit LPS und TNF- α gereiften mDC.....	104
Abb. 35 Stammbaum der zur miRNA-Analyse verwendeten Monozyten, mit M-CSF und GM-CSF stimulierten Makrophagen (M ϕ), unreifen Dendritischen Zellen (iDC) und mit LPS und TNF- α gereiften mDC.....	105

C. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Zur FACS-Analyse von primären Zellen und Zelllinien verwendete Antikörper.....	29
Tab. 2	Herkunft und Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	31
Tab. 3	Genotyp und Herkunft des verwendeten <i>Escherichia coli</i> -Stamms XL1-Blue.....	32
Tab. 4	Mengen der zur HIV-HCVpp-Herstellung verwendeten Plasmide	63
Tab. 5	Prozentuale Expressionsrate der vier HCV-Eintrittsfaktoren auf Monozyten, Makrophagen, primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.....	83
Tab. 6	Relative Infektionsfrequenzen [%] von HIV-HCVpp-infizierten Neohepatozyten unter Einfluss von Hepatitis C-Patientenseren.....	86
Tab. 7	Infektionsfrequenzen [%] von HIV-HCVpp-infizierten Neohepatozyten unter dem Einfluss von humanem AB-Serum.....	88
Tab. 8	Prozentuale Expressionsfrequenz der Fc γ -Rezeptoren I-III auf Monozyten, Makrophagen, Neohepatozyten, primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.....	89
Tab. 9	Expression der charakteristischen Reifungsmarker auf humanen DC nach Inkubation mit LPS und TNF- α	102

1. Einleitung

1.1 Hepatitis C

Die Hepatitis C ist eine durch das Hepatitis C-Virus (HCV) verursachte Entzündung der Leber. Bis zur Entdeckung von HCV im Jahr 1989 wurde sie als Non-A-non-B-Hepatitis (NANBH) klassifiziert (Choo et al., 1989). Nach Berechnungen der Weltgesundheitsorganisation WHO sind zwischen 1 und 3 % der Weltbevölkerung an Hepatitis C erkrankt, was etwa 170 Mio. Menschen entspricht. Die Infektion zeigt weltweit eine starke Variabilität auf; in Deutschland liegt die Prävalenz bei 0,4-0,7%, in vielen Entwicklungsländern liegt die Prävalenz deutlich höher und erreicht in Ägypten mit 20% ihren Höchstwert (Abb. 1). Damit ist Hepatitis C ein globales Gesundheitsproblem.

Eine Besonderheit der HCV-Infektion liegt in der Tatsache, dass zwischen 70 und 80% der infizierten Personen eine chronische Infektion entwickeln. Da weder die akute noch die frühe chronische Infektion in der Regel charakteristische Symptome aufweisen bleibt die Krankheit oft undiagnostiziert. Nur bei etwa 20% der Infizierten kommt es in diesem Stadium zu unspezifischen grippeähnlichen Symptomen oder zur Gelbsucht. Die Infektion mit Hepatitis C-Viren erfolgt meist parenteral über Blutübertragung durch Nadelstichverletzungen und intravenösen Drogenmissbrauch und früher auch durch Blutprodukte. Seit 1990 werden alle Blutprodukte auf HCV-RNA hin untersucht, wodurch das Risiko für eine Ansteckung auf diesem Weg praktisch ausgeschlossen ist. Die Mehrheit der heutigen Hepatitis C-Patienten haben sich vor der Einführung dieser Tests über Blutprodukte infiziert.

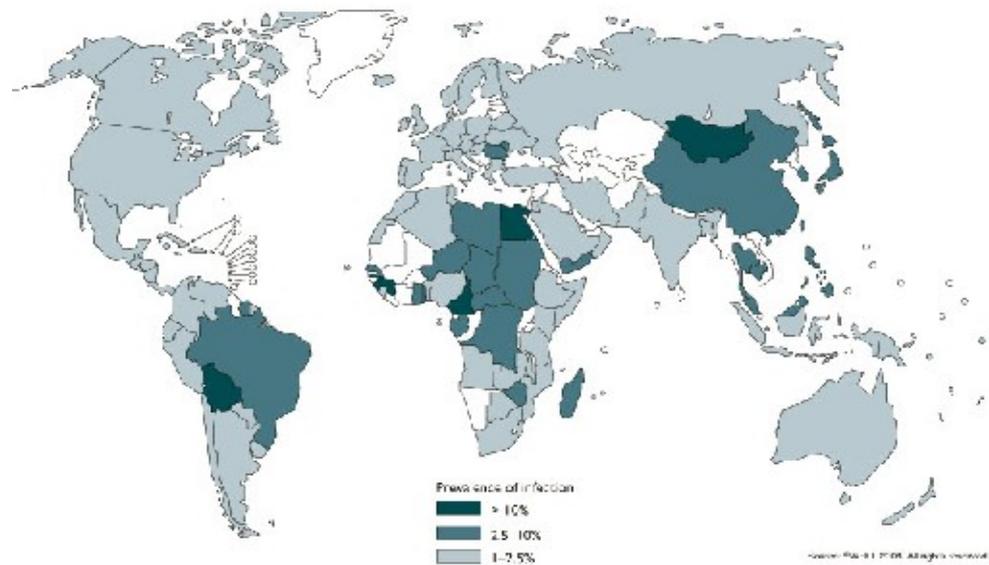


Abb. 1: Globale Prävalenz für Hepatitis C 2007 (Quelle: Weltgesundheitsorganisation WHO, 2008)

Anders als bei Hepatitis B und HIV ist eine HCV-Übertragung auf sexuellem Weg eher selten und spielt eine untergeordnete Rolle.

Die Hepatitis C führt über eine chronische Leberentzündung zur Entwicklung einer Leberfibrose. Dabei ist der individuelle Verlauf variabel und wird von verschiedenen Ko-Faktoren mit beeinflusst. Diese sind zum Beispiel das Alter und Geschlecht des Patienten, chronischer Alkoholkonsum und Ko-Infektionen wie zum Beispiel HIV. Etwa 20% der HCV-Patienten entwickeln im Verlauf von 20-25 Jahren das Krankheitsbild der Leberzirrhose. Bei vorhandener Zirrhose beträgt das jährliche Risiko zur Entwicklung eines Leberkarzinoms etwa 4%. Leberzirrhose und -karzinom führen zur erhöhten Mortalitätsrate bei einer HCV-Infektion. Die chronische HCV-Infektion ist eine der Hauptursachen für Leberkrebs und stellt die größte Indikation für eine Lebertransplantation dar (Montalbano and Neff, 2005).

1.2 Das Hepatitis C-Virus

Das Hepatitis C-Virus ist stark wirtsspezifisch und befällt in der Natur nur den Menschen, allerdings sind künstliche Infektionen mit Menschenaffen, vorwiegend Schimpansen, beschrieben. Das Virus hat eine Lipidhülle, besitzt ein 9,6 kb großes, positiv-orientiertes einzelsträngiges RNA-Genom (+ssRNA) und wird als eigenständiger Genus "Hepacivirus" den *Flaviviridae* zugeordnet. Das Virus ist das einzige bekannte RNA-Virus das, ohne ein Retrovirus zu sein, eine chronisch persistierende Infektion auszulösen vermag.

Die Visualisierung von Hepatitis-C-Viruspartikeln ist äußerst komplex. Daher unterscheiden sich die Angaben zum Durchmesser je nach Nachweismethode und Virusquelle teilweise deutlich und schwanken zwischen 50 und 100 nm. (Bradley et al., 1985; Gastaminza et al., 2006; He et al., 1987; Nielsen et al., 2006; Maillard et al., 2001; Yu et al., 2007). Die Gestalt der Viruspartikel ist sphärisch bis pleomorph (Gastaminza et al., 2010) und wird durch die Lipidhülle und das Nukleokapsid bestimmt. Die Glykoproteine E1 und E2 sind in die Lipidhülle, welche sich von der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) der Wirtszelle ableitet, eingelagert. Innerhalb der Hülle liegt das ikosahedrische Nukleokapsid („core“). Das RNA-Genom liegt über elektrostatische Wechselwirkung an die Kapsidinnenseite gebunden vor.

Im Vergleich zu anderen Einzelstrang-RNA-Viren ist die Genomvariabilität bei HCV recht hoch. Es werden sechs Genotypen (1-6) unterschieden, die untereinander eine Divergenz von mehr als 28%

in der Aminosäurezusammensetzung haben müssen. Die Genotypen werden weiter in 30 Subtypen untergliedert, wobei diese zwischen 73 und 86% Sequenzhomologie aufweisen. Die Geno- und Subtypen sind geographisch unterschiedlich verteilt. In Europa und Nordamerika dominieren die Typen 1a, 1b und 3a, in Asien der Subtyp 1b, in Afrika Genotyp 4, in Südafrika der Genotyp 5 und in Hongkong und Vietnam Genotyp 6. Die Genotypen 2 und 3 sind in geringerem Prozentsatz ubiquitär vertreten.

1.2.1 Genomorganisation

Das RNA-Genom von HCV kodiert für ein etwa 3000 Aminosäuren großes Polyprotein, das einen einzigen offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF) enthält (siehe Abb. 2). Der ORF wird 5' und 3' von einem nicht translatierten Bereich flankiert, wovon der 5' gelegene Bereich eine interne ribosomale Bindestelle („internal ribosomal entry site“; IRES) des Typs 3 enthält. Sie gewährt eine Translation des RNA-Genoms in Abwesenheit einer 5'-Cap-Struktur. Das entstehende Polyprotein wird dann ko- und posttranslational von zellulären und viralen Proteasen in zehn verschiedene Einzelproteine zerschnitten. In 5' nach 3'-Richtung sind das die Strukturproteine core, E1, E2 und p7 sowie die Nicht-Strukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B.

1.2.2 Strukturproteine

Das core-Protein ist für die Ausbildung des viralen Nukleokapsids im Viruspartikel verantwortlich. Es ist das erste Protein, das vom ORF kodiert wird. Durch eine Signalpeptidase wird das core-

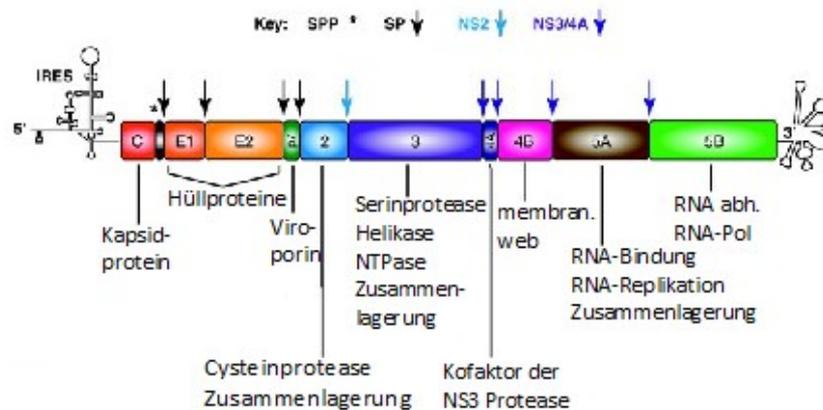


Abb 2: HCV-Genomstruktur und Funktion viraler Proteine. Die bei der Proteinprozessierung des Polyproteins beteiligten Proteasen sind oberhalb der Genomstruktur dargestellt. Die 5' und 3' gelegenen nicht translatierten Bereiche sind in ihrer vermuteten Sekundärstruktur dargestellt. Derivate des core-Proteins die durch ribosomalen „frame-shift“ entstehen sind nicht abgebildet. SPP: Signalpeptidpeptidase; SP: Signalpeptidase; RNA-abh. RNA-Pol: RNA-abhängige RNA-Polymerase. (modifiziert nach (Bartenschlager et al., 2011))

Vorläuferprotein aus dem Polyprotein herausgeschnitten und anschließend mittels C-terminaler Prozessierung durch Signalpeptidpeptidasen in das reife 21 kDa große Protein prozessiert. Dieses ist ein dimerer, α -helicaler Komplex bestehend aus zwei Domänen. Die N-terminale, hydrophile Domäne enthält viele basische, und damit positiv geladene, Aminosäurereste. Sie ist in der RNA-Bindung beteiligt (Boulant et al., 2005) und besitzt RNA-Chaperonaktivität (Cristofari et al., 2004). Die C-terminale, hydrophobe Domäne ist für die Anlagerung des core-Proteins an Lipidtropfen notwendig (Boulant et al., 2006). Diese Assoziation ist von Bedeutung für die Replikation und die Virionmorphogenese. Es wurde ein Einfluss des core-Proteins auf den Lipidstoffwechsel der Wirtszelle beobachtet, weswegen vermutet wird, dass das Protein an der Ausbildung einer Fettleber, einem häufigen Hepatitis C-Symptom, beteiligt ist (Barba et al., 1997).

E1 und E2 sind Transmembran-Glykoproteine, die nicht-kovalent verbundene Heterodimere bilden. Sie werden hauptsächlich in die ER-Membran eingelagert und sind im Virion die Oberflächenproteine der Virushülle. Zusammen bilden sie die funktionale Einheit, die von zentraler Bedeutung für die Interaktion mit den HCV-Eintrittsfaktoren und damit für die Aufnahme des Viruspartikels in die Zielzelle ist. Die Reifung und Faltung der Glykoproteine ist ein komplexer Prozess, der die Chaperone des ER benötigt und zusätzlich abhängig von der Ausbildung von Disulfidbrücken und Glykosylierung ist. Eine Deletion der Transmembrandomäne von E2 führt zum Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung von E1/E2-Heterodimeren (Cocquerel et al., 1998; Russ and Engelman, 2000). Durch Extraktionsversuche konnte gezeigt werden, dass E2 alleine in die Membran eingelagert werden kann. Die Assoziation ist aber im Komplex mit E2 deutlich fester.

Das p7-Protein ist ein 63 Aminosäure langes α -helicales Membranprotein (Montserret et al., 2010), das oft nur unvollständig von E2 abgespalten wird. Es lagert sich *in vitro* zu hexa- und/oder heptagonalen Komplexen zusammen (Clarke et al., 2006; Luik et al., 2009). In künstlichen Membranen haben p7-Oligomere Kationenkanalaktivität (Griffin et al., 2003; Pavlovic et al., 2003). Dies lässt vermuten was, dass es sich bei p7 um eine Viroporin handelt. *In vitro* ist p7 nicht für die HCV-Replikation notwendig, es ist aber *in vivo* für eine produktive Infektion erforderlich (Sakai et al., 2003).

1.2.3 Nicht-Strukturproteine

Die NS2-3-Protease ist eine für die Replikation *in vivo* essentielle Autoprotease (Kolykhalov et al., 2000; Pietschmann et al., 2006). Dabei liegt die Proteaseaktivität sowohl im C-Terminus von NS2 in Form einer Cysteinprotease und im N-Terminus von NS3 in Form einer Serinprotease. Zusätzlich hat NS2 eine wichtige Funktion bei der Produktion infektiöser Viren, möglicherweise in einem späten Reifungsschritt, der erst nach der Zusammenlagerung des Partikels erfolgt (Ma et al., 2011; Pietschmann et al., 2006).

NS3 hat neben der Protease-Aktivität eine RNA-Helikase/NTPase-Aktivität. Die NS3-Helikase ist ein Mitglied der Superfamilie 2 der DexH/D-box-Helikasen. Sie entwindet und verbindet einzel- und doppelsträngige RNA-Abschnitte mit komplexer Sekundärstruktur unter ATP-Hydrolyse. Dabei wechseln sich schnelle Entwindungsphasen mit Phasen des Stillstands ab, was an die Motorproteine des Zytoskeletts erinnert (Levin et al., 2005; Serebrov and Pyle, 2004). Das NS4A Protein ist eine Cofaktor von NS3. Es ist für die Membranassoziation des NS3-4A-Komplexes verantwortlich. Die NS3-4A Serinprotease hat sich als wirkungsvolles Ziel für speziell entwickelte, spezifische Inhibitoren erwiesen.

Das 27 kDa große Nicht-Strukturprotein NS4B ist bisher noch recht wenig charakterisiert. Eine seiner Funktionen ist die Ausbildung eines Komplexes netzartiger Membranstrukturen, die man als „membranous web“ bezeichnet. Diese Struktur dient als Gerüst für den HCV-Replikationskomplex (Egger et al., 2002).

NS5A ist ein stark phosphoryliertes Protein, das sowohl in einer basalphosphorylierten Form p56 als auch in einer hyperphosphorylierten Form p58 vorliegen kann. Biochemische Analysen haben drei Unterdomänen (DI-DIII) des Moleküls aufgezeigt (Tellinghuisen et al., 2004). DI kann sich an RNA anlagern und ist wichtig für die RNA-Replikation (Huang et al., 2005). DII scheint *in vitro* entbehrlich für den Lebenszyklus von HCV zu sein, wohingegen DIII für den Zusammenbau von Viruspartikeln nötig ist (Tellinghuisen et al., 2008b). DIII wird von der Kaseinkinase II an einem C-terminalen Serinrest phosphoryliert und kann erst dann mit dem core-Protein interagieren (Masaki et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008a). Die Bedeutung dieser Interaktion wird dadurch bestätigt, dass bei DIII-deletierten Mutanten weder DIII noch core-Protein im gleichen Lipidtropfen gefunden werden können (Appel et al., 2008).

Bei der Replikation von HCV wird von dem positiv-orientierten Virusgenom eine negativ-orientierte RNA-Kopie angefertigt. Diese Kopie dient wiederum als Matrize für weitere positiv-orientierte Virusgenome, die anschließend in die Virionen verpackt werden. Das Schlüsselenzym für beide Kopieschritte ist das NS5B-Protein, bei dem es sich um eine RNA-abhängige RNA-Polymerase („RNA-dependent RNA-polymerase“; RdRp) handelt. Das Protein ist C-terminal in der ER-Membran verankert, die funktionelle Domäne ist zum Zytosol hin orientiert. NS5B besitzt keine Korrekturleseaktivität, weswegen die bei der Replikation auftretenden Fehlpaarungen nicht korrigiert werden können.

1.3 Der HCV-Zelleintritt

Die HCV-Anlagerung und der Eintritt in die Zielzelle ist ein komplexer mehrstufiger Prozess. Durch Versuche an verschiedenen Modellsystemen wurden mehrere Moleküle identifiziert die mit HCV interagieren (Zeisel et al., 2011). Dazu gehören CD81 (Pileri et al., 1998), der „Scavenger receptor class B type I“ SRBI (Scarselli et al., 2002), das „Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule three grabbing non integrin“ DC-SIGN, das „Liver and lymph-specific intercellular adhesion molecule three grabbing non integrin“ L-SIGN (Lozach et al., 2004; Pohlmann et al., 2003) , Claudin-1 (CLDN1) (Evans et al., 2007; Yang et al., 2008) und Occludin (OCLN) (Liu et al., 2009; Ploss et al., 2009).

In vivo erreicht HCV über das sinusoidale Blut die Leber. Möglicherweise werden freie Viruspartikel über DC-SIGN und L-SIGN gefangen, denn es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine mit hoher Affinität an virales E2-Protein binden (Gardner et al., 2003; Pohlmann et al., 2003). Dabei müssen diese Fängerproteine nicht zwingend auf Hepatozyten exprimiert sein. Auch eine Expression auf angrenzenden Kupffer-Zellen, einem leberspezifischen Makrophagensubtyp, und Endothelzellen der Leber könnte genügen (Lozach et al., 2004). Auf Hepatozyten scheint das Heparinsulfat Glykosaminoglykan (HS) eine erste Anlagerungsstelle zu sein, so dass Viren auf der Zelloberfläche angereichert und dadurch weitere Interaktionen erleichtert werden (Barth et al., 2003; Barth et al., 2006; Koutsoudakis et al., 2006). Diese Proteine können die Infektion zwar zum Teil deutlich steigern sind aber nicht essentiell für die Infizierbarkeit einer Zelle mit HCV.

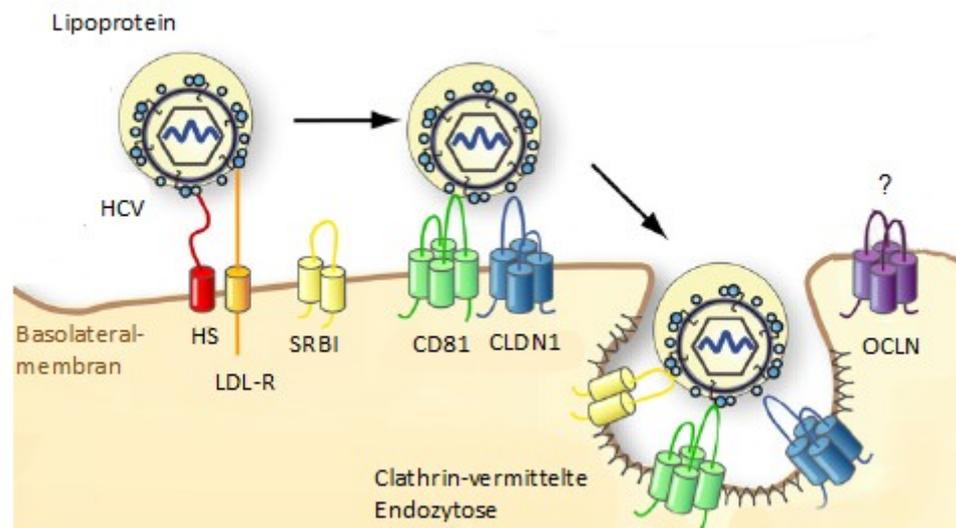


Abb. 3: Molekulare Mechanismen beim HCV-Eintritt in einen Hepatozyten. An Lipidproteine angelagertes HCV reichert sich durch Kontakte mit HS und LDL-R auf der Basolateralmembran von Hepatozyten an. Erst die Interaktion mit Wirtsfaktoren wie SRBI, CD81, CLDN1 und OCLN führt zur Internalisierung des Virions über Clathrin-vermittelte Endozytose. Die Interaktionspartner von OCLN sind nicht bekannt. Abbildung verändert nach (Zeisel et al., 2011)

Die im Folgenden beschriebenen vier Proteine sind in den letzten Jahren als essentielle Faktoren für die HCV-Infektion entdeckt worden. CD81 ist ein ubiquitär exprimiertes 25 kDa großes Protein aus der Tetraspanin-Familie. Das Protein hat zwei extrazelluläre Schleifen von denen die größere mit E2 interagiert und in löslicher Form eine Virusanlagerung an die Zelle zu hemmen vermag (Zhang et al., 2004). Humanes SRBI ist ein 82 kDa großes Glykoprotein, welches in der Leber und auf steroidogenem Gewebe stark exprimiert wird (Krieger, 2001). Das Protein bindet eine Vielzahl von Lipoproteinen wie das „high density lipoprotein“ HDL, das „low density lipoprotein“ LDL und oxidiertes LDL (oxLDL), und ist unter anderem am bidirektionalen Cholesterintransport in der Zellmembran beteiligt. Darüber hinaus werden sowohl eine Funktion in der Bindung von HCV, als auch in der Bindung nachfolgenden Schritten vermutet (Catanese et al., 2010; Krieger, 2001; Zeisel et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die

physiologischen SRBI-Liganden einen modulierenden Einfluss auf die HCV-Infektion haben können; so kann sowohl eine HCVpp- als auch eine HCVcc-Infektion durch HDL gesteigert (Bartosch et al., 2005; Voisset et al., 2005) und durch oxLDL gehemmt werden (von Hahn et al., 2006). CLDN1, ein 23 kDa großes Protein mit vier Transmembrandomänen, ist eine wichtige Komponente von „tight junctions“, jenen Zellkontakten die parazelluläre Permeabilität und Zellpolarisierung regulieren. CLDN1 ist auf allen Epithelzellen exprimiert, kommt aber auf Hepatozyten besonders gehäuft vor (Furuse et al., 1998). Bemerkenswert ist, dass CLDN1 auf Hepatozyten auch außerhalb von „tight junctions“ auf basolateralen Oberflächen exprimiert wird (Reynolds et al., 2008). Auch wenn bisher nie eine direkte HCV-CLDN1-Interaktion beobachtet werden konnte (Evans et al., 2007; Krieger et al., 2010), wurde CLDN1 in Klonierungsexperimenten als kritischer Faktor im Zelleintritt von HCV identifiziert. Möglicherweise ist die Fähigkeit mit CD81 Komplexe zu bilden der entscheidende Faktor bei der HCV-Infektion (Harris et al., 2010; Harris et al., 2008). Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass freies, also nicht an „tight junctions“ gebundenes, CLDN1 im HCV-Zelleintritt beteiligt sein soll (Cukierman et al., 2009; Evans et al., 2007) und dabei vermutlich in einem der Bindung nachfolgenden Schritt beteiligt ist (Evans et al., 2007; Krieger, 2001). Auf hepatischen Zelllinien können auch CLDN6 und CLDN9 den HCV-Zelleintritt positiv beeinflussen. OCLN ist ähnlich wie CLDN1 ein Protein mit vier Transmembrandomänen, das in „tight junctions“ exprimiert wird, aber mit 69 kDa deutlich größer ist. Es ist, obwohl bisher keine direkte Interaktion mit HCV beobachtet werden konnte, zum HCV-Zelleintritt notwendig (Liu et al., 2009; Ploss et al., 2009). Eine Beteiligung an einem

der Bindung nachfolgenden Schritt wird diskutiert (Benedicto et al., 2009). OCLN könnte für die Wirtsspezifität von HCV wichtig sein, denn durch die Expression von humanem OCLN in Mauszelllinien können diese mit HCV infiziert werden (Ploss et al., 2009). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass OCLN in infizierten Hepatozyten herunter reguliert wird, was ein Mechanismus zur Vermeidung von Superinfektion sein könnte (Liu et al., 2009). HCV wird über Clathrin-vermittelte Endozytose erst in Endosomen internalisiert (Blanchard et al., 2006). Dann kommt es, wie bei allen Flaviviren, zur Ansäuerung des Endosoms (Koutsoudakis et al., 2006; Tscherne et al., 2006) und zur Verschmelzung der Membranen. Dadurch gelangt das Genom ins Cytolasma.

1.4 HCV-Replikation

Das positiv-strängige RNA-Genom von HCV kann direkt als mRNA fungieren und muss nicht erst umgeschrieben werden. Der 5' nicht translatierte Bereich des Genoms bildet zusammen mit den ersten 20-40 Nukleotiden des Kapsidgens die IRES, die direkt an die 40S-ribosomale Untereinheit binden kann. Anschließend lagern sich zelluläre Initiationsfaktoren der Translation an den Genom-Ribosomen-Komplex an. Für diese Bindungsreaktion ist die besondere Struktur der IRES-Region von Bedeutung (Siridechadilok et al., 2005; Spahn et al., 2001). Anschließend lagert sich die 60s-Untereinheit an und die Translation beginnt. Das entstehende Polyprotein wird ko- und posttranslational von zellulären und viralen Proteasen in reife Struktur- und Nicht-Strukturproteine zerschnitten. Die Strukturproteine und das p7-Polypeptid werden dabei von der ER-Signalpeptidase und die Nicht-

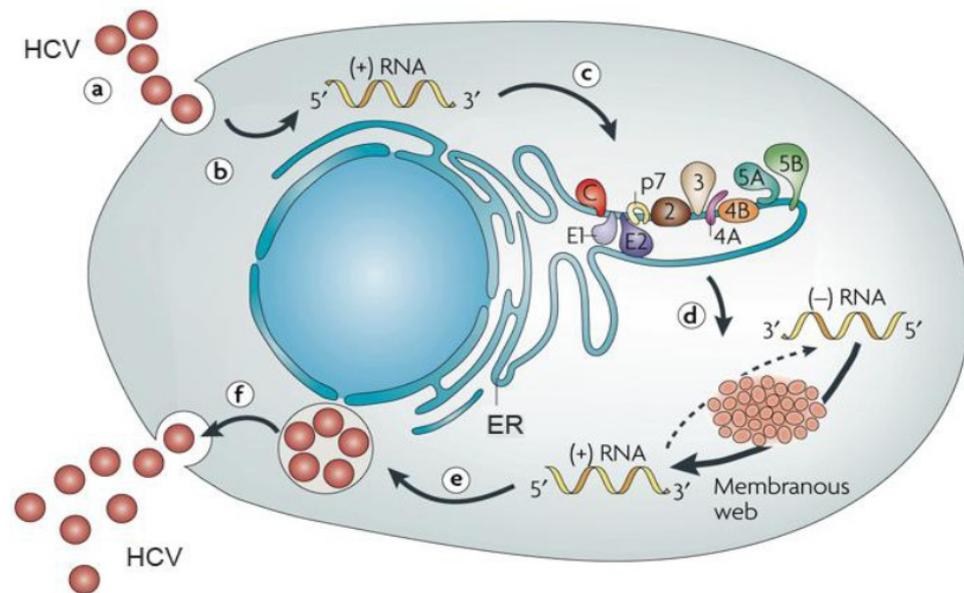


Abb. 4 Modell des HCV-Lebenszyklus

a) HCV bindet über verschiedene Rezeptoren an die Plasmamembran und wird b) über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert. Nach der Fusion mit frühen Endosomen wird die HCV-RNA ins Zytoplasma entlassen. c) Über die interne ribosomale Bindestelle (IRES) bindet das Genom an Ribosomen, die Translation beginnt und die Polyproteine werden prozessiert. d) Nach der initialen Translation der viralen RNA am rauen ER kommt es zur Bildung spezialisierter Membran-Kompartimente („membranous web“), an denen die HCV-Replikation erfolgt. e) Die viralen Strukturproteine werden an der ER-Membran prozessiert und durch Verknüpfung mit der gebildeten HCV-RNA zu Virionen verpackt, die anschließend durch zelluläre Sekretion f) ausgeschleust werden.

Translation, Polyproteinprozessierung und Ausbildung des „membranous web“ sind der Übersichtlichkeit halber als einzelne Schritte dargestellt, finden aber in Realität vermutlich in großer räumlicher Nähe statt. Abbildung modifiziert nach Moradpour et al., 2007

Strukturproteine von den viralen Proteasen NS2-3 und NS3-4A prozessiert. Die entstehenden Proteine wurden bereits in Abschnitt 1.2.2 und 1.2.3 beschrieben.

Das virale Protein NS4B induziert direkt nach seiner Translation die Bildung der netzartigen Membranstruktur „membranous web“, die als Gerüst für den HCV-Replikationskomplex dient (Egger et al., 2002). Mittels der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B wird das virale Genom über eine negativ-orientierte RNA-Zwischenstufe, die als Matrize für die Genome der Tochterviren, vervielfältigt. Für den

Zusammenbau des Nukleokapsids gibt es zwei Modelle je nachdem wo der Prozess beginnt. Im ersten Modell beginnt der Zusammenbau an cytosolischen Lipidtropfen (cLD). Die virale RNA, die an NS5A gebunden vorliegt, wird ebenfalls über cLD zu dem core-Protein transportiert (Bartenschlager et al., 2011). Im zweiten Modell wird der cLD mit dem Kapsidprotein zum ER zurück geleitet, wo es mit der an NS5A gebundenen RNA interagiert (Bartenschlager et al., 2011).

Die Entstehung und Reifung von HCV-Viruspartikeln ist eng mit dem Stoffwechselweg der „very low density-Lipoproteine“ (VLDL) verknüpft. Es wurde gezeigt, dass core-Proteine in luminalen Lipidtropfen, Vorläufern von VLDL, angereichert vorkommen (Huang et al., 2007). Wie die Hüllproteine zu den Lipidtropfen rekrutiert werden ist bisher noch unklar, aber NS2 und p7 könnten daran beteiligt sein. Die fertigen Viruspartikel werden zum Golgi-Apparat geleitet und verlassen die Zelle über zelluläre Exkretion. Der virale Lebenszyklus ist in Abb.4 zusammengefasst dargestellt.

1.4.1 Antivirale Therapie

Bei der chronischen Hepatitis C besteht die Standardtherapie in der kombinierten Gabe von pegyliertem Interferon- α (PEG-IFN- α) und Ribavirin. Das Therapieziel ist es sechs Monate nach Therapieende keine HCV-RNA im Blut nachweisen zu können; man spricht dann von „sustained virological response“. Die Behandlung dauert in der Regel zwischen 24 und 48 Wochen, kann im Ausnahmefall aber noch verlängert werden (Grammatikos and Sarrazin, 2010). Der Erfolg der Therapie ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie eventueller Ko-

Infektionen mit HIV oder HBV, Fibrosegrad der Leber, Dauer der Erkrankung, initialer Viruslast und besonders dem Genotyp des Virus. Genotyp 1 hat schlechtere Therapieprognosen als die Genotypen 2 und 3 (Grammatikos and Sarrazin, 2010). Bereits in den 80er Jahren wurde die HCV-Infektion mit der parenteralen Gabe von humanen Zytokin Interferon- α therapiert. Da das Zytokin nicht sehr stabil ist, musste das Medikament in der Regel täglich verabreicht werden. Durch die Kopplung von Interferon an das Polymer Polyethylenglykol (PEG) konnte die Wirkungsdauer verlängert werden, so dass nur noch eine Applikation pro Woche nötig ist. In den 90er Jahren wurden Studien mit dem Nukleosidanalogen Ribavirin gemacht, wobei sich zeigte, dass das Medikament zwar in Monotherapie nahezu keine Wirkung besitzt, aber in Kombination mit IFN- α die virologischen Ansprechraten von etwa 15% auf etwa 40% steigert (McHutchison et al., 1998). Als Wirkmechanismus von Ribavirin werden sowohl eine erhöhte Fehlerrate der HCV-Replikation als auch immunologische Effekte diskutiert (Crotty et al., 2002; Lau et al., 2002). Die Ansprechraten der aktuellen Kombinationstherapie liegen bei etwa 50% im Falle von Genotyp 1 und auf 80% bei den Genotypen 2 und 3. Nicht alle HCV-Patienten können erfolgreich behandelt werden. Außerdem sind die starken Nebenwirkungen ein Problem der Therapie.

1.5 HCV Infektionssysteme

1.5.1 HCV-Modellsysteme

Über viele Jahre war die Analyse des HCV-Infektionszyklus durch das Fehlen eines Zellkulturmodells stark eingeschränkt. Daher wurden die

ersten Experimente mit HCV-RNA-Transkripten *in vivo* durchgeführt (Kolykhalov et al., 1997), wobei der Nachweis der Virusreplikation nicht gelang. Dies wurde erst durch die Entwicklung des HCV-Replikon-Systems (Abb.5A) möglich (Lohmann et al., 1999). Hiermit konnte erstmals eine persistierende HCV-RNA-Replikation in Zellkultur mittels eines subgenomischen Genotyp-1b-Isolats nachgewiesen werden. Dabei kodiert die bicistronische Replikon-RNA für einen selektierbaren Marker wie z.B. eine Neomycin-Resistenz unter der Kontrolle der HCV-IRES und die HCV-Strukturproteine unter der Kontrolle einer zweiten heterologen IRES wie der des Encephalomyocarditisvirus (EMCV). Die Replikon-RNA wird durch Elektroporation in Huh7-Zellen eingebracht. Dort führt die Replikation der RNA zur Expression des Markergens und ermöglicht so die Selektion resistenter Kolonien. Zur Steigerung der Replikationseffizienz wurden spezielle Subklone der Huh7-Zelllinie selektiert, die Huh7.5-Zellen, die eine Mutation im RIG-Gen haben, sowie die Huh7-Lunet-Zellen. Dadurch wird die antivirale Reaktion der Zelle unterdrückt (Sumpter et al., 2005). Mit Hilfe des Replikon-Systems ist eine effiziente HCV-Replikation *in vitro* detektierbar, aber es findet keine Produktion infektiöser HCV-Partikel statt.

Ein wichtiger Schritt in der Erforschung des HCV-Zelleintritts kam durch die Erzeugung von HCV-Pseudopartikeln (HCVpp) (Abb.5B), die basierend auf einem retroviralen Rückgrad, an ihrer Oberfläche unmodifizierte HCV-Glykoproteine tragen (Bartosch et al., 2003; Hsu et al., 2003). Die Partikel wurden durch Ko-Transfektion von HEK-Zellen mit drei verschiedenen Expressionsvektoren hergestellt. Sie kodieren für die HCV-Glykoproteine E1 und E2, die gag-pol-Elemente von MLV

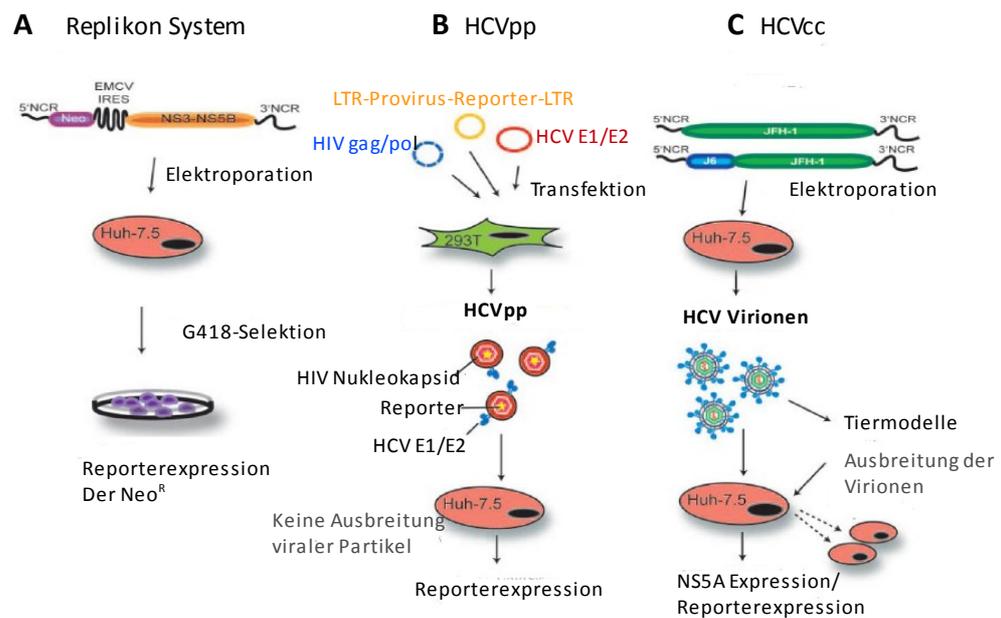


Abb. 5 Modellsysteme zur Erforschung des HCV-Infektionszyklus

A: Beim Replikon-System wird ein RNA-Konstrukt mit Resistenzgenen in die Zielzelle elektroporiert und mit Hilfe der Resistenz selektioniert. Das Modell erlaubt das Studium der viralen Replikation. **B:** HCV-Pseudopartikel dienen der Untersuchung des Zellentritts. Die infizierte Zelle kann mittels des Reporters detektiert werden. **C:** HCVcc-Modell zur Analyse der Replikation als auch der Infektion. Huh7.5-Zellen werden mit einem chimären RNA-Konstrukt elektroporiert und produzieren anschließend infektiöse Viruspartikel. Die Infektion kann über Marker, Immunfluoreszenz oder RNA-Nachweis detektiert werden.

oder HIV und einem retroviralen Genom, das ein Reporter-gen wie EGFP oder Luciferase enthält. Die sich nach Transfektion bildenden Partikel können Zellen infizieren aber in diesen keine infektiösen Nachkommen mehr bilden. Durch das Reporter-gen kann die infizierte Zelle detektiert und somit der virale Zelleintritt untersucht werden. Dieser erfolgt HCV-Glykoprotein-vermittelt entsprechend nativer HCV-Partikel (Bartosch and Cosset, 2006; Tellinghuisen et al., 2007). Der Nachteil dieses Modellsystems besteht darin, dass alle intrazellulären Vorgänge HCV-atypisch sind und entsprechend des retroviralen Lebenszyklus ablaufen.

Ein drittes Infektionsmodell vereinigt die Eigenschaften der bisher genannten Modelle. 2005 wurde die isolierte HCV-RNA eines

japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis in Huh7-Zellen transfiziert. Anschließend konnten virale Partikel („HCV cell culture“, HCVcc) (Abb.5C) im Überstand detektiert werden (Lindenbach et al., 2006; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Die zuerst niedrigen Titer wurden durch Verwendung der Huh7.5-Zelllinie und Chimärenbildung mit Genomen anderer Genotypen gesteigert. Mit HCVcc-Partikeln lassen sich *in vivo* Schimpansen und mit humanen Hepatozyten transplantierte uPA-SCID-Mäuse infizieren (Lindenbach et al., 2006; Wakita et al., 2005). Das System wird durch die geringe Infektiosität der im Tierversuch produzierten Partikel und die fehlende Lipoproteinkomplexierung der Partikel im *in vitro*-Versuch limitiert. Dadurch und wegen der Tatsache, dass es derartige Genomhybride in der Natur nicht gibt, kann auch mit diesem Modell keine HCV-Infektion unter Normalbedingungen nachgestellt werden (Farquhar and McKeating, 2008).

1.5.2 Zellsysteme für HCV-Infektionen

Da es sich bei HCV um ein hepatotropes Virus handelt, sind Leberzellen seine primären Wirtszellen. Daher sind primäre, humane Hepatozyten (PHH) das physiologischste Ex-Vivo-System zur Untersuchung von HCV-Zelleintritt und Replikation. Die Nachteile sind die begrenzte Verfügbarkeit gesunder PHH und die, durch phänotypische Veränderungen hervorgerufenen, zeitlich limitierten Kulturbedingungen. Darüber hinaus zeigen HCV-infizierte humane Hepatozyten nur schwache Replikationsraten. Daher und wegen ihrer unbegrenzten Verfügbarkeit basiert die Mehrzahl der HCV-Studien auf Versuchen mit hepatischen Zelllinien. Ein Nachteil der Zellen ist die

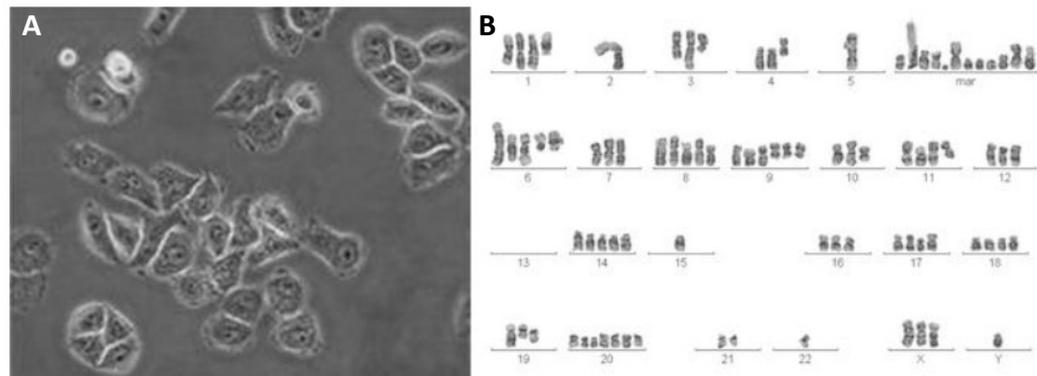


Abb. 6 Morphologie und Karyotyp der Hepatokarzinomzelllinie Huh7

A: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Huh7-Zellen bei etwa 50 % Konfluenz. **B:** Karyogramm der Huh7-Zelllinie (erstellt im Institut für Humangenetik, Homburg Saar, AG Meese)

Tatsache, dass ihr Genom durch die Immortalisierung und die hohe Passagenzahl stark degeneriert ist. Im Karyogramm der häufig verwendeten Zelllinie Huh7 lassen sich zahlreiche Chromosomenaberrationen erkennen (Abb. 6). Darüber hinaus sind anormales Wachstumsverhalten, dysfunktionale Mitochondrien und abweichende Endozytose- und Signalkaskaden beschrieben. Bisher gibt es keine Daten darüber, ob HCV-relevante Stoffwechselwege bei Huh7 im Vergleich zu PHH verändert sind. Immortalisierte Zellkulturen können also nie die wahren physiologischen Bedingungen einer HCV-Infektion abbilden und sind somit als artifizielles System zu betrachten. Aus dieser Tatsache erwächst die Notwendigkeit eines physiologisch-relevanten Infektionssystems für HCV.

1.6 Monozyten und Zellen monozytärer Herkunft

1.6.1 Monozyten

Monozyten sind Zellen des Immunsystems und gehören zu den Leukozyten. Mit 10 – 20 μm sind sie größer als T- und B-Lymphozyten. Ihre Aufgabe ist es bei der Zirkulation durch das Blut entweder

selbstständig Pathogene mittels Phagozytose aufzunehmen oder, durch Botenstoffe vermittelt, ins Gewebe auszuwandern. Zirkulierende Monozyten haben eine Lebensdauer von etwa einem bis drei Tagen ehe sie ausdifferenzieren und ins Gewebe einwandern. Der wichtigste Speicherort für Monozyten ist die rote Pulpa in der Milz, von wo die Zellen im Falle einer akuten Entzündung zahlreich auswandern können. Monozyten sind keine einheitliche Zellpopulation. Allen Typen ist jedoch der Marker CD14 gemeinsam, jedoch können andere Marker, wie CD16, unterschiedlich stark oder auch nicht exprimiert werden. Je nach weiteren Stimuli in ihrer Umgebung entwickeln sich dann aus Monozyten Makrophagen und Dendritische Zellen.

1.6.2 Makrophagen

Die Lebensdauer von Makrophagen kann mehrere Monate betragen. Ihre Aufgabe ist die Phagozytose von Zelltrümmern und Pathogenen im Gewebe. Sie präsentieren anschließend Teilpeptide der aufgenommenen Substanzen via MHC-II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Dadurch können Lymphozyten aktiviert und eine adaptive Immunantwort initiiert werden.

Makrophagen sind ähnlich wie Monozyten keine einheitliche Zellpopulation. Es werden zahlreiche Typen, je nach Gewebe in dem sie vorkommen, unterschieden. So nennt man zum Beispiel Makrophagen der Leber Kupffer'sche Sternzellen, die der Knochen Osteoklasten und die der Lunge Alveolarmakrophagen. Typisch für alle Makrophagen ist die Expression der Marker CD14 und CD68. Bezüglich anderer Marker können Makrophagenpopulationen sehr heterogen sein (Mosser and Edwards, 2008).

1.6.3 Dendritische Zellen

Die Dendritische Zelle (DC) ist ein weiterer Zelltyp, der sich von Monozyten ableitet. Ihre Lebensdauer beträgt in der Regel wenige Tage. Morphologisch bilden sie viele dünne armartige Ausläufer aus. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose und MHC-Präsentation von Antigenen. Unreife Dendritische Zellen im Gewebe sind phagozytoseaktiv. Haben sie ein Antigen aufgenommen stellen sie die Phagozytoseaktivität nahezu ein, reifen und präsentieren das Antigen sowohl auf MHC-II als auch auf MHC-I-Molekülen. Die Präsentation aufgenommener Antigene via MHC-I ist typisch für Dendritische Zellen und wird als „cross presentation“ bezeichnet. Die Dendritischen Zellen wandern über die Lymphe in die Lymphknoten. Dort stimulieren sie Lymphozyten antigenspezifisch. DC sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen.

1.6.4 Neohepatozyten

Der Bedarf an humanen Hepatozyten z.B. für Transplantationen oder für pharmazeutische Tests wächst ständig. Von besonderem Interesse ist die Erzeugung von Hepatozyten aus humanen Vorläuferzellen, weil hier eine aufwändige und risikoreiche Biopsie verzichtet werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass aus fötalen humanen Lebern und Knochenmark reife Hepatozyten differenziert werden können (Crosby et al., 2002; Malhi et al., 2002). Im Jahr 2002 entdeckten Zhao *et al.*, dass pluripotente Stammzellen aus adulten Monozyten des peripheren Blutes sich mittels Wachstumsfaktoren in leberähnliche Zellen differenzieren lassen (Zhao et al., 2003). Diese Grundidee griffen Ruhnke und Mitarbeiter auf und differenzierten leberähnliche Zellen,

sogenannte Neohepatozyten oder Neoheps, aus Monozyten des peripheren Blutes von adulten Spendern (Ruhnke et al., 2005a). Dabei wurde eine zweistufige Differenzierungsstrategie angewendet. In einem ersten Schritt werden die Zellen in einem Medium mit dem „macrophage colony stimulating factor“ M-CSF und Interleukin-3 (IL-3) kultiviert. Einzeln bewirkt M-CSF eine Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen und IL-3 eine Proliferation myeloider Zellen. In Kombination bewirkten diese Faktoren eine Dedifferenzierung der Monozyten (Ruhnke et al., 2005b), die man nun wegen ihrer Entwicklungseigenschaften als „programmable cells of monocytic origin“ PCMO bezeichnet. Werden die PCMO daraufhin in einem Medium mit FGF-4 kultiviert, wird eine hepatische Entwicklung eingeleitet (Abb. 7A). Die resultierenden Neohepatozyten haben viele Gemeinsamkeiten mit primären Hepatozyten wie zum Beispiel die Morphologie (Abb. 7B) sowie die Expression, Aktivität, Induzierbarkeit und Inhibierbarkeit von Enzymen der Arzneimittelmetabolisierung (Ehnert et al., 2008). Des Weiteren sind CYP-Gene in Neohepatozyten induzierbar, eine Eigenschaft, die viele hepatische Zelllinien verloren haben (Ruhnke et al., 2005b).

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits die Differenzierung von Monozyten zu PCMO und schließlich zu Neohepatozyten etabliert werden. Die Morphologieveränderungen während des Reifungsprozesses sind in Abb. 7 dargestellt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Neohepatozyten mit HCVpp infizierbar sind. („Entwicklung eines Personen-spezifischen Zellkultursystems zur Untersuchung von Hepatitis C Virus Infektionen“ von Christina Hohn, 2009.) Ungeklärt blieb allerdings ob es sich bei den Neohepatozyten um

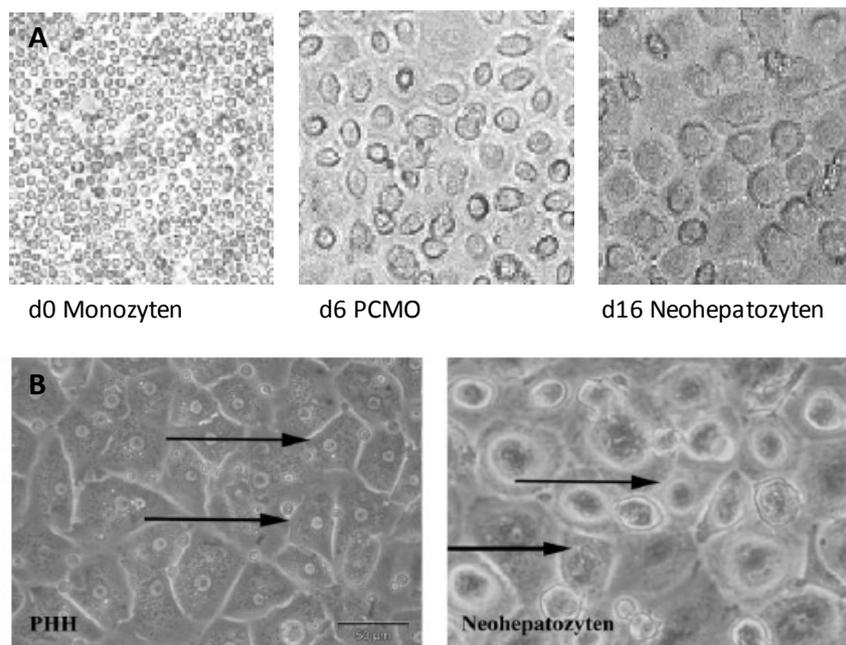


Abb. 7: Morphologie von Monozyten, PCMO und Neohepatozyten während des Differenzierungsprozesses (A) im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten(B).

A: Humane Monozyten aus peripherem Blut (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 hepatozytenartigen Neohepatozyten (d16) zu erhalten. Dargestellt sind die jeweiligen Zellpopulationen in 20facher Vergrößerung. **B:** Primäre humane Hepatozyten (PHH, Prof. Dr. J. Hengstler, Universität Leipzig) im Vergleich zu Neohepatozyten (d20). Vergrößerung 40fach. Pfeile markieren morphologisch ähnliche Zellen. Abbildung verändert nach „Entwicklung eines Personen-spezifischen Zellkultursystems zur Untersuchung von Hepatitis C Virus Infektionen“ von Christina Hohn, 2009.

transdifferenzierten Hepatozyten oder um leberähnliche Makrophagen handelt (Riquelme et al., 2009). Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es, diese Frage zu beantworten, um ein tieferes Verständnis für den beobachteten Effekt der Infizierbarkeit mit HCV zu erlangen.

1.7 microRNA

MiRNAs sind kleine, nicht kodierende RNAs von 20 bis 24 Nukleotiden (nt) Länge. Sie hemmen die Genexpression durch Bindung der miRNA an die mRNA. Dabei führt partielle Komplementarität zur Translationshemmung und absolute Komplementarität durch perfekte

Basenpaarung zum Abbau der Ziel-mRNA. Dieser Prozess wurde in verschiedensten biologischen Prozessen wie Apoptose, Proliferation, Zelldifferenzierung und Metastase beobachtet (Bartel, 2004; Stefani and Slack, 2008).

MiRNAs werden von Genen kodiert die auch in den Introns proteinkodierender Gene vorliegen können (Kim, 2005). Die Primärtranskripte (pri-miRNA) sind zwischen 500 und 3000 nt groß. Sie besitzen eine 5'Cap-Struktur und einen Poly-A-Schwanz. Die pri-miRNA wird durch die RNase III Drosha zusammen mit RNA-bindenden Proteinen in einem Microprozessor-Komplex gebunden und zu 60 bis 110 nt langen Vorläufer-miRNAs (pre-miRNA) prozessiert (Gregory et al., 2004; Lee et al., 2003). Der Export aus dem Zellkern ins Cytoplasma erfolgt mittels Exportin-5. Im Plasma wird die pre-miRNA durch das RNase III-Enzym Dicer-1 gespalten und in einen kurzen dsRNA-Duplex prozessiert (Hutvagner et al., 2001; Lee et al., 2003; Lund et al., 2004). Dieser wird von einer Helikase zu der reifen etwa 20 nt langen miRNA entwunden und dann in den Multikomponentenkomplex "RNA-induced silencing complex 2" RISC eingebaut (Hutvagner and Simard, 2008; Mourelatos et al., 2002). In dieser Form kann die miRNA ihre transkriptionshemmende Funktion ausführen.

Die Expression und die Expressionsstärke von miRNAs ist sehr zell- und entwicklungsspezifisch. Nicht selten können einige zehntausend Transkripte in einer Zelle gemessen werden. Aus der Expressionsstärke dieser miRNAs kann ein Expressionsprofil (miRNA-Profil) erstellt werden, das als Marker für Differenzierungszustände und auch

Krankheiten herangezogen werden kann (Ferracin et al., 2010; Keller et al., 2011)

Die leberspezifische miRNA-122 hat im Gegensatz zu den beschriebenen mRNA-inhibierenden Eigenschaften einen positiven Einfluss auf die Virusreplikation von HCV. Es konnte gezeigt werden, dass miRNA-122 an die 5'-nichttranslatierten Bereiche des Virusgenoms bindet und essentiell für die Virusreplikation in Huh7-Zellen ist (Jopling et al., 2006). Dies wird dadurch bekräftigt, dass für eine HCVcc-Infektion ein funktionierender miRNA-Apparat notwendig ist (Randall et al., 2007) und eine ektopische Expression von miRNA-122 in nicht-hepatischen Zellen die HCV-Replikation verstärkt (Chang et al., 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein zu miRNA-122 komplementäres Oligonukleotid in chronisch HCV-infizierten Schimpansen die Virämie verringern und das Überleben verlängern konnte (Pfeffer and Baumert). Die Stärke des Einflusses der zellulären miRNA auf die Virusreplikation *in vivo* ist noch Gegenstand der Forschung. Allerdings ist es bemerkenswert, dass HCV nicht nur auf die Proteinumgebung der Wirtszelle sondern auch an deren miRNA-Verhältnisse angepasst ist.

1.8 Ziele der Arbeit

HCV ist die häufigste Ursache chronischer Lebererkrankungen. Durch die Wirtsbeschränkung des Virus auf den Menschen sind experimentelle Studien erschwert. Bisher kann kein Kleintiermodell die komplexen Gegebenheiten in der humanen Leber widerspiegeln. Da die Verfügbarkeit von gesunden, primären Hepatozyten sehr begrenzt ist,

bleiben Untersuchungen zum HCV-Lebenszyklus meist auf wenige hepatozytäre Zelllinien beschränkt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von Neohepatozyten als Alternative für HCV-Infektionsstudien.

Viele HCV-Patienten zeigen trotz neutralisierender Antikörper keine Viruseliminierung. Daher sollte im ersten Teil der Arbeit der Einfluss von humanem Serum und neutralisierenden Antikörpern auf die Infektionsfrequenzen von Neohepatozyten mit HIV-HCVpp untersucht werden. Hierbei war von besonderem Interesse, ob es diesbezügliche Unterschiede zur hepatozytären Zelllinie Huh7 gibt und worin diese bestehen. Ferner sollte analysiert werden, ob Neohepatozyten die einzigen infizierbaren Zellen monozytärer Herkunft sind. Insbesondere sollte untersucht werden, ob bei der Differenzierung von Neohepatozyten aus Monozyten donorspezifische Eigenschaften erhalten bleiben.

Im weiteren Teil der Arbeit sollten verschiedene Zelltypen anhand ihres miRNA-Profiles charakterisiert werden. Von besonderem Interesse war die Klassifizierung von Neohepatozyten als Hepatozyten oder Makrophagen. Ferner sollten die Effekte verschiedener Reifungsstimuli auf monozytäre Zellen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

AB-Serum, human	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Agarose	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin	Bayer, Leverkusen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Casyton	Schärfe, Reutlingen
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DEPC	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
DMEM (1x) High Glucose	PAA Laboratories, Cölbe GIBCO, Langley
DMSO	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
FGF-4	PeproTech
Ficoll	PAA Laboratories, Cölbe
FKS	PAA Laboratories, Cölbe
FKS (für Huh7.5)	Apath, St. Louis
FKS (LPS-frei)	Biochrom AG, Berlin
Formamid	Serva, Heidelberg
Gentamicinsulfat	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
GM-CSF	Genzyme, Neu-Isenburg
HEPES	AppliChem, Darmstadt
IL-3	PeproTech
IL-4	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Zentrales Chemikalienlager, Uds
L-Glutamin	GIBCO, Langley
LB-Agar	Invitrogen
LB-Medium	BD Bioscience, Heidelberg
LPS	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Lysing solution	BD Bioscience, Heidelberg
M-CSF	PeptoTech
MnCl ₂	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NEAA	PAA Laboratories, Cölbe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
PFA	AppliChem, Darmstadt
PMA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
RbCl ₂	Merck, Darmstadt
RPMI-1640	Cambrex, Oberhaching
RPMI-1640 ohne Phenolrot	GIBCO, Langley
Saponin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Sucrose / D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
TNF-α	R&D Systems, Minneapolis
Tris/HCl	ICN Biomedicals, Illich
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Cölbe GIBCO, Langley

2.2 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Zur FACS-Analyse von primären Zellen und Zelllinien verwendete Antikörper

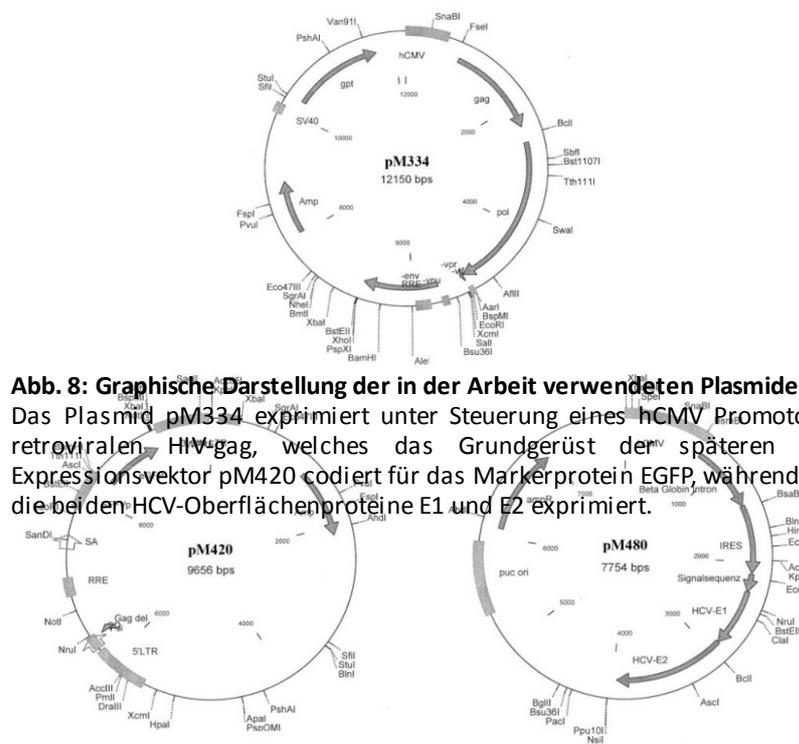
[h] gegen humane Antigene gerichtet; [m] aus Maus gewonnen; [r] aus Hase (rabbit) gewonnen; [g] aus Ziege (goat) gewonnen; FITC Fluoresceinisothiocyanat; PE Phycoerythrin;

Antigen	Klon	Konjugation	Isotyp	Hersteller
CD81 [h]	JS-81	FITC	IgG _{1K} [m]	BD Pharmingen
SRBI [h]	EP 1556Y	/	IgG [r]	Novus Biologicals
CLDN [h]	1C5-D9	/	IgG ₂ [m]	Abnova
OCLN [h]	OC-3F10	FITC	IgG _{1K} [m]	Invitrogen
FcRγ-I [h]	10.1	FITC	IgG ₁ [m]	Leico Technologies
FcRγ-II [h]	FUN-2	FITC	IgG _{2bK} [m]	BioLegend
FcRγ-III [h]	3G8	FITC	IgG _{1K} [m]	BioLegend
DC-SIGN [h]	120507	PE	IgG _{2b} [m]	R&D Systems
L-SIGN [h]	120604	FITC	IgG _{2b} [m]	R&D Systems
CK-18 [h]	B23.1. (DC10)	FITC	IgG1 [m]	abcam
CK-19 [h]	EP1580Y	/	IgG [r]	Lifespan Biosciences
Albumin [h]	polyklonal	FITC	IgG [r]	Rockland
CD1a [h]	NA1/34	FITC	IgG [m]	Dako
CD3 [h]	VCHT1	FITC	IgG1 [m]	Beckman Coulter

CD14 [h]	TÜK4	PE	IgG [m]	Dako
CD19 [h]	J4.119	PE	IgG1k [m]	Beckman Coulter
CD80 [h]	MAB104	PE	IgG1 [m]	Beckman Coulter
CD83 [h]	HB15A	PE	IgG2b [m]	Beckman Coulter
CD86 [h]		FITC	IgG [m]	BD Pharmingen
HLA-DR/DP/DQ [h]	CR3/43	FITC	IgG [m]	Dako
HLA-ABC [h]	W6132	PE	IgG [m]	Dako
CD68 [h]	KP1	/	IgG [m]	Dako
CD68 [h]	PGM1	/	IgG3k [m]	Dako
Hepatozytäres Antigen [h]	OCH1E5	/	IgG1k [m]	Dako
mouse-IgG	polyklonal	PE	[g]	Beckman Coulter
mouse-IgG	polyklonal	FITC	[g]	Dako
rabbit-IgG	polyklonal	FITC	[g]	Southern Biotec

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. aufgeführt und in Abb. 8 graphisch dargestellt.



Tab. 2. Herkunft und Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pM334	Expressionsvektor; HIV gag-pol; "packaging"-Signal; hCMV Promotor	*
pM420	Expressionsvektor; EGFP-Gen; Integrations-Signal; kein Promotor	*

pM480	Expressionsvektor;HCV-E1 und -E2 Gen; hCMV Promotor	*
-------	---	---

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

2.4 Bakterien und Bakterienkultur

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 ist in Tab. 3 dargestellt.

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

Tab.3 Genotyp und Herkunft des verwendeten *Escherichia coli*-Stamms XL1-Blue

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene

2.4.1 Erzeugung kompetenter Bakterien

Unter Kompetenz versteht man die Fähigkeit von Bakterien, DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Sie ist damit Voraussetzung

für Transformierbarkeit. In der Natur dient Kompetenz vor allem der Reparatur von mutierten Genomabschnitten und der Evolution durch horizontalen Gentransfer durch die Aufnahme von Fremdgenen. Nur einige Bakterienarten zeigen eine natürliche Kompetenz. Ihr Genom verfügt über einen kompletten Satz an Kompetenzgenen und deren Genprodukte für die Erkennung, Aufnahme und Integration durch Rekombination in das Genom verantwortlich sind.

Das Darmbakterium *Escherichia coli* verfügt nicht über einen kompletten Satz an Kompetenzgenen und ist dadurch nicht natürlich kompetent. Allerdings kann mit Hilfe einer Rubidiumchloridbehandlung und anschließendem Hitzeschock eine künstliche Kompetenz erreicht werden.

Verwendete Lösungen:

Transformationspuffer 1

RbCl	0,1 M
MnCl ₂	0,05M
CaCl ₂	0,01 M
Essigsäure (pH 7,5; NaOH)	0,03 M
Glycerol	15 % (v/v)
In Aqua _{bidest} pH 5,8	

Transformationspuffer2:

MOPS (pH 6,8)	0,01 M
RbCl	0,01 M
CaCl ₂	0,075 M
Glycerol	15 % (v/v)
In Aqua _{bidest}	

Durchführung:

30 ml antibiotikafreies LB-Medium wurden mit *Escherichia coli* XL1-Blue angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf eine optische Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) von 0,1 verdünnt. Anschließend wurde die Suspension etwa 2 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert bis die exponentielle Wachstumsphase erreicht wurde. Dies war bei einer OD₆₀₀ von 0,3 gegeben. Die Bakterienkultur wurde dann in 50 ml Aliquots abgefüllt und 15 min auf Eis inkubiert, anschließend 5 min bei 4°C und 400g zentrifugiert und das Pellet mit 16 ml Transformationspuffer 1 gewaschen. Das Pellet wurde in 4 ml Transformationspuffer 2 aufgenommen und in 50µl-Aliquots bei -80°C gelagert.

2.4.2 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 kompetenten *E.coli* Bakterien mit 50 pg des zu amplifizierenden Plasmids versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Induktion des Hitzeschocks wurde die Bakteriensuspension für 70s bei 42°C inkubiert, bevor sie erneut 5 min auf Eis gekühlt wurde. Zur Regeneration der Bakterienzellen wurden diese in 1 ml LB-Medium überführt und 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren der transformierten Zellen auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmedium.

2.4.3 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. Die Methode basiert auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse. 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_{bide}st. resuspendiert.

2.4.4 Bestimmung 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 wurde sich diese Eigenschaften zu Nutze gemacht.

Durchführung:

Die Messung der Absorption einer wässrigen DNA-Lösung gegen Aqua_{bidest.} 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 1cm und einer Wellenlänge von 260 nm einer Extinktion von 1. Das in dieser Arbeit zur DNA-Bestimmung verwendete NanaDrop 2000c der Firma PeqLab konnte auch in nur 1-2µl unverdünnter DNA-Lösung die DNA-Konzentration bestimmen.

2.4.5 Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, die in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen beide Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch spalten. Restriktionsenzyme unterscheiden sich in der Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus. Der Verdau der DNA erfolgte mittels Typ II Restriktionsendonukleasen, bei denen die DNA-Bindestelle auch der Schnittstelle entspricht. Dadurch wird die DNA innerhalb der Erkennungssequenz gespalten, wodurch DNA-Fragmente definierter Länge entstehen, die anhand ihrer Größe im Agarose-Gel (siehe 2.4.6.) identifiziert werden können.

Verwendete Lösungen:

„Gel-loading“-Puffer (GLB)

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 Reaktionspuffers eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua_{bidest.} auf 20 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen "Gel-loading"-Puffer abgestoppt, indem das darin enthaltene EDTA die für die Restriktionsendonukleasen notwendigen Mg²⁺-Ionen komplexiert.

2.4.6 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe erfolgte mittels der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Diese Technik ermöglicht die Trennung geladener Moleküle im elektrischen Feld. Sie basiert darauf, dass DNA bei neutralem pH polyanionisch, d.h. stark negativ geladen 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:1 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. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und anschließend auf ca. 55°C abgekühlt. Angefärbt wurde die DNA, durch das in doppelsträngige DNA und RNA interkalierende, Ethidiumbromid, welches in einer Endkonzentration von 0,7 µg/ml der in 1 x TAE-Puffer gelösten Agarose zugesetzt wurde. Anschließend wurde die Mischung in eine Gelkammer mit Taschenkamm (Größe der Taschen: 30µl) gegossen. Nachdem das Agarose-Gel vollständig polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in Klarsichtfolie verpackt bei 4° im Dunkeln bis zur Verwendung gelagert. Zur Benutzung wurde das Gel in eine Horizontal-Gel-Apparatur überführt und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Eine Versetzung der DNA-Proben mit 1/5 Volumen Blaumarker diente zur Markierung der Laufrichtung und Erhöhung der Dichte. Dabei entspricht das Wanderungsverhalten von Bromphenolblau einem doppelsträngigen linearisierten 300 bp-Fragment. Die Proben wurden in die Geltaschen auf der Kathodenseite der Gelkammer geladen. Die gleichzeitige Auftrennung von DNA eines Größenmarkers diente zur späteren Ermittlung der DNA-Fragment-Größen. Die Elektrophorese erfolgte bei 8 V/cm. Unter UV-Licht erfolgte die Anregung der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe, die daraufhin Licht im sichtbaren Bereich emittierten. Zur Detektion diente das Bildverarbeitungssystem „ChemiDoc XRS+ Imaging System“ der Firma Biorad.

2.5 Zellkultur

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

2.5.1 Zelllinien

293T/17-Zellen

Bei der 293T/17-Zelllinie handelt es sich um ein Derivat von primären, embryonalen Nierenzellen (auch bezeichnet als HEK "Human Embryonic Kidney"). Diese wurden mit Adenovirus 5 transformiert und enthalten Sequenzen des Virusgenoms (293-Zellen). In diese Zelllinie wurde das simian virus 40 (SV40) große T-Antigen einkloniert um eine besonders gute Transfizierbarkeit zu erhalten (293T). Die erhaltenen Klone wurden mit pBND und pZAP-Vektoren getestet um eine Linie zu erhalten, die besonders hohe Titer von Retroviren produziert. Dabei zeigte Klon 17 besonders gute Transfizierbarkeit (293T/17)(Pear et al., 1993).

Huh7-Zellen

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 Leberzelllinien (Nakabayashi et al., 1982)

Huh7 Lunet-Zellen:

Bei der Zelllinie Huh7-Lunet handelt es sich um einen Subtyp der Huh7-Linie. Der Subtyp wurde auf Grund seiner besonders guten Transfizierbarkeit und seiner hohen HCV-RNA-Replikation

isoliert(Blight et al., 2002; Lohmann et al., 1999).

Huh7.5-Zellen

Huh7.5 bezeichnet einen Subklon der Huh7-Zelllinie. Diese Zellen enthielten ursprünglich ein selektierbares HCV-Replicon, wurden jedoch durch die Behandlung mit Interferon- α „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 (Blight et al., 2002).

U937-Zellen

Die U937-Zelllinie wurde aus einem Gewebsmakrophagenlymphom eines 37 Jahre alten Patienten isoliert. Sie werden benutzt um das Differenzierungsverhalten von Monozyten zu untersuchen, da sie durch verschiedene chemische Stimuli dazu angeregt werden können, sich zu Makrophagen zu entwickeln (Larrick et al., 1980).

2.5.2 Puffer und Lösungen für die Zellkulturarbeit

1x PBS

NaCl	8,0 g/l
KCl	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ × 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 primären humanen Zellen muss grundsätzlich PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ verwendet werden, da diese Ionen die Zellen in den Waschschr

vorstimulieren könnten.

2.5.3 Zellkulturmedien

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

Medium zur Kultivierung von HEK 293T/17-Zellen

DMEM (1x) High Glucose (GIBCO)	
FKS, hitzeinaktiviert	10% (v/v)
HEPES	25 mM
Gentamicin	50 µg/ml

Medium zur Kultivierung von Huh7-Zellen

DMEM (1x) High Glucose (PAA)	
FKS, hitzeinaktiviert	10% (v/v)
NEAA	1 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Medium zur Kultivierung von Huh7.5-Zellen

DMEM (1x) High Glucose (Gibco)	
FKS, hitzeinaktiviert (Apath)	10% (v/v)
NEAA	1 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Medium zur Reifung von AB-Makrophagen

RPMI 1640

FKS, hitzeinaktiviert 20% (v/v)

humanes AB-Serum 5% (v/v)

Penicillin 100 U/ml

Streptomycin 100 µg/ml

Medium zur Reifung von M-CSF-Makrophagen

RPMI 1640

FKS (LPS-frei), hitzeinaktiviert 10% (v/v)

Penicillin 100 U/ml

Streptomycin 100 µg/ml

M-CSF 100 ng/ml

Medium zur Reifung von GM-CSF-Makrophagen

RPMI 1640

FKS (LPS-frei), hitzeinaktiviert 10% (v/v)

Penicillin 100 U/ml

Streptomycin 100 µg/ml

GM-CSF 1,4 µg/ml

Medium zur Reifung von iDC

RPMI 1640

FKS (LPS-frei), hitzeinaktiviert 10% (v/v)

Penicillin 100 U/ml

Streptomycin 100 µg/ml

GM-CSF $2,8 \times 10^5$ UIL-4 4×10^4 UMedium zur Reifung von mDC mit LPS

RPMI 1640	
FKS (LPS-frei), hitzeinaktiviert	10% (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
GM-CSF	$2,8 \times 10^5$ U
IL-4	4×10^4 U
LPS	250 ng/ml

Medium zur Reifung von mDC mit TNF- α

RPMI 1640	
FKS (LPS-frei), hitzeinaktiviert	10% (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
GM-CSF	$2,8 \times 10^5$ U
IL-4	4×10^4 U
TNF- α	500 ng/ml

Medium zur Reifung von U937-Zellen zu Makrophagen

RPMI 1640	
FKS, hitzeinaktiviert	10% (v/v)
PMA	16 nM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Medium zur Reifung von Neoheopatozyten I (SH-Medium)

RPMI 1640	
(ohne Farbindikator)	
Humanes AB-Serum,	
hitzeinaktiviert	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 μ g/ml

Medium zur Reifung von Neoheopatozyten II (HA-Medium)

RPMI 1640

(ohne Farbindikator)

Humanes AB-Serum,

hitzeinaktiviert 10% (v/v)

L-Glutamin 2 mM

β -Mercaptoethanol 0,1 mM

FGF-4 3 ng/ml

Penicillin 100 U/ml

Streptomycin 100 μ g/ml

Einfrriermedium

RPMI 1640 oder DMEM (1x)

High Glucose

FKS 20% (v/v)

DMSO 10 % (v/v)

2.5.4 Subkultivierung adhärenter Zellen

Adhärente Zelllinien wurden 80-90 % konfluent in Kultur gehalten. Dreimal pro Woche wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst, in frischem Kulturmedium aufgenommen und zur Stammhaltung 1:10 gesplittet. Die verwendeten Zellen wurden mit der VenorGem Mycoplasmen-PCR (siehe 2.5.6) untersucht und waren frei von Mycoplasmen.

2.5.5 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 über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter der Firma Nalgene gelagert und danach in der Gasphase über flüssigem Stickstoff langfristig gelagert.

Auftauen

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

2.5.6 Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind zellwandlose Organismen, 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 laidawii*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hominis* und *Mycoplasma salivarium* sind. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.6 Isolierung von peripheren Blutzellen

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 Hepatitis C-Virus-negativ.

2.6.1 Isolierung mononukleärer Zellen der peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation

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 Blutkonservenbeutel 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 (Troge Medical GmbH, Hamburg) 25-45 ml Blut entnommen. Die verwendeten Blutentnahme-Röhrchen (Monovette, Sarstedt) enthielten gerinnungshemmende Substanzen (Li-Heparin), 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 unverdünnt verwendet. 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 Suspension überschichtet. Um den Gradienten nicht zu zerstören, wurde 25 Minuten bei 350 g ohne Bremse zentrifugiert. Dabei trennten sich die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte (Abb. 9). 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. Die PBMC-enthaltende 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 Waschsritten für ca. 15 Sekunden in 5 ml Aqua_{bidest.} resuspendiert und unmittelbar danach mit 45 ml PBS versetzt wurden. Dieser hypotone Schock ermöglicht die selektive Lyse der Erythrozyten, während die PBMC intakt bleiben. Beim Aufnehmen der

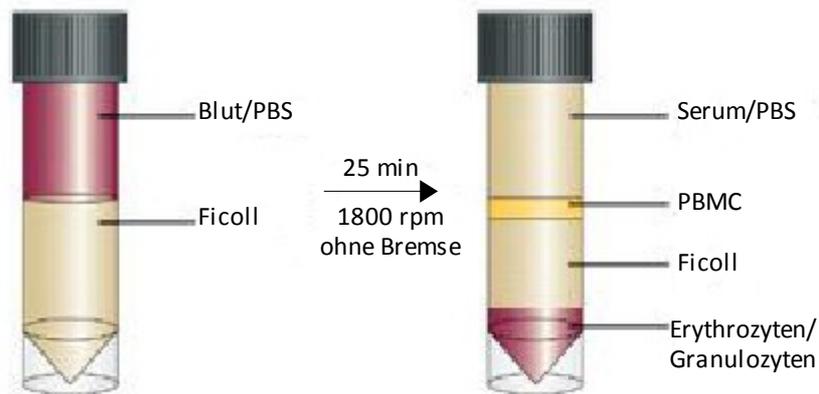


Abb. 9. Graphische Darstellung der Zell- und Flüssigkeitsschichten vor und nach der Dichtegradienten-Zentrifugation. Das Leukozyten-Konzentrat (Blut) wurde im Verhältnis 4:3 mit PBS verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Ficoll geschichtet. Nach einer 25-minütigen Zentrifugation bei 1800 rpm (ohne Bremse) trennten sich die Zellen auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichte in die dargestellten Schichten. Die PBMC sammeln sich dabei in einer Schicht zwischen Serum/PBS und Ficoll

Zwischenschicht wird stets ein Teil des Überstandes mitüberführt, so dass die PBMC mit Thrombozyten verunreinigt sind. Um diese zu entfernen wurde am Ende ein Waschschrift mit 10-minütiger Zentrifugation bei 100g durchgeführt. Das Pellet wurde in 30-50 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl im CASY bestimmt (siehe 2.6.4).

2.6.2 Adhärenz von Monozyten an Plastikoberflächen

Zur Differenzierung von Neohepatozyten, sowie zur Reifung von Makrophagen, musste die 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 2-4 h bei 37°C inkubiert. Die nicht adhärenen Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL, "peripheral blood lymphocytes") wurden abgenommen und verworfen. Die

adhärenten Monozyten wurden vorsichtig mit PBS bzw. Medium gewaschen und durch Zugaben von frischem Medium zu Makrophagen bzw. Neohepatozyten ausdifferenziert (siehe 2.7. und 2.8.).

2.6.3 Isolation von Monozyten aus PBMC mit magnetischen Kügelchen

Alternativ zu der in den Punkten 2.6.1 und 2.6.2 genannten Methode können Monozyten auch direkt mittels magnetischer Kügelchen aus den PBMC isoliert werden, ohne dass eine Adhärenz notwendig wird. Hierbei wird der nur auf Monozyten und Makrophagen stark exprimierte Marker CD14 ausgenutzt, wobei der Prozentsatz an Makrophagen in PBMC sehr niedrig ist. Die magnetischen Kügelchen (Milentyi, Bergisch Gladbach) sind mit einem Antikörper gegen humanes CD14 beschichtet. Werden die Kügelchen zusammen mit PBMC inkubiert, lagern sie sich an die Monozyten an. Werden die Zellen anschließend auf eine Säule gegeben, die von einem starken Magneten umgeben ist, bleiben die Monozyten zusammen mit den Kügelchen in der Säule während alle anderen Zelltypen ungehindert durchlaufen können. Durch Entfernen der Säule aus dem Magneten und Ausdrücken der Zellen mit einem Stempel werden die Monozyten unbeschadet entfernt. Laut Herstellerangaben schaden die auf der Zelloberfläche verbleibenden Kügelchen den Zellen in keiner Weise.

Verwendete Lösungen:

Waschpuffer

PBS

FCS (LPS-frei) hitzeinaktiviert 5 %
EDTA 2 mM

Durchführung:

PBMC wurden zweimal mit PBS bei 1400 rpm für 6 min gewaschen, bevor sie mit 1,6 ml Waschpuffer und 50 – 100 µl CD14-Kügelchen 30 min bei 4°C inkubiert wurden. Nach 15 min wurde die Zellsuspension einmal kurz durchmischt. Dann wurde mit 50 ml PBS gewaschen und das Pellet in 4 ml Waschpuffer aufgenommen. Die Säule wurde in den Magneten eingesetzt und mit 4 ml Waschpuffer equilibriert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde noch zweimal zurück auf die Säule gegeben, um möglichst viele Monozyten anzureichern. Anschließend wurde mit 4 ml Waschpuffer gespült, die Säule aus dem Magnet entfernt und mit weiteren 4 ml Waschpuffer mit dem Stempel die Zellen in eine frisches Reaktionsgefäß mit 20 ml PBS gedrückt. Danach wurde einmal gewaschen, das Pellet in 10 ml PBS zur weiteren Verwendung aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.6.4 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

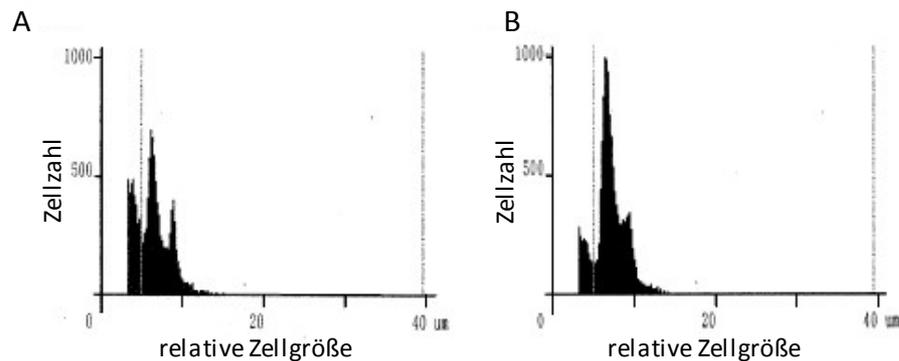


Abb. 10. Populationen der kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes nach Isolierung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (A) und anschließender Adhärenz (B). Dargestellt sind die Histogramme (A) von PBMC nach der Isolierung über einen Ficoll-Gradienten und (B) von Zellen (PBL) der entsprechenden Suspension nach Adhärenz an Plastikoberflächen. 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 Monozytenpopulation 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.

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. 10). 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.

2.7. *In vitro* Differenzierung in Neohepatozyten

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

Durchführung:

Zur Differenzierung von Neohepatozyten wurden frisch isolierte PBMC (siehe 2.6.1) in vorgewärmtes SH-Medium aufgenommen und in einer Dichte von $1,5 - 2 \times 10^6 / \text{cm}^2$ 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 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 wurden die nicht adhärennten PBL vorsichtig abgenommen und verworfen. Die adhärennten 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.

2.8 *In vitro* Differenzierung humaner Blut-Monozyten in Makrophagen

2.8.1 Differenzierung in AB-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. Bei AB-Makrophagen handelt es sich um eine gemische Population aus M-CSF-Makrophagen und GM-CSF-Makrophagen.

Durchführung:

Frisch isolierte PBMC (siehe 2.6.1) 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 % CO_2 wurden die nicht adhärenen PBL vorsichtig abgenommen und verworfen. Die adhärenen Monozyten wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und in frischem, vorgewärmtem Makrophagen-Reifungs-Medium aufgenommen. Alternativ wurden sie mittels des CD14-Markers mit magnetischen Kügelchen aus den PBMC isoliert. Die Kultivierung erfolgte mit einem Mediumwechsel am dritten Tag für sechs Tage bei 37°C und 5 % CO_2 .

2.8.2 Differenzierung in M-CSF-Makrophagen

Alternativ zur Differenzierung mit AB-Serum können Makrophagen *in vitro* mit Zytokinen wie dem „macrophage colony-stimulating factor“ M-CSF oder dem „granulocyte/macrophages colony-stimulating factor“ GM-CSF aus Monozyten isoliert werden. Dabei entwickeln sich zwei unterschiedliche Makrophagenpopulationen die in AB-Makrophagen beide enthalten sind.

Durchführung:

Zur Differenzierung in M-CSF-Makrophagen wurden CD14^+ Monozyten, die mit magnetischen Kügelchen aus PBMC isoliert wurden, in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte in 1 ml Differenzierungsmedium kultiviert. Am Tag drei wurde das Medium durch frisches Medium ausgetauscht.

2.8.3 Differenzierung in GM-CSF-Makrophagen

Die Differenzierung von GM-CSF-Makrophagen erfolgte Analog zur Differenzierung von M-CSF-Makrophagen (2.8.2) mit dem Unterschied, dass die Zellen in Medium zur Reifung von GM-CSF-Makrophagen

kultiviert wurden.

2.9 *In vitro* Differenzierung humaner Blut-Monozyten in Dendritischen Zellen

In vivo kommen Dendritische Zellen in zwei verschiedenen Reifungsstadien als unreife DC (iDC) und als reife DC (mDC) vor. *In vitro* ist es möglich, iDC aus CD34⁺ Vorläuferzellen oder aus CD14⁺ Monozyten zu differenzieren und anschließend zu mDC zu reifen. In dieser Arbeit wurden iDC aus CD14⁺ Monozyten mittels Inkubation mit GM-CSF und IL-4 zu iDC differenziert und unter Verwendung der Reifungsstimuli LPS oder TNF- α gereift.

Durchführung:

Zur Differenzierung in DC wurden über magnetische Kügelchen isolierte CD14⁺ Monozyten aus PBMC in Differenzierungsmedium in 6-Lochplatten in einer Dichte von 1×10^6 c/Loch gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. An Tag drei wurden 500 μ l des Mediums abgenommen und 6 min bei 1400 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 600 μ l frischem Medium aufgenommen und in die Lochplatte zurückgegeben. Dabei soll das größere Mediumvolumen die Verdunstung ausgleichen.

Zur DC-Reifung wurde das Medium an Tag 6 komplett abgenommen und 6 min bei 1400 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und die Zellen in 1 ml Reifungsmedium mit LPS oder TNF- α aufgenommen. Die Zellen werden zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂ ausgereift.

2.10 Isolation von primären humanen Hepatozyten aus Lebergewebe

Primäre humane Hepatozyten wurden in der Arbeit zur miRNA-Analyse verwendet. Bei den Zellen handelte es sich um pathologisch normal aussehendes Lebergewebe, das bei der chirurgischen Entfernung von Lebertumoren, großzügig mit dem eigentlichen Tumor entfernt worden war. Die Zellentnahme wurde von Professor Schilling, Abteilung Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Entnahme sofort in sterilem PBS aufbewahrt und bis zur weiteren Bearbeitung nicht länger als vier Stunden bei 4°C gelagert. Zur Entfernung des im Gewebe verbliebenen Blutes wurde das Leberstück mit PBS perfundiert. Das Leberstück wurde bis zur Isolation der miRNA bei -80°C gelagert.

2.11 miRNA-Analyse

2.11.1 Isolation der Total-RNA inklusive miRNA

Verwendete Lösungen:

RNase-freies Wasser

H₂O_{dd}

0,1 % DEPC

Durchführung:

Die im folgenden beschriebenen Versuche zur miRNA wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Meese, Humangenetik, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar durchgeführt. Zur Isolation der Total-RNA inklusive miRNA wurden die bei -80°C gelagerten Zellproben aufgetaut und in 10 ml RNase-freiem Wasser durch starkes Mischen resuspendiert. Danach wurden die Proben 10 min bei 5000g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Total-RNA wurde mittels des miRNeasy Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Hierzu wurde das Zellpellet in 700 µl QIAzol-Lysis-Reagenz aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen über Qiagen Shredder-Säulen gegeben. Dem Durchfluss wurde anschließend 140 µl Chloroform zugegeben, kurz gemischt und 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Zelllysat 15 min bei 14000 rpm und 4° zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthält nun die RNA, sie wurde abgenommen und mit der 1,5fachen Menge 100%igem Ethanol versetzt. Von dieser Mischung wurden je 700 µl auf eine Säule gegeben und 15 s bei 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Zentrifugationsschritt noch einmal mit 700 µl RWT-Puffer und zweimal mit 500 µl RPL-Puffer wiederholt, wobei der letzte Zentrifugationsschritt auf 2 min verlängert wurde. Zum Trocknen der Säule wurden sie 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend wurde die RNA durch eine einminütige Zentrifugation mit Elutionspuffer bei 13000 rpm eluiert. Die RNA-Konzentrationsbestimmung wurde wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben

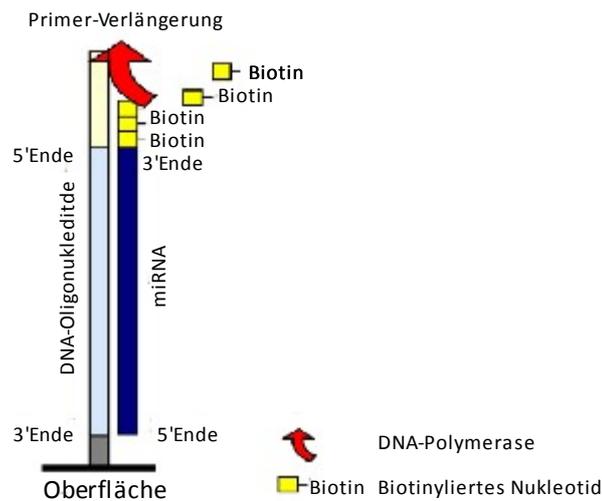


Abb. 11: Prinzip des „microfluidic primer extension assays“ MPEA. Die hybridisierte miRNA wirkt als Primer einer DNA-Polymerase die die miRNA um biotinylierte Nucleotide verlängert. Verändert nach Vorwerk et al. 2008

durchgeführt.

2.11.2 Qualitätsüberprüfung der Total-RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Qualitätsüberprüfung der isolierten RNA wurden die Proben durch Hitze denaturiert und anschließend auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Intakte RNA weist im Gel unter UV-Licht die drei charakteristischen Banden bei 5,1 kb (28S rRNA), 1,9 kb (18S rRNA) und bei 0,1 bis 0,3 kb (5.8S rRNA, 5S rRNA, tRNA) auf.

Verwendete Lösungen:

10x MOPS-Puffer

MOPS	0,2 M
NaCl	0,05 M

EDTA	0,01 M
DEPC	0,10%
PH 5,5 -7	
ü.N. bei 37°C inkubieren	

RNA-Ladepuffer

Deionisiertes Formamid	720 µl
10x MOPS-Puffer	160 µl
Ethidiumbromid	100 µl
Glycerin	80 µl
Gesättigte Bromphenolblau-Lsg	80 µl
RNase-freies Wasser	160 µl

Durchführung:

Zur Herstellung des Formaldehyd-Agarosegels wurde 0,5 g Agarose in 47,3 ml 1xMOPS-Puffer aufgelöst und bei 55°C für 30 min erwärmt. Des weiteren wurden 2,7 ml 37% Formaldehyd 30 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze zusammen gegeben und in eine Gelkammer gegossen. Die zu untersuchende RNA wurde mit RNA-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend für mindestens 1 h bei 80 Volt im Formaldehydgel aufgetrennt.

2.11.3 miRNA-Microarrayanalyse

Die Analyse der miRNA-Expression der verschiedenen Zelltypen mittels Biochip wurde mit dem Geniom Realtime Analyzer und dem Geniom® Biochip miRNA homo sapiens durchgeführt. Der Biochip enthält die komplementären Sequenzen zu allen 866 in der Sanger miRBase 12.0 niedergelegten miRNAs und „mature star“-Sequenzen.

Von diesen Sequenzen werden je sieben Replikate in zufälliger Verteilung auf den Biochip aufgebracht. Zusätzlich befinden sich synthetisch hergestellte Oligonukleotide als Kontrollsequenzen auf dem Chip.

Zur Detektion wurde der „microfluidic primer extension assay“ MPEA verwendet (Vorwerk et al., 2008). Hierbei wird die miRNA unmarkiert auf den Chip aufgebracht. Sie bindet aspezifische DNA-Oligonukleotide durch Hybridisierung. Die Oligonukleotide haben einen 5'-Poly-T-Überhang, der nicht mit der miRNA hybridisiert. Dadurch kann eine DNA-Polymerase mit zugesetzten, biotinylierten ATPs ein Biotin an jede gebundene miRNA anfügen. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 11 dargestellt. Dieses biotinylierte Nukleotide können im Geniom Realtime Analyzer nach Waschschritten und einer Signalverstärkung detektiert werden. Es entstehen Detektionsbilder, die mittels Geniom Wizard Software analysiert wurden. Die Rohwerte der Spotintensitäten wurden für jeden Array. Nach einer Hintergrundkorrektur wurde der Median der Intensitätswerte für die sieben Replikate jeder miRNA berechnet. Zur Normalisierung der Ergebnisse verschiedener Arrays wurde die Methode „Variance Stabilizing Normalization“ VSN angewendet. Für alle weiteren Analysen wurden die VSN-normalisierten Intensitätswerte herangezogen.

2.12. Immunzytochemische und immunhistochemische Färbungen

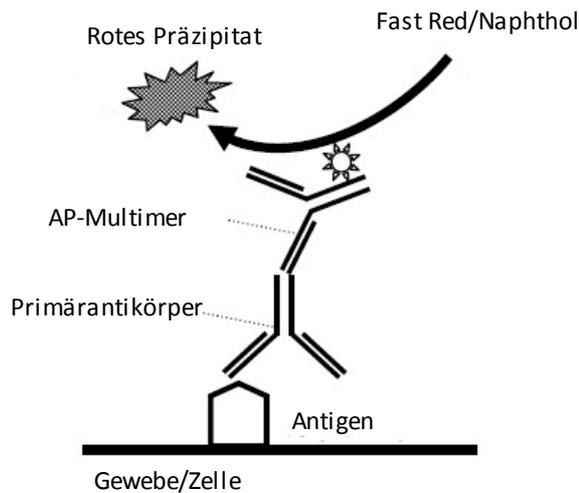


Abb. 12: Schematischer Aufbau der immunzytochemischen und immunhistochemischen Färbungen. In einem ersten Schritt bindet der Primärantikörper an des Antigen auf der Zelle oder dem Gewebe. In einem zweiten Schritt bindet der Sekundärantikörper, der an alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt vorliegt, an den Fc-Teil des Primärantikörpers. In dem dritten Schritt setzt die AP die Substrate Fast Red und Naphthol in einen roten Farbstoff um, der in dem umgebenden Puffer nicht löslich ist und ausfällt. Die Detektion erfolgt im Mikroskop.

Die immunzytochemischen und immunhistochemischen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bohle, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen bzw. die mit dem Mikrotom erzeugten Leberschnitte auf Objektträgern in Formalin fixiert. Die Färbungen wurden automatisch in der BenchMark Ultra der Firma Ventana Medical Systems Inc, Tucson, Arizona nach Standardprotokollen des Herstellers durchgeführt. Das Detektionssystem „ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit“ war ebenfalls von Ventana.

Bei der Immunzytochemie bzw der Immunhistochemie unterscheidet man direkte und indirekte Verfahren, bei erstem ist der Primärantikörper bereits an ein Enzym gekoppelt, was den direkten Nachweis des Antigens erlaubt. Bei letztem ist der Primärantikörper

ungekoppelt und es wird ein sekundärer, enzymgekoppelter, gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichteter, Antikörper zugegeben. Hierbei wurde das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Bei beiden Verfahren erfolgt die Visualisierung des Antigens durch die enzymatische Umsetzung der farblosen Substrate Fast Red und Naphthol zu einem roten, unlöslichen Farbstoff. In dieser Arbeit wurden ausschließlich indirekte Methoden angewendet. Nach den Antikörperschritten werden die Zellkerne mit Hematoxylin II angefärbt und anschließend mit einer „Bluing Solution“ umgefärbt. Das Prinzip der Antikörperbindung ist in Abb. 12 dargestellt.

2.13. Herstellung viraler Pseudotypen

Pseudoviren sind chimäre virale Partikel, die aus Bestandteilen verschiedener Viren bestehen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pseudoviren bestehen aus einem HIV-Rückgrat, den HCV-Oberflächenproteinen E1/E2 und einem Gen für ein EGFP-

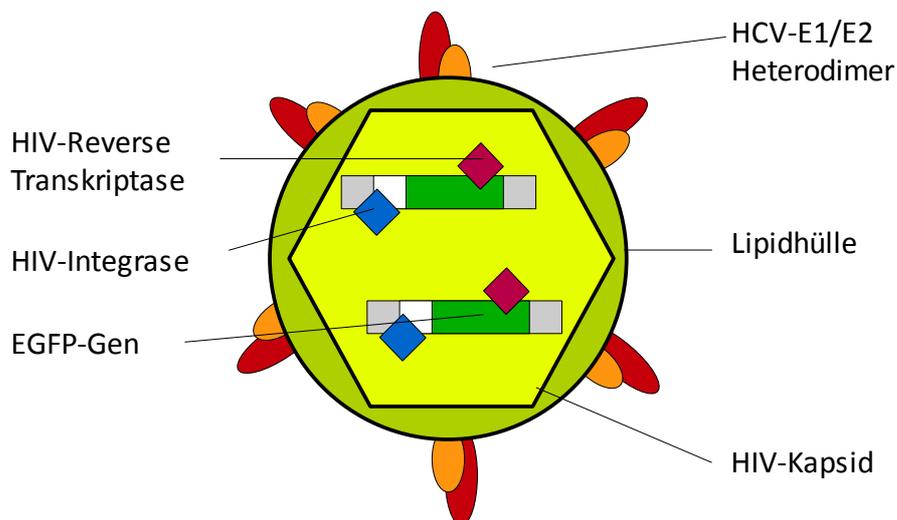


Abb. 13: Schematische Darstellung der HIV-HCVpp. Der chimäre Viruspartikel besteht aus HIV-Bestandteilen wie dem Kapsid und Enzymen Reverse Transkriptase und Integrase sowie den HCV-Oberflächenproteinen E1 und E2. Diese sind als Heterodimer in die Lipidhülle eingelagert. Im doppelt vorhandenen RNA-Genom befindet sich das Gen für das Markerprotein EGFP.

Tab.4: Mengen der zur HIV-HCVpp-Herstellung verwendeten Plasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung	Eingesetzte Menge / 10cm Platte
pM334	HIV-core	12,5 µg
pM420	EGFP	7,5µg
pM480	HCV-E1 und -E2	2µg

Markerprotein. Der schematische Aufbau der verwendeten HIV-HCVpp ist in Abb. 13 dargestellt. Die generierten Partikel sind in der Lage Zielzellen zu infizieren, es entstehen aber keine weiteren infektiösen Viruspartikel. Die Visualisierung infizierter Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

2.13.1. Herstellung von HCV-Pseudotypen (HIV-HCVpp)

Bei den in dieser Arbeit generierten HCV-Pseudotypen (HIV-HCVpp = "HIV-HCV pseudo particles") handelt es sich um eine Kombination retroviraler Partikel ohne Hüllproteine mit den nativen HCV-Glykoproteinen E1 und E2 sowie einem Gen für das Markerprotein EGFP kodiert in der verpackten RNA.

Verwendete Lösungen:

Transfektions-Medium:

DMEM 1 x High Glucose

Chloroquin 25 µM

Penicillin 100 U/ml

Streptomycin 100 µg/ml

CaCl₂ Lösung:

CaCl₂ 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), mittels CaCl₂-Transfektion in 293T/17-Zellen eingebracht. Dazu wurden am Vortag der Transfektion 293T/17-Zellen in einer Zelldichte von $9 \times 10^4 / \text{cm}^2$ in 10cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden definierte Mengen der einzelnen Expressionsplasmide (Tab. 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/17-Zellen getropft, die vorher in Transfektions-Medium aufgenommen worden waren. Nach sechs Stunden wurde der Zellüberstand entfernt und durch Standard-Medium ersetzt. Die Ernte der sezernierten Pseudotypen erfolgte 24 und 48 Stunden nach erfolgter Transfektion durch Abnahme der Zellüberstände und Lagerung bei 4°C. Zur Entfernung möglicher Zellreste wurden die gepoolten Überstände zehn Minuten bei 1000 g zentrifugiert, bevor die HIV-HCVpp-Lösung durch eine 0,45 µm-große Membran filtriert wurde. Die HCV-Pseudotypen wurden anschließend mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Dazu wurden jeweils 29 ml der

HIV-HCVpp-Lösung mit 5 ml einer 20 %-igen Saccharose-Lösung unterschichtet und anschließend zwei Stunden bei 24000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman Coulter, Optima L-90k Ultrazentrifuge, SW28 Rotor). Die HIV-HCVpp-Pellets wurden nach der Zentrifugation in jeweils 100µl RPMI aufgenommen und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die konzentrierten HIV-HCVpp-Lösungen wurden vereinigt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.14 Infektionsstudien unter Verwendung viraler Pseudotypen

Virale Pseudotypen sind in der Lage durch Anlagerung ihrer Oberflächenproteine rezeptorspezifisch 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 (2.15) ausgewertet. Wachstumsaktive Zelllinien (Huh7) mussten dabei am Vortag der Infektion in den Gewebekulturplatten ausgesät werden, während die Neohepatozyten direkt in den entsprechenden Platten ausdifferenziert wurden.

2.14.1. Titration viraler Pseudotypen

Die Infektiosität 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 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 900 g und 31°C im Auslenkrotor zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten in den Brutschrank transferiert, wo sie 4-6h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden für weitere 72 h in regulärem Huh7-Medium kultiviert. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in FACS-FIX aufgenommen und noch am gleichen oder dem folgenden 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:

$$iP/ml = \frac{\text{EGFP}^+ \text{ Zellen}}{100} \times \text{Zellzahl} \times \frac{1000}{V_{\text{HIV-HCVpp}}}$$

iP/ml	infektiöse Partikel/ml
EGFP ⁺ Zellen	EGFP positive Zellen in %
V _{HIV-HCVpp}	Volumen Pseudotyp [µl]

2.14.2. Infektionsstudien mit viralen Pseudotypen

Die Infektion adhärenter Zellen erfolgte generell wie in 2.14.1

beschrieben. Das Volumen der eingesetzten Pseudotypen orientierte sich am Titer der eingesetzten Pseudotypen sowie an der Zellzahl der zu infizierenden Zellen. Die „multiplicity of infection“ MOI ergibt sich gemäß folgender Formel:

$$\text{MOI} = \frac{\text{iP/ml} \times V_{\text{HIV-HCVpp}}}{\text{Zellzahl}}$$

MOI	„multiplicity of infection“
iP/ml	infektiöse Partikel/ml
$V_{\text{HIV-HCVpp}}$	Volumen Pseudotyp [ml]

Umgestellt nach „ $V_{\text{HIV-HCVpp}}$ “ wird errechnet welches Volumen Pseudotyp pro Ansatz benötigt wird. Die Zellzahl in den zu infizierenden Ansätzen wurde am Tag der Infektion mittels CASY[®] bestimmt. Die entsprechenden Volumina an, in Zellkultur-Medium gelösten, Pseudotypen wurde zu den Zielzellen gegeben. Um einen Einfluss von humanem oder fötalem Serum auf die Infektionsrate auszuschließen, wurden die Infektionen in serum-freien Zellkulturmedien durchgeführt. Die Anlagerung der viralen Partikel an die Oberfläche der Zielzellen wurde erleichtert, indem die Ansätze eine Stunde bei 900 g und 31°C im Auslenkrotor zentrifugiert wurden. Nach einer sechsständigen Inkubation im Brutschrank wurde der infektiöse Überstand entfernt und die Zellen wurden für weitere 72 h in regulärem Zellkultur-Medium kultiviert. Zur FACS-Analyse wurden die Huh7-Zellen mit Trypsin, die Neohepatozyten mit Akkutase von der Gewebekulturplatte abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Fix aufgenommen und noch am gleichen oder dem folgenden Tag im Durchflusszytometer untersucht.

2.15 Durchflusszytometrie

2.15.1. Allgemeines zur Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder „fluorescence activated cell sorting“ - (FACS)-Analyse stellt eine Methode zur Untersuchung 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. 14 und 15). Die Einheit der FACS-Analyse ist somit die relative Lichtintensität. Die Darstellung erfolgt mit Hilfe eines sogenannten Punktwolkendiagramms, „dot plot“, bei dem die beiden Werte gegeneinander aufgetragen werden. Mit Hilfe eines „gates“ ist es möglich, die zu analysierende Zellpopulation weiter einzugrenzen. Die zu untersuchenden Zellen exprimieren entweder selbst ein fluoreszierendes Molekül (hier EGFP) oder werden mit Antikörpern fluoreszenzmarkiert. 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 in Histogrammen oder Punktwolkendiagrammen dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein FACScan der Firma Becton Dickinson benutzt. Die Messung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des CellQuest™ Programms Version Mac AppR 3.0.1.

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. 15)). Die Expression der verschiedenen Antigene wurde mit direkt bzw. indirekt markierten Antikörpern untersucht. 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. 16 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.

Neben der Antigen-Expression wurde die FACS-Analyse zusätzlich zur Detektion des fluoreszierenden Markerproteins EGFP verwendet. Die Darstellung erfolgte dabei mit Hilfe eines Punktwolkendiagramms, bei dem die EGFP-Fluoreszenz gegen die Zellgröße aufgetragen wurde. 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. Innerhalb dieser Population wurde dann durch Setzen eines regionalen "Markers" (R2)

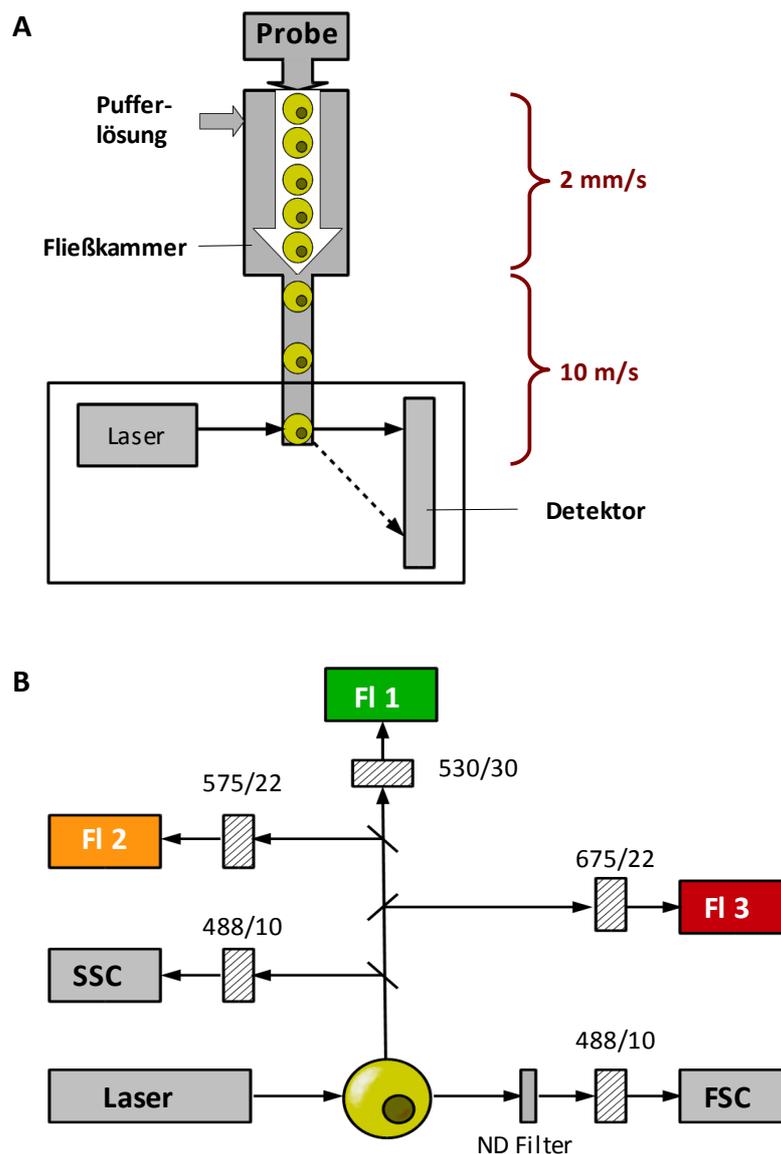


Abb. 14.: Schematischer Aufbau eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters ("fluorescence activated cell sorter" FACS) A: Zur durchflusszytometrischen Messung werden die Zellen der Probe entweder zunächst mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt oder sie exprimieren ein fluoreszierendes Protein. Im Gerät werden die Zellen durch Überdruck stark beschleunigt, so dass sie beim Eintreten in die Meßkammer vereinzelt und am Meßpunkt fokussiert werden. **B:** Die gleichzeitige Messung des Vorwärts- („forward scatter“ FSC) und des 90°-Seitwärtsstreulichtes („side scatter“ SSC) ermöglicht dabei die Bestimmung der relativen Zellgröße sowie der relativen Zellgranularität. Durch den enthaltenen Argon-Laser werden zudem die an die Antikörper gebundenen Fluorochrome bzw. das exprimierte Fluoreszenzprotein zur Lichtemission angeregt. Die Emission wird über halbdurchlässige Spiegel durch Bandpassfilter zu den Detektoren der jeweiligen Fluoreszenz geleitet.

FI 1 = Fluoreszenz 1, ND Filter = neutral density filter, schraffiert = Bandpassfilter.

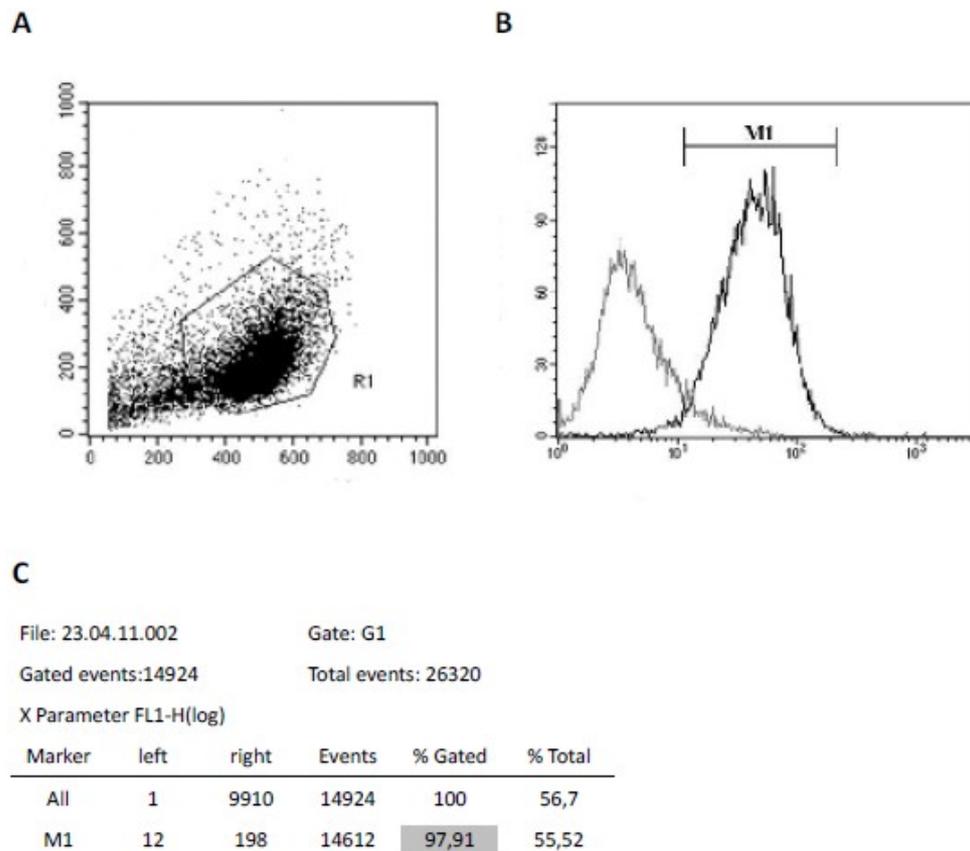


Abb. 15: Darstellung der Größe und Granularität von Huh7-Zellen, der Expression von CD81 innerhalb der Zell-Population und der statistischen Auswertung. **A:** Bei der Darstellung der Größe gegen die Granularität können mit Hilfe eines "gates" die toten Zellen und Zelltrümmer von der Messung ausgeschlossen werden. **B:** Innerhalb der Population wurden als Histogramm die CD81-positiven Zellen dargestellt, zusätzlich wurde als Negativkontrolle das Histogramm von unmarkierten Zellen darüber gelegt. **C:** Durch das Setzen eines Markers (M1) lässt sich eine Statistik bezüglich des prozentualen Anteils der CD81-positiven Population berechnen. 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.

der prozentuale Anteil EGFP positiver Zellen ermittelt. Als Referenzwert diente dabei ein "dot plot" nicht-infizierter Zellen (Abb. 16 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. 16 B und D).

2.15.2. Färbung von Oberflächen-Antigenen zum durchfluss-

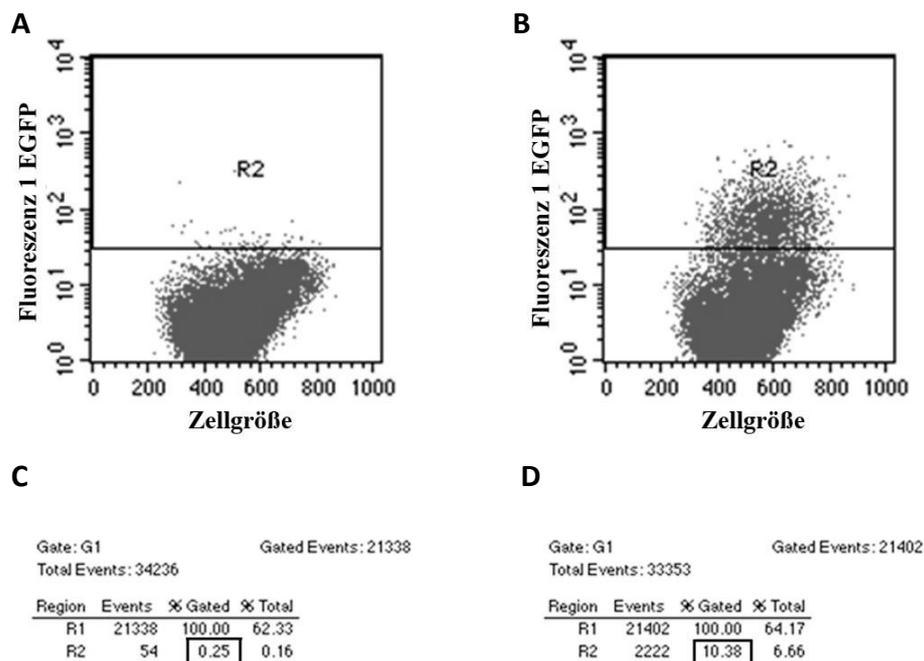


Abb. 16.: Analyse der EGFP-Expression in HIV-HCVpp-infizierten Huh7-Zellen mittels Punktwolken-Diagramm. Nach Selektion der lebenden Zell-Population wurde ein Ansatz nicht-infizierter Huh7-Zellen (A) einer HIV-HCVpp-infizierten Probe (B) gegenübergestellt. Durch das Setzen eines regionalen Markers (R2) 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.

zytometrischen 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

FKS 2%

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 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 min 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 100-150 μ l Fixierlösung aufgenommen. Die fixierten Zellen konnten bis zur FACS-Analyse für mehrere Tage im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt werden.

2.15.3. 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 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 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 3 min lang bei 250 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Antikörper wurden direkt in die verbleibende Flüssigkeit pipettiert, und die nachfolgende Färbung wurde, wie unter 2.15.2. beschrieben, durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Unterschiede zwischen Huh7-Zellen und primären Hepatozyten

Ziel dieser Versuche war es die Qualität von Huh7-Zellen als Infektionssystem für HIV-HCVpp-Infektionsstudien zu überprüfen. Hierzu wurde die Zelllinie immunzytochemisch und bezüglich des miRNA-Profiles mit primären Hepatozyten verglichen. Bei der Untersuchung des miRNA-Profiles wurden darüber hinaus Vergleiche zwischen verschiedenen Huh7-Subtypen mit der Ursprungszelle angestellt.

3.1.1 Immunzytochemische und immunhistochemische Untersuchungen an Huh7-Zellen und primären Hepatozyten

Gewebeschnitte aus pathologisch normal aussehendem, an Lebertumore angrenzendem, Lebergewebe wurden ebenso wie auf Objektträger geheftete Huh7-Zellen in Formalin fixiert. Die Anfärbung der Antigene erfolgte mit ungekoppelten Antikörpern. Durch Zugabe von Alkalische Phosphatase-gekoppelte Sekundärantikörper, die gegen den Fc-Teil der Primärantikörper gerichtet waren, konnte am Expressionsort der Antigene das Substrat Fast Red/Naphthol von dem Enzym in einen unlöslichen roten Farbstoff umgesetzt werden. Es wurden Antikörper gegen den Makrophagenmarker CD68 und gegen das leberspezifische hepatozytäre Antigen zur Charakterisierung der Zellen verwendet. Nach Antikörpermarkierungen wurden die Zellkerne mit Hematoxylin II angefärbt und anschließend mit einer „Bluing Solution“ umgefärbt. Die Ergebnisse der

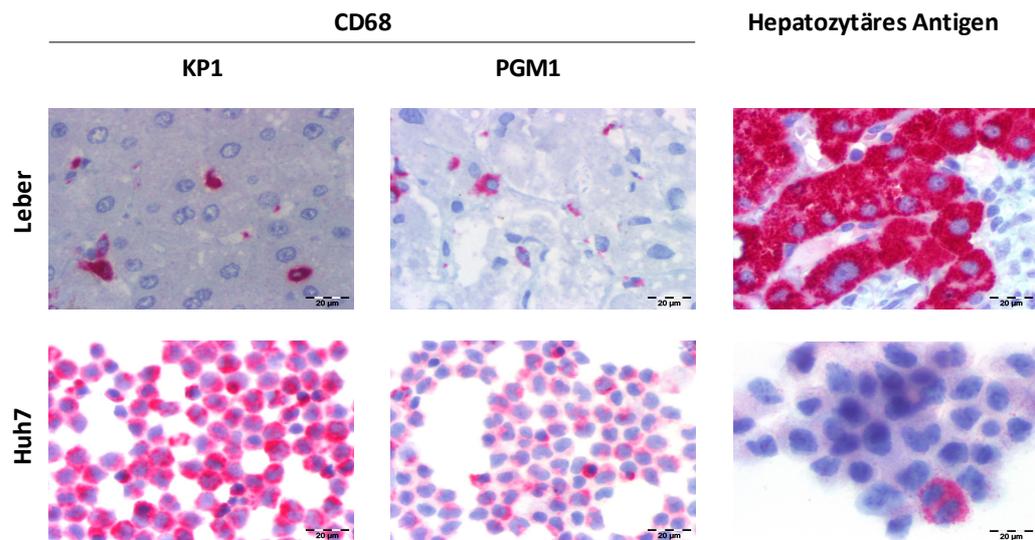


Abb. 17: Immunzytochemische bzw. immunhistochemische Färbung von Huh7-Zellen und Leberschnitten mit zwei verschiedenen CD68-Antikörpern und einem Antikörper gegen das hepatozytäre Antigen. Gewebeschnitte aus an Lebertumore angrenzende pathologisch normalem Lebergewebe und an Objektträger geheftete Huh7-Zellen wurden in Formalin fixiert und mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit dem Farbstoff Fast Red/Naphthol. Das Antigen exprimierende Zellen wurden dadurch rot angefärbt.

immunzytochemischen Färbung sind in Abb.17 dargestellt. Dort ist zu erkennen, dass auf PHH CD68 von beiden Antikörpern nicht detektiert werden konnte. Lediglich der in Lebergewebe häufige Makrophagentyp der Kupffer'schen Sternzellen konnte mit beiden Antikörpern angefärbt werden. Genau entgegengesetzt verhält es sich bei der Färbung nach dem hepatozytären Antigen bei Leberschnitten. Hier wurden nur die PHH angefärbt und die Kupffer'schen Sternzellen blieben ungefärbt. Die Huh7-Zellen wurden von beiden CD68-Antikörpern KP1 und PGM1 angefärbt, dabei ist die Signalstärke bei KP1 im Vergleich zu PGM1 erhöht. Es fällt auf, dass die Signalstärke zwischen den Zellen nicht identisch ist, also einige Zellen stärker angefärbt werden als andere. Der Antikörper gegen das hepatozytäre Antigen verursacht bei Huh7-Zellen weitestgehend nur eine schwache Hintergrundanfärbung, lediglich einige wenige Zellen exprimieren das hepatozytäre Antigen deutlich stärker.

3.1.2 miRNA-Analysen an Huh7-Zellen und primären Hepatozyten

Aus PHH von zwei Donoren sowie aus den Zelllinien Huh7, Huh7.5 und Huh7-Lunet wurde die Total-RNA isoliert und mittels MPEA auf dem Geniom® Biochip miRNA homo sapiens hybridisiert. Die Analyse der miRNA-Expression wurde mit dem Geniom Realtime Analyzer gemessen. Aus den resultierenden Detektionsbildern wurden nach der Normalisierung mit der VSN-Methode mittels Geniom Wizard Software die miRNA-Charakteristik der fünf Proben visualisiert. Aus diesem Datensatz wurde eine „Heatmap“ der hierarchischen Gruppierung der 19 unterschiedlichsten miRNAs der fünf Zellproben erstellt (Abb 18A). Bei der gewählten Darstellungsform korreliert rote Farbe mit einer starken Expression der miRNA, schwarz mit einer mittleren Expressionsstärke und grün mit einer niedrigen Expressionsstärke. Es ist zu erkennen, dass sich die PHH in ihrem miRNA-Profil von den Zelllinien unterscheiden. Auffällig ist die deutlich stärkere Expression der miRNA-122 bei den primären Zellen. Huh7.5-Zellen und Huh7-Lunet-Zellen exprimieren diese miRNA zwar schwächer als PHH aber stärker als Huh7. Aus den Unterschieden und Gemeinsamkeiten der gesamten miRNAs wurde ein „Verwandschaftsbaum“ berechnet (Abb. 18 A oben). Es ist zu erkennen, dass sich die primären Leberzellen von den Zelllinien klar trennen. Die Subtyp der Huh7-Zelllinie Huh7.5 liegt näher an den PHH als Huh7 und Huh7-Lunet-Zellen. Um die Expression der miRNAs der Zelltypen untereinander darzustellen wurde eine Korrelationsmatrix erstellt (Abb. 18 B). Bei dieser Darstellung steht gelb für einen Korrelationsfaktor von 1, also eine 100%ige Deckungsgleichheit und dunkelblau für einen Korrelationsfaktor von 0, also absolut keine

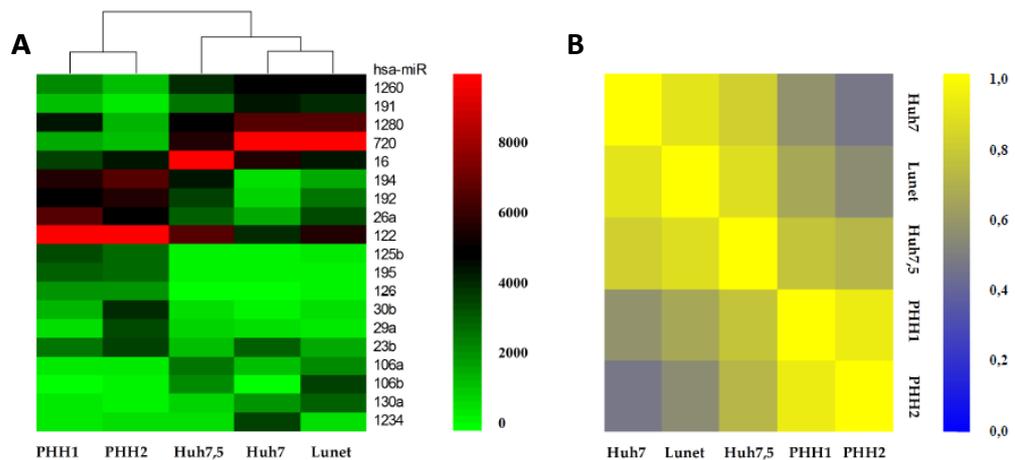


Abb. 18: miRNA-Charakteristika von primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien. A: „Heatmap“ der hierarchischen Gruppierung der 19 unterschiedlichsten miRNAs von zwei Donoren PHH und drei hepatischen Zelllinien (Huh7, Huh7.5 und Huh7 Lunet (Lunet)). Die analysierten Proben sind auf der X-Achse aufgetragen, die miRNAs auf der Y-Achse. Rote Farbe steht für eine starke Expression der miRNA, während grüne Farbe mit niedriger Expression korreliert. Die Expressionsstärke schwankt zwischen 0 und 10000. Die Proben können in zwei Gruppen unterteilt werden; links die zwei PHH Donoren und rechts die drei Zelllinien. **B:** Farbcodierte Korrelation der miRNA-Expressionsmuster von primären Hepatozyten und drei hepatischen Zelllinien. Starke Ähnlichkeit wird gelb angezeigt, schwache dunkelblau.

Gemeinsamkeit. Eine Besonderheit dieser Darstellung ist die Korrelation jeder Zellprobe mit sich selbst, die sich in der gelben Diagonalen niederschlägt. Es zeigte sich, dass PHH der beiden Donoren am stärksten untereinander korrelieren. Ebenso kommt es zu einer Korrelation zwischen den Zelllinien.

3.2 Neohepatozyten sind effizient mit HIV-HCVpp infizierbar

3.2.1 Neohepatozyten sind die einzigen mit HIV-HCVpp infizierbaren Zellen monozytärer Herkunft

Die Untersuchungen des HCV-Zelleintritts in hepatische Zellen kann erst seit der Entwicklung sogenannter Pseudotypen untersucht werden. Dabei handelt es sich um hybride Viren aus HIV und HCV (HIV-

HCVpp) die aus stabilen HIV-Strukturen, den Oberflächenmolekülen E1 und E2 von HCV sowie aus einem EGFP als Reportersystem bestehen. Die verwendeten HIV-HCV-Pseudoviren wurden durch Cotransfektion der drei Plasmide HIV Δ env, HCV E1/E2 und EGFP in 293T/17-Zellen hergestellt. Die gesammelten Zellüberstände wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert und der Titer durch Infektion von Huh7-Zellen bestimmt. Der Erfolg der Infektion wird 72 h nach Viruszugabe im Durchflusszytometer bestimmt. Hierzu werden die Zellen abgelöst, gewaschen und fixiert ehe sie im Durchflusszytometer gemessen werden, mit dem die Prozentzahl EGFP-positiver Zellen durch Anregung mit einem Laser bestimmt werden kann.

Zur Untersuchung der Infizierbarkeit von Neohepatozyten im Vergleich zu anderen Zellen monozytärer Herkunft wurden PBMC aus dem Erythrozytenkonzentrat eines repräsentativen Spenders isoliert, auf vier Ansätze aufgeteilt und die Monozyten mittels Adhärenz abgetrennt. Ein Ansatz wurde sechs Tage in AB-Makrophagen-Medium zu AB-Makrophagen differenziert, zwei Ansätze wurden sechs Tage in SH-Medium zu PCMO differenziert und einer der PCMO-Ansätze wurde zehn Tage in HA-Medium zu Neohepatozyten differenziert. Jeder Zelltyp wurde zum Zeitpunkt der terminalen Differenzierung (Monozyten d1, Makrophagen und PCMO d6, Neohepatozyten d16) mit HIV-HCVpp mit einer MOI von 0,1 infiziert. Als Positivkontrolle der Infizierbarkeit wurden Huh7-Zellen analog infiziert. Zweiundsiebzig Stunden nach der Viruszugabe wurden die Zellen abgelöst, gewaschen, in FACS-Fix fixiert und innerhalb von 24 h im Durchflusszytometer gemessen. Die Ergebnisse der Infektion sind in Abb. 19 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass weder Monozyten

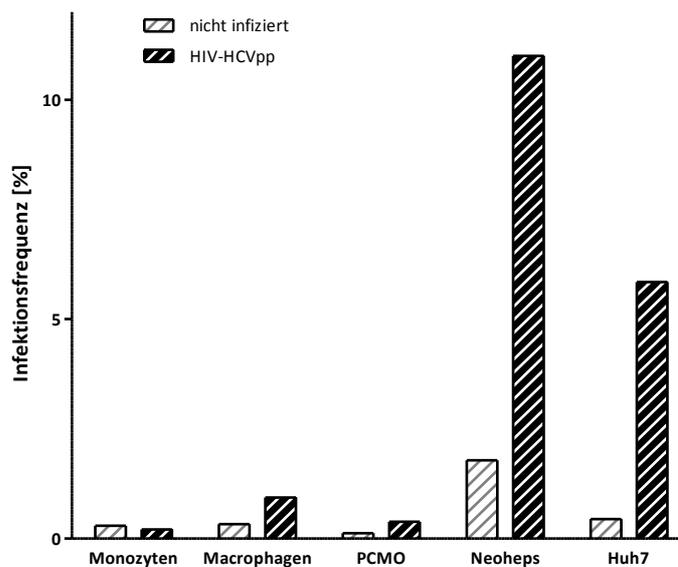


Abb. 19: Infektionsfrequenz von HIV-HCVpp-infizierten Monozyten, Makrophagen, PCMO und Neohepatozyten von einem Donor. Monozyten aus dem „buffy coat“ eines repräsentativen Donors wurden mit AB-Serum zu Makrophagen oder mit SH-Medium erst zu PCMO und dann mit HA-Medium zu Neohepatozyten differenziert. Jeder genannten Zelltyp sowie Huh7-Zellen wurden mit HIV-HCVpp (MOI 0,1) infiziert. Dargestellt sind die Infektionsfrequenzen der infizierten Zellen in schwarz und der uninfizierten Kontrollen in weiß.

noch Makrophagen oder PCMO effizient mit HIV-HCVpp infiziert wurden. Einzig Neohepatozyten als einzige Zellen monozytärer Herkunft und die Huh7-Zellen zeigen ein positives EGFP-Signal nach der Infektion. Um diese Beobachtung näher zu untersuchen wurde ein zweistufiges Verfahren gewählt. Zuerst sollte die Differenzierung der Neohepatozyten anhand der hepatischen Marker Albumin, Cytokeratin-18 und Cytokeratin-19 sowie der HCV-Eintrittsfaktoren CD81, CLDN1, SRBI und OCLN überprüft werden. In einem zweiten Schritt sollte die Expression der Eintrittsfaktoren auf allen Zellen monozytärer Herkunft verglichen werden. Für die FACS-Färbung der Oberflächenmoleküle wurden die lebenden Zellen durch Zugabe fluoreszenzgekoppelter Antikörper angefärbt. Zur Färbung der intrazellulären Antigene wurden die Zellen erst fixiert und dann mit Saponin permeabilisiert. Anschließend konnten fluoreszenzgekoppelte

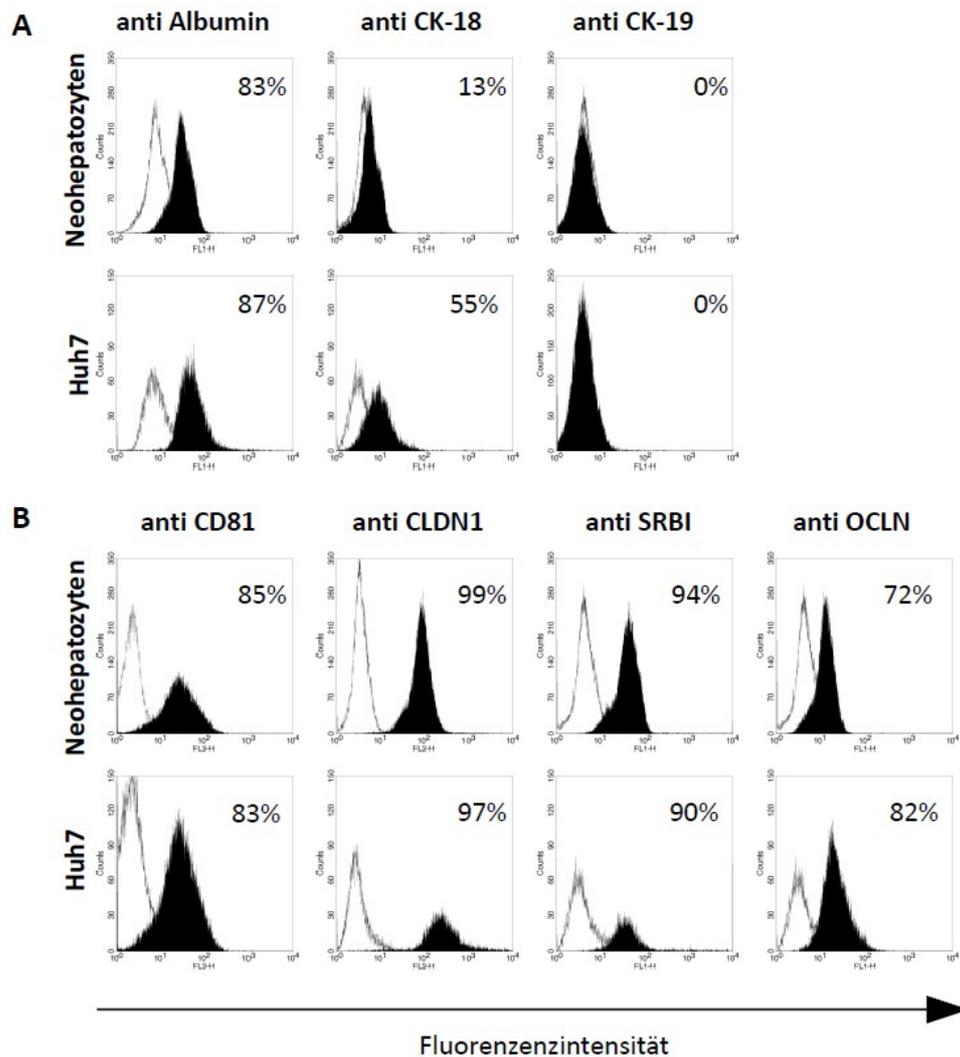


Abb. 20: Expressionsmuster hepatischer Marker und der HCV-Eintrittsfaktoren auf Neohepatozyten eines repräsentativen Donors und Huh7-Zellen. A: Expressionsstärke des hepatozyten-spezifischen Markerproteins Albumin und der epithelialen Marker Cytokeratin-18 (CK-18) für reife Zellen und Cytokeratin-19 (CK-19) für unreife Zellen. **B:** Expressionsstärke der HCV-Eintrittsfaktoren CD81, Claudin-1 (CLDN1), SRBI und Occludin-1 (OCLN). Die FACS-Färbung der Oberflächenantigene erfolgte direkt auf lebenden Zellen durch Zugabe Protein-spezifischer fluoreszenzgekoppelter Antikörper. Die intrazellulären Antigene wurden nach Fixierung der Zellen und Permeabilisierung mit Saponin mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern angefärbt. Die Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist die Expressionsfrequenz abzüglich des Hintergrundes durch Bindung unspezifischer Isotyp-Kontrollantikörper.

Antikörper in die Zellen eindringen und an ihr Antigen binden. Die Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch gemessen. In Abb. 20 sind die Expressionsmuster der hepatischen Marker und der HCV-Eintrittsfaktoren von Neohepatozyten dargestellt. Als Kontrolle dienen Huh7-Zellen. Es ist zu sehen, dass die Expressionswerte der

hepatischen Marker und der HCV-Eintrittsfaktoren der Neohepatozyten weitestgehend denen der Huh7-Zellen entsprechen. Einzige Ausnahme hiervon ist die Expression von CK-18, das nur auf 13% der Neohepatozyten angefärbt werden konnte aber auf 55% der Huh7-Zellen. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass es sich bei den Neohepatozyten um reife enddifferenzierte Zellen mit epithelialem und hepatischem Charakter handelt. Dabei entsprachen die beobachteten Expressionsmuster den in der Arbeitsgruppe beobachteten üblichen Werten für Neohepatozyten.

Im zweiten Schritt der Untersuchung wurden erneut PBMC aus Erythrozytenkonzentraten zweier Donoren (Do 1 und Do 2) isoliert, die Monozyten über Adhärenz abgetrennt, auf zwei Ansätze aufgeteilt und die Monozyten mittels Adhärenz abgetrennt. Ein Ansatz wurde sofort zur FACS-Färbung verwendet ein zweiter wurde sechs Tage in AB-Makrophagen-Medium zu Makrophagen differenziert. Aus den PBMC zweier weiterer Donoren (Do 3 und Do 4) wurden nach dem beschriebenen Protokoll Neohepatozyten differenziert. Zusätzlich wurden PHH zweier weiterer Donoren (Do 5 und Do 6), die freundlicherweise von der AG Robinet, Unité Inserm U.748 der Universität Straßburg zur Verfügung gestellt wurden, aufgetaut und ebenfalls für die FACS-Färbung verwendet. Zusätzlich dienten Huh7- und Huh7.5-Zellen als Kontrolle. Die Färbung erfolgte nach oben genanntem Prinzip. Die Ergebnisse der Messung sind in Abb. 21 und Tab 5 dargestellt. Es ist zu sehen, dass alle untersuchten Zellen CD81 exprimieren, einzig Donor 5 der PHH zeigt eine Expressionsfrequenz von 29%, alle anderen Zellen zeigen eine Expressionsrate zwischen 70 und 94 %. CLDN1 wird auf Monozyten und Makrophagen in einer

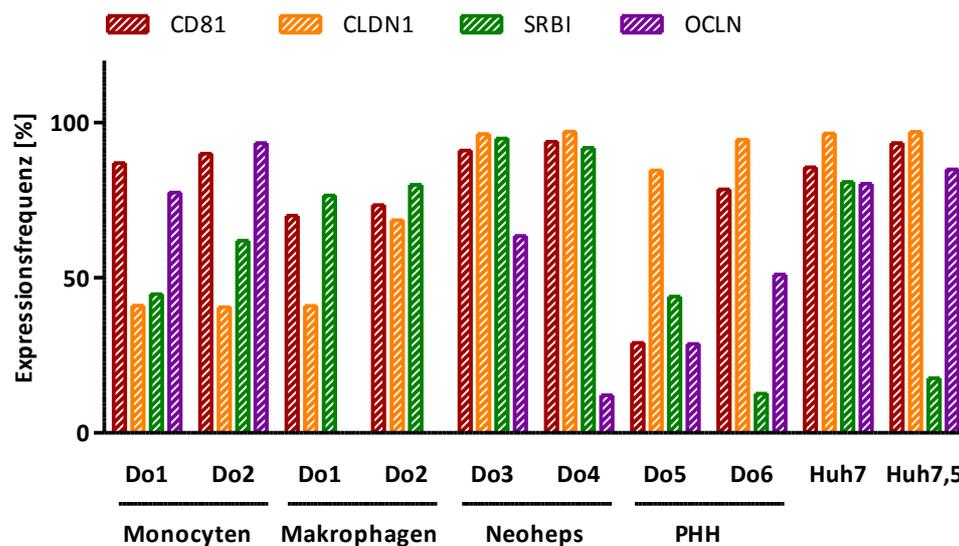


Abb. 21: Expressionsmuster der vier HCV Eintrittsfaktoren auf Monozyten, Makrophagen, Neohepatozyten, primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.

Der Nachweis der Antigene erfolgte mit FITC-gekoppelten primären Antikörpern (CD81, OCLN), FITC-gekoppelte sekundäre Antikörper (SRBI) und PE-gekoppelte sekundäre Antikörper (CLDN1). Die Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist die Expressionsfrequenz abzüglich des Hintergrundes durch Bindung unspezifischer Isotyp-Kontrollantikörper.

Tab. 5: Prozentuale Expressionsrate der vier HCV-Eintrittsfaktoren auf Monozyten, Makrophagen, primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.

		Expressionsfrequenz [%]			
		CD81	CLDN1	SRBI	OCLN
Monozyten	Do 1	87	41	45	78
	Do 2	90	41	62	93
Makrophagen	Do 1	70	41	77	0
	Do 2	73	69	80	0
Neohepatozyten	Do 3	91	96	95	64
	Do 4	94	97	92	12
PHH	Do 5	29	85	44	29
	Do 6	79	95	13	51
Huh7		86	97	81	80
Huh7,5		93	97	18	85

Frequenz zwischen 41 und 69% exprimiert. Sie steigt aber bei der Entwicklung zu Neohepatozyten auf etwa 96% an, womit sie eher mit der Expressionsfrequenz von primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien vergleichbar ist (85-97%). SRBI ist ohne erkennbares Muster

auf allen Zelltypen zwischen 13 und 95 % exprimiert. Besonders hohe Werte werden bei Neohepatozyten erreicht (92 und 95%). OCLN wird auf Monozyten (78 und 93%) und hepatischen Zelllinien (80 und 85%) recht stark exprimiert. Niedrigere und weniger homogene Expressionswerte wurden aus Neohepatozyten (12 und 64 %) und PHH (29 und 51%) gemessen. Auf Makrophagen konnte OCLN nicht nachgewiesen werden.

3.2.2 Neohepatozyten zeigen donorspezifische Unterschiede in ihrer Infizierbarkeit mit HIV-HCVpp

In diesem Versuch sollte herausgefunden werden, ob Neohepatozyten von mehreren Präparationen stets ähnliche und donorspezifische oder präparationsspezifische Eigenschaften zeigen. Als Marker hierfür wurde die Infizierbarkeit mit HIV-HCVpp gewählt. Hierzu wurden zwei Testpersonen dreimal an drei verschiedenen Tagen im Abstand von zwei Tagen bis zu 21 Monaten Blut entnommen. Aus dem Blut wurden die PBMC isoliert und die Monozyten zu Neohepatozyten differenziert. An Tag 16 des Differenzierungsprozesses wurden die Zellen mit HIV-HCVpp mit einer MOI von 0,1 infiziert. Hierzu wurde für alle Infektionen Viren der gleichen Charge verwendet. 72 h nach der Infektion wurden die Zellen abgelöst, gewaschen, fixiert und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. In Abb. 23 sind die Ergebnisse des Versuchs graphisch dargestellt. Es sind in Abb. 23 A die Infektionsfrequenzen der drei Einzelinfektionen für beide Donoren zuehen. Donor 1 zeigt Infektionsfrequenzen von 2,45, 1,5 und 2,25%. Bei Donor 2 liegen sie mit 5,0, 4,6 und 5,5 % deutlich höher. Die Mittelwerte der drei Infektionen sind in Teil B zu sehen. Der Mittelwert der Infektionsfrequenzen für Donor 1 liegt bei 2%, der von Donor 2 bei 5%.

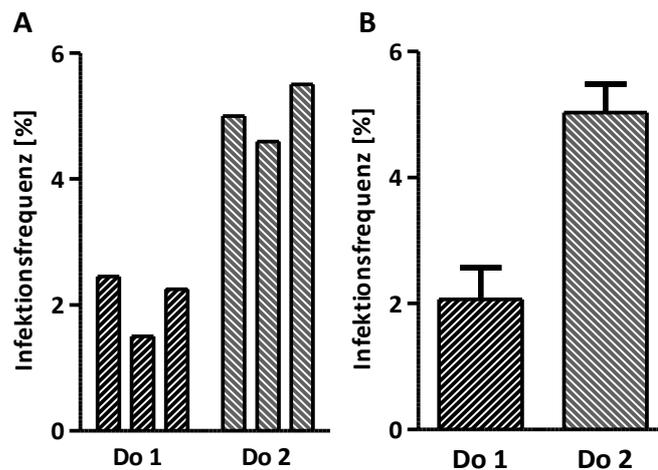


Abb. 22: Infektionsfrequenz von HIV-HCVpp-infizierten Neohepatozyten aus drei Präparationen von je zwei Donoren. A: Darstellung der Infektionsfrequenzen der drei einzelnen Infektionen. **B:** Darstellung des Mittelwerts der Infektionen mit Standardabweichung. Den beiden Testpersonen wurde an drei Tagen Blut entnommen, direkt die PBMC isoliert und aus den Monozyten Neohepatozyten differenziert. Alle Neohepatozyten wurden an Tag 16 mit dem identischen HIV-HCVpp in einer MOI von 0,1 infiziert. Die Zellen wurden nach 72h abgelöst, fixiert und durchflusszytometrisch gemessen.

3.2.3 Patientenserum können sowohl steigernden als auch hemmenden Einfluss auf die Infektionsfrequenzen von HIV-HCVpp infizierten Neohepatozyten haben

Im Plasma chronisch infizierter Hepatitis C-Patienten sind meist Antikörper gegen die HCV-Oberflächenproteine E1 und E2 zu finden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Antikörper die HIV-HCVpp-Infektion von Huh7-Zellen inhibieren können. Tatsächlich wird nur bei wenigen HCV-Patienten eine spontane Viruseliminierung beobachtet, selbst wenn *in vitro* neutralisierende Antikörper vorhanden sind. Daher sollte hier der Einfluss von Patientenantikörpern auf die relative Infektierbarkeit von Neohepatozyten untersucht werden. Hierzu wurden Neohepatozyten aus Monozyten von acht Donoren differenziert. Die HIV-HCV-Pseudoviren wurden eine Stunde vor Zugabe des Infektionsansatzes mit affinitätsgereinigten antiE1E2-

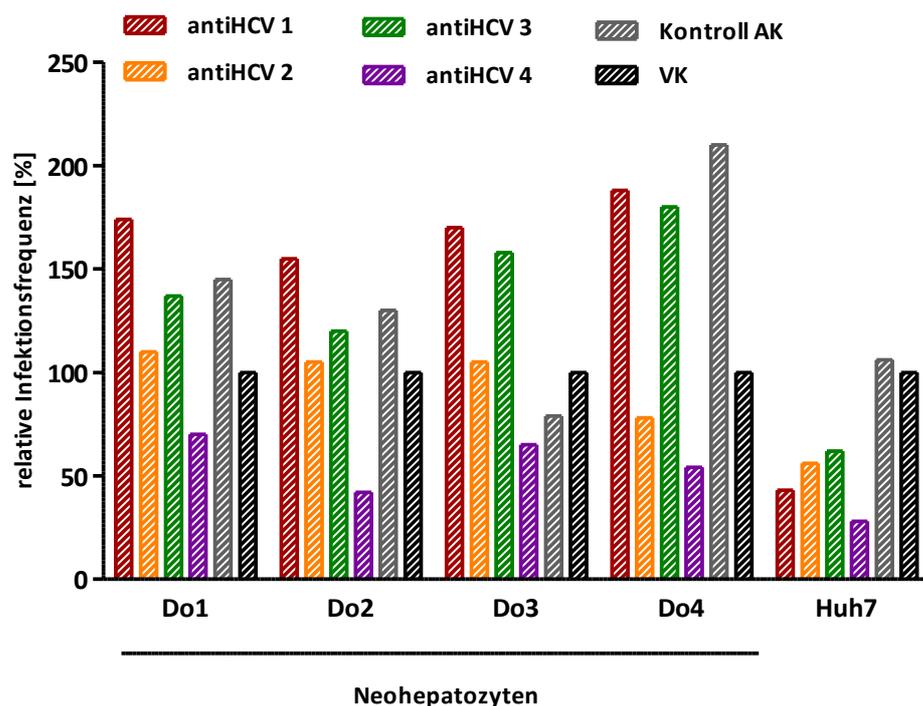


Abb. 23: Einfluss von Hepatitis C-Patientenseren auf die HIV-HCVpp- Infektion von Neohepatozyten und Huh7-Zellen. Neohepatozyten und Huh7-Zellen wurden in 96-Loch-Platten kultiviert. Die HCV-Pseudotypen wurden eine Stunde vor Zugabe des Infektionsansatzes mit affinitätsgereinigten antiE1E2-Antikörpern verschiedener Patienten versetzt (100 µg/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. VK: Viruskontrolle. Die Daten wurden in Kollaboration mit C. Hohn erstellt und bereits im Rahmen ihrer Dissertation, „Entwicklung eines Personen-spezifischen Zellkultursystems zur Untersuchung von Hepatitis C Virus Infektionen“, 2009, in ähnlicher Form veröffentlicht.

Tab. 6: Relative Infectionsfrequenzen [%] von HIV-HCVpp-infizierten Neohepatozyten unter Einfluss von Hepatitis C-Patientenseren

		anti HCV1	anti HCV2	anti HCV3	anti HCV4	Kontroll AK	VK
Neohepatozyten	Do 1	174	110	137	70	145	100
	Do 2	155	105	120	42	130	100
	Do 3	170	105	158	65	79	100
	Do 4	188	180	180	54	210	100
Huh7		43	62	62	28	106	100

Antikörpern von vier verschiedenen Patienten versetzt (100 µg/ml) und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von

0,1 infiziert. Analog wurden Huh7-Zellen als Kontrolle behandelt. Die Analyse der Pseudotyp-Infektion erfolgte nach 72 h mittels Durchflusszytometrie. Die Infektionsfrequenzen wurden relativ zur Viruskontrolle ohne Antikörper ausgewertet. Die Ergebnisse der Versuche sind anhand von vier repräsentativen Donoren in Abb. 23 und Tab.6 dargestellt. Es ist zu sehen, dass alle Patientenserum die Infektion von Huh7-Zellen inhibieren konnten. Im Gegensatz dazu war der Effekt der Antikörper auf die Neohepatozyteninfektion nicht einheitlich. AntiHCV1 steigerte die Infektion in jedem Fall auf 155 bis 188%. Durch Zugabe von antiHCV2 steigerte sich die relative Infektionsfrequenz bei den Donoren 1-3 leicht auf 105 – 110%, bei Donor 4 deutlich auf 180%. Bei allen vier Donoren führte die Zugabe von antiHCV3 zur Steigerung der Infektionsfrequenzen auf 120 – 180%. antiHCV4 senkte in allen vier Fällen die Infektionsfrequenzen auf Werte zwischen 70 – 42% herab. Auch die isolierten Kontrollantikörper aus HCV-negativen Spendern führte bei den Donoren 1, 2 und 4 zur Steigerung der Infektionsfrequenzen auf 130 – 210 %, nur bei Donor 2 führte der Kontrollantikörper zur Inhibition auf 79%. Die Daten wurden in Kollaboration mit C. Hohn erstellt und bereits im Rahmen ihrer Dissertation, „Entwicklung eines Personen-spezifischen Zellkultursystems zur Untersuchung von Hepatitis C Virus Infektionen“, 2009, in ähnlicher Form veröffentlicht.

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Einfluss auf antiE1E2-Antikörper oder auf allgemeine Serumeffekte zurückzuführen ist, wurden Neohepatozyten aus den Monozyten von zehn Donoren differenziert. Sie wurden mit HIV-HCVpp mit und ohne humanes AB-Serum infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen abgelöst, gewaschen und

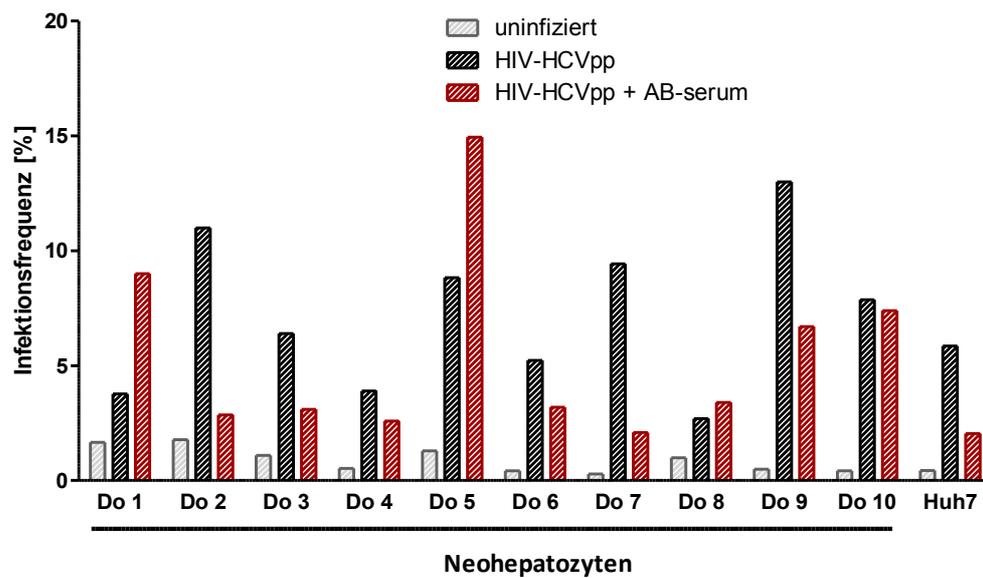


Abb. 24: Einfluss von humanem AB-Serum auf die Infektionsfrequenzen HIV-HCVpp-infizierter Neohepatozyten. Neohepatozyten aus Monozyten von zehn Donoren wurden zu Neohepatozyten differenziert und mit HIV-HCVpp in einer MOI von 0,1. Jede Infektion wurde zusätzlich unter Einfluss von 10% humanem AB-Serum durchgeführt. Analog wurden Huh7-Zellen infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen abgelöst und durchflusszytometrisch gemessen.

Tab. 7: Infektionsfrequenzen [%] von HIV-HCVpp-infizierten Neohepatozyten unter dem Einfluss von humanem AB-Serum.

		uninfiziert	HIV-HCVpp	HIV-HCVpp AB-Serum
Neohepatozyten	Do 1	1,7	3,8	9,0
	Do 2	1,8	11,0	2,9
	Do 3	1,1	6,4	3,1
	Do 4	0,5	3,9	2,6
	Do 5	1,3	8,8	15,0
	Do 6	0,4	5,2	3,2
	Do 7	0,3	9,4	2,1
	Do 8	1,0	2,7	3,4
	Do 9	0,5	13,0	6,7
	Do 10	0,4	7,9	7,4
Huh7		0,4	5,9	2,1

durchflusszytometrisch gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 und in Tab. 7 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Infektionsfrequenzen unter Zugabe von humanem AB-Serum in drei Fällen höher liegen als

ohne Serum. Bei Donor 1 steigt die Infektionsfrequenz unter Einfluss von humanem AB-Serum von 3,8 auf 9,0%; bei Donor 5 von 8,8 auf 15,0% und bei Donor 8 von 2,7 auf 3,4%. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor 2,37, 1,7 beziehungsweise 1,26. Bei den sieben anderen Donoren sinkt die Infektionsfrequenz durch Zugabe des AB-Serums ab, bleibt aber stets oberhalb der Negativkontrolle. Ebenso verhält es sich mit Huh7-Zellen, dort sinkt die Infektionsfrequenz von 5,9 auf 2,1%.

Um zu klären, ob die Steigerung der Infektionsfrequenzen antikörpervermittelt, ist wurde eine Analyse der Expression der Fc γ -Rezeptoren I – III (Fc γ -R I – III) durchgeführt. Bei Fc γ -Rezeptoren handelt es sich um Membranrezeptoren verschiedener Immunglobuline. Zu diesen gehören die Fc γ -Rezeptoren die an IgGs binden können. Sie sind für die Phagozytierung vom opsonierten Pathogenen von Bedeutung. Es gibt drei große Subtypen von Fc γ -Rezeptoren. Dabei handelt es sich um Fc γ -R I (auch CD64), Fc γ -R II (auch CD32) und Fc γ -R III (auch CD16). Sie sind in unterschiedlicher Verteilung auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Manche Flaviviren wie Dengue Viren nutzen Fc-Rezeptoren zur antikörperabhängigen Infektionssteigerung.

Das Expressionsmuster der Fc γ -Rezeptoren I-III sollte auf Monozyten, Makrophagen, Neohepatozyten und PHH untersucht werden. Zusätzlich dienten Huh7- und Huh7.5-Zellen als Kontrolle. Hierzu wurden die Zellen mehrerer Donoren mit FITC-gekoppelten, primären Antikörpern direkt gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 und Tab. 8 dargestellt. Es ist zu erkennen,

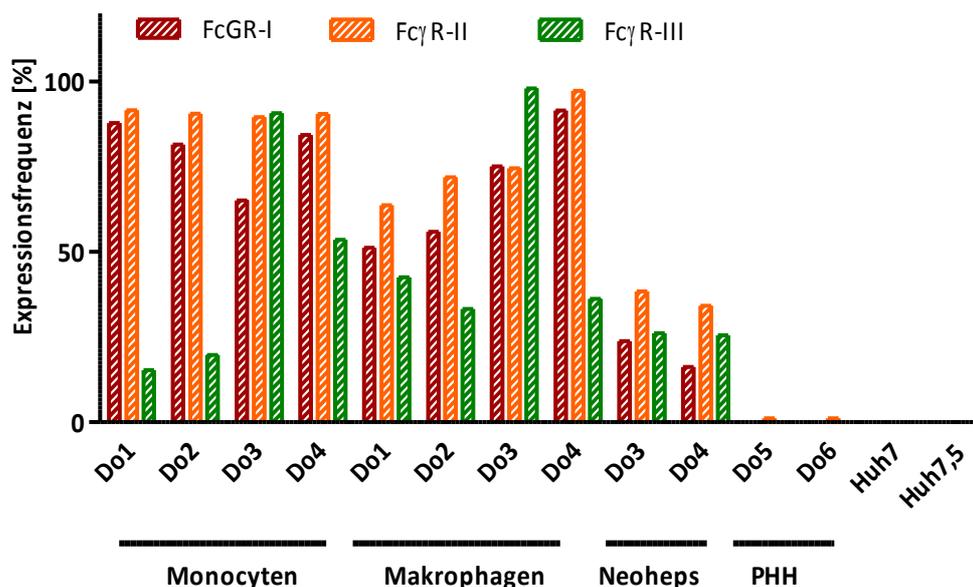


Abb. 25: Expressionsmuster der Fc γ -Rezeptoren I-III auf Monozyten, Makrophagen, Neohepatozyten, primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.

Der Nachweis der Antigene erfolgte mit FITC-gekoppelten primären Antikörpern. Dargestellt ist die Expressionsfrequenz abzüglich des Hintergrundes durch Bindung unspezifischer Isotyp-Kontrollantikörper.

Tab 8: Prozentuale Expressionsfrequenz der Fc γ -Rezeptoren I-III auf Monozyten, Makrophagen, Neohepatozyten, primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien.

		Expressionsfrequenz [%]		
		Fc γ -R I	Fc γ -R II	Fc γ -R III
Monozyten	Do 1	88	92	15
	Do 2	82	91	20
	Do 3	65	90	91
	Do 4	84	91	54
Makrophagen	Do 1	51	64	43
	Do 2	56	72	33
	Do 3	75	75	98
	Do 4	92	97	36
Neohepatozyten	Do 3	24	38	26
	Do 4	16	34	26
PHH	Do 5	0	1	0
	Do 6	0	1	0
Huh7		0	0	0
Huh7.5		0	0	0

dass die Expressionsfrequenz von Fc γ -R I bei Monozyten und Makrophagen zwischen 51 und 92 % liegt und bei Neohepatozyten auf 16 und 24% absinkt. Ähnliches wurde für den Fc γ -R II beobachtet. Hier werden bei Monozyten und Makrophagen Werte zwischen 72 und 97% angenommen. Die Expressionswerte der Neohepatozyten liegen mit 34 und 38% deutlich niedriger. Der Fc γ -R III scheint insgesamt weniger homogen exprimiert zu sein. Es werden bei allen Zellen monozytärer Herkunft Werte zwischen 15 und 98% detektiert ohne, dass sich eine Regelmäßigkeit erkennen lässt. Insgesamt zeigen die Neohepatozyten eine herabgesetzte Expressionsfrequenz für alle drei Fc γ -Rezeptoren. Primäre Hepatozyten und hepatische Zelllinien zeigen keine Expression eines der Fc γ -Rezeptoren.

3.2.4 Neohepatozyten lassen sich ohne Einschränkungen aus Nabelschnurblut differenzieren

Um HCV-Infektionen unter *in vivo*-Bedingungen zu untersuchen, mussten stets Schimpansen herangezogen werden. Dieses Modellsystem ist aber neben der moralischen Bedenklichkeit sehr teuer und zeitaufwändig. Daher war es Ziel der Wissenschaft, ein alternatives Tiermodell zu etablieren. Dies wurde erreicht, als es gelang, uPA/SCID-Mäusen zu züchten. Diese Tiere sind leberdefizient, da bei ihnen ein Selbstmordgen hinter dem Albuminpromotor inkloniert wurde. Da Hepatozyten Albumin exprimieren, wird jeder gebildete Hepatozyt sofort in Apoptose geschickt. Diese Mäuse bleiben ohne funktionsfähige Leber. Statt dessen haben sie ein „Pseudoorgan“ aus Bindegewebe, an der Stelle wo normal die Leber wäre. Da die Albuminexpression aus Hepatozyten beschränkt ist, entstehen keine weiteren Schädigungen für

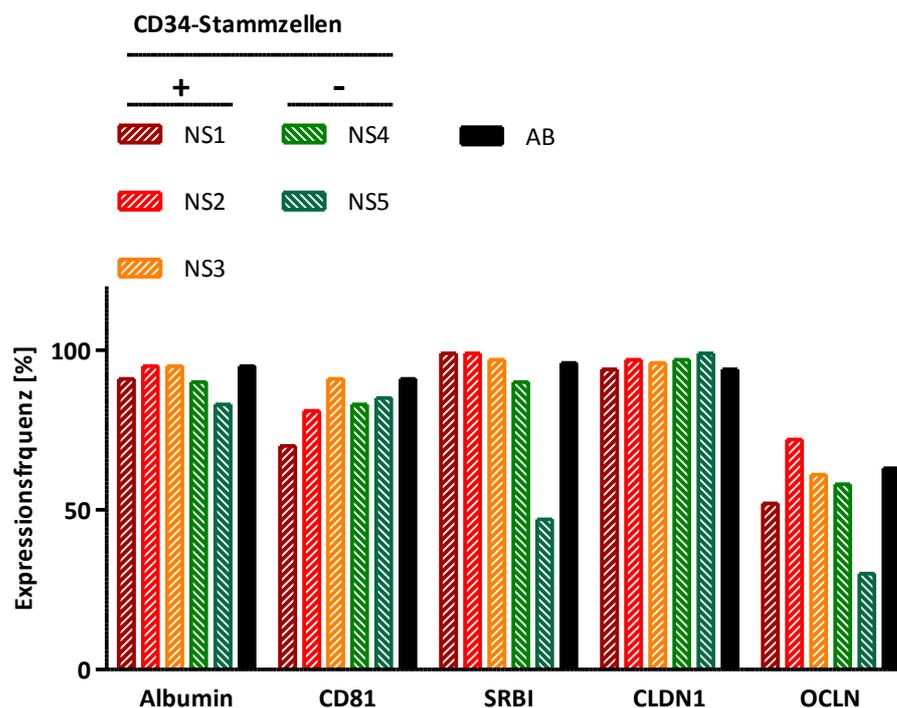


Abb. 26: Expressionsmuster der hepatischen Marker Albumin, CD81, SRBI, CLDN1 und OCLN auf Neohepatozyten von fünf Donoren Nabelschnurblut mit (NS1-3) und ohne CD34+Stammzellen (NS4 und 5) und einem repräsentativen Donor adultem Blut (AB). Die CD34 positiven Stammzellen wurden bei zwei Donoren mittels magnetischer Kügelchen negativ isoliert. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit FITC-gekoppelten primären Antikörpern (Albumin, CD81, OCLN), FITC-gekoppelte sekundäre Antikörper (SRBI) und PE-gekoppelte sekundäre Antikörper (CLDN1). Die Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist die Expressionsfrequenz abzüglich des Hintergrundes durch Bindung unspezifischer Isotyp-Kontrollantikörper.

die Mäuse. Diese Tiere leiden außerdem unter der „severe combined immunodeficiency“ (SCID) und haben daher kein funktionierendes Immunsystem. Werden diesen Mäuse nun humane Hepatozyten injiziert, kann es zur Repopulation der Leber mit humanen Hepatozyten kommen. Nach der Injektion zusätzlicher humane Stammzellen aus Nabelschnurblut entwickelt das Tier ein humanes Immunsystem. Wird die Maus mit HCVcc infiziert, kann der Verlauf der Infektion in einer humanen Leber unter dem Einfluss eines humanen Immunsystems verfolgt werden. Allerdings sind die Donoren des Nabelschnurblutes und der Leber per se unterschiedlich. Daher ist das System nie autolog und es wird immer zu allogenen Interaktionen,

wie Abstoßungsreaktionen und erhöhten Entzündungswerte, kommen. Um diese Interaktionen zu minimieren, wäre es theoretisch möglich ein autologes System bestehend aus Stammzellen und Neohepatozyten aus den Monozyten des gleichen Nabelschnurblutes zu generieren. Als Vorversuch hierzu sollte herausgefunden werden, ob sich aus Nabelschnurmonozyten Neohepatozyten differenzieren lassen. Dies sollte anhand des hepatischen Markers Albumin und der HCV-Eintrittsfaktoren CD81, CLDN1, SRBI und OCLN bewertet werden. Ferner sollte getestet werden, ob es Unterschiede zwischen direkt differenzierten Neohepatozyten und Neohepatozyten, die nach negativer Isolation der CD34⁺-Stammzellen mit magnetischen Kügelchen differenziert wurden, gibt. Hierzu wurde das Nabelschnurblut aus frischen Nabelschnüren mit dafür vorgesehenen Nabelschnurblutbeuteln entnommen. Am gleichen Tag wurden die PBMC isoliert und im Falle der Donoren NS 4 und 5 die CD34⁺-Stammzellen mit Hilfe von magnetischen Kügelchen negativ isoliert. Aus den Monozyten wurden jeweils Neohepatozyten differenziert. An Tag 16 der Reifung wurden die Zellen abgelöst, gewaschen und mit den Antikörpern inkubiert. Bei Albumin, CD81 und OCLN wurden FITC-gekoppelte Primärantikörper verwendet. Im Falle von SRBI wurden FITC-gekoppelte und im Falle von CLDN1 PE-gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet. Nach der gemeinsamen Inkubation wurden die Zellen gewaschen, fixiert und innerhalb von einer Woche durchflusszytometrisch gemessen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 26 grafisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Expression aller Marker zwischen den Neohepatozyten aus Nabelschnurblut mit Stammzellen, denen nach negativer Isolation von Stammzellen und denen aus adultem Blut weitestgehend ähnlich ist.

Lediglich bei dem stammzelldepletierten Donor NS5 bleibt die Expression von SRBI und OCLN unter dem Mittel zurück.

3.3 Charakterisierung von Neohepatozyten und Vergleich mit anderen Zellen monozytärer Herkunft

Ziel des Versuches war es, Neohepatozyten mit den Mitteln der Immunzytochemie und der miRNA-Analyse zu charakterisieren und mit Monozyten, Makrophagen und PHH zu vergleichen. Der Verwandtschaftsgrad zu den genannten Zelltypen sollte bestimmt werden.

3.3.1 Immunzytochemische Charakterisierung von Neohepatozyten

Auf Objektträgern geheftete Monozyten, AB-Makrophagen und Neohepatozyten eines Donors wurden ebenso wie Gewebeschnitte aus pathologisch normal aussehendem, an Lebertumore angrenzendem Lebergewebe in Formalin fixiert. Die Anfärbung der Antigene erfolgte mit ungekoppelten Antikörpern. Durch Zugabe von einem an Alkalische Phosphatase gekoppeltem Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil der Primärantikörper gerichtet war, konnte am Expressionsort der Antigene das Substrat Fast Red/Naphthol von dem Enzym in einen unlöslichen roten Farbstoff umgesetzt werden. Es wurden Antikörper gegen den Makrophagenmarker CD68 und gegen das leberspezifische, hepatozytäre Antigen zur Charakterisierung der Zellen verwendet. Nach Antikörpermarkierungen wurden die Zellkerne mit Hematoxylin II angefärbt und anschließend mit einer „Bluing Solution“ ungefärbt. Die Ergebnisse der

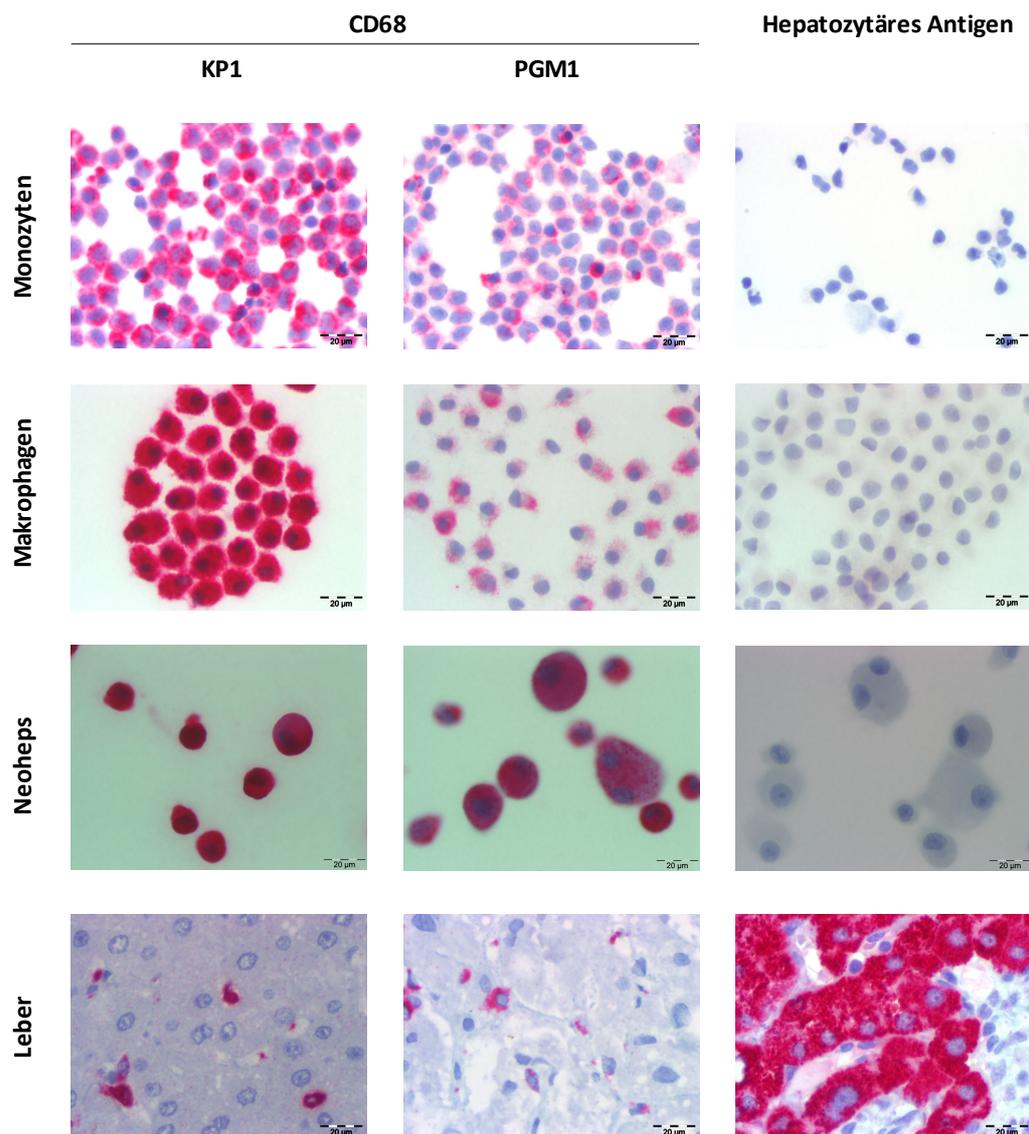


Abb 27: Immunzytochemische Färbung von Monozyten, Makrophagen und Neohepatozyten eines Donors und PHH mit zwei verschiedenen Klonen von CD68-Antikörpern und einem Antikörper gegen das hepatozytäre Antigen. Gewebeschnitte aus an Lebertumoren angrenzendem, pathologisch normalem, Lebergewebe und an Objektträger geheftete Monozyten, Makrophagen und Neohepatozyten eines Donors sowie Huh7-Zellen wurden in Formalin fixiert und mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit dem Farbstoff Fast Red/Naphthol. Antigen-exprimierende Zellen wurden dadurch rot angefärbt.

immunzytochemischen Färbung sind in Abb. 27 dargestellt. Dort ist zu erkennen, dass sowohl Monozyten als auch Makrophagen und Neohepatozyten mit den beiden CD68-Antikörpern anfärbbar sind. Alle drei Zelltypen sind nicht mit dem hepatozytären Antigen anfärbbar. Die Bilder des Leberschnitts sind identisch mit denen von Abb. 17 und

dienen hier nur als Kontrolle. Die in den Leberschnitten enthaltenen PHH sind nicht mit den CD68-Antikörpern anfärbbar, lediglich die enthaltenen Kupfer'schen Sternzellen geben bei beiden Antikörpern ein positives Signal. Die PHH lassen sich mit dem Antikörper gegen das hepatozytären Antigen anfärben, nur die Kupfer'schen Sternzellen bleiben negativ für den Antikörper.

3.3.2 miRNA-Analysen an Neohepatozyten, Monozyten und Makrophagen von mehreren Donoren sowie primären Hepatozyten und hepatozytären Zelllinien

Aus PBMC zweier Donoren wurden Monozyten über Adhärenz isoliert und auf mehrere Ansätze aufgeteilt. Diese wurden entweder direkt zur miRNA-Isolation eingefroren bzw. in AB-Makrophagenmedium oder SH-Medium kultiviert. Die Makrophagen wurden an Tag 0, 1, 6 und bei Donor 1 auch an Tag 16 geerntet. Die PCMO wurden an Tag 6 geerntet. Die verbliebenen PCMO wurden zehn Tage in HA-Medium kultiviert und die entstehenden Neohepatozyten an Tag 16 geerntet. Ebenso wurden noch Neohepatozyten von zwei weiteren Donoren (Donor 3 und 4) differenziert und geerntet sowie PHH von zwei Patienten (Donor 5 und 6), Huh7-, Huh7.5-, Huh7-Lunet- und U937-Zellen. Aus allen Proben wurde die Total-RNA isoliert und mittels MPEA auf dem Geniom® Biochip miRNA homo sapiens hybridisiert. Die Analyse der miRNA-Expression wurde mit dem Geniom Realtime Analyzer gemessen. Aus den resultierenden Detektionsbildern wurden nach der Normalisierung mit der VSN-Methode mittels Geniom Wizard Software die miRNA-Charakteristik der Proben visualisiert. Aus diesem Datensatz wurde eine „Heatmap“ der hierarchischen Gruppierung der

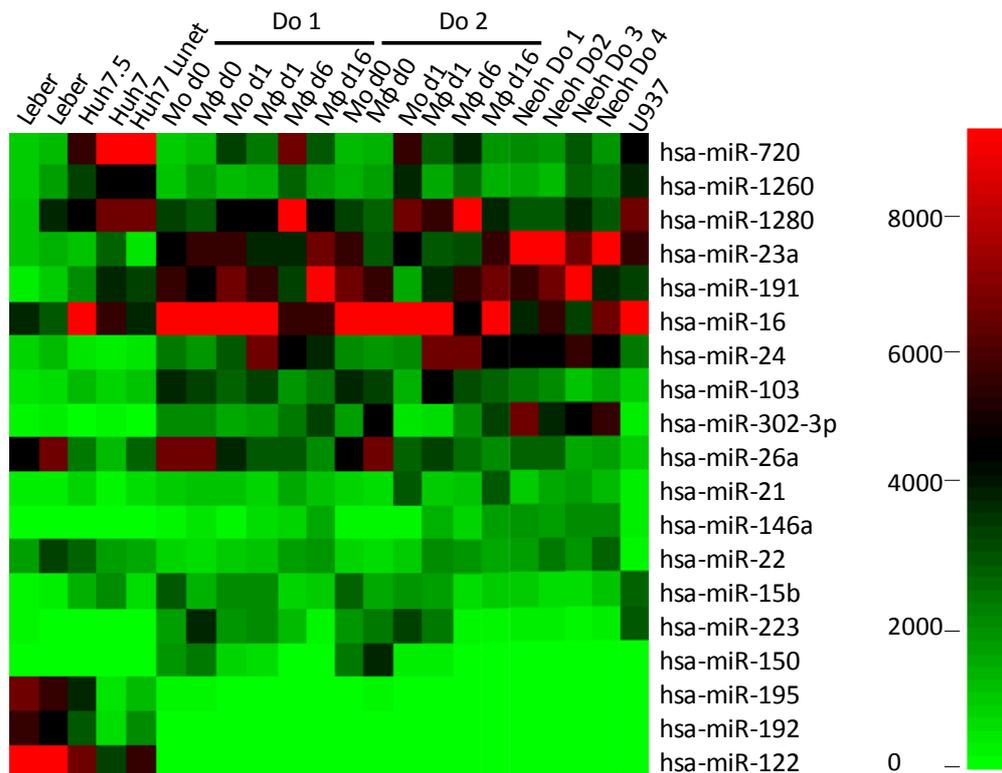


Abb. 28: miRNA-Charakteristika von Monozyten (Mo), Makrophagen (M ϕ), Neohepatozyten und der Makrophagenzelllinie U937 sowie primären Hepatozyten und hepatischen Zelllinien. Heatmap der hierarchischen Gruppierung der 19 unterschiedlichsten miRNAs von zwei Donoren PHH und drei hepatischen Zelllinien (Huh7, Huh7.5 und Huh7 Lunet (Lunet)). Die analysierten Proben sind auf der X-Achse aufgetragen, die miRNAs auf der Y-Achse. Rote Farbe steht für eine starke Expression der miRNA, während grüne Farbe mit niedriger Expression korreliert. Die Expressionsstärke schwankt zwischen 0 und 10000.

19 unterschiedlichsten miRNAs aller Zellproben erstellt (Abb 28). Bei der gewählten Darstellungsform korreliert rote Farbe mit einer starken Expression der miRNA, schwarz mit einer mittleren Expressionsstärke und grün mit einer niedrigen Expressionsstärke. Es ist zu erkennen, dass einige miRNAs typisch für bestimmte Zelltypen oder Zeitpunkte in der Entwicklung sind. Die miRNAs 122, 192 und 195 sind charakteristisch für PHH. Wobei miR-195 und miR-192 auch schwach in hepatischen Zelllinien vorkommen. MiR-122 findet sich in hepatischen Zelllinien schwächer als in PHH. Hier fällt auf, dass von allen drei hepatischen Zelllinien Huh7-Zellen diese miRNA am schwächsten

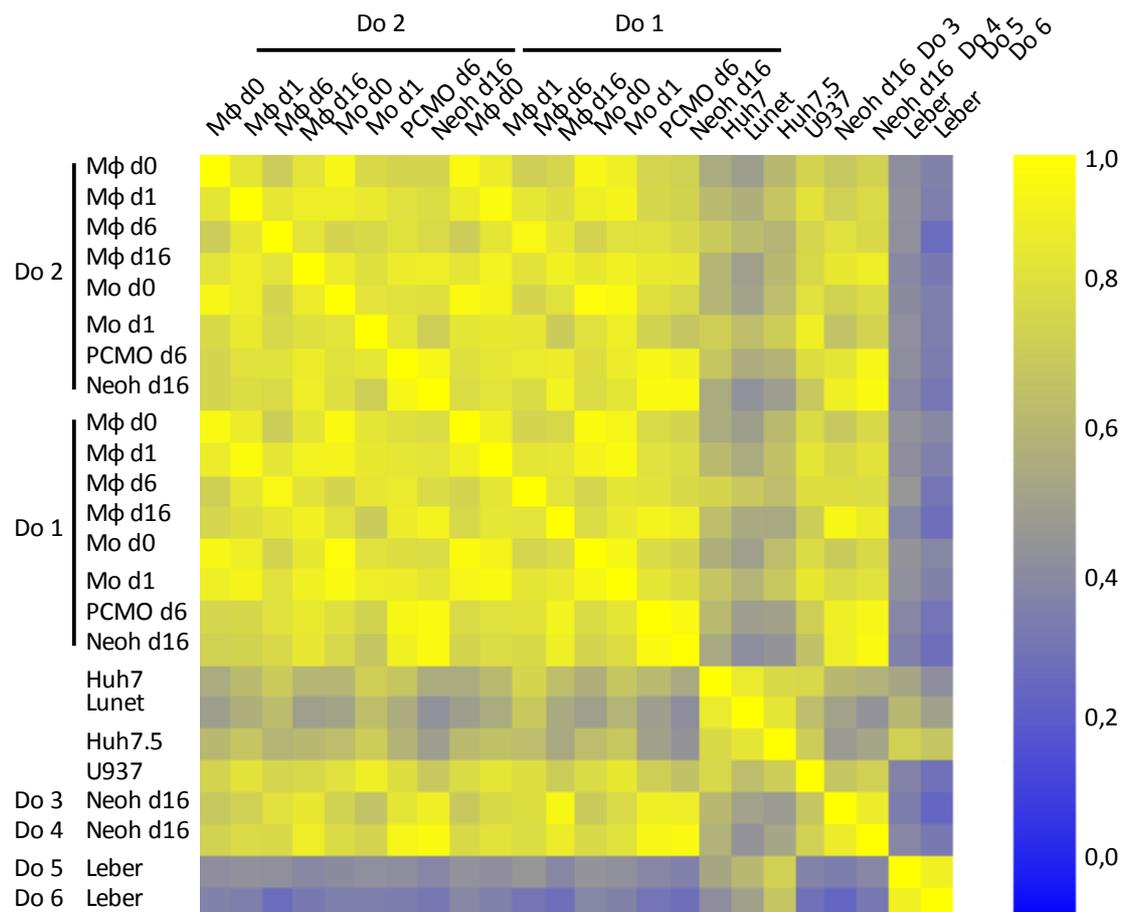


Abb.29: Farbcodierte Korrelationsmatrix der miRNA-Expressionsmuster von Monozyten und Makrophagen zu verschiedenen Differenzierungszeiten, PCMO, Neohepatozyten, induzierten U937-Zellen, primären Hepatozyten und drei hepatischen Zelllinien. Starke Ähnlichkeit wird gelb angezeigt, schwache dunkelblau. Mo: Monozyten, Mφ: Makrophagen, Neoh: Neohepatozyten

exprimieren. Im Gegensatz dazu gibt es miRNAs, die in den hepatischen Zelllinien stärker exprimiert werden als in PHH. Dabei handelt es sich um miR-720, miR-1260 und miR-1280. Diese drei scheinen sehr typisch zu sein für hepatische Zelllinien. Es fällt auf, dass Huh7.5 diese miRNAs durchweg schwächer exprimiert als Huh7 und Huh7-Lunet. Charakteristisch für Monozyten und Makrophagen ist ein ganzes Cluster an miRNAs die mit wechselnden Stärken vorrangig exprimiert werden. Hierzu gehören miR-23a, miR-191, miR-16 und miR-24. MiR-16 ist insbesondere auf frühen Monozyten und Makrophagen erhöht und sinkt mit fortschreitender Reifung ab. In

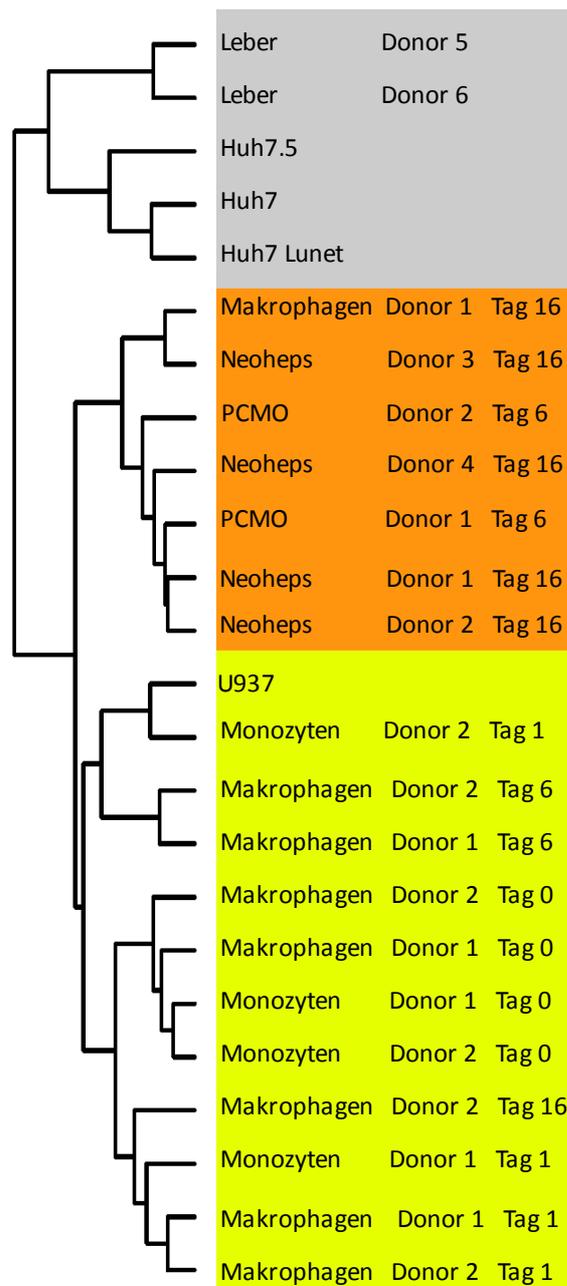


Abb. 30: Stammbaum der verwendeten Monozyten und Makrophagen zu verschiedenen Differenzierungszeiten, PCMO, Neohepatozyten, induzierten U937-Zellen, primärem Lebergewebe und drei hepatischen Zelllinien. Verschiedene Cluster sind farblich abgetrennt.

Neohepatozyten ist die miRNA eher schwach exprimiert. Allerdings ist diese miRNA auch in Huh7.5-Zellen und schwächer in Huh7 exprimiert. In Neohepatozyten sind die miRNAs miR-23a, miR-24 und miR-302-3p leicht im Vergleich zu den monozytären Zellen erhöht. Aus diesen Daten wurde mit Hilfe der Genom Wizard Software eine

Korrelationsmatrix erstellt. In dieser wird die Ähnlichkeit jeder Zellprobe mit jeder anderen Zellprobe farblich dargestellt. Gelb entspricht großer Ähnlichkeit und Blau entspricht niedriger Ähnlichkeit. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 29 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Ähnlichkeiten zwischen hepatischen Zelllinien und PHH bestehen. Ebenso zeigen alle Zellen monozytärer Herkunft inklusive Neohepatozyten und U937-Zellen eine hohe Ähnlichkeit zueinander. Aufgrund der Ähnlichkeiten wurde mit der Geniom Wizard Software ein Stammbaum der analysierten Zelltypen erstellt (Abb. 30). Der Stammbaum zerfällt in zwei große Zweige. Der erste enthält PHH und hepatische Zelllinien (in Abb. 30 grau unterlegt), der zweite Zellen monozytärer Herkunft und die U937-Zelllinie (in Abb. 30 gelb/orange unterlegt). Der hepatische Zweig zerfällt weiter in PHH und die Zelllinien. Dabei fällt auf, dass Huh7.5-Zellen näher an den PHH liegen als die anderen Zelllinien. Der monozytäre Zweig teilt sich in frühe Monozyten, Makrophagen und U937-Zellen (in Abb. 30 gelb unterlegt) und in Neohepatozyten, späte Makrophagen (Tag 16), und PCMO (in Abb. 30 orange unterlegt).

3.4 Charakterisierung von sich im Reifungsstimulus unterscheidenden Makrophagen und Dendritischen Zellen

Um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede von differenziell stimulierten Makrophagen und Dendritischen Zellen zu untersuchen wurde ein miRNA-Profil dieser Zelltypen erstellt. Die zentrale Frage der Untersuchung war dabei, ob verschiedene Reifungsstimuli auch Unterschiede innerhalb der Zelle bewirken, die sich im Muster der exprimierten miRNAs niederschlagen. Hierzu wurden aus dem Blut

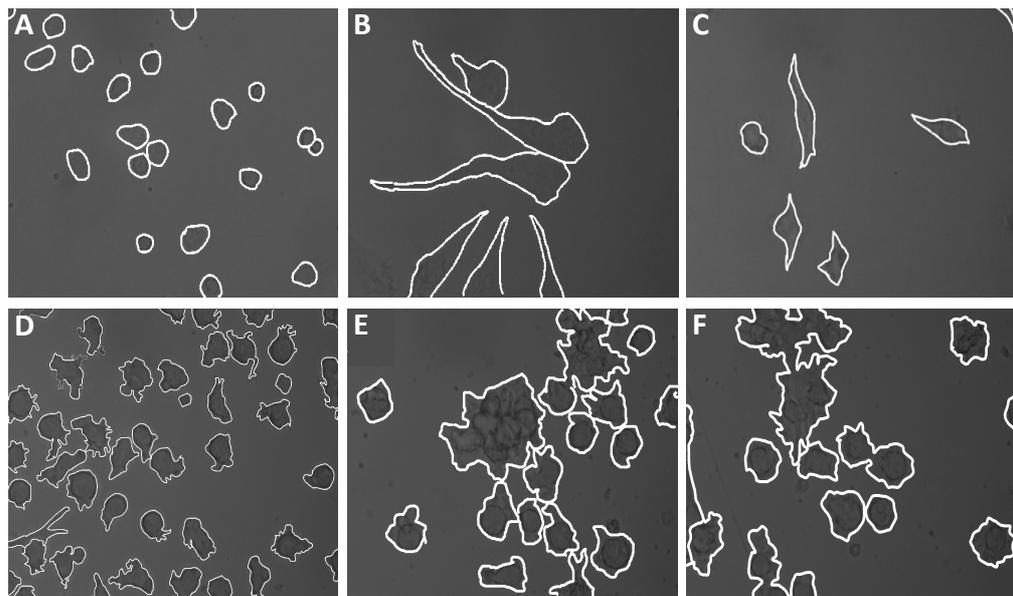


Abb. 31: Mikroskopische Aufnahmen von Zellen monozytärer Herkunft eines repräsentativen Donors (Vergrößerung 400x). A: Monozyten, B: M-CSF-Makrophagen, C: GM-CSF-Makrophagen, D: iDC, E: LPS-mDC, F: TNF- α -mDC. Monozyten wurden aus PBMC eines repräsentativen Donors mit magnetischen Kügelchen isoliert. Die Monozyten wurden entweder sofort fotografiert (A), sechs Tage in M-CSF- bzw. GM-CSF-haltigem Medium kultiviert (B, C) oder sechs Tage mit IL-4 und GM-CSF-haltigem Medium zu iDC gereift. Diese wurden entweder sofort fotografiert (D) oder weiter zwei Tage mit LPS- bzw. TNF- α -haltigem Medium kultiviert (E, F). Die Zellgrenzen wurden zur Verbesserung der Deutlichkeit mit weißen Linien hervorgehoben.

von drei gesunden Spendern die PBMC isoliert und mit Hilfe von magnetischen Kügelchen die Monozyten isoliert. Diese wurden entweder mit Medium zur Reifung von M-CSF-Makrophagen bzw. mit Medium zur Reifung von GM-CSF-Makrophagen oder mit IL-4 und GM-CSF-haltigem Medium sechs Tage bei 37° und 5% CO₂ kultiviert. Bei den Makrophagenansätzen erfolgte ein Mediumwechsel an Tag 3, bei den iDC-Ansätzen an Tag 2 und 4. An Tag 6 wurden diejenigen iDC-Ansätze die stimuliert werden sollten mit Medium zur Reifung von mDC mit LPS bzw. Medium zur Reifung von mDC mit TNF- α versetzt und weiter 48 h bei 37° und 5% CO₂ kultiviert. Am letzten Tag der Reifung (Makrophagen und iDC: Tag 6; mDC Tag 8) wurden die Zellen fotografiert. Diese Bilder sind in Abb. 31 dargestellt. Zur Erhöhung der Deutlichkeit und wegen des geringen Kontrastes sind die Zellgrenzen

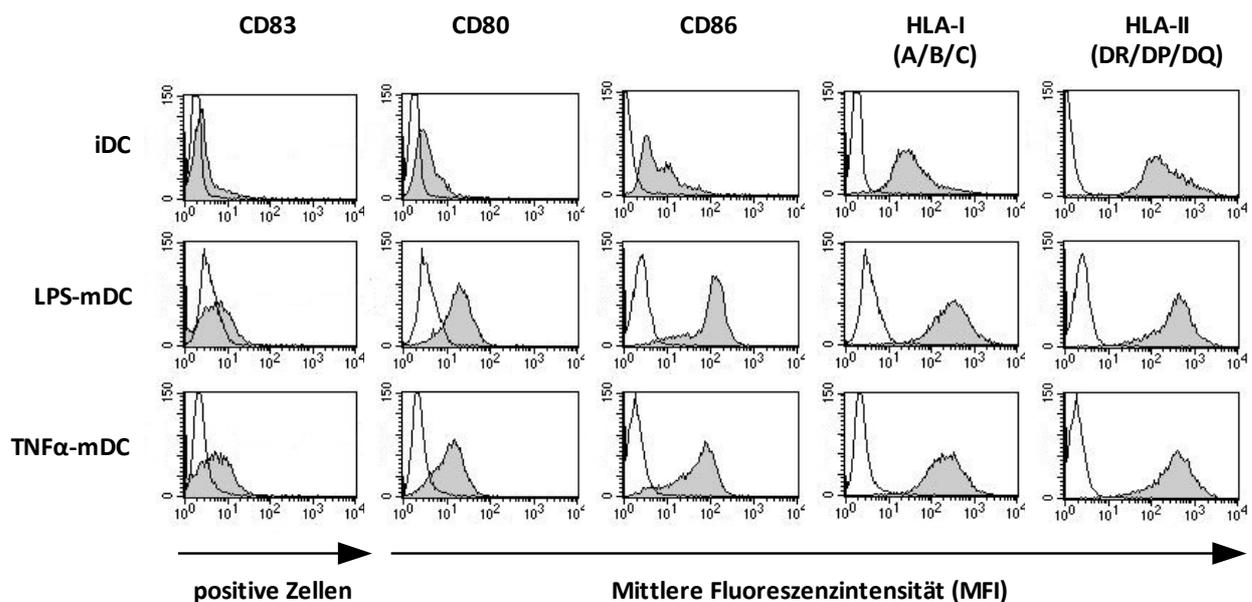


Abb. 32: Quantifizierung der Ausreifung humaner iDC zu mDC durch LPS und TNF- α anhand der Expression kostimulatorischer Oberflächenproteine und HLA-Moleküle. 1×10^6 iDC wurden mit LPS und TNF- α und 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen, gefärbt und die Expression der charakteristischen Reifungsmarker durchflusszytometrisch bestimmt. Im Histogramm ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bzw. die Anzahl positiver Zellen [%] gegen die Anzahl vermessener Zellen aufgetragen. In grau dargestellt ist die Expressionsstärke der jeweiligen Oberflächenantigene, in weiß die dazugehörige Hintergrundfluoreszenz. Es sind die Ergebnisse eines repräsentativen Donors dargestellt.

Tab. 9: Expression der charakteristischen Reifungsmarker auf humanen DC nach Inkubation mit LPS und TNF- α .

	Positive Zellen [%]	Mittlere Fluoreszenzintensität			
	CD83	CD80	CD86	HLA-I (A/B/C)	HLA-II (DR/DP/DQ)
iDC	4,1	4,1	9,8	51,7	295,2
LPS-mDC	17,0	21,1	114,9	361,1	439,8
TNFα-mDC	16,3	13,5	60,8	255,8	442,2

mit weißen Linien nachgezogen worden. Es ist zu erkennen, dass Monozyten eine annähernd runde Zellform haben. Die Makrophagen hingegen sind länglicher in ihrer Gestalt, wobei die M-CSF-Makrophagen eine tütenartige Zellform haben und die GM-CSF-Makrophagen eine spindelartige. Ferner haben die M-CSF-Makrophagen ein größeres Volumen. Die Dendritischen Zellen haben

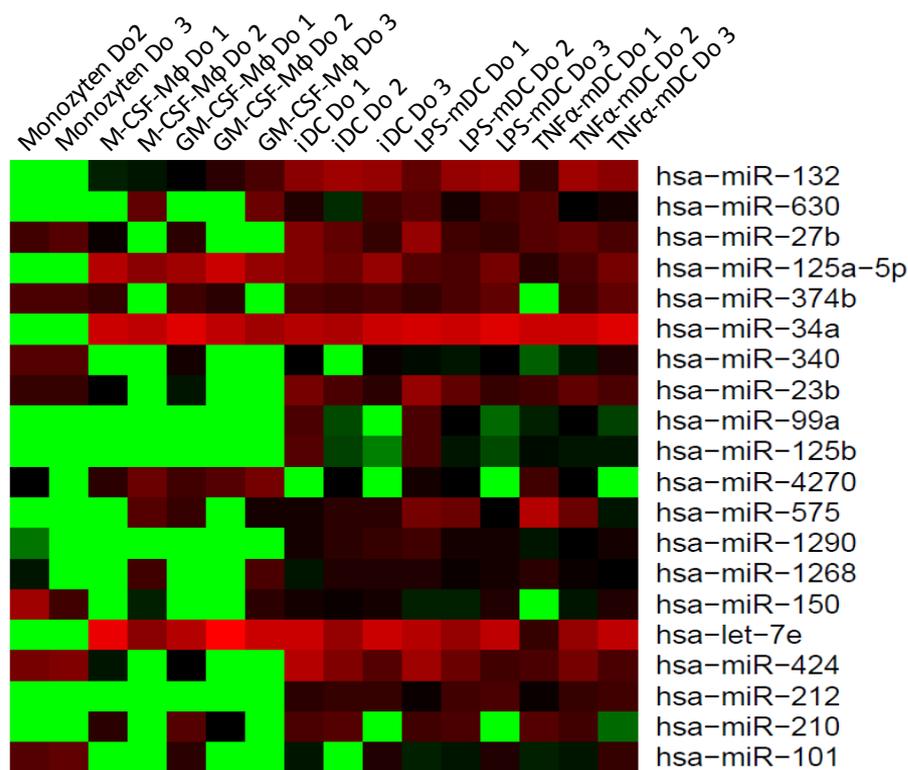


Abb. 33: miRNA-Charakteristika von Monozyten, mit M-CSF und GM-CSF stimulierten Makrophagen (M ϕ), unreifen Dendritischen Zellen (iDC) und mit LPS und TNF- α gereiften mDC. Heatmap der hierarchischen Gruppierung der 20 unterschiedlichsten miRNAs von drei Donoren. Die analysierten Proben sind auf der X-Achse aufgetragen, die miRNAs auf der Y-Achse. Rote Farbe steht für eine starke Expression der miRNA, während grüne Farbe mit niedrige Expression korreliert. Die Expressionsstärke schwankt zwischen 0 und 10000.

eine ungleiche Gestalt mit zahlreichen armartigen Zellausstülpungen, sogenannten Dendriten. Die unreifen Dendritischen Zellen liegen vereinzelt in der Kultur vor, während die gereiften Zellen sich zu Zellhaufen zusammenlagern. Die Dendritischen Zellen wurden zur durchflusszytometrischen Analyse abgelöst, gewaschen und mit Antikörpern gegen kostimulatorische Oberflächenproteine und HLA-Moleküle gefärbt. Die Proben wurden durchflusszytometrisch gemessen und sind in Abb. 32 und Tab. 9 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Zahl positiver Zellen bzw. die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aller untersuchten kostimulatorischen Oberflächenproteine und HLA-Moleküle bei der Reifung von iDC zu mDC steigt. Dabei liegt die

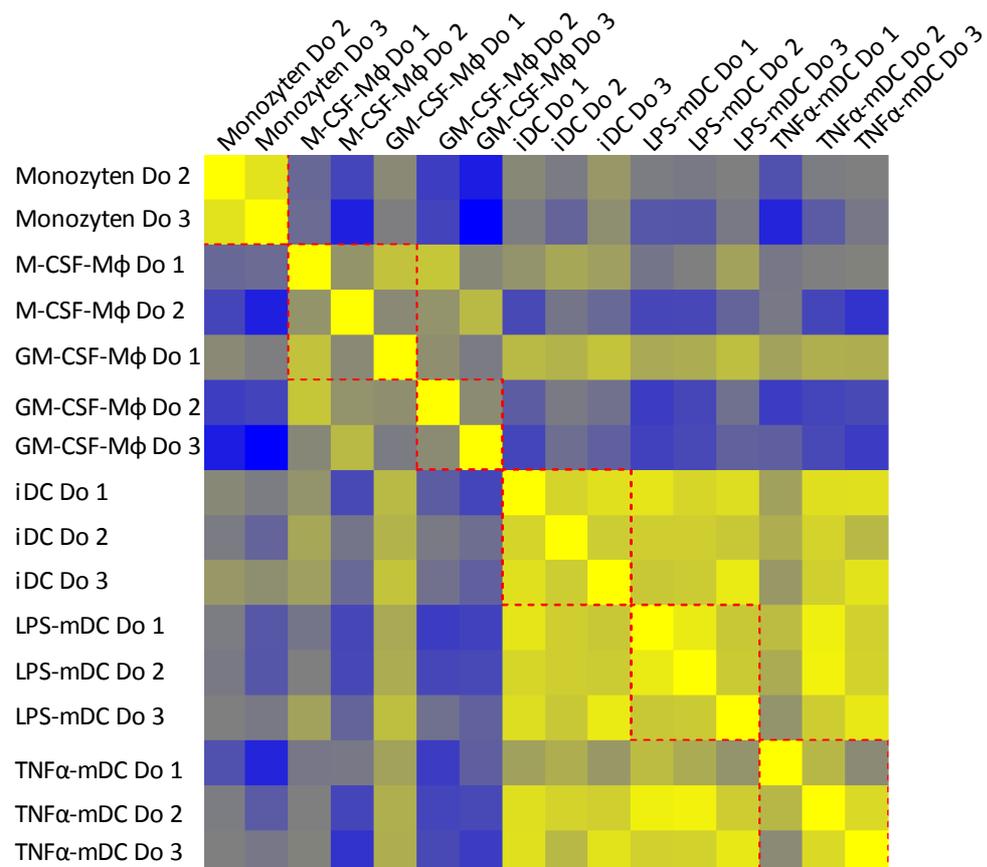


Abb. 34: Farbcodierte Korrelationsmatrix der miRNA-Expressionsmuster von Monozyten, M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen (Mφ), iDC und mit LPS und TNF- α gereiften mDC. Starke Ähnlichkeit wird gelb angezeigt, schwache dunkelblau.

Zahl positiver Zellen bzw. die MFI bei LPS-mDC stets höher als bei TNF- α -mDC. Aus allen Proben wurde die Total-RNA isoliert und mittels MPEA auf dem Geniom® Biochip miRNA homo sapiens hybridisiert. Die Analyse der miRNA-Expression wurde mit dem Geniom Realtime Analyzer gemessen. Aus den resultierenden Detektionsbildern wurden nach der Normalisierung mit der VSN-Methode mittels Geniom Wizard Software die miRNA-Charakteristik der Proben visualisiert. Aus diesem Datensatz wurde eine „Heatmap“ der hierarchischen Gruppierung der 20 unterschiedlichsten miRNAs aller Zellproben erstellt (siehe Abb. 33). Bei der gewählten Darstellungsform korreliert rote Farbe mit einer starken Expression der

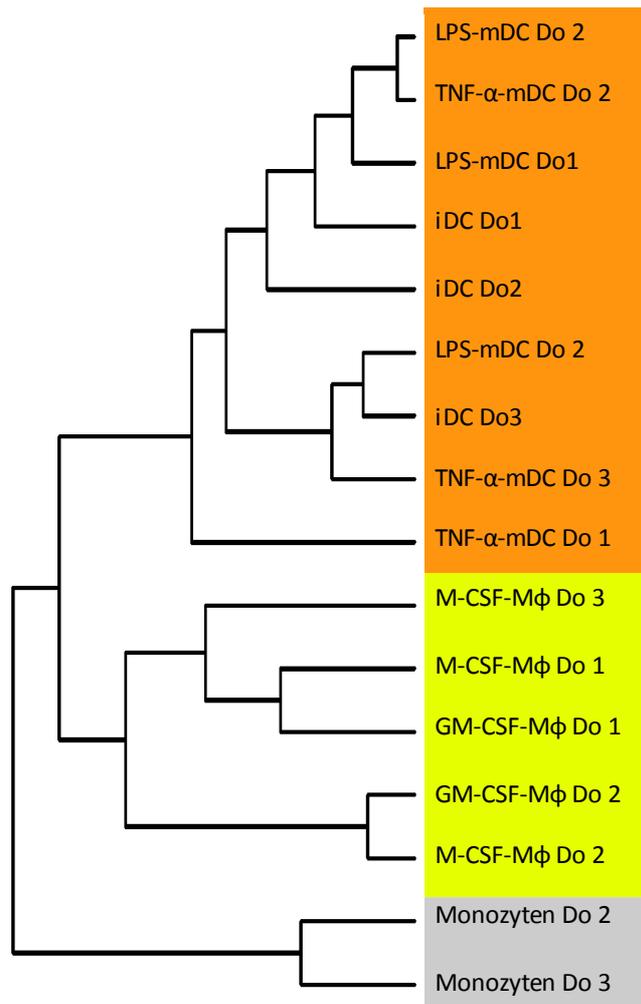


Abb. 35: Stammbaum der zur miRNA-Analyse verwendeten Monozyten, mit M-CSF und GM-CSF stimulierten Makrophagen (M ϕ), unreifen Dendritischen Zellen (iDC) und mit LPS und TNF- α gereiften mDC. Aus der Expressionsstärke aller untersuchten miRNAs wurde mit der Geniom Wizard Software ein Stammbaum errechnet. Verschiedene Cluster sind farblich abgetrennt.

miRNA, schwarz mit einer mittleren Expressionsstärke und grün mit einer niedrigen Expressionsstärke. Es ist zu erkennen, dass die Expressionsniveaus in den Monozyten insgesamt niedriger sind als bei Makrophagen oder den Dendritischen Zellen; dort konnten die meisten aktiven miRNAs beobachtet werden. Nur zwei beobachtete miRNAs sind auf Monozyten stärker exprimiert als auf den von Monozyten abgeleiteten Zellen.; dies sind miR-340 und miR-101. MiR-424 und miR-23b sind zwar auf Monozyten und Dendritischen Zellen vertreten, nicht aber auf Makrophagen. Einige miRNAs sind auf allen monozytären

Zellen exprimiert mit Ausnahme von Monozyten. Dies sind miR-34a, miR-125a-5p, miR-132 und let-7e. Einige miRNAs sind ausschließlich in Dendritischen Zellen exprimiert. Dies sind beispielsweise miR-99a, miR-125b, miR-1290 und miR-212. Aus diesen Daten wurde mit Hilfe der Genom Wizard Software eine Korrelationsmatrix erstellt. In dieser wird die Ähnlichkeit jeder Zellprobe mit jeder anderen Zellprobe farblich dargestellt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 34 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die größten Gemeinsamkeiten in drei Gruppen finden. Dies ist die Gruppe der Monozyten, der Makrophagen und der Dendritischen Zellen. Dabei scheinen die Unterschiede innerhalb dieser Gruppen marginal zu sein. GM-CSF- und M-CSF-Makrophagen zeigen große Gemeinsamkeiten. Ähnliches wurde bei den Dendritischen Zellen beobachtet. Hier lässt sich anhand der Korrelationsmatrix nicht zwischen unreifen und den zwei gereiften Zellen unterscheiden. Aufgrund dieser Daten wurde mit der Genom Wizard Software ein Stammbaum der analysierten Zelltypen erstellt (siehe Abb. 35). Der Stammbaum zerfällt in zwei Teile, zum einen in den Monozyten-Teil (grau unterlegt) zum anderen in den Makrophagen/Dendritische Zellen-Teil (gelb/orange unterlegt). Dieser teilt sich in einen Makrophagenbereich, wobei keine Trennung zwischen G-MCSF- und M-CSF-Makrophagen erfolgt, und in den Bereich der Dendritischen Zellen. Auch hier erfolgt keine sichtbare Gruppierung der unreifen bzw. der unterschiedlich gereiften Dendritischen Zellen. Es ist ebenfalls keine Gruppierung von Proben des gleichen Donors zu erkennen.

4. Diskussion

Das Hepatitis-C-Virus ist neben HIV einer der weltweit bedeutendsten viralen Infektionserreger des Menschen. HCV ist in der Lage eine chronische Infektion auszulösen und ist damit eine Besonderheit unter den RNA-Viren. Die chronische Infektion führt zu schwerwiegenden Leberschädigungen wie Leberzirrhose und Leberkarzinom. Da es bisher keinen Impfstoff gibt und die Therapie sehr unsichere Heilungsaussichten hat, stellt HCV ein bedeutendes globales Gesundheitsproblem dar.

4.1 Huh7-Zellen als Infektionssystem für HCV

Der HCV-Lebenszyklus konnte lange Zeit nur unzureichend untersucht werden. Dies lag zum einen daran, dass es kein geeignetes Zellkultur- oder Kleintiermodell gab. Zum anderen zeigen HCV-Isolate aus Patientenblut nur eine sehr geringe Replikationsrate bei In-Vitro-Experimenten mit humanen Hepatozyten. Leberzellen von Ratten oder Mäusen sind für HCV generell nicht permissiv (Flint et al., 2006; Pietschmann and Bartenschlager, 2003). Die einzige Möglichkeit HCV zu untersuchen war daher lange Zeit die Infektion von Schimpansen. Diese Experimente sind aber, neben der ethischen Problematik, auch sehr zeit- und kostenintensiv (Pietschmann and Bartenschlager, 2003).

Die bisherigen Kenntnisse über HCV stammen weitestgehend von Infektionsstudien mit der hepatozytären Zelllinie Huh7. Die Zelllinie leitet sich von 1982 isoliertem Tumorgewebe eines 57-jährigen japanischen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom ab. Seither ist sie

eine der bedeutendsten Leberzelllinien und wird aufgrund der guten Permissivität für HCV für Infektionsstudien verwendet (Nakabayashi et al., 1982). Auch besondere Subklone der Zelllinie werden wegen ihrer spezifischen Eigenschaften häufig verwendet. So ist der Subklon Huh7-Lunet besonders gut transfizierbar und weist eine hohe HCV-RNA-Replikation auf (Blight et al., 2002; Lohmann et al., 1999). Der Subklon Huh7.5 enthielt ursprünglich ein selektierbares HCV-Replicon, wurde dann durch die Behandlung mit Interferon- α "geheilt" (Blight et al., 2002). Huh7.5-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass HCV besonders gut in ihnen repliziert. Diese Eigenschaft beruht mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einer Störung der zelleigenen Interferonantwort, die durch eine Mutation des *RIG-I*-Gens bedingt ist. Dadurch ist es möglich Huh7.5-Zellen als Zellkultursystem für HCV_{cc} zu nutzen.

Die Vorteile der Huh7-Zelllinie liegen allgemein in der leichten und unbegrenzten Verfügbarkeit der Zellen und in der guten Infizierbarkeit mit HCV. Diese ist unter anderem auf die Expression aller notwendigen HCV-Eintrittsfaktoren auf der Zelloberfläche zurückzuführen (siehe Abb. 20 und 21). Die Beobachtung, dass Cytokeratin-18 im Gegensatz zu Cytokeratin-19 exprimiert wird, zeigt, dass es sich bei der Zelllinie um reife, enddifferenzierte Zellen epithelialen Ursprungs handelt. Bei der Betrachtung der HCV-Eintrittsfaktoren fällt auf, dass deren Expression durchweg die der primären humanen Hepatozyten übersteigt (Abb. 21). Des Weiteren werden auf Huh7-Zellen, genau wie auf Hepatozyten, keine Fc γ -Rezeptoren exprimiert (Abb. 25).

Den bereits genannten Vorteilen der Zelllinie stehen zahlreiche Nachteile gegenüber. Wie in Abb. 6B zu erkennen ist, zeigt das

Karyogramm der Zellen zahlreiche Aberrationen. Viele der Chromosomen gibt es, teilweise nur fragmentarisch, mehrfach. So erkennt man das Chromosom 20 insgesamt sieben mal. Andere Chromosomen kommen haploid vor, wie Chromosomen 2, 5, 15 und 22; Chromosom 13 ist gar nicht zu finden. Diese Eigenschaften sind charakteristisch für Tumorzellen und schon oft beschrieben worden (Muller et al., 1987; Seifertova, 1981).

Mit Hilfe der Technik der Immunzytochemie sollten die hepatischen Qualitäten von Huh7-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden Huh7-Zellen und Leberschnitte mit Antikörpern gegen CD68 und das Hepatozytäre Antigen gefärbt und miteinander verglichen. CD68 ist ein Glykoprotein das an LDL binden kann. Es wurde bereits 1989 als Marker für Monozyten und Makrophagen beschrieben (Micklem et al., 1989). In dieser Arbeit wurden zwei CD68-Antikörper, KP1 und PGM1, verwendet, da es gelegentlich zu einer leichten Bindung eines der Antikörper an andere myeloide Zellen oder sogar an nicht myeloide Zellen wie Fibroblasten kommen kann (Kunisch et al., 2004). Durch die Verwendung zweier, sehr unterschiedlicher, Antikörper kann das Risiko der Fehlbestimmung fast ausgeschlossen werden. Beide Antikörper konnten nur an die Kupffer'schen Sternzellen aus den Leberschnitten binden. Hingegen konnten beide Antikörper, entgegen den Erwartungen, alle Huh7-Zellen anfärben.

Das Hepatozytäre Antigen ist ein Mitochondrien-assoziiertes Protein, das mit dem monoklonalen Antikörper „hepatocyte paraffin 1“ (Hep Par 1) markiert werden kann. Durch Immunpräzipitation, Massenspektrometrie und In-Silico-Peptidsequenzvergleiche konnte

gezeigt werden, dass es sich bei dem Antigen um die Carbamoyl-Phosphat-Synthetase 1 handelt (Butler et al., 2008). Der Antikörper wird hauptsächlich dazu verwendet, um zwischen Lebertumoren und in der Leber liegenden, nicht-hepatischen Tumoren wie z.B. Metastasen zu unterscheiden (Wee, 2006). Ein Vorteil des Antikörpers liegt in der besonderen Sensitivität in der Detektion von hepatischen Tumoren (Chu et al., 2002; Fan et al., 2003; Wennerberg et al., 1993). Daher ist es bemerkenswert, dass sich Huh7-Zellen in der Immunzytochemie fast nicht mit dem Antikörper anfärben ließen (Abb. 17). Der Verlust von einer so lebertypischen Eigenschaft legt die Vermutung nahe, dass auch weitere Lebercharakteristika verloren gegangen sind. Daraus lässt sich schließen, dass sich die Huh7-Zelllinie seit ihrer Isolation aus Tumorgewebe deutlich verändert hat. Dies könnte auf die lange Kultivierung und entsprechend zahlreichen Passagen zurückgehen. Darauf gehen vermutlich auch die Einzelnukleotidpolymorphismen zurück, die inzwischen bei Huh7-Zellen aus verschiedenen Laboren gefunden werden konnten (Bensadoun et al., 2011).

Aus diesen Beobachtungen heraus, stellt sich die Frage, ob es sich bei Huh7-Zellen noch um eine Leberzelllinie im engeren Sinne handelt. Um dies zu beantworten, wurden miRNA-Analysen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass sich das miRNA-Profil von Huh7-, Huh7.5- und Huh7-Lunet-Zellen zum Teil deutlich von dem Muster von PHH unterscheiden (siehe Abb. 18A). Es fällt unter anderem die deutlich schwächere Expression der miR-122 auf, die für eine effiziente HCV-Replikation nahezu unerlässlich ist (Jopling et al., 2006). In der farbkodierten Korrelationsmatrix ist nur eine begrenzte Ähnlichkeit zwischen primären Hepatozyten und den hepatischen Zelllinien im

miRNA-Muster zu beobachten (siehe Abb. 18B). Der größte Unterschied wurde hierbei zwischen den PHH und Huh7 beobachtet.

In der Arbeit konnten mehrere Unterschiede zwischen den Huh7-Subklonen beobachtet werden. So liegt die Expressionsfrequenz von SRBI bei Huh7.5-Zellen deutlich unter der von Huh7-Zellen und damit näher an der von primären Hepatozyten. Da Huh7.5-Zellen mit HCV infizierbar sind, konnten wir zeigen, dass nur wenig SRBI zum HCV-Zelleintritt benötigt wird, was bereits von Cocquerel und Mitarbeitern vorgeschlagen wurde (Cocquerel et al., 2006). Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die bei anderen behüllten Viren gemacht wurden. Dort konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Oberflächenproteine in geringer Konzentration für notwendige Konformationsänderungen verantwortlich sein können (Kuhmann et al., 2000; Tailor et al., 2003; Tailor et al., 2000). Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Huh7-Zellen weniger miR-122 exprimieren als Huh7.5- und Huh7-Lunet-Zellen. Dies könnte eine weitere Erklärung, zusätzlich zum gestörten Interferonsystem, sein, weswegen diese Subklone eine bessere HCV-Replikation als Huh7-Zellen aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Huh7-Zellen zwar alle nötigen HCV-Eintrittsfaktoren exprimieren und auch für HCV permissiv sind, aber auch hepatische Eigenschaften verloren haben. So weisen sowohl die immunzytochemischen Färbungen als auch das miRNA-Profil der Huh7-Subklone darauf hin, dass sich die Zelllinien von ihrem Ursprung entfernt haben und heute nur noch leberähnlich sind, aber keine äquivalenten, immortalisierten Hepatozyten darstellen. Bisher gibt es zu Huh7, trotz aller Kritikpunkte an der Zelllinie, keine gleichwertige

Alternative für HCV In-Vitro-Infektionen. Gerade deswegen sollten die Ergebnisse vergangener und zukünftiger Experimente mit Huh7-Zellen kritisch betrachtet und nicht generalisiert werden. Dies trifft im Besonderen auf pharmakologische Experimente mit möglichen zukünftigen HCV-Medikamenten zu.

4.2 Neohepatozyten sind ein valides und patientenspezifisches Infektionssystem für HCV

Bisher stehen zwei mögliche Zellen für HCV-Infektionsstudien zur Verfügung. Das physiologischste Kultursystem für Hepatitis C-Viren sind primäre humane Hepatozyten, da hier Spendereigenschaften erhalten bleiben. Allerdings sind diese Zellen von gesunden Spendern nur durch eine invasive Biopsie zu erhalten, was mit gesundheitlichen Risiken verbunden ist. Ferner sind Experimente mit PHH nur eine kurze Zeitspanne nach der Entnahme möglich. Diese beiden Punkte erklären die häufige Verwendung der bereits beschriebenen Huh7-Zelllinie.

Da Huh7-Zellen, wie gezeigt, nur noch bedingt hepatische Eigenschaften aufweisen, wird eine physiologische und leicht verfügbare Zelle für HCV-Infektionsstudien benötigt. Eine mögliche Alternative kam auf, als Zhao und Mitarbeiter 2003 zeigten, dass leberähnliche Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes differenzierbar sind (Zhao et al., 2003). Aufgrund dieser Beobachtung entwickelten Ruhnke und Mitarbeiter eine Methode um leberähnliche Zellen, sogenannte Neohepatozyten oder Neoheps, aus Monozyten des peripheren Blutes von adulten Spendern zu differenzieren (Ruhnke et

al., 2005a). Diese Zellen sollten als mögliche Quelle für Transplantate oder als Testsystem für Medikamente dienen. Ehnert und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Neohepatozyten große Ähnlichkeiten zwischen den Enzymen der Metabolisierung von Medikamenten mit primären Hepatozyten aufweisen (Ehnert et al., 2008). Eine weitere, in unserer Arbeitsgruppe vorgeschlagene, Verwendungsmöglichkeit wäre, Neohepatozyten als Infektionssystem für HCV-Zelleintrittstudien zu verwenden. Hier konnte gezeigt werden, dass Neohepatozyten mit HCVpp infizierbar sind, dass die HCV-Eintrittsfaktoren CD81, CLDN und SRBI sowie der hepatische Marker Albumin exprimiert werden und dass der Infektionsweg genau wie bei Huh7 Zellen über die HCV-Eintrittsfaktoren CD81, CLDN und SRBI vonstatten geht (Doktorarbeit von Christina Hohn „Entwicklung eines Personen-spezifischen Zellkultursystems zur Untersuchung von Hepatitis C Virus Infektionen“, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich dies bestätigen und zusätzlich zeigen, dass auch OCLN, ein weiterer Eintrittsfaktor für HCV, auf Neohepatozyten exprimiert wird (siehe Abb. 20).

Eine Besonderheit der HCV-Infektion ist, dass viele chronisch-infizierte Patienten neutralisierende Antikörper gegen HCV E1/E2 besitzen. Bei allen untersuchten Fällen von spontaner Viruseliminierung konnte eine massive CD4- und CD8-T-Zell-Antwort beobachtet werden (Diepolder et al., 1995; Thimme et al., 2001). Bei Patienten mit einer frühen Viruseliminierung oder auch nur einem Zustand stabiler Viruslast werden stets antiHCV-Antikörper gefunden (Lavillette et al., 2005; Pestka et al., 2007). Da es trotz Antikörperbildung häufig zur chronischen Infektion kommt, reicht offensichtlich allein deren Anwesenheit nicht aus, um die Infektion zu kontrollieren (Logvinoff et

al., 2004). Interessanterweise steht dies im Gegensatz dazu, dass Antikörper aus Patientenserum bei HIV-HCVpp-Infektionen auf Huh7-Zellen stets einen inhibitorischen Effekt hatten (Haberstroh et al., 2008; Pestka et al., 2007). Um diese Diskrepanz zu untersuchen, haben wir den in der genannten Literatur geschilderten Versuchsaufbau auf Neohepatozyten übertragen. Der inhibitorischen Effekt bei Huh7-Infektionen konnte bestätigt werden (siehe Abb.23). Im Gegensatz dazu wurden bei Neohepatozyten teilweise inhibitorische, aber auch steigernde Einflüsse der Patientenseren beobachtet.

Handelt es sich bei den beobachteten Serumeffekten um allgemeine Eigenschaften von Serum oder um einen spezifischen Einfluss der antiE1/E2-Antikörper? In erstem Fall müsste durch Zugabe von humanem Serum eines gesunden Spenders zur Infektion ein Effekt zu beobachten sein. Wie in Abb. 24 ersichtlich wird, hat humanes AB-Serum tatsächlich einen teils inhibierenden und teils steigernden Einfluss auf die Infektionsfrequenz von Neohepatozyten, aber einen inhibierenden Einfluss auf Huh7-Zellen. Da auch Seren von HCV-negativen Spendern die Infektion steigern können (siehe Abb.23), spricht dies für einen Einfluss des humanen Serums, dessen Effekt unabhängig von neutralisierenden Antikörpern ist. Dies legt nahe, dass die Antikörper einen untergeordneten Einfluss auf die Infizierbarkeit von Neohepatozyten haben. Eine Erklärung liefern Germi *et al*; sie beschrieben, dass Lipide aus humanem Serum, über Interaktion mit HCV-Virionen, einen Einfluss auf die Infektionsfrequenz haben können (Germi et al., 2002). Des Weiteren sind auch im Serum enthaltene „High Density Lipoproteine“ (HDL) in der Lage die HCV-Infektionsfrequenz zu erhöhen (Voisset et al., 2005), während sie von oxidierten „Low

Density Lipoproteinen“ herabgesetzt wird (von Hahn et al., 2006). Interessanterweise ist die Infektionssteigerung stark donorabhängig. Es sind sowohl die Eigenschaften des Serums als auch die der Neohepatozyten von Bedeutung. Sind beide Faktoren infektionsfördernd geht die Infektion leichter vonstatten.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die beobachteten Effekte ist die antikörpervermittelte Infektionssteigerung. Dabei binden Antikörper, in der Regel IgG, an die Virushülle, führen aber nicht zur Neutralisation, sondern zu einer verbesserten Aufnahme des Virus in die Zelle. Damit wird die Ausbreitung und Vermehrung des Virus begünstigt. Für Dengueviren konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der Fc γ -Rezeptoren für die antikörperabhängige Infektionssteigerungen notwendig ist (Takada et al., 2001). Diese Oberflächenproteine, die sich in drei Klassen (I-III) einteilen lassen, leiten in der Folge die Aufnahme des Antikörper-Virus-Komplexes in die Zelle ein. Auch bei HCV konnte eine Infektionssteigerung durch hoch verdünnte, neutralisierende Antikörper über die Fc γ -Rezeptoren I und II gezeigt werden (Meyer et al., 2008). Bei der Untersuchung der Fc γ -Rezeptor-Expression konnten alle drei Klassen auf Zellen monozytärer Herkunft nachgewiesen werden. Hingegen wurden keine Fc γ -Rezeptoren auf hepatischen Zellen exprimiert (siehe Abb. 25). Damit scheint ausgeschlossen, dass die Antikörper eine Infektionssteigerung von HCV in Hepatozyten bewirken. Trotzdem könnte der beobachtete Effekt *in vivo* in einem anderen Zelltyp von Bedeutung sein. Wenn in einem HCV-Patienten neutralisierende Antikörper dazu führen können, dass Virionen in einen, bisher unbekanntem, Typ von Zellen monozytärer Herkunft eindringen, ist dem Virus eine Möglichkeit gegeben der

Antikörperantwort zu entkommen. Somit hätte das Virus ein extrahepatisches Reservoir. Es bleibt die Frage wie das Virus auf Hepatozyten übertragen werden kann. Hierzu ist, zumindest bei B-Zellen, ein dichter Zellkontakt ausreichend (Valli et al., 2007; Valli et al., 2006). Wären die HCV-Virionen zum Beispiel in Kupffer'schen Sternzellen verborgen, könnte die Infektion von diesen Zellen zum nahe gelegenen Hepatozyten vonstatten gehen. Auf diesem Weg, über eine „virologische Synapse“, können auch andere Viren wie HIV, Herpes simplex-Viren und Masern-Viren von Zelle zu Zelle übertragen werden (Sattentau, 2008). Bei diesem „Zell-zu-Zell-Transfer“ haben neutralisierende Antikörper keinen Effekt, weil die Virionen nicht frei zugänglich sind (Brimacombe et al., 2011; Valli et al., 2007; Valli et al., 2006; Witteveldt et al., 2009). Zusammen mit unserer Beobachtung, dass die Infizierbarkeit der Neohepatozyten mit HIV-HCVpp donorabhängig ist (siehe Abb. 22), liegt es auf der Hand, dass der „Zell-zu-Zell-Transfer“ ebenso einer Donorabhängigkeit unterworfen ist. Dies könnte erklären, weswegen einige Patienten mit neutralisierenden Antikörpern eine Viruseliminierung erreichen und andere nicht.

Aufgrund der Tatsache, dass alle untersuchten Zellen monozytärer Herkunft Fc γ -Rezeptoren exprimierten, stellten wir die Frage, ob Neohepatozyten wirklich die einzigen HIV-HCVpp-infizierbaren Zellen monozytärer Herkunft sind. Entsprechende Infektionsstudien wurden durchgeführt und zeigten, dass weder Monozyten, AB-Makrophagen noch PCMO infizierbar sind. Einzig Neohepatozyten zeigten eine deutliche Infizierbarkeit (siehe Abb. 19). Die Expression der Fc γ -Rezeptoren ist offensichtlich nicht für die Infizierbarkeit der Neohepatozyten ohne zusätzliche Antikörper oder Seren

verantwortlich. Daher untersuchten wir die Expression der HCV-Eintrittsfaktoren auf Monozyten, Makrophagen und Neoheps und verglichen sie mit der Expression auf primären Hepatozyten und den hepatischen Zelllinien Huh7 und Huh7.5 (siehe Abb. 21). Wir konnten bestätigen, dass die Eintrittsfaktoren sowohl auf Neohepatozyten als auch auf primären Hepatozyten und den Zelllinien exprimiert werden. Ferner konnte die Expression aller vier Faktoren auf Monozyten, aber das Fehlen von Occludin auf Makrophagen beobachtet werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Reijerkerk und Mitarbeitern, dass Occludin die Passage von Monozyten durch das Endothel ins Gewebe verhindert (Reijerkerk et al., 2006). Occludin wird erst im Zuge der Monozytenreifung abgebaut und ermöglicht so die Diapedese. Dies kann erklären warum Makrophagen nicht mit HIV-HCVpp infizierbar sind.

Es drängt sich jedoch die Frage auf, warum Monozyten trotz aller vier Eintrittsfaktoren nicht mit HIV-HCVpp infizierbar sind. Eine Möglichkeit wäre, dass es ein fünftes, bisher unbekanntes, Oberflächenmolekül gibt, welches für den HCV-Zelleintritt mitverantwortlich ist. Dieses scheint dann auf Neohepatozyten im Gegensatz zu Monozyten exprimiert zu sein. Eine alternative Erklärung wäre die Expression eines negativen Faktors wie EWI-2wint auf der Oberfläche von Monozyten (Rocha-Perugini et al., 2008). Dieser Faktor könnte an andere Eintrittsfaktoren binden und die HCV-Zell-Interaktion verhindern. Möglicherweise geht er bei der Reifung zu Neohepatozyten verloren. Eine dritte mögliche Erklärung könnte in der wichtigen Interaktion der Eintrittsfaktoren begründet sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Claudin-1 an CD81 essenziell für

den HCV-Zelleintritt ist (Harris et al., 2010; Krieger et al., 2010). Bisher ist wenig über weitere Proteininteraktionen bekannt, aber da Monozyten keine „tight-junctions“ ausbilden, kommen Claudin-1 und Occludin vermutlich nicht koexprimiert vor. Dieser Mangel könnte die Zellen vor dem Viruseintritt schützen.

Ein großer Vorteil, den primäre Hepatozyten gegenüber Huh7-Zellen als Zielzellen für HCV haben, ist die Beibehaltung verschiedener genetischer Donoreigenschaften, die für die Infektion von Bedeutung sein können (Grammatikos and Sarrazin, 2010). Um diese donorspezifischen Eigenschaften bei Neohepatozyten zu untersuchen, nutzten wir die Infektionsfrequenzen mit HIV-HCVpp als Nachweismethode. Hierzu wurden zwei Blutspendern dreimal an drei verschiedenen Tagen Blut entnommen und aus den Monozyten Neohepatozyten generiert. Diese wurden am 16. Tag der Reifung mit HIV-HCVpp infiziert. Wir konnten zeigen, dass die Infektionsraten von Neohepatozyten eines Donors große Ähnlichkeit zwischen den drei Präparationen aufweisen (siehe Abb. 22). Die Blutentnahmen lagen hierbei zwischen zwei Tagen und 21 Monaten auseinander. Somit konnten wir zeigen, dass Neohepatozyten eines Donors auch über einen langen Zeitraum konstante Eigenschaften aufweisen. Es konnten nur vernachlässigbare Abweichungen zwischen den Präparationen wahrgenommen werden, die auf minimale Schwankungen in der Zelldichte zurückzuführen sein können. Unsere bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass HIV-HCVpp-Infektionen der Neohepatozyten donorabhängig sind. Ausstehende Versuche sollen bestätigen, ob die Infizierbarkeit der Neohepatozyten mit der primärer Hepatozyten korreliert.

Eine Anwendung von Neohepatozyten ist die Nutzung als autologes humanisiertes In-Vivo-HCV-System in Mäusen. Dieses beruht auf uPA/SCID-Mäusen, welche keine Hepatozyten in der Leber haben und immundefizient sind (Meuleman and Leroux-Roels, 2008). Es ist möglich diesen Mäusen humane Hepatozyten zu injizieren, die die Leber repopulieren. Ferner kann durch Injektion mit humanen Stammzellen aus Nabelschnurblut ein humanes Immunsystem in den Tieren entwickelt werden (Kakinuma et al., 2007). Da dieses nicht autolog zur Leber ist kommt es zu Alloreaktionen zwischen Immunsystem und Hepatozyten. Darunter versteht man die Abstoßung körperfremder Zellen durch das Immunsystem, das die fremden, genetisch unterschiedlichen Hepatozyten, erkennt. Trotzdem können mit diesen Tieren In-Vivo-Experimente mit HCVcc durchgeführt werden (Meuleman and Leroux-Roels, 2008). Mit Neohepatozyten, differenziert aus dem gleichen Nabelschnurblut aus dem die CD34⁺-Stammzellen isoliert wurden, ist jedoch ein autologes System vorstellbar. Wir konnten zeigen, dass die Reifung von Neohepatozyten aus Nabelschnurblut möglich ist und diese keine Unterschiede zu Neohepatozyten aus adultem Blut aufweisen (siehe Abb. 26). Somit wurden keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Zelldifferenzierung durch die Isolation der CD34⁺-Stammzellen gefunden. Dies bedeutet, dass Neohepatozyten grundsätzlich eine mögliche Alternative zu primären humanen Hepatozyten bei der Repopulierung von uPA/SCID-Mäusen sind. Ihr großer Vorteil besteht darin, dass Leber und Immunsystem von einem Donor stammen und somit autolog sind.

4.3 Neohepatozyten sind eine spezielle Makrophagen Subpopulation mit hepatischen Eigenschaften

Derzeit ist unklar, ob es sich bei Neohepatozyten um transdifferenzierte Monozyten oder um Makrophagen mit hepatischen Eigenschaften handelt. Um dies zu klären, wurden Monozyten, Makrophagen und Neohepatozyten des selben Donors immunzytochemisch auf den Monozyten/Makrophagen-Marker CD68 und das Hepatozytäre Antigen hin untersucht und mit entsprechend gefärbten Leberschnitten verglichen. Es zeigte sich, dass sich Neohepatozyten ähnlich anfärben lassen wie Makrophagen und Monozyten, somit CD68 stark exprimieren und negativ für das Hepatozytäre Antigen sind. Das Hepatozytäre Antigen ist sehr charakteristisch für Lebergewebe und auch auf leberähnlichen Tumoren extrahepatischen Ursprungs anzutreffen (Wennerberg et al., 1993). Daher kann es sich bei Neohepatozyten nur um eine Makrophagen-Subpopulation handeln. Das Verbleiben des Makrophagenmarkers CD68 ist ein weiteres Zeichen, dass es zu keiner echten Transdifferenzierung gekommen ist.

Um ein tieferes Verständnis für die Eingruppierung der Neohepatozyten zu erhalten, wurde ein miRNA-Profil der Neohepatozyten erstellt. Hierzu wurden Monozyten isoliert und zu Neohepatozyten differenziert. Dabei wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung Proben entnommen, miRNA isoliert und daraus ein miRNA-Profil erstellt. Zusätzlich wurden Monozyten zu Makrophagen differenziert und diese kurz nach Zugabe des Differenzierungsmediums, an Tag sechs und an Tag 16 geerntet und

analog zu den Neohepatozyten behandelt. Ebenso wurden primäre Hepatozyten und hepatische Zelllinien untersucht. Bei der Betrachtung der 19 unterschiedlichsten miRNAs (Abb. 28) fallen einzelne miRNAs besonders auf. So wird die miRNA-122, die für eine HCV-RNA-Replikation notwendig ist (Jopling et al., 2006), nicht in Neohepatozyten exprimiert. Dies lässt vermuten, dass eine HCV-Replikation in Neohepatozyten nicht, oder nur zu sehr geringem Maße, möglich ist. Vergleichsweise niedrig wird in Neohepatozyten, aber auch in den hepatischen Zelllinien und PHH, die miRNA-16 exprimiert. Es wird beschrieben, dass sie in der Zelldifferenzierung beteiligt ist und in verschiedenen Tumoren herunter reguliert vorliegt (Calin et al., 2002). Die miRNAs 23a und 302-3p werden besonders stark in Neohepatozyten exprimiert. MiRNA-23a ist ein wachstumsfördernder und antiapoptotischer Faktor (Zhu et al., 2010); miRNA-302-3p gehört zu der miRNA-302-Gruppe, die ein Marker für Pluripotenz ist (Barros-del Jesus et al., 2009). Die drei letztgenannten miRNAs sind mit Zelldifferenzierung und -reifung assoziiert, was dem neu erworbenen Differenzierungsstatus der Neohepatozyten entspricht. Aus der Korrelationsmatrix (Abb. 29) geht hervor, dass es große Ähnlichkeiten zwischen Neohepatozyten und den anderen Zellen monozytärer Herkunft gibt.

Aus den gesammelten Daten wurde ein Stammbaum der analysierten Zelltypen erstellt (Abb. 30). Daraus lässt sich schließen, dass bereits viele wichtige Differenzierungsschritte vom Monozyten zum Neohepatozyten in der Entwicklungsstufe der PCMO eingeleitet oder sogar bereits abgeschlossen sind. PCMO und Makrophagen gleichen Alters zeigen ein deutlich unterschiedliches miRNA-Profil. Das

bedeutet, dass das erste Neohepatozytenmedium SH den größeren Beitrag zur Einleitung der neohepatischen Entwicklung beiträgt. Dies reicht aber, wie in Abb. 19 ersichtlich, nicht aus, um eine mit HIV-HCVpp infizierbare Zelle zu generieren. Dies weist darauf hin, dass kleinere Unterschiede in der Genaktivität die Infizierbarkeit einer Zelle beeinflussen können.

Bemerkenswert ist die unterschiedliche Gruppierung der zwei 16 Tage alten Makrophagen. Es könnte sich, bei einem der Ansätze, um einen Ausreißer handeln. Langzeitkulturrexperimente mit weiteren Donoren könnten diese Beobachtung erklären. Denkbar wäre hingegen auch, dass es sich um einen Streueffekt handelt. Dieser könnte auf der für Makrophagen ungewöhnlich langen Kultivierungsdauer von 16 Tagen beruhen. Üblicherweise werden Makrophagen nicht länger als sechs Tage kultiviert. Daher wäre es möglich, dass Seneszenz zur Aktivierung untypischer miRNAs führt. Die Tatsache, dass die gleich alten Neohepatozyten keine ähnliche Streuung aufweisen könnte darin begründet liegen, dass sie einen viel längeren Entwicklungsprozess durchlaufen, der erst an Tag 16 beendet ist. Zu dem Zeitpunkt sind die Makrophagenproben schon zehn Tage über ihre übliche Kultivierungsdauer in Kultur.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei Neohepatozyten um (i) eine Makrophagenpopulation mit einzelnen hepatischen Eigenschaften handelt, die (ii) als einziger Zelltyp monozytärer Herkunft mit HIV-HCVpp infizierbar ist und (iii) donorspezifische Eigenschaften beibehält. Somit erfüllen Neohepatozyten alle Kriterien eines patientenspezifischen

Infektionssystems für die Untersuchung des HCV-Zelleintritts. Der besondere Vorteil liegt in der Beibehaltung von personentypischen Eigenschaften, die sich im Zelleintritt niederschlagen.

4.4 Intradifferenzielle Unterschiede von Makrophagen und Dendritischen Zellen zeigen sich nicht auf miRNA-Ebene

Aus der Beobachtung heraus, dass sich Neohepatozyten als Makrophagensubtyp zum Teil deutlich im miRNA-Profil von den AB-Makrophagen unterscheiden, wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage weiter untersucht, ob es diese großen Unterschiede auch bei anderen Zellen monozytärer Herkunft gibt. Dazu wurden Monozyten zu Makrophagen auf drei verschiedene Arten differenziert. Die klassische Methode ist die Verwendung von humanem AB-Serum als Differenzierungsmedium. Dabei entsteht allerdings keine homogene Makrophagenpopulation sondern eine Mischung morphologisch unterschiedlicher Zellen. Um homogene Makrophagen zu erhalten können die Glykoproteine „macrophage -colony stimulating factor“ (M-CSF) oder „granulocyte/macrophage -colony stimulating factor“ (GM-CSF) verwendet werden. Beide bewirken jeweils eine typische, morphologisch einheitliche Differenzierung von Makrophagen (Stanley et al., 1994). Entsprechend ihrer Reifungsstimuli werden sie als M-CSF- bzw. GM-CSF-Makrophagen bezeichnet.

Von besonderem Interesse ist hierbei, ob die verschiedenen Stimuli auch spezifische, intrazelluläre Veränderungen hervorrufen, ob es also zur differenziellen miRNA-Expression kommt. Es wurden Dendritische Zellen (DC) als Versuchszellen gewählt, da mehrere Substanzen

beschrieben sind, die diese Zellen *in vitro* von unreifen Dendritischen Zellen (iDC) zu reifen Dendritischen Zellen (mDC) differenzieren können.

In diesen Experimenten wurden Lipopolysaccharide (LPS) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) als Reifungsstimuli für die DC eingesetzt. Auf der Oberfläche der DC bindet LPS an den Rezeptor Toll-like-Rezeptor (TLR) -4. TLRs waren die ersten identifizierten Mustererkennungsrezeptoren, die eine große Bandbreite pathogenassoziierter molekularer Muster erkennen konnten (Beutler, 2009; Hoffmann, 2003). Bisher sind zehn humane TLRs bekannt, die jeweils verschiedene Strukturen, wie Lipoproteine oder doppelsträngige RNA, erkennen. TLRs bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die über leucinreiche Wiederholungssequenzen die pathogenen Moleküle erkennen können, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne von der aus die Signalkaskade initiiert wird. Diese läuft über verschiedene Proteine wie MyD88 und TRIF und endet schließlich in NF κ B und IRF-3 (Kawai and Akira, 2011).

Der zweite in der Arbeit verwendete Reifungsstimulus für DC war TNF- α . Dabei handelt es sich um ein Protein bestehend aus drei identischen 157 AS großen Untereinheiten. Das Protein kann von zwei Rezeptoren erkannt werden, TNF-R1 und TNF-R2. Beide Proteine sind auf DC vertreten, aber auf Zellen des Immunsystems überwiegt TNF-R2 (Wajant et al., 2003). Von beiden Rezeptoren werden ähnliche Signalkaskaden aktiviert, die zur Aktivierung von NF κ B und c-Jun führen (Chen and Goeddel, 2002; Wajant et al., 2003).

Von allen Zellen wurde die RNA isoliert, das miRNA-Profil erstellt und eine Korrelationsmatrix der miRNA-Ähnlichkeiten errechnet (Abb. 34). Es lassen sich drei Gruppen erkennen, Monozyten, Makrophagen und DC, die untereinander wenig Gemeinsamkeiten zeigen. Dies wird auch im errechneten Stammbaum deutlich. Ferner fällt auf, dass die Unterschiede innerhalb dieser Gruppen sehr gering sind. So gibt es keine Aufspaltung der M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen, oder zwischen den drei untersuchten DC-Populationen. Dies bedeutet, dass die verwendeten Stimuli zwar eine morphologische Veränderung hervorrufen, aber dass sich diese Veränderung nicht auf die Zellphysiologie auswirkt. Demnach sind die Eigenschaften der Zellen nahezu identisch. Durch GM-CSF und M-CSF werden keine unterschiedlichen „mDC-Subtypen“ gereift, sondern einen Typ mit zwei morphologischen Erscheinungsbildern.

Die Gemeinsamkeit der Stimuli LPS und TNF- α ist ihre in NF κ B endende Signalkaskade (Chen and Goeddel, 2002; Kawai and Akira, 2011; Wajant et al., 2003). Da beide Stimuli gleiche miRNA-Profile hervorrufen, lässt sich schließen, dass der NF κ B-Weg hauptsächlich für die Induktion der miRNAs verantwortlich ist. Zwar werden von LPS noch der Transkriptionsfaktor IRF 3 und von TNF- α noch c-Jun aktiviert, doch auf Grund der großen Gemeinsamkeit im miRNA-Profil beider Stimuli schließen wir, dass diese Transkriptionsfaktoren hauptsächlich Einfluss auf die Morphologie haben. Ebenso ist eine redundante oder untergeordnete Funktion beider Transkriptionsfaktoren in DC denkbar.

Die DC-Reifungsbedingungen können nur teilweise die Bedingungen im Organismus wiedergeben. Dort werden die DC statt durch aufgereinigte Substanzen durch komplexe Strukturen und Stoffgemische stimuliert. So wäre es interessant die DC mit Pathogenen wie z.B. Viren oder Hefen zu stimulieren und die Unterschiede im miRNA-Profil anschließend zu untersuchen. Eventuell bewirkt der Kontakt mit verschiedenen Erregern die Reifung differenzieller, besonders angepasster DC-Subtypen.

Was bedeutet die Klassifizierung der DC und Makrophagen für die Neohepatozyten? Wir konnten zeigen, dass Dendritische Zellen, als Beispiel von Zellen monozytärer Herkunft, eine eigene Gruppe im miRNA-Stammbaum bilden. Dies belegt, dass die beobachteten miRNA-Unterschiede zwischen Monozyten und Neohepatozyten im Rahmen der natürlich vorkommenden Differenzierungsunterschiede liegen. So kann spekuliert werden, dass es eine neohepatozyten-ähnliche Makrophagen-Subpopulation *in vivo* gibt.

5. Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus stellt mit etwa 200 Millionen Infizierten ein globales Gesundheitsproblem dar. Zielzellen des Virus sind vorwiegend humane Hepatozyten. Sie sind in Zellkultur schwierig zu handhaben und nur durch invasive Maßnahmen wie Leberbiopsien und Leberresektionen zu gewinnen. Daher sind die meisten Studien zum HCV-Lebenszyklus an immortalisierten, humanen Leberzelllinien wie Huh7 und deren Abkömmlingen durchgeführt worden. Diese Zellen unterscheiden sich allerdings durch ihr degeneriertes Genom und den, im miRNA-Profil sichtbaren, veränderten Stoffwechsel von primären Hepatozyten. Somit wird in Huh7-Zellen keinesfalls die "In-Vivo"-Situation wiedergespiegelt. Basierend auf der Notwendigkeit eines physiologischeren und patientenspezifischen Systems für HCV-Infektionsstudien wurden daher Neohepatozyten im Rahmen der vorliegenden Arbeit als alternatives Zellsystem charakterisiert.

Infektionsexperimente mit HIV-HCVpp zeigten, dass humanes Serum, unabhängig vom Vorhandensein HCV-neutralisierender Antikörper, donorabhängig steigernde oder inhibierende Einflüsse auf die Infektion von Neohepatozyten haben konnte. Die gleichen Seren wirkten stets inhibierend auf die Infektion von Huh7-Zellen. Dies korrelierte mit der Expression von Fc γ -Rezeptoren, die nur auf Zellen monozytärer Herkunft nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise sind aber Neohepatozyten, unabhängig von der breiten Expression von Fc γ -Rezeptoren, die einzigen Zellen monozytärer Herkunft, die effizient infiziert werden konnten. Durch durchflusszytometrische Analysen

konnte dies zum Teil auf die differenzielle Expression des HCV-Eintrittsfaktors Occludin zurückgeführt werden. Durch mehrfache, zeitlich versetzte Präparationen von Neohepatozyten aus Monozyten von zwei repräsentativen Donoren konnten wir deutliche donorspezifische Unterschiede in den Infektionsfrequenzen beobachten.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit verschiedene Zelltypen anhand ihres miRNA-Profiles klassifiziert. Mittels dieser Methode konnten wir Neohepatozyten zweifelsfrei als eine Makrophagen-Subpopulation identifizieren. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Reifung von Dendritischen Zellen und Makrophagen mit verschiedenen Stimuli zur Ausbildung ähnlicher miRNA-Profile führt.

Insgesamt betrachtet sind Neohepatozyten ein effizientes System zur Untersuchung des HCV-Zelleintritts unter Beibehaltung donorspezifischer Eigenschaften. Zukünftig könnten Infektionsstudien mit Neohepatozyten verschiedener Spender durchgeführt werden, um individuelle Faktoren beim HCV-Zelleintritt zu identifizieren. Daraus ließen sich möglicherweise Hinweise über die Ursachen verschiedener Verläufe und Chronifizierungsgrade bei der HCV-Infektion erhalten.

6. Summary

With about 200 million infected patients, the hepatitis C virus is a global health problem. Main target cells of the virus are human hepatocytes. They are difficult to handle and to cultivate *in vitro* and are assessible only by invasive liver biopsies and liver resections. Therefore the major studies of the HCV life cycle are made with immortalised, human cell lines like Huh7 and their subclones. These cells differ from primary hepatocytes in their degenerated genome and the altered metabolism visible in the miRNA profile. Therefore Huh7 cells can not reflect the „in-vivo“-situation. Based on the necessity of a more physiological and patient-specific system for HCV infection studies, neohepatocytes were characterized as an alternative cell system.

Infection experiments with HIV-HCVpp showed a donor-dependend influence of human serum on the infection of neohepatocytes independend of the existence of neutralizing antibodies. The same sera had a inhibiting influence on Huh7 infection. This correlated with the expression of Fc γ -receptors, that could only be observed on cells of monocytic origin. Interestingly neohepatocytes are the only cells of monocytic origin that could be infected efficiently independend of the broad expression of Fc γ -receptors. This could partly be due to the differential expression of the HCV entry factor Occludin. We could observe distinct differences in infection frequency at neohepatocytes prepared at different time points out of monocytes from two representative donors.

Furthermore we classified different cell types with the help of miRNA-profiles. With this method we were able to identify neohepatocytes as a macrophage subpopulation. In addition we could show the development of similar miRNA-profiles in dendritic cells and macrophages matured with different stimuli.

Altogether neohepatocytes are an efficient system for analysing the HCV entry into target cells with donor-specific characteristics. In future infection, neohepatocytes of different donors could be used to identify individual factors in HCV entry. From these it may be possible to identify mechanisms that underly the different HCV-chronofication rates between individuals.

7. Abstract

Basierend auf der Notwendigkeit eines patientenspezifischen Systems für HCV-Infektionsstudien wurden Neohepatozyten im Rahmen der vorliegenden Arbeit als alternatives Zellsystem zu hepatischen Zelllinien charakterisiert. Infektionsexperimente mit HIV-HCVpp zeigten, dass humanes Serum, unabhängig vom Vorhandensein HCV-neutralisierender Antikörper, donorabhängig steigernde oder inhibierende Einflüsse auf die Infektion von Neohepatozyten haben konnte. Die gleichen Seren wirkten stets inhibierend auf die Infektion von Huh7-Zellen. Dies korrelierte mit der Expression von Fc γ -Rezeptoren, die nur auf Zellen monozytärer Herkunft nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise sind aber Neohepatozyten, unabhängig von der breiten Expression von Fc γ -Rezeptoren, die einzigen Zellen monozytärer Herkunft, die effizient infiziert werden konnten. Dies konnte zum Teil auf die differenzielle Expression des HCV-Eintrittsfaktors Occludin zurückgeführt werden. Durch mehrfache, zeitlich versetzte Präparationen von Neohepatozyten aus Monozyten konnten wir deutliche donorspezifische Unterschiede in den Infektionsfrequenzen beobachten. Des Weiteren wurden in dieser Arbeit Neohepatozyten anhand ihres miRNA-Profiles zweifelsfrei als eine Makrophagen-Subpopulation klassifiziert. Insgesamt betrachtet sind Neohepatozyten ein effizientes System zur Untersuchung des HCV-Zelleintritts unter Beibehaltung donorspezifischer Eigenschaften.

Based on the necessity of a more physiological and patient-specific system for HCV infection studies, neohepatocytes were characterized as an alternative cell system to hepatic cell lines. Infection experiments with HIV-HCVpp showed a donor-dependent influence of human serum on the infection of neohepatocytes independent of the existence of neutralizing antibodies. The same sera had an inhibiting influence on Huh7 infection. This correlated with the expression of Fc γ -receptors, that could only be observed on cells of monocytic origin. Interestingly neohepatocytes are the only cells of monocytic origin that could be infected efficiently independent of the broad expression of Fc γ -receptors. This could partly be due to the differential expression of the HCV entry factor Occludin. We could observe distinct differences in infection frequency at neohepatocytes prepared at different time points out of monocytes from two representative donors. Furthermore we were able to identify neohepatocytes as a macrophage subpopulation with their miRNA-profiles. Altogether neohepatocytes are an efficient system for analysing the HCV entry into target cells with donor-specific characteristics.

8. Literaturverzeichnis

Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS pathogens* 4, e1000035.

Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M.J., Miyamura, T., et al. (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1200-1205.

Barroso-del Jesus, A., Lucena-Aguilar, G., and Menendez, P. (2009). The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8, 394-398.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and Andre, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in microbiology* 19, 95-103.

Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., et al. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry* 278, 41003-41012.

Barth, H., Schnober, E.K., Zhang, F., Linhardt, R.J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2006). Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *Journal of virology* 80, 10579-10590.

Bartosch, B., and Cosset, F.L. (2006). Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 348, 1-12.

Bartosch, B., Dubuisson, J., and 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., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.M., Lavillette, D., and Cosset, F.L. (2005).** An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *Journal of virology* 79, 8217-8229.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Bartosch, B., Cosset, F.L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernandez, A., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M., et al. (2009).** The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *Journal of virology* 83, 8012-8020.
- Bensadoun, P., Rodriguez, C., Soulier, A., Higgs, M., Chevaliez, S., and Pawlotsky, J.M. (2011).** Genetic background of hepatocyte cell lines: Are in vitro hepatitis C virus research data reliable? *Hepatology (Baltimore, Md)* 54, 748.
- Beutler, B.A. (2009).** TLRs and innate immunity. *Blood* 113, 1399-1407.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006).** Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology* 80, 6964-6972.
- Blight, K.J., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2002).** Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology* 76, 13001-13014.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R.G., Ratnier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.P., Penin, F., and McLauchlan, J. (2006).** Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The Journal of biological chemistry* 281, 22236-22247.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F., and Lavergne, J.P. (2005).** Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *Journal of virology* 79, 11353-11365.
- Bradley, D.W., McCaustland, K.A., Cook, E.H., Schable, C.A., Ebert, J.W., and Maynard, J.E. (1985).** Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 88, 773-779.
- Brimacombe, C.L., Grove, J., Meredith, L.W., Hu, K., Syder, A.J., Flores, M.V., Timpe, J.M., Krieger, S.E., Baumert, T.F., Tellinghuisen, T.L., et al. (2011).** Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *Journal of virology* 85, 596-605.

Butler, S.L., Dong, H., Cardona, D., Jia, M., Zheng, R., Zhu, H., Crawford, J.M., and Liu, C. (2008). The antigen for Hep Par 1 antibody is the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 88, 78-88.

Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 15524-15529.

Catanese, M.T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J.K., Paonessa, G., Rice, C.M., Cortese, R., Vitelli, A., et al. (2010). Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. Journal of virology 84, 34-43.

Chang, J., Guo, J.T., Jiang, D., Guo, H., Taylor, J.M., and 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.

Chen, G., and Goeddel, D.V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science (New York, NY 296, 1634-1635.

Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and 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.

Chu, P.G., Ishizawa, S., Wu, E., and Weiss, L.M. (2002). Hepatocyte antigen as a marker of hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical comparison to carcinoembryonic antigen, CD10, and alpha-fetoprotein. The American journal of surgical pathology 26, 978-988.

Clarke, D., Griffin, S., Beales, L., Gelais, C.S., Burgess, S., Harris, M., and Rowlands, D. (2006). Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro. The Journal of biological chemistry 281, 37057-37068.

Cocquerel, L., Meunier, J.C., Pillez, A., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998). A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. Journal of virology 72, 2183-2191.

Cocquerel, L., Voisset, C., and Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. The Journal of general virology 87, 1075-1084.

- Cohen, S.N., Chang, A.C., and 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.
- Cristofari, G., Ivanyi-Nagy, R., Gabus, C., Boulant, S., Lavergne, J.P., Penin, F., and Darlix, J.L. (2004).** The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic acids research* 32, 2623-2631.
- Crosby, H.A., Nijjar, S.S., de Goyet Jde, V., Kelly, D.A., and Strain, A.J. (2002).** Progenitor cells of the biliary epithelial cell lineage. *Seminars in cell & developmental biology* 13, 397-403.
- Crotty, S., Cameron, C., and Andino, R. (2002).** Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 80, 86-95.
- Cukierman, L., Meertens, L., Bertaux, C., Kajumo, F., and Dragic, T. (2009).** Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts. *Journal of virology* 83, 5477-5484.
- Diepolder, H.M., Zachoval, R., Hoffmann, R.M., Wierenga, E.A., Santantonio, T., Jung, M.C., Eichenlaub, D., and Pape, G.R. (1995).** Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 346, 1006-1007.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and 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., and 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.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007).** Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801-805.

- Fan, Z., van de Rijn, M., Montgomery, K., and Rouse, R.V. (2003).** Hep par 1 antibody stain for the differential diagnosis of hepatocellular carcinoma: 676 tumors tested using tissue microarrays and conventional tissue sections. *Mod Pathol* 16, 137-144.
- Farquhar, M.J., and McKeating, J.A. (2008).** Primary hepatocytes as targets for hepatitis C virus replication. *Journal of viral hepatitis* 15, 849-854.
- Ferracin, M., Veronese, A., and Negrini, M. (2010).** miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. Expert review of molecular diagnostics 10, 297-308.
- Flint, M., von Hahn, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C.T., Balfe, P., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2006).** Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *Journal of virology* 80, 11331-11342.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998).** Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of cell biology* 141, 1539-1550.
- Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., and 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.
- Gastaminza, P., Dryden, K.A., Boyd, B., Wood, M.R., Law, M., Yeager, M., and Chisari, F.V. (2010).** Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *Journal of virology* 84, 10999-11009.
- Gastaminza, P., Kapadia, S.B., and Chisari, F.V. (2006).** Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *Journal of virology* 80, 11074-11081.
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., Zarski, J.P., and Drouet, E. (2002).** Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *Journal of medical virology* 68, 206-215.
- Grammatikos, G., and Sarrazin, C. (2010).** [Chronic hepatitis C]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 135, 2525-2534; quiz 2535-2528.

- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.
- Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., and 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.
- Haberstroh, A., Schnober, E.K., Zeisel, M.B., Carolla, P., Barth, H., Blum, H.E., Cosset, F.L., Koutsoudakis, G., Bartenschlager, R., Union, A., *et al.* (2008). Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 135, 1719-1728 e1711.
- Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., Mee, C.J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., *et al.* (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *The Journal of biological chemistry* 285, 21092-21102.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., *et al.* (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *Journal of virology* 82, 5007-5020.
- He, L.F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H.J., and Purcell, R.H. (1987). Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *The Journal of infectious diseases* 156, 636-640.
- Hoffmann, J.A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and 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.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr., and Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5848-5853.

Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D., and Cameron, C.E. (2005). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 280, 36417-36428.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, NY)* 293, 834-838.

Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 22-32.

Jacob, M.C., Favre, M., and Bensa, J.C. (1991). Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry* 12, 550-558.

Jopling, C.L., Norman, K.L., and Sarnow, P. (2006). Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71, 369-376.

Kakinuma, S., Asahina, K., Okamura, K., Teramoto, K., Tateno, C., Yoshizato, K., Tanaka, Y., Yasumizu, T., Sakamoto, N., Watanabe, M., et al. (2007). Human cord blood cells transplanted into chronically damaged liver exhibit similar characteristics to functional hepatocytes. *Transplantation proceedings* 39, 240-243.

Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637-650.

Keller, A., Leidinger, P., Bauer, A., Elsharawy, A., Haas, J., Backes, C., Wendschlag, A., Giese, N., Tjaden, C., Ott, K., et al. (2011). Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nature methods* 8, 841-843.

Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 376-385.

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

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

- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2006).** Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *Journal of virology* 80, 5308-5320.
- Krieger, M. (2001).** Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *The Journal of clinical investigation* 108, 793-797.
- Krieger, S.E., Zeisel, M.B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H.J., Schnober, E.K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., et al. (2010).** Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology (Baltimore, Md)* 51, 1144-1157.
- Kuhmann, S.E., Platt, E.J., Kozak, S.L., and Kabat, D. (2000).** Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 74, 7005-7015.
- Kunisch, E., Fuhrmann, R., Roth, A., Winter, R., Lungershausen, W., and Kinne, R.W. (2004).** Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Annals of the rheumatic diseases* 63, 774-784.
- Larrick, J.W., Fischer, D.G., Anderson, S.J., and Koren, H.S. (1980).** Characterization of a human macrophage-like cell line stimulated in vitro: a model of macrophage functions. *J Immunol* 125, 6-12.
- Lau, J.Y., Tam, R.C., Liang, T.J., and Hong, Z. (2002).** Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 35, 1002-1009.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J.M., et al. (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.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., et al. (2003).** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

- Levin, M.K., Gurjar, M., and Patel, S.S. (2005).** A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase. *Nature structural & molecular biology* 12, 429-435.
- Lindenbach, B.D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A.J., McKeating, J.A., Lanford, R.E., Feinstone, S.M., Major, M.E., Leroux-Roels, G., et al. (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.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., and Wang, T. (2009).** Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *Journal of virology* 83, 2011-2014.
- Logvinoff, C., Major, M.E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S.M., Alter, H., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (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., and 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., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.L., and Altmeyer, R. (2004).** C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *The Journal of biological chemistry* 279, 32035-32045.
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Jr., Dwek, R.A., Biggin, P.C., Venien-Bryan, C., and Zitzmann, N. (2009).** The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12712-12716.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004).** Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, NY)* 303, 95-98.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J.M., Shanmugam, S., Singh, S.M., Lemon, S.M., and Yi, M. (2011).** Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *Journal of virology* 85, 86-97.

- Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R., and Budkowska, A. (2001).** Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *Journal of virology* 75, 8240-8250.
- Malhi, H., Irani, A.N., Gagandeep, S., and 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.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., et al. (2008).** Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of virology* 82, 7964-7976.
- McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.H., Cort, S., and Albrecht, J.K. (1998).** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *The New England journal of medicine* 339, 1485-1492.
- Meuleman, P., and Leroux-Roels, G. (2008).** The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral research* 80, 231-238.
- Meyer, K., Ait-Goughoulte, M., Keck, Z.Y., Fong, S., and Ray, R. (2008).** Antibody-dependent enhancement of hepatitis C virus infection. *Journal of virology* 82, 2140-2149.
- Micklem, K., Rigney, E., Cordell, J., Simmons, D., Stross, P., Turley, H., Seed, B., and Mason, D. (1989).** A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies. *British journal of haematology* 73, 6-11.
- Montalbano, M., and Neff, G.W. (2005).** An update in liver transplantation in patients with hepatitis B and hepatitis C. *Minerva gastroenterologica e dietologica* 51, 109-126.
- Montserret, R., Saint, N., Vanbelle, C., Salvay, A.G., Simorre, J.P., Ebel, C., Sapay, N., Renisio, J.G., Bockmann, A., Steinmann, E., et al. (2010).** NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis C virus. *The Journal of biological chemistry* 285, 31446-31461.

- Moradpour, D., F. Penin, et al. (2007).** Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5(6): 453-463.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008).** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002).** miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development* 16, 720-728.
- Muller, W., Fusting, M., and Firsching, R. (1987).** DNA pattern in choroid plexus papillomas. *Zentralblatt fur Neurochirurgie* 48, 102-105.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982).** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* 42, 3858-3863.
- Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Burt, A.D., Martin, C., Pumechockchai, W., and Toms, G.L. (2006).** Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *Journal of virology* 80, 2418-2428.
- Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., and 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.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L., and Baltimore, D. (1993).** Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8392-8396.
- Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., et al. (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.
- Pfeffer, S., and Baumert, T.F. (2010).** Antagonizing microRNA-122 and treatment of hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 51, 1461-1463.

Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2003). Tissue culture and animal models for hepatitis C virus. *Clinics in liver disease* 7, 23-43.

Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.L., *et al.* (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.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., *et al.* (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., and Rice, C.M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882-886.

Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of virology* 77, 4070-4080.

Randall, G., Panis, M., Cooper, J.D., Tellinghuisen, T.L., Sukhodolets, K.E., Pfeffer, S., Landthaler, M., Landgraf, P., Kan, S., Lindenbach, B.D., *et al.* (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.

Reijerkerk, A., Kooij, G., van der Pol, S.M., Khazen, S., Dijkstra, C.D., and de Vries, H.E. (2006). Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells. *Faseb J* 20, 2550-2552.

Reynolds, G.M., Harris, H.J., Jennings, A., Hu, K., Grove, J., Lalor, P.F., Adams, D.H., Balfe, P., Hubscher, S.G., and McKeating, J.A. (2008). Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology (Baltimore, Md)* 47, 418-427.

Riquelme, P., Wundt, J., Hutchinson, J.A., Brulport, M., Jun, Y., Sotnikova, A., Girreser, U., Braun, F., Govert, F., Soria, B., *et al.* (2009). A refined characterisation of the NeoHepatocyte phenotype necessitates a reappraisal of the transdifferentiation hypothesis. *Differentiation; research in biological diversity* 77, 263-276.

- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., et al. (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., and 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., Martin, F., Brulport, M., Schormann, W., Hengstler, J.G., Klapper, W., Ulrichs, K., Hutchinson, J.A., et al. (2005b).** Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 128, 1774-1786.
- Russ, W.P., and Engelman, D.M. (2000).** The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *Journal of molecular biology* 296, 911-919.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2003).** The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11646-11651.
- Sattentau, Q. (2008).** Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nature reviews* 6, 815-826.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (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.
- Seifertova, M. (1981).** Karyotypes of the 5-azacytidine-sensitive and -resistant line of AKR mouse leukemia. *Neoplasma* 28, 317-323.
- Serebrov, V., and Pyle, A.M. (2004).** Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 430, 476-480.
- Siridechadilok, B., Fraser, C.S., Hall, R.J., Doudna, J.A., and Nogales, E. (2005).** Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science (New York, NY)* 310, 1513-1515.

- Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., and 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.
- Stanley, E.R., Berg, K.L., Einstein, D.B., Lee, P.S., and Yeung, Y.G. (1994).** The biology and action of colony stimulating factor-1. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 12 Suppl 1, 15-24; discussion 25.
- Stefani, G., and Slack, E.J. (2008).** Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 219-230.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y.M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and 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, C.S., Lavillette, D., Marin, M., and Kabat, D. (2003).** Cell surface receptors for gammaretroviruses. *Current topics in microbiology and immunology* 281, 29-106.
- Taylor, C.S., Nouri, A., and Kabat, D. (2000).** Cellular and species resistance to murine amphotropic, gibbon ape, and feline subgroup C leukemia viruses is strongly influenced by receptor expression levels and by receptor masking mechanisms. *Journal of virology* 74, 9797-9801.
- Takada, A., Watanabe, S., Okazaki, K., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2001).** Infectivity-enhancing antibodies to Ebola virus glycoprotein. *Journal of virology* 75, 2324-2330.
- Tellinghuisen, T.L., Evans, M.J., von Hahn, T., You, S., and Rice, C.M. (2007).** Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *Journal of virology* 81, 8853-8867.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008a).** Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS pathogens* 4, e1000032.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., Treadaway, J.C., and Rice, C.M. (2008b).** Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *Journal of virology* 82, 1073-1083.

- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., and Rice, C.M. (2004).** The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *The Journal of biological chemistry* 279, 48576-48587.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C., and Chisari, F.V. (2001).** Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of experimental medicine* 194, 1395-1406.
- Tscherne, D.M., Jones, C.T., Evans, M.J., Lindenbach, B.D., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2006).** Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of virology* 80, 1734-1741.
- Valli, M.B., Crema, A., Lanzilli, G., Serafino, A., Bertolini, L., Ravagnan, G., Ponzetto, A., Menzo, S., Clementi, M., and Carloni, G. (2007).** Molecular and cellular determinants of cell-to-cell transmission of HCV in vitro. *Journal of medical virology* 79, 1491-1499.
- Valli, M.B., Serafino, A., Crema, A., Bertolini, L., Manzin, A., Lanzilli, G., Bosman, C., Iacovacci, S., Giunta, S., Ponzetto, A., et al. (2006).** Transmission in vitro of hepatitis C virus from persistently infected human B-cells to hepatoma cells by cell-to-cell contact. *Journal of medical virology* 78, 192-201.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J., and 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.
- von Hahn, T., Lindenbach, B.D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2006).** Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43, 932-942.
- Vorwerk, S., Ganter, K., Cheng, Y., Hoheisel, J., Stahler, P.F., and Beier, M. (2008).** Microfluidic-based enzymatic on-chip labeling of miRNAs. *New biotechnology* 25, 142-149.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003).** Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation* 10, 45-65.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., et al. (2005).** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine* 11, 791-796.

- Wee, A. (2006).** Diagnostic utility of immunohistochemistry in hepatocellular carcinoma, its variants and their mimics. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14, 266-272.
- Wennerberg, A.E., Nalesnik, M.A., and Coleman, W.B. (1993).** Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *The American journal of pathology* 143, 1050-1054.
- Witteveldt, J., Evans, M.J., Bitzegeio, J., Koutsoudakis, G., Owsianka, A.M., Angus, A.G., Keck, Z.Y., Fong, S.K., Pietschmann, T., Rice, C.M., et al. (2009).** CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *The Journal of general virology* 90, 48-58.
- Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S.C., Montelaro, R.C., Coyne, C.B., and 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, X., Qiao, M., Atanasov, I., Hu, Z., Kato, T., Liang, T.J., and Zhou, Z.H. (2007).** Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology* 367, 126-134.
- Zeisel, M.B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S., and Baumert, T.F. (2011).** Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *Journal of hepatology* 54, 566-576.
- Zeisel, M.B., Koutsoudakis, G., Schnober, E.K., Haberstroh, A., Blum, H.E., Cosset, F.L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoel, M., Royer, C., et al. (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.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C.M., and 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., and 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.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9294-9299.

Zhu, L.H., Liu, T., Tang, H., Tian, R.Q., Su, C., Liu, M., and Li, X. (2010). MicroRNA-23a promotes the growth of gastric adenocarcinoma cell line MGC803 and downregulates interleukin-6 receptor. *The FEBS journal* 277, 3726-3734.

Danksagung

Ich danke Professor Andreas Meyerhans dafür, dass er mir ein so interessantes Thema überlassen hat, das ich selbständig und mit viel Eigenverantwortung bearbeiten durfte.

Ebenso danke ich Professor Meese für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt auch den Spendern der Blutspendezentrale in den Winterbergkliniken, Saarbrücken. Des Weiteren danke ich den Müttern (und Neugeborenen), die freundlicherweise ihr Nabelschnurblut für die Forschung zur Verfügung gestellt haben.

Außerdem danke ich Petra Leidinger, Andreas Keller und Christina Backes für die Übernahme der miRNA-Analysen und Mathias Wagner für die immunzytochemischen Färbungen. Professor Baumert, Mirjam Zeisel, Eric Robinet und Cathy Royer danke ich für die anregenden Diskussionen und die Unterstützung mit Antikörpern und Hepatozyten.

Besonders danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Virologie, die mir nicht nur ihr Blut gespendet haben, sondern mich auch immer unterstützt haben. Vielen Dank Tim, Anke, Marie, Javier, Tanja, Tanja, Nicoletta, Barbara, B², Alina, Anna, Tina, Jan, David, Henrik und Thorsten.

Ich danke meinen Freunden, den Bohemians, der Academy und ganz besonders Michael und meiner Familie für die stete Unterstützung und willkommene Ablenkung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michael Ehrhardt
Geburtstag	01. September 1981
Geburtsort	Neunkirchen, Saar

Schulische Ausbildung

Aug. 1988 – Jul. 1992	Pestalozzi-Grundschule, Neunkirchen
Aug. 1993 - Mai 2001	Gymnasium am Steinwald, Neunkirchen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

Aug. 2001 – Mai. 2002	AIDS-Hilfe Saar e.V., Saarbrücken
-----------------------	-----------------------------------

Studium und wissenschaftlicher Werdegang

Okt. 2002 – Okt. 2008	Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes
Ab Jan. 2009	Dissertation als wissenschaftlicher Mitarbeiter 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, Dezember 2011

(Michael Ehrhardt)