

**Generierung und Charakterisierung humaner Hepatitis C Virus
(HCV) -spezifischer Antikörperfragmente und
Analyse des Einflusses von HCV auf die Expression zellulärer
Proteine**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Juliane Karthe

aus Oranienburg

August 2009

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Johannes Bode
Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2009

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht:in Originalarbeiten

Karthe J.*, Tessmann K.*, Li J., Machida R., Daleman M., Häussinger D., Heintges T. (2008) *Specific targeting of hepatitis C virus core protein by an intracellular single-chain antibody of human origin*. Hepatology 48(3): 702-712 (* gleichberechtigte Erstautoren)

Brenndörfer E.D., **Karthe J.**, Frelin L., Cebula P., Erhardt A., Schulte am Esch J., Hengel H., Bartenschlager R., Sällberg M., Häussinger D., Bode J.G. (2009) *The non-structural 3/4A protease of HCV activates EGF-induced signal-transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase*. Hepatology 49(6): 1810-1820

Bode J.G., Brenndörfer E.D., **Karthe J.** and Häussinger D. (2009) *Interplay between host cell and hepatitis C virus regulating viral replication*. Biological Chemistry (accepted)

als Posterbeiträge

Hebler J., Tessmann K., Häussinger D., Heintges T. *Inhibition of HCV NS3 helicase/ protease activity by recombinant human antibodies*. 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oktober 2004, Heidelberg

Brenndörfer E.D., **Karthe J.**, Frelin L., Cebula P., Erhardt A., Sällberg M., Häussinger D., Bode J.G. *The hepatitis C virus non-structural 3/4A protease interferes with EGF-induced signal-transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase*. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oktober 2008, San Antonio, USA

Brenndörfer E.D., **Karthe J.**, Frelin L., Cebula P., Erhardt A., Sällberg M., Häussinger D., Bode J.G. *The hepatitis C virus non-structural 3/4A protease cleaves the T-cell protein tyrosine phosphatase thereby interfering with EGF-induced signal-transduction*. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2008, San Francisco, USA

Karthe J., Brenndörfer E.D., Frelin L., Häussinger D., Bode J.G. *Proteomic analysis of liver tissue from hepatitis C virus non-structural 3/4A transgenic mice to identify prospective NS3/4A targets*. 4th International Conference of the SFB 575 "Experimental Hepatology", November 2008, Düsseldorf

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
TABELLENVERZEICHNIS	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	12
1.1 Das Hepatitis C Virus	12
1.1.1 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus	12
1.1.2 Das Core Protein	15
1.1.3 Der NS3/4A-Komplex	18
1.1.4 Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis C Virus	19
1.1.5 Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Wirtszelle	21
1.1.6 Modellsysteme zur Untersuchung des Hepatitis C Virus	22
1.1.7 Therapie der Hepatitis C Virus Infektion	23
1.2 Das Immunsystem	24
1.2.1 Die spezifische, humorale Immunantwort	27
1.2.2 Struktur und Funktion von Immunglobulinen	27
1.3 Die Generierung von humanen Antikörperfragmenten mit Hilfe der Phage-Display Technologie	30
1.3.1 Phagen-Biologie und Phage-Display	31
1.3.2 Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente	37
1.3.3 Einsatz und Bedeutung rekombinanter, therapeutischer Antikörper	38
1.4 Zielsetzung der Arbeit	40
2 MATERIAL UND METHODEN	41
2.1 Material, Substanzen und Lösungen	41
2.1.1 Materialien für die Zellkultur	41
2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze	41
2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien	41
2.1.4 Kits	42
2.1.5 PCR und Klonierung	42
2.1.6 Plasmide	42
2.1.7 Primärantikörper und Sekundärantikörper	43
2.1.8 Fluoreszierende Farbstoffe	44

2.1.9	Materialien für den Phage-Display	44
2.1.10	Computerprogramme und Datenbanken zur Datenauswertung	44
2.2	Methoden	45
2.2.1	Zellbiologische Methoden	45
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	46
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	52
2.2.4	FRET	57
2.2.5	Phage-Display	58
2.2.6	Statistische Auswertung	64
3	ERGEBNISSE	65
3.1	Generierung und Charakterisierung humaner Hepatitis C Virus (HCV) -spezifischer Antikörperfragmente	65
3.1.1	Affinitätsselektion (Panning) gegen HCV Core Peptide	65
3.1.2	Identifizierung und Klassifizierung hochaffiner humaner Antikörperfragmente gegen HCV Core Peptide	67
3.1.3	Identifizierung des Bindungsmotivs des Sc42	81
3.1.4	Nachweis der intrazellulären Interaktion zwischen den Antikörperfragmenten und dem HCV Core Protein mittels FRET	84
3.1.5	Anwendung verschiedener Systeme zur Untersuchung der funktionellen Relevanz des Sc42	85
3.2	Einfluss von HCV auf die Expression zellulärer Proteine	92
3.2.1	Vergleichende Proteomanalyse von NS3/4A-transgenen Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen	92
3.2.2	Identifizierung zellulärer Zielproteine des Hepatitis C Virus	95
4	DISKUSSION	104
4.1	Generierung und Charakterisierung humaner Hepatitis C Virus (HCV) -spezifischer Antikörperfragmente	104
4.2	Einfluss von HCV auf die Expression zellulärer Proteine	115
5	ZUSAMMENFASSUNG	119
6	SUMMARY	121
	LITERATURVERZEICHNIS	123
	DANKSAGUNG	134
	LEBENS LAUF	135

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1	Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des Hepatitis C Virus	13
1.2	Zusammenfassende Darstellung der Funktion des HCV Core Proteins	18
1.3	Zusammenfassende Darstellung des Lebenszyklus des Hepatitis C Virus	21
1.4	Zusammenfassende Darstellung der angeborenen und adaptiven Immunantwort	26
1.5	Schematische Darstellung eines Immunglobulins G und den davon abgeleiteten Antikörperfragmenten	29
1.6	Aufbau, Gene und Genprodukte des filamentösen Phagen f1 (M13/fd)	32
1.7	Zusammenfassende Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte des Phage-Displays	36
1.8	Eine Auswahl abgeleiteter, rekombinanter Antikörperformate	38

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1	Prinzip der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfertechnik am Beispiel des Donor / Akzeptor-Paares CFP / YFP	58
2.2	Ausgewählte Peptide des HCV Core Proteins für die Affinitätsselektion	61

3. ERGEBNISSE

3.1	Affinitätsselektion der Phagenpopulation, die spezifisch an das Jak- und Stat-Peptid des HCV Core Proteins binden	67
3.2	Untersuchung der Bindungsaffinität der selektierten Antikörperfragmente mittels ELISA	69
3.3	Western Blot Analysen der aus dem Periplasma isolierten Antikörperfragmente	71
3.4	Nachweis der Bindung der selektierten Jak/Stat-Antikörperfragmente an HCV Core	73
3.5	Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen Jak-Antikörperfragmente nach Kabat ^[4]	74
3.6	Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen Stat-Antikörperfragmente nach Kabat ^[4]	75
3.7	Kolokalisation der selektierten Antikörperfragmente mit HCV Core in der Hepatomazelllinie Huh7 wt	79
3.8	Identifizierung des putativen Bindungsmotivs des Antikörperfragments Sc42 innerhalb des HCV Core Proteins	82
3.9	Kolokalisation des HCV Core Proteins mit Adipophilin (ADRP) in der Hepatomazelllinie Huh7 wt	83

3.10	Nachweis der intrazellulären Interaktion des Sc42 mit dem HCV Core Protein mittels FRET-Analyse	84
3.11	HCV Core-induzierte transkriptionelle Aktivierung des SOCS3-Promotors und die Überprüfung der inhibitorischen Wirkung des Antikörperfragments Sc42	85
3.12	HCV Core-supprimierte mRNA-Expression der Cyclooxygenase 2 und Überprüfung der inhibitorischen Wirkung des Antikörperfragments Sc42	87
3.13	Bestimmung der Infektiosität von Zellkulturüberständen des Hepatitis C Virus JFH1/adpt1	89
3.14	Inhibitorische Wirkung des Sc42 Antikörperfragments auf die HCV Core Expression, die HCV Replikation und die Zellproliferation	91
3.15	Klassifizierung der differentiell exprimierten Proteine aus Leberlysaten von NS3/4A-transgenen Mäusen	93
3.16	Erhöhte mRNA-Expression von Apolipoprotein E sowohl in NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zellen als auch in subgenomischen HCV Replikonzellen	96
3.17	Erhöhte Proteinexpression von Apolipoprotein E sowohl in NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zellen als auch in subgenomischen HCV Replikonzellen	97
3.18	Proteinexpression von Apolipoprotein E in Patienten mit chronischer HCV Infektion	98
3.19	Subzelluläre Lokalisation von Apolipoprotein E in den Hepatomazelllinien Huh7 wt, Huh7 Core-NS3 und Huh 9-13	99
3.20	Kolokalisation von Apolipoprotein E mit dem strukturellen HCV Protein Core	100
3.21	Kolokalisation von Apolipoprotein E mit den nichtstrukturellen HCV Proteinen	101
3.22	Kolokalisation des Golgi-Markers GM130 mit dem nichtstrukturellen HCV Protein NS3	102
4.	DISKUSSION	
4.1	Zusammenfassende Darstellung der Isolierung humaner HCV Core-spezifischer Antikörperfragmente sowie der putativen, antiviralen Wirkung des Sc42	113
4.2	Zusammenfassende Darstellung der funktionellen Relevanz von Apolipoprotein E für den viralen Lebenszyklus des Hepatitis C Virus	118

TABELLENVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

- | | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 | F-spezifische filamentöse Phagengene bzw. -proteine, ihre Funktion und die mögliche Verwendung im Phage-Display | 33 |
| 1.1 | Für die klinische Anwendung zugelassene rekombinante Antikörper | 39 |

2. MATERIAL UND METHODEN

- | | | |
|-----|---------------------------------------------------------|----|
| 2.1 | Verwendete Primär- und Sekundärantikörper | 43 |
| 2.2 | Verwendete Zelllinien und ihre Kultivierung | 45 |
| 2.3 | Verwendete Oligonukleotide für Real-Time-PCR | 47 |
| 2.4 | Verwendete Oligonukleotide für PCR | 48 |
| 2.5 | Verwendete <i>E. coli</i> Stämme mit Genotypbezeichnung | 51 |
| 2.6 | Verwendete Fluorophore | 57 |

3. ERGEBNISSE

- | | | |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 | Anreicherung der selektionierten scFv Phagen gegen das Jak- und Stat-Peptid des HCV Core Proteins | 66 |
| 3.2 | Einteilung der VL und VH der humanen Jak-scFv in Klassen, Subgruppen und Zuordnung der ursprünglichen Keimbahngene der einzelnen Segmente | 77 |
| 3.3 | Einteilung der VL und VH der humanen Stat-scFv in Klassen, Subgruppen und Zuordnung der ursprünglichen Keimbahngene der einzelnen Segmente | 78 |
| 3.4 | Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine aus Leberlysaten von NS3/4A-transgenen Mäusen und ihre Funktionen | 94 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2-Azino-di-3-Ethylbenzthiazolinsulfonat
ApoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar/e
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CARDIF	<i>CARD adaptor inducing IFNβ</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
C _H 1	konstante CH1-Domäne der schweren Kette
C _L 1	konstante CL1-Domäne der leichten Kette
CMV	Cytomegalievirus
D	Deutschland
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB	<i>avian erythroblastosis oncogene B</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallin</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FR	<i>framework region</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GB	Großbritannien
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HCV	Hepatitis C Virus
HER-2	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>

His	Histidin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria-broth</i>
LD	<i>lipid droplet</i> , Lipidtröpfchen
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
NK	<i>natural killer</i>
NS	nicht strukturell
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pfu	<i>plaque forming units</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PK	Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rezeptor
RIG	<i>retinoic acid inducible gene</i>
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>single chain fragment of the variable region</i>
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>

Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCID50	<i>tissue culture infective dose 50</i>
Thr	Threonin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIP47	<i>mannose-6-phosphate receptor binding protein 1</i>
tk	<i>thymidine kinase</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>TNF-receptor associated protein</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFNβ</i>
Tris	Trishydroxy-Aminomethan
Tyk	Tyrosinkinase
Tyr	Tyrosin
U	unit(s)
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VH	variable Domäne der schweren Kette
VL	variable Domäne der leichten Kette
v/v	Volumenprozent
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom 4-Chlor-3-indolyl β -D-Galaktopyranosid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Die Standardeinheiten des SI-Systems wurden nicht aufgenommen. Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Hepatitis C Virus

Bereits in den 70er Jahren konnten die Hepatitis Viren A und B als Auslöser viral verursachter Leberentzündungen identifiziert werden. Darüber hinaus wurden jedoch Verlaufsformen der Hepatitis beobachtet, bei welchen weder Hepatitis A noch B als verursachender Erreger nachgewiesen werden konnte und zunächst als Non-A/Non-B Hepatitiden bezeichnet wurden. Im Jahre 1989 konnte die Arbeitsgruppe um M. Houghton erstmalig mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungsmethoden das Hepatitis C Virus als Erreger der so genannten Non-A/Non-B Hepatitis identifizieren und charakterisieren^[8]. Das Hepatitis C Virus ist weltweit eine der häufigsten Ursachen chronischer Lebererkrankungen. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind über 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus infiziert, was einer Prävalenz von etwa 3 % entspricht^[9]. In Deutschland hingegen beträgt die Prävalenz der HCV Infektionen nur 0,6-0,7 %. Es wird davon ausgegangen, dass etwa 500.000 Menschen in Deutschland Träger des Hepatitis C Virus sind^[10, 11] und pro Jahr 500 Neuinfektionen hinzukommen.

1.1.1 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus

Auf der Grundlage molekularbiologischer Untersuchungen lässt sich das Hepatitis C Virus in die Familie der Flaviviridae und spezieller in die Gattung der Hepaciviren einordnen. Zu der Familie der Flaviviridae werden auch die Gattungen der Flaviviren und der Pestiviren gezählt, die eine Vielzahl von Viruserkrankungen sowohl beim Menschen als auch beim Tier hervorrufen können. Beispiele für Flaviviren sind unter anderem das Gelbfieber-Virus, das Dengue-Virus und das West-Nil-Virus, wohingegen die hauptsächlich tierpathogenen Erreger der klassischen Schweinepest und der bovinen Virusdiarrhoe den Pestiviren zuzuordnen sind.

Das Hepatitis C Virus ist durch einen hohen Grad genetischer Variabilität gekennzeichnet, die aus den fehlenden Korrekturmechanismen (3'-5'-Exonukleaseaktivität) der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase bei gleichzeitig hoher viraler Replikationsrate resultiert. Die durchschnittliche Mutationswahrscheinlichkeit liegt in etwa bei 10^{-4} bis 10^{-5} Austausch pro Nukleotidposition und Replikationszyklus^[12]. Die dadurch entstehenden genetischen Polymorphismen führen zu einer Gruppierung in Genotypen, Subtypen, Isolaten und Quasispezies. Die Klassifizierung des Hepatitis C Virus erfolgt in sechs verschiedene Genotypen (1-6), deren globale Verteilung einer regionalen Spezifität unterliegt. Die häufigste Verbreitung zeigt der Genotyp 1 (1a und 1b), der überwiegend in Europa und Amerika vorkommt. Basierend auf verschiedenen Studien konnte belegt werden, dass in Deutschland

die Genotypen 1b, gefolgt von 1a, 2 und 3 vorherrschend sind ^[13-15]. Der Genotyp 4 kommt überwiegend in Ägypten vor, wohingegen der Genotyp 2 in einigen Regionen Afrikas häufiger zu verzeichnen ist. Trotz der beträchtlichen Sequenzunterschiede innerhalb der verschiedenen Genotypen unterliegen alle der gleichen Genomorganisation (Abbildung 1.1).

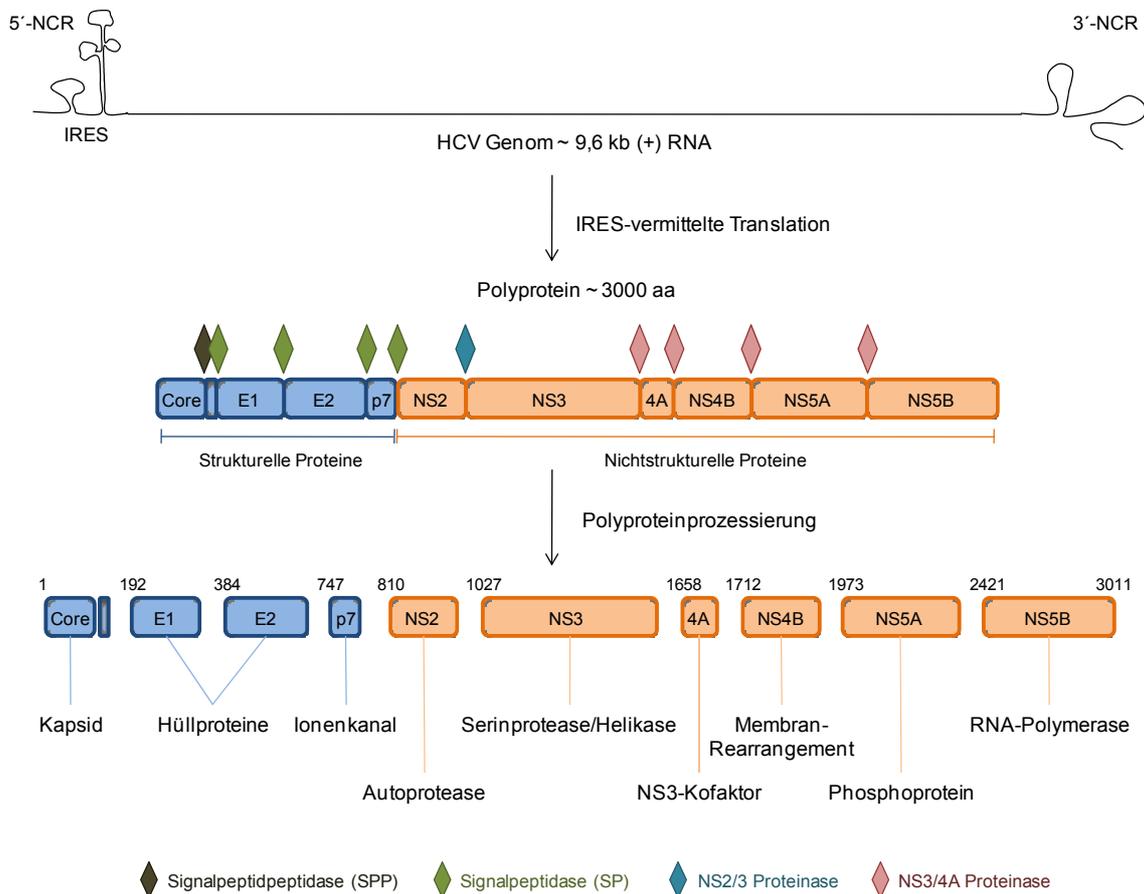


Abbildung 1.1: **Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des Hepatitis C Virus.** Das Hepatitis C Virus umfasst ein 9,6 kb positiv polarisiertes RNA Genom. Durch IRES-vermittelte Translation entsteht ein Vorläuferpolyprotein, welches mit Hilfe zellulärer und viraler Proteasen prozessiert wird. Dabei entstehen vier strukturelle (Core, E1, E2, p7) und sechs nichtstrukturelle (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) Proteine. Abkürzungen: IRES: *internal ribosome entry site*; NCR: *noncoding region*; E1/2: *envelope*; NS: *nonstructural*; HCV: Hepatitis C Virus (modifiziert nach Moradpour *et al.* ^[6])

Das Hepatitis C Virus ist durch ein einzelsträngiges RNA Genom positiver Polarität mit einer Länge von ~ 9600 Nukleotiden gekennzeichnet. Das RNA Genom wird von den 5'- und 3'- nichtkodierenden Regionen (NCRs) flankiert und kodiert für einen einzigen offenen Leserahmen (ORF), der in einem Vorläuferprotein von ~ 3000 Aminosäuren Länge resultiert. Das HCV Polyprotein wird ko- und posttranskriptionell durch zelluläre und virale Proteasen

prozessiert und führt zur Entstehung von insgesamt vier strukturellen und sechs nicht-strukturellen Proteinen (Abbildung 1.1). Die zelluläre Protease, eine Signalpeptidase des Endoplasmatischen Retikulums (ER), spaltet das Polyprotein im aminoterminalen Bereich, welcher für die Strukturproteine kodiert, an vier Positionen und führt zur Freisetzung von Core, E1, E2 und p7. Das RNA-bindende Core Protein ist an der Bildung des viralen Nukleokapsids beteiligt und in seiner Aminosäuresequenz hochkonserviert. Die Strukturproteine E1 und E2 sind Glykoproteine, die als Heterodimere vorliegen und die Virushülle des Hepatitis C Virus bilden. Untersuchungen haben ergeben, dass sie durch ihre Beteiligung beim Viruseintritt ^[16], bei der Bindung an Rezeptoren und der Fusion mit der Wirtszellmembran ^[17] eine wesentliche Rolle im Replikationszyklus des Virus spielen. Das Polypeptid p7 übernimmt keine Funktion bei der RNA Replikation, weist jedoch eine Ionenkanalaktivität auf und scheint essentiell für die Infektiosität des Hepatitis C Virus in Schimpansen zu sein ^[18]. Der Bereich des Polyproteins, der für die Nichtstrukturproteine kodiert, wird durch Virus-eigene Proteasen prozessiert. Die nichtstrukturellen Proteine NS2-NS5B, beinhalten sowohl die Autoprotease NS2-3, welche an der Position NS2/NS3 spaltet, als auch die Serinprotease NS3, welche für die Prozessierung der Proteine NS4A, NS4B, NS5A und NS5B essentiell ist. NS2 ist ein nichtglykosyliertes, integrales Membranprotein und seine einzig bekannte Funktion ist die proteolytische Spaltung im Polyprotein. Allerdings wird auch eine Beteiligung von NS2 sowohl beim Zusammenbau als auch bei der Freisetzung des Virus diskutiert. Das multifunktionelle NS3-Protein beinhaltet N-terminal eine Serinprotease und C-terminal eine RNA-Helikase / NTPase-Domäne. Die Proteaseaktivität von NS3 wird durch den Kofaktor NS4A verstärkt. Der NS3/4A-Komplex ist hauptsächlich für die Polyproteinprozessierung der von NS3 *downstream* gelegenen Proteine verantwortlich und demzufolge essentiell für die Entstehung des viralen RNA-Replikationskomplexes ^[19, 20]. Das nichtstrukturelle NS4B Protein ist ebenfalls ein integrales Membranprotein, welches kotranslational mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums assoziiert ^[21]. NS4B ist in der Lage intrazelluläre Membranveränderungen hervorzurufen, was zur Annahme führt, dass seine Funktion in der Bildung von Membranstrukturen zur Unterstützung der RNA Replikation liegen könnte ^[22]. NS5A ist ein Membran-assoziiertes Phosphoprotein, welches in zwei Formen vorliegt: phosphoryliert (56 kDa) und hyperphosphoryliert (58 kDa). Es ist nicht nur für die Genomreplikation des Virus essentiell, sondern auch für die Inaktivierung antiviraler Wirtsmechanismen ^[23] sowie die Beeinflussung von intrazellulären Signalwegen ^[24, 25]. NS5B ist die katalytische Komponente der HCV RNA-Replikationsmaschinerie, da es die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase besitzt. Dieses essentielle, virale Enzym wurde sowohl auf biochemischer als auch auf struktureller Ebene umfassend charakterisiert ^[26, 27] und zeichnet sich als ein wichtiger Angriffspunkt antiviraler Therapie-strategien ab ^[28].

1.1.2 Das Core Protein

Durch Spaltung an der internen Signalsequenz zwischen Core und E1 mittels einer wirtseigenen Signalpeptidase (SP) entsteht die unreife Form des Core Proteins (p23) mit einer Länge von 191 Aminosäuren. Durch die Signalsequenz am C-Terminus des Proteins erfolgt eine weitere Prozessierung von Core durch eine ebenfalls zelluläre Signalpeptidase (SPP) und führt zur Entstehung des reifen Core Proteins (p21) ^[29]. Die vollständig prozessierte Form von Core ist ein dimeres, alpha-helikales Protein, welches typische Eigenschaften von Membranproteinen ^[30] besitzt und sich in zwei Domänen unterteilen lässt. Die Unterteilung erfolgt in einen N-terminalen Bereich (D1), der etwa zwei Drittel des Proteins ausmacht und hydrophil ist und einen C-terminalen Bereich (D2), der ein Drittel des Proteins umfasst und stark hydrophobe Eigenschaften aufweist. Die D1-Domäne enthält eine Reihe positiv geladener Aminosäuren und ist hauptsächlich in RNA Bindung, Protein-Protein-Interaktionen, transkriptionelle Regulation des Virus ^[29] sowie Multimerisierung von Core involviert. Die D2-Domäne ist sowohl für die korrekte Faltung von D1 verantwortlich als auch für die Assoziation von Core an so genannte Lipidtröpfchen (*lipid droplets: LD*) und weitere Membranstrukturen wie das ER ^[31, 32]. Die Lipidtröpfchen oder Fettvakuolen sind intrazelluläre Depot-Organellen, die sich aus einem hydrophoben Kern neutraler Lipide, Cholesterolestern und Triacylglycerolen zusammensetzen. Umgeben sind sie von einem Monolayer aus Phospholipiden und einigen wenigen assoziierten Proteinen wie Calveolin, Perilipin, Adipophilin (ADRP) und TIP47, die unter anderen an Prozessen wie dem vesikulären Transport, der Membranfusion und der zytosolischen Motilität ^[33] beteiligt sind. LDs besitzen eine funktionelle Relevanz für die VLDL (*very low density lipoprotein*) -Synthese sowie für die Speicherung von Cholesterol und damit für die Homöostase, welche für die Regulation von freiem intrazellulären Cholesterol verantwortlich ist. Wie bereits ausgeführt, erfolgt die Freisetzung von Core aus dem Polyprotein durch zwei Spaltungsereignisse. Nach der Prozessierung durch die SPP transloziert Core von der ER-Membran an die Lipidtröpfchen, an die es über hydrophobe Aminosäuren seiner D2-Domäne bindet ^[31]. Die Assoziation von Core an Lipidtröpfchen tritt nicht nur in HCV-infizierten Hepatozyten von Schimpansen auf, sondern konnte auch in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen und transgenen Mausmodellen bestätigt werden ^[34, 35]. Neuste Erkenntnisse legen nahe, dass die Interaktion zwischen Core und den LDs eine wesentliche Rolle bei der Produktion infektiöser Viruspartikel spielt ^[36, 37]. Die funktionelle Bedeutung von Core liegt hier in der Rekrutierung der HCV RNA, der nichtstrukturellen HCV Proteine, insbesondere NS5A, sowie des vollständigen Replikationskomplexes. Weiterführende Beobachtungen weisen darauf hin, dass Core eine gesteigerte Produktion von LDs induziert und damit vielleicht auch die funktionelle Relevanz hinsichtlich einer Steatosis ^[38] und einem abnormalen Lipidmeta-

bolismus^[39] liefert, welches beides Krankheitsbilder sind, die durch eine chronische HCV Infektion verursacht werden^[40].

Das vollständig prozessierte Core Protein ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert und interagiert so mit einer Reihe von zytoplasmatischen Proteinen, reguliert intrazelluläre Signalwege und kann die Transkription oder die Repression nukleärer Gene veranlassen. Die Rolle des Core Proteins in der Pathogenese der HCV Infektion ist vielfältig. Core kann abhängig von dem eingesetzten experimentellen System sowohl pro-apoptotisch als auch anti-apoptotisch wirken. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass Core die TNF α -^[41] und die CD95^[42]-Ligand-induzierte Apoptose inhibiert. Bei der Verwendung anderer experimenteller Modellsysteme konnte der pro-apoptotische Einfluss von Core allerdings nicht bestätigt werden^[43]. Die Arbeitsgruppe um M. Kohara konnte eine Hemmung der CD95-Ligand-vermittelten Apoptose durch Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und der daraus resultierenden Aktivierung der Caspasen 9, 3 und 7 belegen^[44]. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Core durch direkte Interaktion mit den zytoplasmatischen Domänen von CD95, TNF-R1^[45] und Lymphotoxin- β -Rezeptor^[46] pro-apoptotisch wirkt. HCV Core kann durch Induzierung von oxidativem Stress^[47], Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Erniedrigung des mitochondrialen Transmembranpotentials auch auf mitochondrielle Funktionen Einfluss nehmen und führt hierdurch zu einer Sensitivierung apoptotischer Mechanismen^[48]. Aufgrund der recht kontroversen Beobachtungen bleibt es weiterhin unklar, in welcher Form HCV Core Einfluss auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose nimmt (induzierend oder inhibierend).

HCV Core greift gleichermaßen in inflammatorische Signalwege ein und auch hier legen eine Reihe von partiell kontrovers diskutierten Daten nahe, dass Core sowohl anti- als auch pro-inflammatorisch wirken kann. Effektorproteine der Immunantwort der Wirtszelle, wie die Cyclooxygenase 2 (Cox2)^[49] werden durch das Kapsidprotein des Hepatitis C Virus reguliert. Die Studie von Jhaveri *et al.* konnte belegen, dass Core eine Herunterregulation der Cyclooxygenase 2 bewirkt und legen eine anti-inflammatorische Wirkung dieses HCV Proteins nahe^[50]. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtung ist interessant, dass die Cyclooxygenase 2 auch eine wesentliche Rolle in der Pathogenese anderer, viraler Infektionen wie bei der Replikation des Cytomegalievirus (CMV)^[51] oder des humanen Herpesvirus 6 (HHV-6)^[52] einnimmt. Die Inhibition der induzierbaren Form der Cox2 könnte dem Virus helfen, die wirtseigene Entzündungsantwort zu umgehen und eine persistierende Infektion zu manifestieren.

Eine Vielzahl von Untersuchungen ergaben, dass Core die Expression von viralen und zellulären Proteinen beeinflusst. Unter anderem konnte beobachtet werden, dass HCV Core mit der Proteinkinase R (PKR) direkt interagiert und diese aktiviert^[53]. Die funktionelle Relevanz wird gleichermaßen durch die Beobachtung einer erhöhten PKR-Expression in

HCV-bedingten hepatozellulären Karzinomen (HCC) unterstützt. Die PKR wird nicht nur durch Interferon induziert und spielt bei der Abwehr von viralen Infektionen eine wesentliche Rolle. Sie ist darüber hinaus in die Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellzyklusregulation, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose involviert und beeinflusst die Aktivierung von Schlüsselmolekülen der zellulären Signalübertragung wie NF- κ B^[54] und STAT3^[3]. Yoshida *et al.* konnte eine direkte Interaktion von HCV Core mit STAT3 und dessen selektive Aktivierung nachweisen. Die Aktivierung von STAT3 durch Core in Mausfibroblasten resultierte in einer STAT3-abhängigen Proliferation und Hochregulation von Bcl-XL und Cyclin D1. Die HCV Core-bedingte Aktivierung des STAT3^[3]- bzw. des Raf1/MAPK^[55]-Signalweges hat eine Steigerung der Zellproliferation zur Folge, die unter gewissen Umständen zu einer Zelltransformation führen kann^[3, 56]. Somit kann HCV Core zur HCC-Entstehung beitragen, was mit Hilfe transgener Mausmodelle belegt werden konnte^[57]. Die Expression von HCV Core kann unterschiedlich auf die JAK/STAT-vermittelte intrazelluläre Signalübertragung wirken. Hosui *et al.* konnte darlegen, dass HCV Core die IL-6-vermittelte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges inhibiert, die durch Behandlung mit IFN γ bedingte Aktivierung des JAK/STAT-Weges dagegen verstärkt. Weitere Beobachtungen legen nahe, dass die Core-vermittelte Modulation des JAK/STAT-Signalweges über zwei verschiedene Mechanismen erfolgt: zum einen über die Bindung von Core an das JAK-Protein und zum anderen über die Hochregulation der Expression des IFN γ -Rezeptors 2 (IFNGR2).

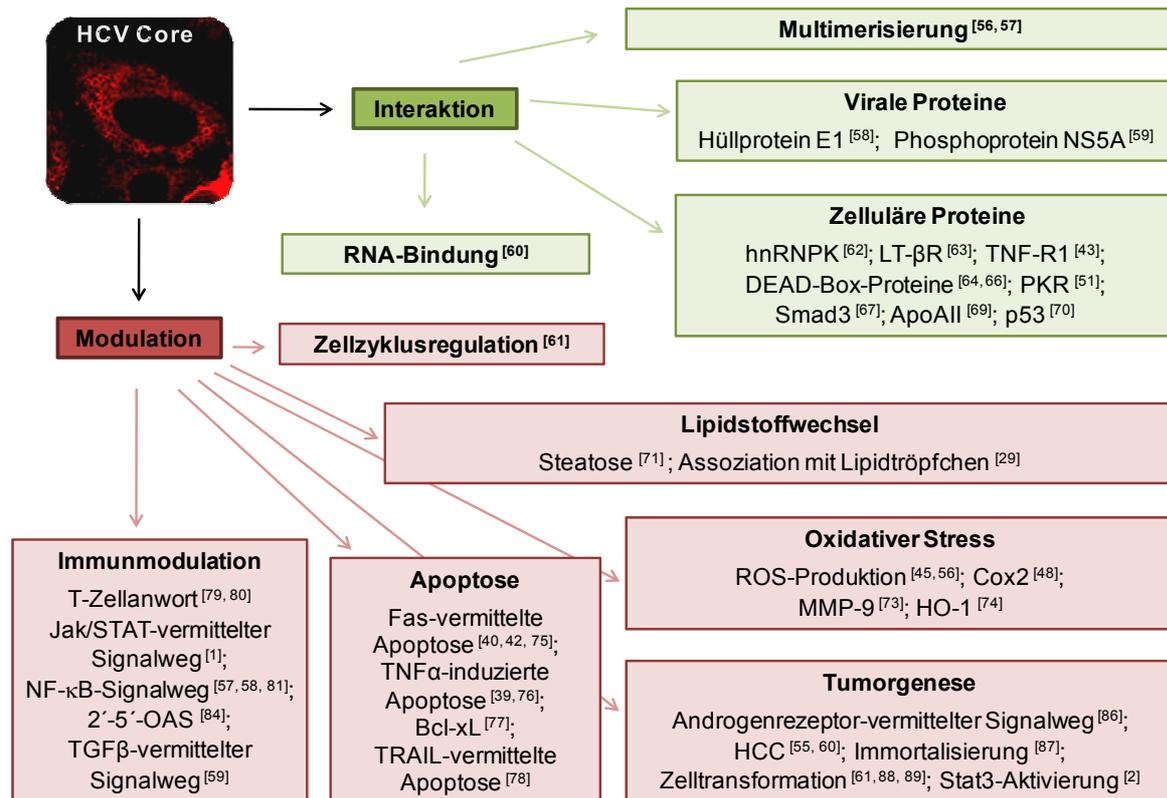


Abbildung 1.2: **Zusammenfassende Darstellung der Wirkung und Funktion des HCV Core Proteins.** Abkürzungen: hnRNPK: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*; LT-βR: Lymphotoxin-β-Rezeptor; TNF-R1: Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1; PKR: Proteinkinase R; ApoAII: Apolipoprotein All; Cox2: Cyclooxygenase 2; MMP-9: Matrix-Metalloproteinase 9; HO-1: *heme oxygenase 1*; HCC: *hepatocellular carcinoma*; STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*; JAK: *janus kinase*; OAS: *oligoadenylate synthase*; TGFβ: *transforming growth factor beta*; TNFα: Tumornekrosefaktor α

1.1.3 Der NS3/4A-Komplex

NS3 ist ein multifunktionelles Protein, das sowohl für die Polyproteinprozessierung als auch für die Replikation des Virus notwendig ist. Das NS3-Protein besteht aus zwei funktionellen Domänen. Die Serinprotease-Domäne ist N-terminal gelegen und umfasst die ersten 189 Aminosäuren des Proteins, wohingegen die Helikase / NTPase-Domäne durch den C-terminalen Bereich des Proteins kodiert wird und zwei Drittel des Proteins darstellt (442 AS). Die Serinprotease-Domäne ist mit dem Kofaktor NS4A (54 AS) assoziiert, welcher der Stabilisierung der Protease dient und für die Prozessierung der Schnittstellen 4A/4B, 4B/5A sowie 5A/5B essentiell ist. Weiterhin bewerkstelligt NS4A die Verankerung von NS3 mit zellulären Membranen, wie zum Beispiel mit der Membran des ERs oder auch des Replikationskomplexes mit Hilfe seiner N-terminalen hydrophoben Aminosäurereste ^[58]. Die C-terminal gelegene DexH/D-box RNA-Helikase ist ein Enzym, das durch die NTP-Hydrolyse erzeugte Energie zur Entwindung doppelsträngiger RNA, RNA/DNA-Homoduplexe sowie

RNA/DNA-Heteroduplexe in 3'→5'-Richtung nutzt ^[59]. Der Wirkungsmechanismus der Helikase ist noch nicht vollständig verstanden, aber es konnte nachgewiesen werden, dass die Helikaseaktivität durch die Interaktion mit der NS3 Serinprotease reguliert wird ^[60]. Es wird angenommen, dass die Funktion der Helikase in der Initiierung der RNA Synthese, in der Entwindung von doppelsträngigen RNA Zwischenstufen zur Eliminierung von Sekundärstrukturen sowie in der Entfernung von Proteinen (Nukleinsäure-bindende Proteine) oder anderen *trans*-wirkenden Faktoren vom RNA Genom liegt. Das NS3 Protein interagiert im Replikationskomplex über seinen Kofaktor NS4A direkt mit NS5B ^[61] und auch mit NS4B und NS5A ^[62]. Auch zahlreiche Interaktionen von NS3 mit zellulären Komponenten, wie Proteinkinase A, Proteinkinase C, p53 und Histone H2B und H4 sind bekannt ^[24].

Der NS3/4A-Komplex ist außerdem in die Blockierung der angeborenen, antiviralen Immunantwort der Wirtszelle involviert ^[63]. Es konnte belegt werden, dass NS3/4A in Signalwege eingreift, die durch die Erkennung doppelsträngiger RNA aktiviert werden und daraufhin die Produktion von IFN α/β als Reaktion auf die Virusinfektion induzieren. Dabei stehen der Wirtszelle zwei Systeme zur Detektion doppelsträngiger RNA (dsRNA) zu Verfügung: der zytoplasmatische RIG-I (*retinoic acid inducible gene*) -Signalweg und der endosomale TLR3 (*toll like receptor 3*) -Signalweg. In beide Signalwege greift NS3/4A durch die proteolytische Spaltung von essentiellen Adapterproteinen ein: im Falle des RIG-I-Weges handelt es sich dabei um Cardif (*CARD adaptor inducing IFN β*) ^[64], im Falle des TLR3-Signalweges um das Adapterprotein TRIF (*TIR domain containing adaptor inducing IFN*) ^[65]. Durch die virale Kontrolle der Interferonproduktion können vielleicht auch systemische Immundefekte und die Etablierung einer persistierenden HCV Infektion erklärt werden. Folglich scheint NS3/4A und speziell seine Proteaseaktivität ein idealer Angriffspunkt antiviraler Therapien zu sein, da nicht nur die HCV Replikation und demzufolge die Entstehung viraler Proteine blockiert wird, sondern auch die angeborene Immunantwort des Wirtes wiederhergestellt werden kann.

1.1.4 Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis C Virus

Eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus ist bisher nur für den Menschen und den Schimpansen beschrieben. Dabei stellen Hepatozyten die Hauptzielzellen des Virus dar, allerdings konnte auch eine Infektion von B-Zellen und dendritischen Zellen beobachtet werden. Der Eintritt des Virus in die Wirtszelle kennzeichnet den Beginn des Lebenszyklus des Virus. Durch die Bindung an die Wirtszelle über die zelluläre Plasmamembran kann das Hepatitis C Virus in die Wirtszelle eintreten. Die Anheftung des Virions wird zum einen über Proteine auf der Zelloberfläche des Virus und zum anderen über verschiedene Typen von zellulären Rezeptoren und Ko-Rezeptoren vermittelt. Der Viruseintritt erfolgt in multiplen Schritten, in die oftmals mehr als ein Rezeptor involviert sind. Die putativen Rezeptoren, über den der Viruseintritt vermittelt wird, sind das Tetraspaninprotein CD81, der LDL-Rezeptor,

der Scavenger-Rezeptor der Klasse B1 (*SR-BI: scavenger receptor BI*), die Mannose-bindenden Lektine DC-SIGN (*dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) und L-SIGN (*liver/lymph nodelspecific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) sowie das erst kürzlich beschriebene Protein Claudin-1 (CLDN1). Die von dendritischen Zellen bzw. lebersinusoidalen Endothelzellen exprimierten Lektine DC-SIGN und L-SIGN fangen in der Leber zirkulierende HCV Partikel ab und erleichtern somit deren initiale Interaktion mit den Hepatozyten. In die initiale Interaktion von HCV sind möglicherweise auch Lipoproteine (LDL und VLDL), die mit den HCV Virionen assoziiert sind, involviert. Bei den hierbei beteiligten Rezeptoren könnte es sich um Glykosaminoglykane und den LDL-Rezeptor handeln. Nach dem initialen Bindungsschritt interagieren die HCV Partikel über das virale Glykoprotein E2 mit den Ko-Rezeptoren SR-BI und CD81. Die Interaktion mit SR-BI erfolgt dabei direkt oder indirekt über HCV-assoziierte Lipoproteine. In der späten Phase des Viruseintritts spielt Claudin-1 eine entscheidende Rolle. Nachdem der Virus-Rezeptor-Komplex in die so genannten *Tight Junctions* migriert, erfolgt die Interaktion mit dem dort lokalisierten CLDN1 und die Clathrin-vermittelte Endozytose wird initiiert. Eine Reihe von Arbeiten belegen, dass der Viruseintritt des Hepatitis C Virus pH-abhängig ist und die Viruspartikel mit frühen Endosomen fusionieren. Es wird angenommen, dass der niedrige pH-Wert in den endosomalen Kompartimenten zu einer Konformationsänderung der viralen Hüllproteine führt, welche wiederum die Fusion der viralen und der endosomalen Membran initiieren, so dass die zytoplasmatische Freisetzung des Virus erfolgen kann.

Die Translation der viralen Proteine erfolgt über die *internal ribosome entry site* (IRES). Kurz nach der Initiierung wird der Translationskomplex zum rauen endoplasmatischen Retikulum aufgrund einer Signalsequenz im Carboxyterminus des Core Proteins transportiert. Am endoplasmatischen Retikulum erfolgt durch NS4B-induzierte spezifische Veränderungen der ER-Membran die Ausbildung der Replikationskomplexe. Die Replikationskomplexe sind von einer Doppelmembran umgeben und setzen sich aus den nichtstrukturellen viralen Proteinen, der viralen RNA und zellulären Faktoren zusammen. Sie sind Orte der viralen RNA Synthese, die durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B erfolgt. Durch die Zusammenlagerung der Replikationskomplexe am ER kommt es zur Einstülpung der ER-Membran ins Lumen und zur Ausbildung des *Budding*-Komplexes, der daraufhin abgeschürt wird und die Zelle über den sekretorischen Weg verlässt ^[6].

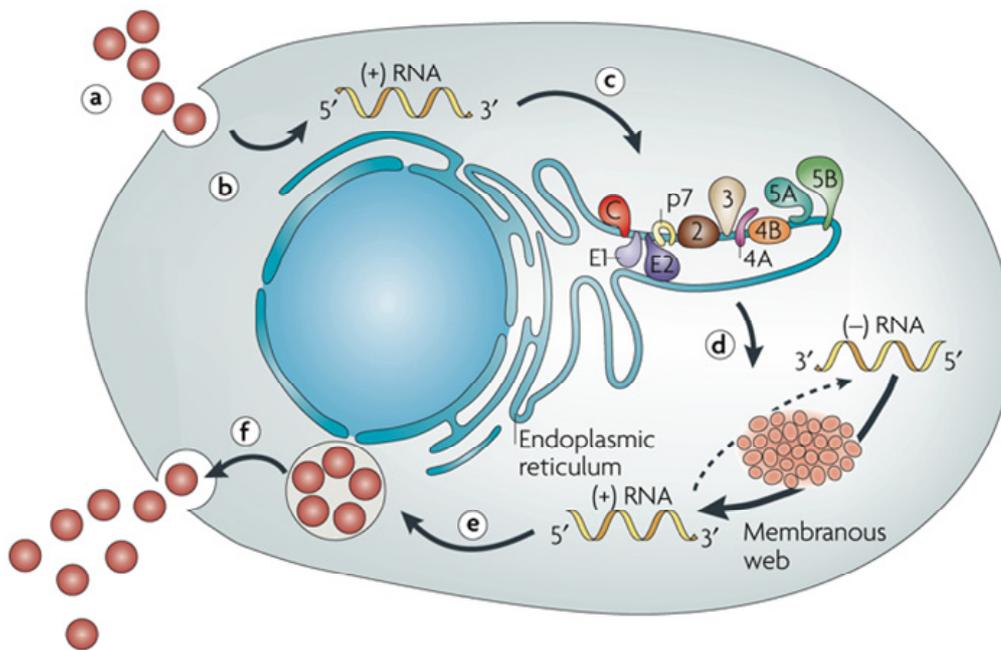


Abbildung 1.3: **Zusammenfassende Darstellung des Lebenszyklus des Hepatitis C Virus.** a) Virusbindung und Internalisierung; b) Zytoplasmatische Freisetzung und Entpackung der Viruspartikel; c) IRES-vermittelte Translation und Prozessierung des Polyproteins; d) RNA Replikation; e) Verpackung und Zusammenbau des Virus; f) Reifung und Freisetzung der Virionen (übernommen aus Moradpour *et al.* ^[6])

1.1.5 Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Wirtszelle

Das Virus sichert sein Überleben in der Wirtszelle durch Umgehung zellulärer Abwehrmechanismen und durch Nutzung einer Vielzahl von wirtszellspezifischen Proteinen und Signalwegen. Die Wirtszellmaschinerie wird vor allem für eine effiziente, virale Replikation des Virusgenoms herangezogen. So zum Beispiel sind die zellulären Immunophilinen Cyclophilin B und FKBP sowie das Hitzeschockprotein HSP90 funktionell relevant für die Virusreplikation ^[66]. Neuste Beobachtungen legen nahe, dass Cyclophilin B spezifisch mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B interagiert und die Assoziation von NS5B mit der viralen RNA fördert. Die Tatsache, dass durch Gabe des Cyclophilin-Inhibitors Cyclosporin A die HCV Replikation supprimiert wird, legt nahe, dass Cyclophilin B essentiell für die virale Replikation ist ^[67]. Basierend auf den Untersuchungen von Okamoto *et al.* ist die Interaktion von NS5A mit dem Immunophilin FKBP8 und der daraus resultierenden Rekrutierung des Chaperons HSP90 zum Replikationskomplex gleichermaßen für die Replikation des Virusgenoms notwendig ^[68]. Es wird diskutiert, dass Immunophilinen und HSP90 zusammen eine Etablierung und Stabilisierung des Replikationskomplexes durch korrekte Faltung und Translokation der darin enthaltenen Proteine bewirken. Weitere zelluläre Proteine, welche für die Replikation des Virus relevant erscheinen, sind die VAPs (*vesicle-associated membrane*

protein-associated protein). Durch das funktionelle Ausschalten der Proteine VAP-A und VAP-B konnte die HCV Replikation supprimiert werden, was darauf schließen lässt, dass diese Proteine die HCV Replikation regulieren ^[69]. Die Regulation der Replikation könnte über den Transport von Lipidkomponenten zum Replikationskomplex erfolgen. Mehrere Veröffentlichungen belegen, dass Lipidkomponenten für den Prozess des *Assemblys*, des *Buddings* und der Replikation des Hepatitis C Virus benötigt werden, und auch für eine Vielzahl anderer Viren funktionell relevant sind ^[70-73]. Die Rolle von Apolipoproteinen hinsichtlich der HCV Infektion und beim Zusammenbau der Virionen gewinnt zunehmend an Bedeutung. Biochemische und morphologische Untersuchungen von Andre *et al.* führten zu der Beobachtung, dass HCV Virionen zusammen mit Lipoproteinen verpackt werden. Solche Lipoviroartikel (LVP) sind reich an Triglyzeriden und Apolipoproteinen ^[74, 75]. Auch die Studie von Chang *et al.* konnte demonstrieren, dass sowohl Apolipoprotein B als auch E in infektiösen HCV Virionen angereichert sind. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass ApoE essentiell für die Virionenproduktion ist, da auch durch den siRNA-vermittelten Knockdown von ApoE die Bildung infektiöser Viruspartikel stark reduziert werden konnte. Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht genau verstanden, allerdings demonstrieren eine Vielzahl von Untersuchungen, dass zahlreiche Genprodukte des Cholesteroll- und Lipidstoffwechsels eine wesentliche Rolle in der RNA Replikation und bei der Verpackung des Virus einnehmen ^[76, 77]. Ein Hinweis auf die mögliche Funktion des Apolipoproteins E liegt vielleicht auch in der Beobachtung, dass HCV zusammen mit VLDLs im Plasma von HCV-infizierten Patienten zirkuliert. VLDLs sind sphärische Partikel, die nur in der Leber produziert werden und den Export von Triglyzeriden und Cholesteroll ins Plasma übernehmen ^[78]. Eine Inhibierung der VLDL-Synthese geht mit der Hemmung der Sekretion infektiöser Viruspartikel einher ^[79]. Basierend auf genetischen Untersuchungen konnte belegt werden, dass bestimmte ApoE-Polymorphismen mit dem Verlauf der HCV Infektion korrelieren ^[80]. Apolipoprotein E interagiert gleichermaßen mit einer Reihe von Zelloberflächenrezeptoren, wie zum Beispiel mit dem LDL-Rezeptor (*low density lipoprotein receptor*) und dem SR-BI, die beide am Eintritt von HCV in die Wirtszelle beteiligt sind.

1.1.6 Modellsysteme zur Untersuchung des Hepatitis C Virus

Die Untersuchung spezifischer Aspekte des Lebenszyklus des Hepatitis C Virus und damit auch die Entwicklung vielversprechender therapeutischer Strategien setzen die Nutzung unterschiedlicher Modellsysteme *in vitro* und *in vivo* voraus. Die Nutzung von *in vivo* Modellen ist aufgrund der Tatsache, dass HCV nur den Menschen und Schimpansen infiziert, stark eingeschränkt. Da die Verwendung von Schimpansen ethisch fragwürdig und kostenintensiv ist, wurden transgene Mausmodelle entwickelt, die einzelne oder mehrere HCV Proteine exprimieren. Ein Fortschritt hinsichtlich eines *in vivo* HCV Infektionsmodells

konnte durch die Etablierung immundefizienter Mäuse mit humanisierten Lebern erreicht werden ^[81].

Für die Erforschung des Hepatitis C Virus stehen verschiedene *in vitro* Modelle zu Verfügung: dazu gehören transiente, zelluläre Expressionssysteme, stabil transfizierte Zelllinien, die Infektion von primären Hepatozyten, rekombinante, infektiöse Zellkultursysteme sowie subgenomische Replikons bzw. Vollängen-Replikons. Mit der Entwicklung des Replikonsystems ist ein entscheidender Durchbruch auf dem Gebiet der HCV Forschung gelungen ^[82, 83]. Für den Prototypen des subgenomischen Replikonsystems wurde das HCV Isolat Con1 (Genotyp 1b) verwendet. Die strukturellen Proteine Core bis p7 sowie NS2 wurden durch die Sequenz des Neomycin-Phosphotransferase-Gens ersetzt, welches eine Selektion positiver Klone mit G418 ermöglicht. Die Translation der nichtstrukturellen Proteine 3-5B erfolgt über eine zweite, heterologe EMCV (Encephalomyokarditis-Virus) -IRES. Nach Transfektion in die humane Hepatomazelllinie Huh7 war es nun aufgrund der G418-Resistenz möglich, positive Klone, die selbstreplizierende HCV RNA enthielten, zu selektionieren. Die Etablierung positiver Klone allerdings war nur durch das Einbringen adaptiver Mutationen ausführbar ^[84]. Aufgrund von Weiterentwicklungen des ursprünglichen Replikonsystems stehen heute auch Systeme des Genotyps 1a ^[85] und 2a ^[86] sowie quantifizierbare Systeme mit Reportergenen (Luciferasereporter) zur Verfügung. Aufgrund der adaptiven Mutationen war es trotz der Verwendung von Vollängen-Replikons nicht möglich, den Schritt der Infektion und des Viruseintritts zu untersuchen sowie infektiöse Viruspartikel zu produzieren. Erst mit der Entdeckung eines neuen HCV Isolats eines japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis C (JFH-1; Genotyp 2a) gelang die Etablierung eines Replikonsystems, das ohne adaptive Mutationen effizient in verschiedenen Zelltypen repliziert ^[86]. Erstmals konnte nun der komplette Lebenszyklus einschließlich der Produktion infektiöser Viruspartikel *in vitro* untersucht werden ^[87].

1.1.7 Therapie der Hepatitis C Virus Infektion

Bei gut 15-20 % der akut HCV-infizierten Patienten heilt die Virusinfektion spontan aus, wohingegen es bei 80 % der Patienten zur Entwicklung einer persistierenden Infektion kommt. Über einen Zeitraum von 20-30 Jahren entwickeln etwa 10-20 % der chronisch HCV-infizierten Patienten eine Leberzirrhose, welche in etwa 5 % der Fälle pro Jahr zur Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) führt. Die derzeitige Standardtherapie zur Behandlung einer chronischen HCV Infektion basiert auf einer Kombination von pegylierten Interferon α (IFN α) und Ribavirin. Ribavirin ist ein Nukleosidanalogon und wirkt auf eine Vielzahl von DNA- und RNA-Viren suppressierend, darunter auch die Familie der Flaviviridae. Die antivirale Wirkungsweise von Ribavirin ist bisher nicht bekannt, allerdings wird angenommen, dass es die HCV Replikation entweder durch Einbau in die RNA und Inhi-

bierung der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase oder indirekt über die Inhibierung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) hemmt. Es beeinflusst außerdem die antivirale Immunantwort und wirkt dabei auf die T-Helferzellen. Ribavirin verstärkt einerseits die Zytokinproduktion der Th1-Zellen (IL-2, IFN γ ; TNF α) und supprimiert andererseits die der Th2-Zellen (IL-4, IL-5, IL-10) ^[88]. Interferon α entfaltet seine antivirale Wirkung durch die Bindung an Oberflächenrezeptoren auf den Virus-infizierten Zellen und induziert die Expression zahlreicher Effektorproteine unter anderem der 2', 5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS), der Proteinkinase R oder der so genannte Mx-Proteine ^[89, 90]. Seine immunmodulatorischen Eigenschaften wirken allgemein auf die Aktivierung der zellulären Immunantwort, wobei speziell zytotoxische T-Zellen sowie NK-Zellen aktiviert werden und der *Crosstalk* zwischen dendritischen Zellen und CD8-T-Zellen unterstützt wird. Seine antiproliferativen Eigenschaften sind z. T. auch für Nebenwirkungen verantwortlich, die bei Patienten unter länger andauernder Interferontherapie beobachtet werden, wie z. B. Thrombozytopenie und Leukopenie sowie Haarausfall. Mit der aktuellen Standardtherapie kann lediglich eine Ausheilung von 54 % erreicht werden. In Subgruppenanalysen wird etwa eine Eliminationsrate von 42 % für die Infektion mit Genotyp 1 erzielt und 82 % für die Infektion mit dem Genotyp 2 und 3 ^[91].

Da viele Patienten für eine Therapie nicht in Frage kommen und die Interferontherapie eine Reihe von Nebenwirkungen aufweist, ist die Entwicklung alternativer Therapieansätze unbedingt notwendig. Der Lebenszyklus des Hepatitis C Virus bietet eine Vielzahl von Angriffspunkten für solche Therapieansätze. So zum Beispiel erscheinen der Viruseintritt, die Polyproteinprozessierung, die RNA Replikation aber auch der Schritt der Virionenproduktion vielversprechend. Dabei ist die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren viraler Enzyme wie zum Beispiel für die Protease NS3/4A oder die Polymerase NS5B am weitesten fortgeschritten. Weitere Therapieansätze basieren auf der RNA-Interferenz-Technologie, auf Antisense-Oligonukleotiden oder umfassen Immunsuppressiva, wie zum Beispiel das Cyclosporin A. Die Entwicklung von Impfstoffen gegen das Hepatitis C Virus gestaltet sich allerdings bisher schwierig ^[92].

1.2 Das Immunsystem

Nach der Aktivierung der angeborenen, unspezifischen Immunantwort, kommen spezifisch erworbene Immunmechanismen zum Einsatz. Als Abwehrmechanismen in der angeborenen Immunabwehr stehen dem Körper phagozytierende Immunzellen, NK-Zellen, das Komplementsystem und humorale Mechanismen, wie Akut-Phase-Proteine und Interferone zur Verfügung. Entscheidend für die angeborene Immunantwort ist dabei, dass ihre Abwehrmechanismen im Genom kodiert sind und keinerlei Anpassung unterliegen. Rezeptoren der angeborenen Immunantwort erkennen eine limitierte Anzahl von Molekülen, welche evo-

lutionär konserviert sind, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, nicht-methylierte CpGs und auch doppelsträngige RNA ^[93]. Diese Rezeptoren sind keimbahnkodiert und ihre Expression ist auf einzelne spezielle Zellen beschränkt und unterliegen keiner klonalen Verteilung. Viele dieser angeborenen Erkennungsstrukturen werden als PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) bezeichnet und über Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie (TLRs) erkannt ^[94]. Die Wiedererkennung von bestimmten Pathogenen allerdings ist eine charakteristische Eigenschaft der adaptiven Immunantwort. Um sich gezielt an Mikroorganismen und Viren anzupassen, entwickelt der Körper eine erworbene spezifische Immunität, die über ein großes Repertoire an T-Zell-Antigen-Rezeptoren (TCRs), Lymphozytenrezeptoren (BCRs) und auch zum großen Teil über Adaptermoleküle, wie Antikörper gewährleistet wird. Die Diversität der TCRs und BCRs, aber auch der Immunglobuline wird über somatische, *site*-spezifische DNA Rekombination erreicht. Weiterhin wird jeder Rezeptor mit seiner jeweiligen Spezifität klonal exprimiert. In der adaptiven Immunität wird zwischen der zellulären und der humoralen Immunantwort unterschieden. Die B-Zellen sind dabei für die Bildung spezifischer Antikörper und damit für die humorale Immunantwort verantwortlich. Die T-Zellen dagegen übernehmen ihre wesentliche Rolle in der zellulären Immunantwort.

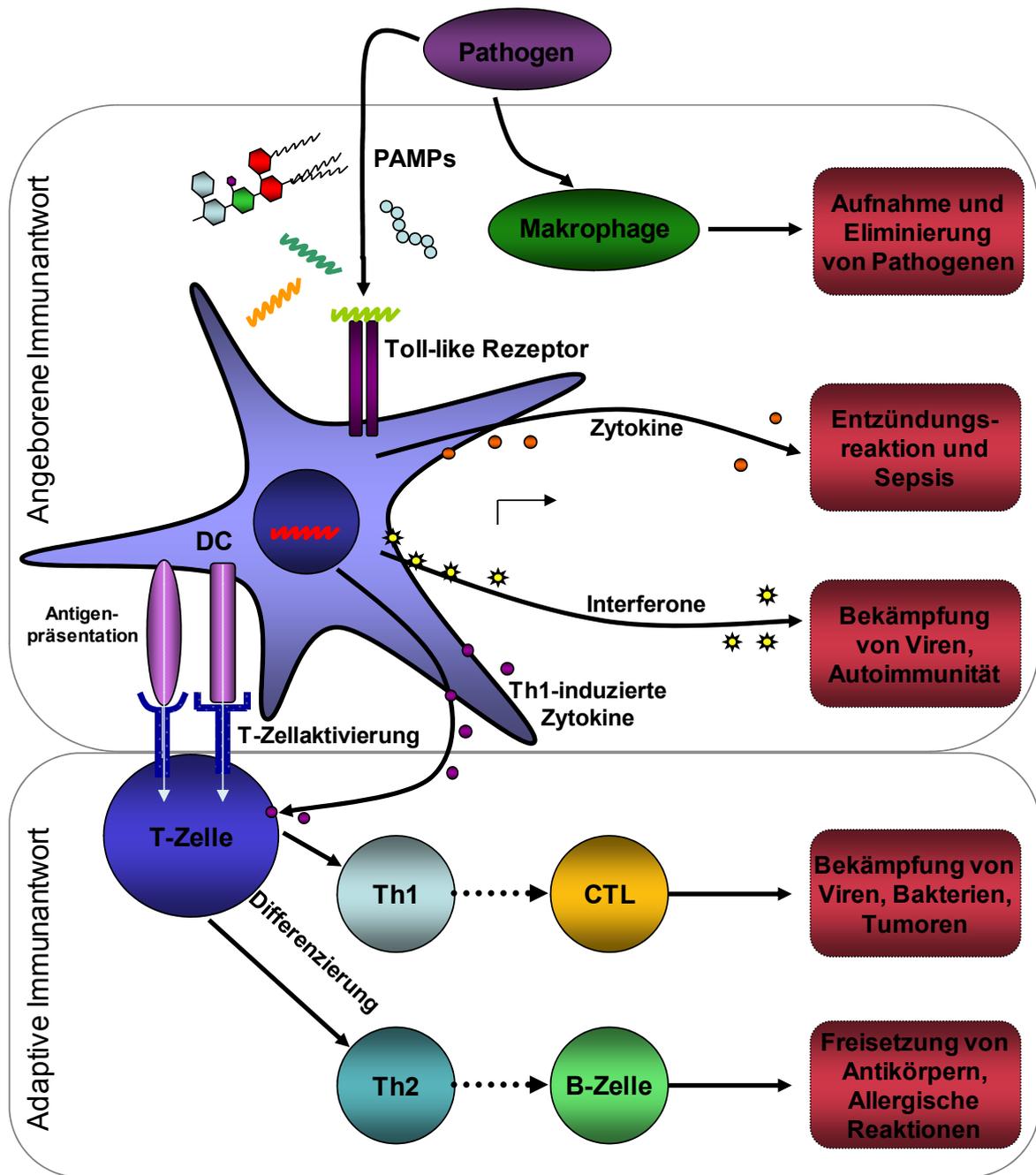


Abbildung 1.4: Zusammenfassende Darstellung der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Abkürzungen: DC: dendritic cells; PAMPs: pathogen-associated molecular patterns; CTL: cytotoxic cell (modifiziert nach Kaisho T: <http://www.rikenresearch.riken.jp/frontline>)

1.2.1 Die spezifische, humorale Immunantwort

Die adaptive Immunität basiert grundlegend auf zwei voneinander verschiedenen Mechanismen: die zellvermittelte und die humorale Immunität. Hierbei ist die adaptive Immunantwort durch vier klassische Merkmale charakterisiert: Spezifität, Gedächtnis, Diversität und „Selbst-Nicht-Selbst“-Diskriminierung. Die zellvermittelte Immunität beinhaltet dabei die Produktion zytotoxischer T-Lymphozyten, die Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen sowie die Ausschüttung von bestimmten Zytokinen und wird durch T-Lymphozyten vermittelt. Die humorale Immunantwort dagegen schließt die Produktion und Sekretion von Antikörpermolekülen als Reaktion auf ein Antigen ein und erfolgt ausschließlich über B-Lymphozyten. B-Lymphozyten wurden in den frühen 60er Jahren zusammen mit den T-Zellen entdeckt und unterscheiden sich phänotypisch nur durch Analyse von entsprechenden Zelloberflächenmarkern. B-Zellen entwickeln sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark, in der Leber des Fetus sowie in spezialisierten Organen von Vögeln, der so genannten *Bursa Fabricius*, die auch für die Namensgebung dieser Zellpopulation entscheidend war. Im menschlichen Körper kommen schätzungsweise 2×10^{12} Lymphozyten vor, von denen 5-15 % die B-Zellen ausmachen ^[95]. Ziel der humoralen Immunantwort ist die Bildung großer Mengen von Antikörpern. Die Immunglobuline besitzen die Fähigkeit, das Komplementsystem zu aktivieren und die Phagozytose zu stimulieren. Weiterhin müssen sie im besonderen Maße in der Lage sein, Moleküle des Pathogens zu binden, welches zum Auslösen der Immunantwort geführt hat. Wenn ein Antigen in den Körper eindringt, wird diesem ein gewaltiges Spektrum von Lymphozyten entgegen gesetzt, die alle jeweils Antikörper mit spezifischen individuellen Erkennungssequenzen tragen.

Die Entwicklung der B-Zellen unterliegt einer streng organisierten Reihenfolge und umfasst zahlreiche Schritte, die schlussendlich zur Reifung der B-Zellen und zur Generierung von immunkompetenten B-Zellen führen. Das Hauptziel dieses Entwicklungsprozesses ist die Bildung von B-Zellpopulationen, die ein breites Spektrum an B-Zellantigenrezeptoren (BCRs) exprimieren, unterschiedliche Spezifitäten aufweisen und zur Erkennung von neuen und wiederkehrenden Antigenen geeignet sind. Jeder B-Lymphozyt trägt auf seiner Oberfläche etwa 10^5 Antikörper, die ihre Funktion als B-Zell-Rezeptoren ausüben und spezifische Epitope binden können.

1.2.2 Struktur und Funktion von Immunglobulinen

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind essentiell für die Funktionstüchtigkeit der humoralen Komponente der adaptiven Immunantwort. Die Funktion der Antikörper liegt einerseits in der spezifischen Erkennung fremder Moleküle (Antigene) und andererseits in der Aktivierung immunologischer Effektormechanismen. Antikörper werden zunächst als Transmembranrezeptoren auf den B-Lymphozyten exprimiert (BCR), doch im Verlauf der

Immunreaktion differenzieren die B-Zellen zu Plasmazellen, die dann in großen Mengen lösliche Antikörper sezernieren.

Ein Antikörpermolekül besteht aus jeweils zwei identischen schweren und leichten Polypeptidketten, die kovalent durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette besteht aus einer aminoterminalen und einer carboxyterminalen Domäne, dabei wird der Aminoterminus als variable Region ($V_{L/H}$) und der Carboxyterminus als konstante Region ($C_{L/H}$) klassifiziert. Jede leichte Kette setzt sich aus einer variablen (V_L) und einer konstanten Domäne (C_L) zusammen, wohingegen bei den schweren Ketten eines IgGs drei konstante (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) auf eine variable Domäne (V_H) folgen. Beim Menschen werden dabei zwei Subtypen der leichten Ketten (κ und λ) und fünf verschiedene Typen von schweren Ig-Ketten (μ , δ , γ , α und ϵ) unterschieden. Je nach Struktur der konstanten Regionen der schweren Ketten werden die Immunglobuline in verschiedene Klassen eingeordnet. Die Bezeichnung der Immunglobulinklassen leitet sich dementsprechend von den konstanten Abschnitten der schweren Ketten ab und führt deshalb zur Klassifizierung in IgM, IgD, IgG, IgA und IgE, wobei das am häufigsten auftretende Immunglobulin das IgG ist.

Aus der Struktur eines IgG-Antikörpers wird ersichtlich, dass es sich hierbei um ein Y-förmiges Molekül handelt, welches ein achsensymmetrisches Heterotetramer bildet. Aufgrund der Symmetrie des Immunglobulins lässt sich schlussfolgern, dass beide Antigenbindungsstellen dieselbe molekulare Struktur, und damit auch dieselbe Bindungsspezifität für ein Antigen aufweisen und dementsprechend als divalent bezeichnet werden. Die Antigenbindungsspezifität wird über die so genannten Fv-Regionen vermittelt, die sich aus den variablen Domänen von leichten (V_L) und schweren (V_H) Ketten zusammensetzen. Wird die Aminosäuresequenz der variablen Domänen genauer betrachtet, so ist erkennbar, dass drei relativ kurze Peptidabschnitte, bestehend aus 10-15 Aminosäuren, eine höhere Variabilität als die übrigen Bereiche aufweisen. Diese insgesamt sechs hypervariablen Bereiche befinden sich bei Betrachtung der dreidimensionalen Struktur des Antikörpers an seiner Außenseite und bilden zusammen das so genannte Paratop, welches für die Antigenbindung verantwortlich ist. Diese Regionen werden als *complementarity determining regions* (CDR) bezeichnet. Sie sind verantwortlich für die Antigenspezifität des Antikörpers und bilden komplementäre Oberflächen gegenüber der antigenen Determinante, dem so genannten Epitop aus. Die CDRs umgebenden Bereiche werden als *framework*-Regionen (FR) bezeichnet. Bei diesen Gerüstregionen handelt es sich um hochkonservierte Bereiche, die der Aufrechterhaltung der Proteinstruktur dienen.

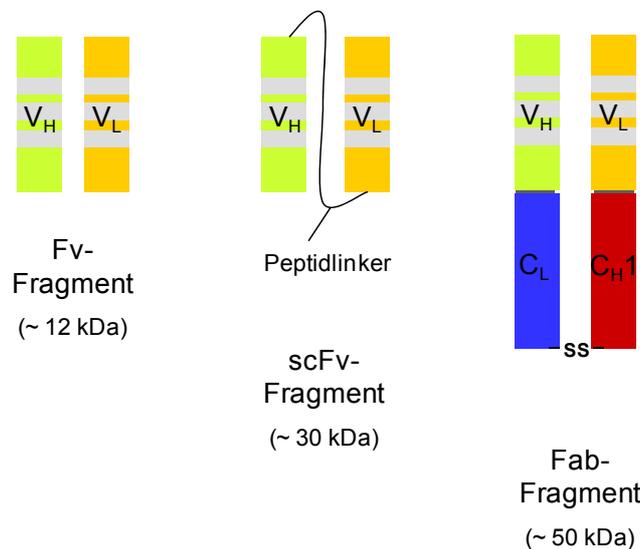
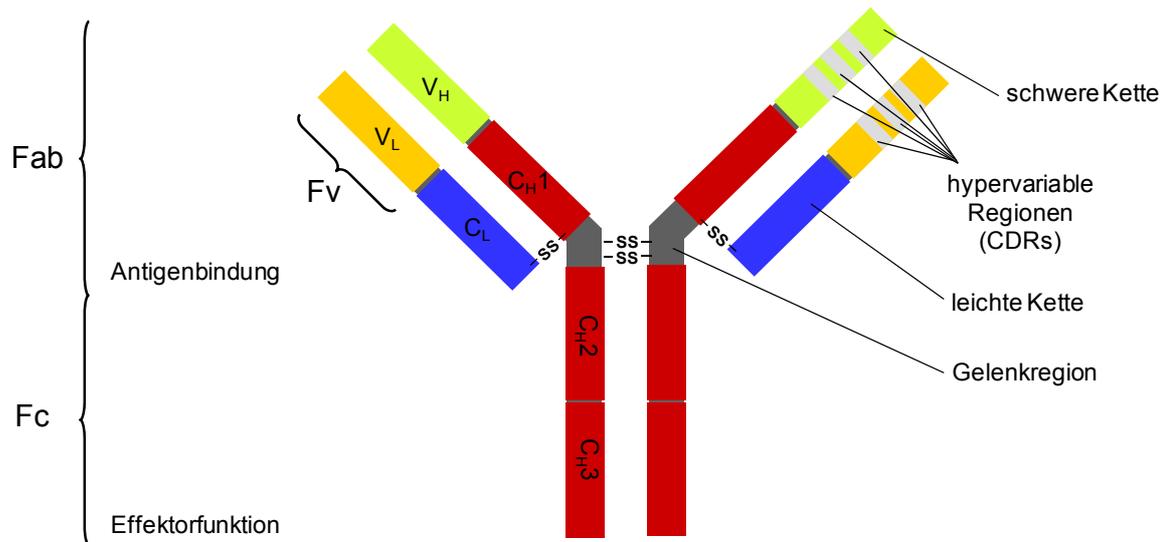


Abbildung 1.5: **Schematische Darstellung eines Immunglobulins G und den davon abgeleiteten Antikörperfragmenten.** Ein Immunglobulin besteht aus jeweils zwei identischen schweren (H) und leichten (L) Polypeptidketten, die kovalent durch Disulfidbrücken (s-s) miteinander verbunden sind. Jede Kette wird durch die variable Region ($V_{L/H}$) und die konstante Region ($C_{L/H}$) charakterisiert. Der variable Teil des Immunglobulins (Fv) ist für die Spezifität des Antikörpers verantwortlich und trägt die kleinste antigenbindende Region, die so genannten CDRs (*complementarity determining regions*). Die einzelnen Fragmente des Globulins übernehmen dabei verschiedene Aufgaben: Fab-Fragment: Antigenbindung, Fc-Fragment: Effektorfunktionen wie Komplementaktivierung und Makrophagenbindung. Abgeleitete Antikörperfragmente sind: das Fv-Fragment (bestehend aus der variablen Region der schweren (V_H) oder leichten (V_L) Kette), das scFv-Fragment (bestehend aus der variablen Region der schweren (V_H) und leichten (V_L) Kette verbunden über eine Peptidverbindung (linker)) und das Fab-Fragment (bestehend aus der konstanten und variablen Region der schweren (V_H/C_H) und leichten (V_L/C_L) Kette). (modifiziert nach Dübel ^[5])

Die konstanten Regionen eines Antikörpermoleküls vermitteln funktionelle Eigenschaften, so genannte Effektorfunktionen, wie die Bindung von NK-Zellen, die Makrophagenaktivierung und die Fähigkeit zur Komplementaktivierung. Aufgrund der Struktur der Immunglobuline vermittelt jeder Isotyp einen anderen Effektormechanismus in der Immunantwort.

Der Mensch besitzt etwa 30000 Gene die eine Diversität von 10^{13} theoretisch möglichen Antikörpern kodieren. Die Genloci der leichten und schweren Ketten liegen beim Menschen auf verschiedenen Chromosomen. Die einzelnen Genloci kodieren keine vollständigen Immunglobuline, sondern nur einzelne Segmente für die entsprechenden Immunglobulinketten. Dabei werden verschiedene Gensegmente unterschieden: das V- (*variable*), D- (*diversity*), J- (*joining*) und C- (*constant*) Segment. Bei der Differenzierung der B-Zellen werden die Gene dieser Keimbahnsegmente durch somatische Rekombination zu den Immunglobulinketten zusammengefügt. Die Gene für die variablen Regionen der schweren Kette bestehen jeweils aus einem V-, einem D-, und einem J-Segment. Die variablen Regionen der leichten Kette dagegen entstehen durch die Kombination aus einem V- und einem J-Segment. Die somatische Rekombination unterliegt dabei bestimmten Regeln, aber auch dem Zufall. So können Gensegmente eines Chromosoms nur in einer bestimmten Reihenfolge (VDJ) rekombiniert werden. Dem Zufall jedoch unterliegt, welches V-Segment mit welchem D- und J-Segment kombiniert wird. Durch diesen zufälligen Mechanismus der somatischen Rekombination kann eine kombinatorische Vielfalt und damit eine riesige Antikörperdiversität erzeugt werden. Diese Vielfalt wird weiterhin durch die zufällige Verknüpfung der schweren und leichten Kette in einer B-Zelle erhöht. Sobald die Gene für eine schwere und eine leichte Kette erfolgreich zusammengefügt wurden und die Zelle einen funktionierenden Antikörper sezernieren kann, beendet die B-Zelle ihren Reifungsprozess. Durch das Prinzip der allelen Exklusion, d. h. jeweils nur ein Allel für die schwere bzw. leichte Kette zu verwenden, wird gewährleistet, dass jede B-Zelle molekular identische Antikörper mit nur einer Spezifität synthetisiert.

1.3 Die Generierung von humanen Antikörperfragmenten mit Hilfe der Phage-Display Technologie

Die Generierung von Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten für Forschung und Diagnostik, aber auch auf dem Gebiet der Medizin, hat in den letzten 20 Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Momentan existieren drei Hauptstrategien auf dem Gebiet der Antikörpergenerierung: die Immunisierung einfacher Nagetiere, die Hybridomtechnologie und der Phage-Display. Mitte der 70er Jahre wurde die Hybridomtechnologie von Köhler und Milstein entwickelt ^[96], die aus *in vitro* gewonnenen Hybridomzellen Antikörper gewünschter Spezifitäten herstellen konnten. Der entscheidende Nachteil dieser Technologie ist, dass der Gewinnung der Antikörper eine Immunisierung meist muriner Versuchstiere vorausgeht und

somit monoklonale Maus Antikörper generiert werden. Damit ist der mögliche therapeutische Einsatz problematisch, da das Immunsystem des Patienten auf die Maus-Antikörper mit der so genannten HAMA-Immunantwort (*human-anti-mouse antibodies*) reagiert. Dadurch wird eine erneute Behandlung unmöglich, da die Antikörper des Patienten die zur Therapie eingesetzten Antikörper neutralisieren noch bevor sie ihr Ziel erreichen ^[5]. Durch die resultierende rasche Ausscheidung des therapeutischen Antikörpers wird auch seine Wirksamkeit maßgeblich beeinträchtigt ^[97, 98]. Durch die Entwicklung von chimären Antikörpern aus nichthumanen leichten und humanen konstanten Domänen konnte die HAMA-Immunantwort in Patienten minimiert, allerdings nie ganz ausgeschlossen werden ^[5, 97].

Eine weitere Möglichkeit zur Humanisierung von Antikörpern bietet das so genannte *CDR-grafting*, erstmal von Jones *et al.* beschrieben ^[99]. Dieser Alternative liegt auch die Gewinnung humaner Antikörper aus Mäusen mittels der Hybridomtechnologie zugrunde. Dazu werden mit Hilfe komplizierter Kreuzungsexperimente transgene Mäuse mit humanem Antikörpergen-Repertoire generiert, die daraufhin humane Immunglobuline produzieren, die sich nur noch geringfügig z. B. durch Glykosylierungsmuster unterscheiden ^[100].

Die Phage-Display-Technologie stellt die Weiterentwicklung auf diesem Gebiet dar und bietet zum einen die Möglichkeit, ohne die Immunisierung von Versuchstieren auszukommen, und zum anderen, die humane Anwendung direkt zu adressieren.

1.3.1 Phagen-Biologie und Phage-Display

Der Phage-Display ist ein *in vitro* Selektionsverfahren, bei dem Peptide und Proteine auf der Oberfläche filamentöser Phagen präsentiert werden. Die Phage-Display-Technologie bietet die Möglichkeit Polypeptide mit gewünschten Eigenschaften aus einem großen Repertoire möglicher Varianten zu gewinnen. Seit der erstmaligen Beschreibung von Smith im Jahre 1985 entwickelte sich diese Methode zu einer leistungsfähigen Technik, um sowohl Proteine mit neuen Eigenschaften zu identifizieren als auch ihre bestehenden Eigenschaften zu verändern ^[101].

Die Phage-Display-Technologie macht sich die Biologie und strukturelle Organisation filamentöser Phagen zu nutze (Abbildung 1.6 und Tabelle 1.1). Filamentöse Phagen bzw. Bakteriophagen gehören zu der großen Familie bakterieller Viren, welche hauptsächlich gramnegative Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli* infizieren. Die dabei routinemäßig im Phage-Display eingesetzten Phagen sind vor allem der Ff-Gruppe (M13-Phage; F1-Phage; Fd-Phage) filamentöser Phagen zuzuordnen.

Filamentöse Phagen sind röhrenförmig aufgebaut und besitzen zirkuläre, einzelsträngige DNA. Ihr Genom ist klein, umfasst etwa 6400 Nukleotide, und kodiert für 11 Gene. Die Phagenpartikel setzen sich aus 5 Hüllproteinen zusammen, wobei das Protein pVIII den Hauptanteil ausmacht. Das abgerundete Ende des Phagen enthält mehrere Kopien (3-5) der

Proteine pVII und pIX, wobei beide Proteine funktionell relevant für die Bildung des Partikels sind ^[102]. Am spitzen Ende befinden sich etwa fünf Kopien der Proteine pII und pVI. Sie sind für die Abtrennung der Partikel von der Zellmembran verantwortlich. Das am besten untersuchte Protein ist das Hüllprotein pIII, welches hauptsächlich für die Präsentation der Proteine (Phage-Display) auf der Oberfläche des Phagen genutzt wird ^[103]. Das pIII-Protein besteht aus zwei funktionellen Domänen: einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne. Der N-terminale Bereich wird zusätzlich in die N1- und N2-Domäne unterteilt und ist für die Bindung des F-Pilus und damit für die Infektiosität der Phagen verantwortlich, dieser ist aber nicht für die Partikelbildung notwendig, wohingegen der C-terminale Bereich für die Verpackung des Phagen essentiell ist, da diese Domäne integraler Bestandteil der Kapsidstruktur ist.

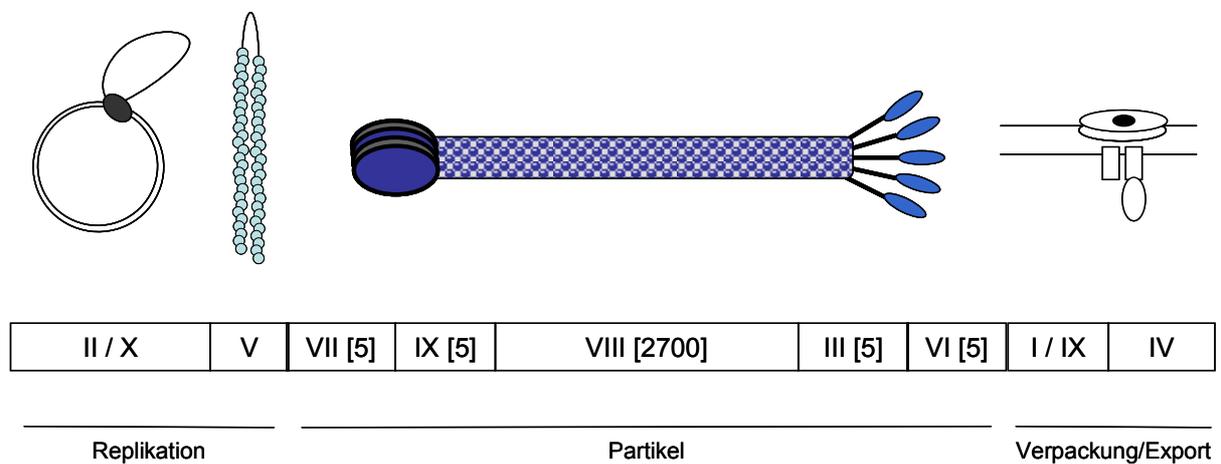


Abbildung 1.6: **Aufbau, Gene und Genprodukte des filamentösen Phagen f1 (M13/fd)**. Gen II kodiert für das Protein pII und Gen X für das Protein pX. Beide Proteine sind verantwortlich für die Initiierung der Replikation. Gen V kodiert für das Protein pV, das die einzelsträngige DNA bindet. Gen VII und IX kodieren für zwei kleine Proteine pVII/pIX, die an der Spitze des Bakteriophagen lokalisiert sind. Gen VIII bildet das Haupthüllprotein pVIII und Gen III und VI kodieren für die Proteine pIII und pVI, die am Ende des Virions lokalisiert sind. Diese Proteine sind für die Beendigung des Zusammenbaus des Partikels, die Freisetzung des Virions und die Infektion verantwortlich. Die Proteine pVII, pIX, pVIII, pIII und pVI sind am Aufbau des Virionenpartikels beteiligt. Die Genprodukte pI und pXI der Gene I und XI resultieren in zwei zytoplasmatischen Membranproteinen. Das Gen IV, das für das Protein pIV kodiert, bildet einen multimeren, äußeren Membrankanal, durch den der Phage das Bakterium verlässt. Demzufolge sind die Proteine pI, pIX und pIV ebenfalls für den Zusammenbau des Virions, aber auch für den Export des Phagen verantwortlich. []: Kopienzahl, in der die Proteine vorliegen; Zur Vereinfachung wurde das Phagen-genom linearisiert dargestellt.

Tabelle 1.1: **F-spezifische filamentöse Phagengene bzw. -proteine, ihre Funktion und die mögliche Verwendung im Phage-Display** (Russel M *et al.* ^[7]).

Gen	Protein	Größe (aa)	Funktion	Verwendung im Phage-Display
I	I ; XI	348 ; 108	Verpackung	nein
II	II ; X	409 ; 111	Replikation	nein
III	III	406	Phagenpartikel: Hüllprotein	ja: N-terminal
IV	IV	405	Verpackung/Export	nein
V	V	87	Replikation	nein
VI	VI	112	Phagenpartikel: Hüllprotein	ja: C-terminal
VII	VII	33	Phagenpartikel: Hüllprotein	ja: N-terminal
VIII	VIII	50	Phagenpartikel: Hüllprotein	ja: N- und C-terminal
IX	IX	32	Phagenpartikel: Hüllprotein	ja: N-terminal

Filamentöse Phagen durchlaufen nicht den lytischen Vermehrungszyklus, der mit der Auflösung der Wirtszelle endet, sondern sie vermehren sich lysogen. *E.coli*-Phagen verwenden selbstübertragende Pili, die den Transfer des Phagenplasmids in das Bakterium vermitteln. Phagen können zwar auch ohne diese Pili Bakterien infizieren, allerdings ist die Effizienz der Infektion um fast vier Größenordnungen vermindert ^[104]. Die Infektion beginnt mit dem Anheften der N2-Domäne des pIII-Proteins an den F-Pilus der *E. coli*-Bakterien ^[105]. Durch diese Bindung wird die N1-Domäne des pIII-Proteins von der basalen Interaktion mit der N2-Domäne freigegeben und kann nun mit dem wirtseigenen Protein TolA interagieren. Dieses Protein reicht von der zytoplasmatischen Membran bis in den periplasmatischen Raum des Bakteriums und fungiert als Korezeptor. Insgesamt sind drei dieser Proteine TolQ, R und A bei der Infektion absolut essentiell ^[106]. Sie vermitteln die Depolymerisierung der Phagen-Hüllproteine für die Insertion in die zytoplasmatische Membran und die Translokation der ssDNA in das Zytoplasma des Bakteriums. Die zirkuläre, einzelsträngige DNA gelangt in das Bakterium und wird dort über die wirtseigene Replikationsmaschinerie vervielfältigt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt über den Replikationsmechanismus „rollender Ring“ (*rolling circle*). Dabei wird an dem einzelsträngigen ringförmigen DNA-Plusstrang (+) ein komplementärer Minusstrang (-) synthetisiert. Dieser Vorgang erzeugt einen doppel-

strängigen Ring, der dann durch den Replikationsmechanismus des rollenden Ringes repliziert wird. Durch weitere Prozessierungsschritte entsteht wiederum einzelsträngige DNA, die entweder als Matrize für die Replikation verwendet oder in Phagenpartikel verpackt und aus dem Bakterium ausgeschleust wird. Der genaue Mechanismus sowie molekulare Details des Infektionsvorgangs der Phagen sind nicht bekannt.

Ein entscheidendes Merkmal filamentöser Phagen ist, dass es sich bei ihrer Produktion um einen sekretorischen Prozess handelt und damit vollständige Phagenpartikel durch die Bakterien in das Wachstumsmedium abgegeben werden. Die Verpackung erfolgt in der zytoplasmatischen Membran und erfordert die Beteiligung von acht integralen Membranproteinen. Die ersten Phagenpartikel treten bereits 10 Minuten nach erfolgter Infektion (bei 37°C) im Kulturüberstand auf. Ihre Anzahl steigt exponentiell über 40 Minuten lang bis die Partikelproduktion in einen linearen Bereich eintritt. Über 1000 Phagen pro Zelle werden in der ersten Stunde produziert. Unter optimalen Bedingungen kann die infizierte Zelle unbegrenzt wachsen und sich teilen und damit Phagen synthetisieren. Eine solch persistierende Infektion ist nur möglich, da die fünf Kapsidproteine und die viralen DNA-Stränge durch Verpackung und Sekretion proportional zu ihrer Synthese aus der Zelle ausgeschleust werden. Zudem wird eine Überakkumulation von nicht-sekretorischen Proteinen durch eine Regulationsschleife verhindert, die durch die Phagenproteine pV/pII vermittelt wird. Bereits kleine Störungen des Lebenszyklus des Phagens können zum Tod der infizierten Zelle führen und die Effizienz des Phage-Displays einschränken. So kann es schon durch kleine Temperaturunterschiede zu einem Ungleichgewicht zwischen der Synthese der einzelnen Komponenten und der Partikelproduktion kommen. Unter anderem resultiert die intrinsische Temperatursensitivität des Proteins pV in einer Akkumulation der ssDNA und führt daraufhin zu einer verminderten Phagenproduktion.

Für den eigentlichen Phage-Display, also für die Präsentation von Peptiden und Proteinen auf der Phagenoberfläche, können alle fünf Kapsidproteine eingesetzt werden. Die Arbeitsgruppe um C. Gao verwendete für die Fusion der Antikörperfragmente die N-terminalen Bereiche der Proteine pVII und pIX^[107]. Das Protein pVI, welches mit dem pIII-Protein interagiert, kann gleichermaßen für die Präsentation der Proteine durch eine carboxyterminale Fusion genutzt werden. Die Fusion mit dem C-terminalen Bereich ist von Vorteil, da ein Stoppkodon am Ende der kodierenden cDNA die Präsentation auf der Phagenoberfläche nicht verhindern kann. Die am häufigsten verwendeten Virionenproteine für den Phage-Display sind die Proteine pIII und pVIII. pVIII-Bibliotheken können bis zu 2700 Kopien kleiner Peptide (bis zu sechs Aminosäuren) auf der Oberfläche der Phagen darstellen^[108]. Das pIII-Protein liegt in fünf Kopien am Ende des Virions vor und wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit für den Phage-Display eingesetzt. Es hat aufgrund seiner Toleranz gegenüber großen Insertionen, seiner Kompatibilität mit monovalenten Display-Formen und

der enormen Verfügbarkeit entsprechender Vektoren entscheidende Vorteile. Allerdings können auch verschiedene Schwierigkeiten auftreten, die die Effizienz des Phage-Displays entscheidend minimieren. So kann zum Beispiel durch die Fusion mit pIII eine drastische Verminderung der Infektiosität auftreten, oder es können Probleme bei der Präsentation der Fusionsproteine auf der Phagenoberfläche entstehen, die meist durch sterische Hinderung hervorgerufen werden.

Ein Phage-Display-Projekt lässt sich generell in drei grundlegende Abschnitte unterteilen: die Herstellung der kombinatorischen Bibliothek, die Selektion sowie die Analyse der ausgewählten Klone (Abbildung 1.7). Am Anfang des Phage-Displays steht die Herstellung und die Amplifizierung einer Bibliothek mit einer größtmöglichen Diversität denkbarer Proteinvarianten (10^{10} - 10^{11} Klone). Um eine kombinatorische Bibliothek anzulegen und sie auf der Oberfläche der Phagen zu präsentieren, muss zunächst die Klonierungsstrategie festgelegt werden. Denn um Proteine auf der Phagenoberfläche exprimieren zu können, müssen entsprechende Phagen- oder Phagemid-Vektoren verwendet werden. Ein Phagen-Vektor basiert auf der ursprünglichen Ff-Phagensequenz, dem gegenüber steht ein Phagemid-Vektor, der nur die Gene der Fusionsproteine zur Präsentation und keine weiteren Phagen-gene beinhaltet ^[109]. In einem Phagen-Vektor wird die cDNA, die präsentiert werden soll, direkt in die kodierende Sequenz des pIII-Gens bzw. anderer Hüllproteine inseriert. Bei Infektion von *E. coli* tragen dann alle Kopien des Hüllproteins das zu selektionierende Protein. Diese Art der Präsentation wird als polyvalent bezeichnet. In einem Phagemid-Vektor dagegen wird die cDNA in ein kleines Plasmid unter der Kontrolle eines schwachen Promotors kloniert. Zusätzlich zu einem Replikationsursprung beinhaltet der Vektor auch einen Ff-Ursprung, der die Produktion eines einzelsträngigen Vektors und damit die subsequente Produktion von Phagenpartikeln ermöglicht. Um Phagenpartikel zu erhalten, müssen die Bakterien nicht nur mit dem Plasmid transformiert, sondern auch mit einem wildtypischen Helferphagen infiziert werden. Die infizierten Zellen stellen dann sowohl die wildtypischen Phagenproteine als auch das Fusionsprotein, welches vom Phagemid kodiert wird, her. Da der Helferphage sein Genom nur sehr ineffizient verpackt, enthalten fast alle Phagenpartikel das Phagemidgenom. Der Vorteil der Phagemid-Vektoren liegt in ihrer geringen Größe und Anwendung einfacher Klonierungsstrategien. Weit verbreitet ist der Einsatz von Phagemid-Vektoren basierend auf dem Phagenprotein pIII, bei deren Verwendung ausschließlich ein monovalenter Display erreicht werden kann. Bei einem monovalenten Phage-Display tragen etwa 10 % oder weniger der Partikel eine Kopie des zu selektionierenden Proteins. Ein weiterer sehr kleiner Prozentsatz trägt zwei Kopien, aber der Hauptanteil der Phagenpartikel präsentiert auf der Oberfläche nur das wildtypische pIII-Protein. Das erscheint zunächst nachteilig, aber die experimentelle Erfahrung hat gezeigt, dass durch monovalente Displays stärker hochaffine Bindungspartner selektioniert werden

können als vergleichsweise durch polyvalente Phage-Display-Strategien ^[110]. Im nachfolgenden Selektionsschritt, also im so genannten Biopanning-Verfahren wird die Phagen-Bibliothek mit dem Zielprotein inkubiert. Durch anschließende extensive Waschschritte werden nicht bzw. wenig affine Phagen entfernt. Die gebundenen Phagen werden daraufhin eluiert und einer weiteren Panning-Runde durch Reinfektion von *E. coli* zugeführt. Die Anreicherung von bindenden gegenüber nichtbindenden Klonen kann in einer Selektionsrunde (Panning) von einem 2-fachen bis hin zu einem 1000-fachen Verhältnis variieren, obwohl eine 10fache Anreicherung eher typisch ist. Im letzten Schritt erfolgt die Analyse der hochaffinen Klone zunächst durch Sequenzierung und anschließend durch Charakterisierung ihrer Eigenschaften, wie die Analyse ihrer Bindungseigenschaften gegenüber dem Antigen. Bei der Charakterisierung der Proteine wird oftmals das Format der Fusionsproteine, d. h. die Präsentation auf der Phagenoberfläche zugunsten löslicher Nicht-Fusionsproteine verlassen. Mit Hilfe des Amber-Stoppkodons, das zwischen der inserierten cDNA und der Sequenz des pIII-Proteins liegt, können Nicht-Fusionsproteine bei Transformation der Phagemide in so genannte *nonsuppressor E. coli*-Stämme erhalten werden ^[111, 112].

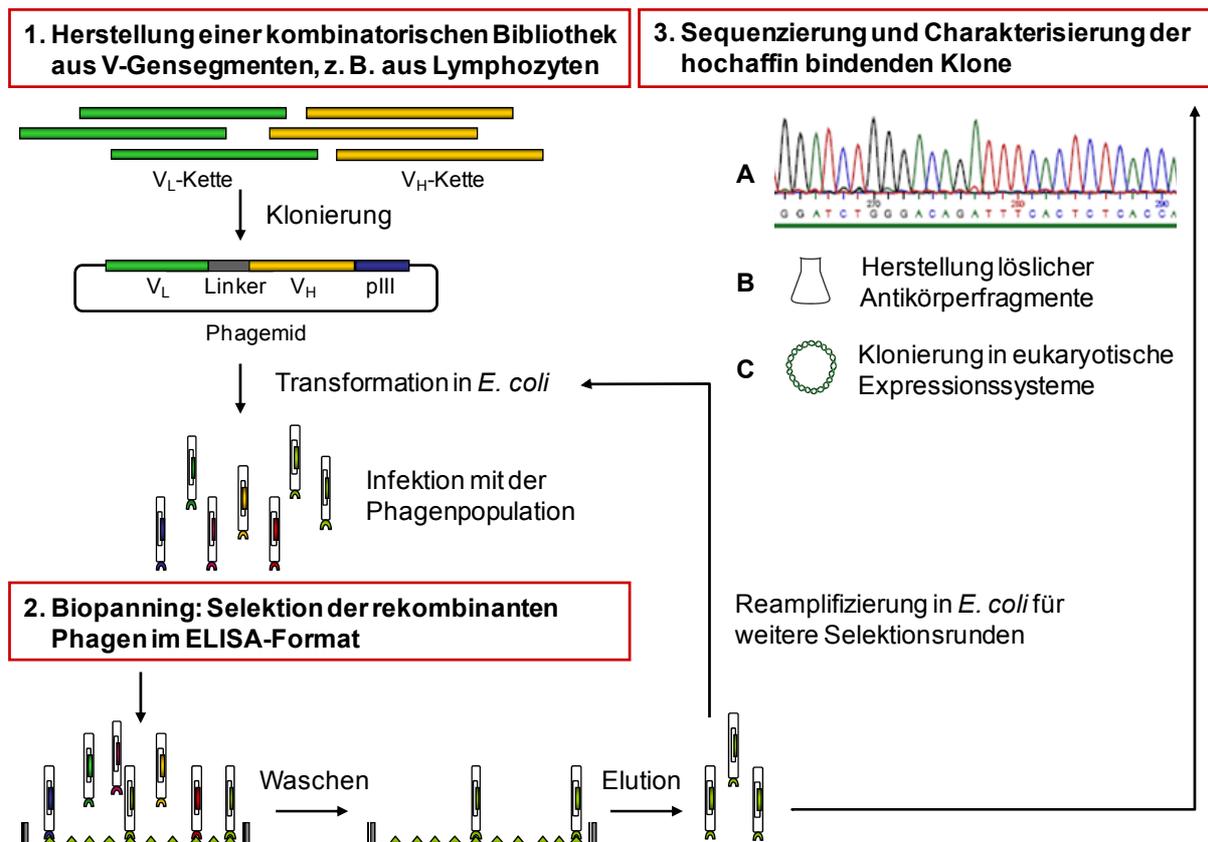


Abbildung 1.7: Zusammenfassende Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte des Phage-Displays.

1.3.2 Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente

Die Phage-Display-Technik bietet die Möglichkeit, rekombinante Antikörper bzw. Antikörperfragmente zu generieren. Es existieren unterschiedlichste Formate dieser Antikörperfragmente, ausgehend von der kleinsten Einheit eines Immunglobulins (Fv) bis hin zu vollständigen Fab-Fragmenten. Zur Übersicht sind einige der gängigsten Formate rekombinanter Antikörper in Abbildung 1.8 dargestellt.

Die kleinste Einheit des menschlichen Immunglobulins ist das so genannte Fv-Fragment. Es beinhaltet eine vollständige Antigenbindungsstelle bestehend aus den variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Kette. Um eine Dissoziation beider Domänen zu verhindern, sind zusätzliche Stabilisierungselemente notwendig. Demzufolge werden Linker-Strukturen eingefügt, die gewährleisten, dass die Fv-Fragmente auf der Oberfläche der Phagen stabil genug sind, um die Selektion gegen das Antigen zuzulassen. Die verwendeten Linker-Strukturen sind meist kurze Serin- und Glycin-reiche Peptide, die zur Bildung eines Einzelkettenantikörperfragments, einem so genannten *single chain Fv fragment* (scFv) führen^[113]. Dabei werden flexible, hydrophile, 15 bis 20 Aminosäuren lange Peptide mit dem Carboxyterminus der V_H -Kette und mit dem Aminoterminus der V_L -Domäne verknüpft^[114].

Die scFv-Fragmente (~ 25 kDa) sind kleiner als Fab-Fragmente (~ 50 kDa), weisen aber meist eine höhere Affinität bzw. Antigenbindungsaktivität gegenüber ihrem Antigen als die entsprechenden Fab-Fragmente des gleichen Antikörpers auf^[115]. Aufgrund des fehlenden Fc-Teils in den Einzelkettenantikörperfragmenten wird das Auslösen der Effektorfunktionen, wie beispielsweise die Komplementaktivierung, weitgehend verhindert.

Beide Antikörperformate können auf der Oberfläche der Phagen exprimiert werden, allerdings neigen die scFv-Fragmente bei höheren Konzentrationen zur Aggregatbildung. Die Aggregatbildung führt oftmals zu schlechten Isolierungs- und Aufreinigungsbedingungen der Einzelkettenantikörperfragmente. Allerdings liegt der größte Vorteil der scFv-Fragmente in ihrer reduzierten Größe, die etwa nur noch einem Sechstel eines vollständigen Immunglobulins entspricht. *In vivo* Untersuchungen belegen, dass die Reduktion der Größe eine verbesserte Penetration des Gewebes zur Folge hat sowie bessere Diffusionseigenschaften im Gewebe gewährleistet werden können^[116]. Einzelkettenantikörperfragmente unterliegen einem schnellen renalen Abbau. Die Halbwertszeit dieser Fragmente beträgt oftmals nur wenige Stunden, was ihre Effektivität herabsetzt. Die Antikörperfragmente werden demzufolge modifiziert und an Substanzen gekoppelt, um gewünschte pharmakokinetische Eigenschaften zu erreichen und so optimierte therapeutische Antikörper zu erhalten^[117]. Durch die Möglichkeit der Klonierung der scFv-Fragmente in prokaryotische und eukaryotische Vektorsysteme erreichen die Antikörperfragmente ein weites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten sowohl im Bereich der Forschung und Diagnostik als auch im Bereich der klinischen Anwendung.

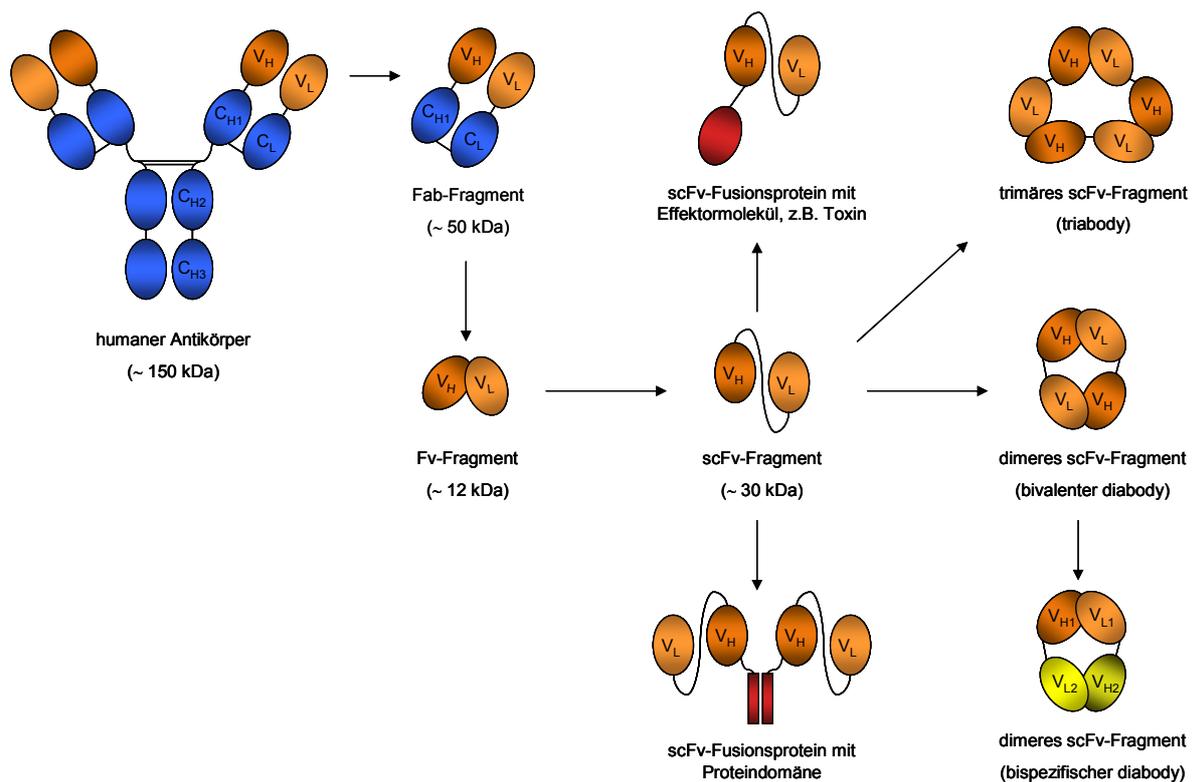


Abbildung 1.8: **Eine Auswahl abgeleiteter, rekombinanter Antikörperformate.** Abkürzungen: V_H : variable Region der schweren Kette (orange); V_L : variable Region der leichten Kette (orange); C_{H13}/C_L : konstante Regionen (blau); Fv: variabler Teil eines Antikörpers; scFv: durch einen Peptidlinker stabilisiertes Fv-Fragment, bestehend aus der variablen Region der leichten und schweren Kette (modifiziert nach Dübel ^[5])

1.3.3 Einsatz und Bedeutung rekombinanter, therapeutischer Antikörper

In den letzten 15 Jahren haben therapeutische Antikörper zunehmend an Bedeutung gewonnen, vor allem auf den Gebieten der Onkologie und Infektiologie (Tabelle 1.2). Der schwierigste und entscheidendste Schritt für die optimale Generierung therapeutischer Antikörper ist die Auswahl des Zielantigens. Die Selektion des Zielantigens setzt das Wissen um biochemische Signalwege der Erkrankung voraus. Oftmals sind die biochemischen und molekularbiologischen Grundlagen bei Tumor- und Viruserkrankungen nicht wirklich verstanden, so dass die optimale Auswahl des Zielantigens für die Intervention des Antikörpers problematisch ist. Für die Wahl des Zielantigens wird häufig das Expressionsmuster des Zielantigens miteinbezogen. Ein optimales Szenario ist eine spezifische Expression oder eine Überexpression des Zielmoleküls in den Tumorzellen bzw. in den Virus-infizierten Zellen. Ein Beispiel in der Onkologie ist unter anderem Trastuzumab (Herceptin®), welches den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER-2) bindet. Obwohl HER-2 in

einer limitierten Anzahl von Zelltypen und Zellgeweben vorkommt, wird dieser Rezeptor in 30 % aller Brustkrebskrankungen überexprimiert ^[118, 119]. Ein weiterer vielversprechender humanisierter, monoklonaler Antikörper ist Bevacizumab (Avastin®), welcher seit 2005 bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird. Bevacizumab ist gegen den Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtet und unterbindet die Angiogenese, also die Neubildung von Blutgefäßen zur Versorgung des Tumors.

Tabelle 1.2: Für die klinische Anwendung zugelassene rekombinante Antikörper (Zulassung der US Food and Drug Administration (FDA))

Bezeichnung	Antikörper-Typ	Zielantigen	Indikation	Zulassung
Onkologie				
ReoPro® (Abciximab)	chimär; Fab	Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	Verhinderung der Blutplättchen-Aggregation	1994/97
Humaspect® (Votumumab)	human, radiomarkiert	-	Kolonkarzinom: <i>in vivo</i> Diagnostik	1996
Remicade® (Infliximab)	chimär	TNF α	Rheumatoide Arthritis, Morbus Chron	1998/99
Herceptin® (Trastuzumab)	humanisierter IgG1	HER-2	Brustkrebs	1998
Erbix® (Cetuximab)	chimärer IgG1	EGFR	Dickdarmkrebs	2003
Avastin® (Bevacizumab)	humanisierter IgG1	VEGF	Darmkrebs	2004
Mylotarg® (Gemtuzumab Ozogamicin)	humanisiertes IgG4-Calicheamicin-Konjugat	CD33	Akute myeloische Leukämie	2000
Bexxar® (Tositumomab)	murines IgG2a-131I-Radiokonjugat	CD20	Rezidierte B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome	2003
Humira® (Adalimumab)	humanes IgG1	TNF α	Rheumatoide Arthritis	2003
Infektiologie				
Synagis® (Palivizumab)	humanisiert	RSV F-Protein	Respiratorisches Synzytial-Virus	1998

Die Entwicklung und der Einsatz rekombinanter Antikörper zur Intervention von Infektionskrankheiten wie HIV und HCV ist bei weitem nicht so fortgeschritten wie auf dem Gebiet der Onkologie. Eine Vielzahl von Antikörpern konnte isoliert werden, die spezifisch gegen virale und wirtseigene Proteine gerichtet sind und so Einfluss auf die Infektion, die Replikation und

die Ausbreitung des Virus nehmen. Im Jahre 1993 wurde erstmalig ein humanes Einzelkettenantikörperfragment als potenzielles therapeutisches Molekül entwickelt, welches an das Hüllprotein gp120 des HI-Virus bindet ^[120]. Weitere regulatorische Proteine, welche durch das HI-Virus kodiert werden, wurden zur Entwicklung therapeutischer, rekombinanter Antikörper herangezogen, unter anderem die reverse Transkriptase ^[121], die Integrase ^[122] sowie das *Tat*- ^[123] und das *Rev*-Protein ^[124]. Weitere Ansätze basieren auf dem Versuch den HIV-Viruseintritt zu verhindern. Solche Antikörper sind zum Beispiel gegen die Chemokinrezeptoren CCR5 ^[125] und CXCR4 ^[126] gerichtet, welche wichtige Korezeptoren des HI-Virus darstellen.

Auch für das Hepatitis C Virus wurde die Entwicklung therapeutischer, rekombinanter Antikörper beschrieben. So konnten unter anderem Antikörper gegen die Strukturproteine Core ^[2, 127] und E2 ^[128] sowie gegen die nichtstrukturellen Proteine NS3 ^[129] und NS5B ^[130] isoliert werden, für die *in vitro* eine Inhibierung der enzymatischen Aktivität nachgewiesen werden konnte ^[130-132]. Die bisher aufgeführten Beispiele legen nahe, dass die intrazelluläre Immunisierung mittels geeigneter Antikörperfragmente einen vielversprechenden antiviralen Therapieansatz darstellt ^[127].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit umfasst zwei wesentliche Aspekte. Der erste Aspekt **(1)**, der bearbeitet wurde, war die Generierung und Charakterisierung von humanen, hochaffinen Einzelkettenantikörperfragmenten (scFv), welche in der Lage sind, das Zielantigen, in diesem Falle das hochkonservierte Strukturprotein Core des Hepatitis C Virus, zu binden. Es wurden humane, intrazelluläre Antikörperfragmente mit hoher inhibitorischer Wirkung kloniert und detailliert analysiert. Die Generierung der rekombinanten Antikörperfragmente erfolgte mittels der Phage-Display-Technologie auf der Grundlage einer humanen, rekombinatorischen Antikörperbibliothek. Die daraufhin selektierten Antikörper gegen das HCV Core Protein wurden charakterisiert und auf ihre biologische Wirksamkeit mit Hilfe unterschiedlicher Modellsysteme überprüft.

Der zweite Aspekt **(2)** dieser Arbeit beschäftigt sich mit einer vergleichenden Proteomanalyse von NS3/4A-transgenen *versus* den entsprechenden wildtypischen Mäusen. Dabei sollten neue Erkenntnisse über den Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Expression von Wirtszellproteinen und über HCV-bedingte Veränderungen der Wirtszelle gewonnen werden, die zum Verständnis der Wirkungsweise des Virus beitragen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material, Substanzen und Lösungen

2.1.1 Materialien für die Zellkultur

Deckgläser Ø 12 mm	Engelbrecht; Edermünde, Deutschland
Gewebekulturflaschen: 75 cm ² ; 175 cm ²	Greiner; Solingen, Deutschland
Gewebekulturschalen: 6 cm; 10 cm	Falcon; Heidelberg, Deutschland
Gewebekulturplatten: 6 well; 12 well	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
MaTek™-Schalen	MaTek Corporation; Ashland, USA
Minisart ^{Plus} Sterilfilter: 0,2 µm	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht; Edermünde, Deutschland

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (4500 mg/l Glukose)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMEM/Nutrient Mix F-12	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma; München, Deutschland
FCS	Perbio; Bonn, Deutschland
G418 (Geneticin)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
PBS	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Cytogen; Sinn-Fleisbach, Deutschland
Zeocin	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien

Ampicillin	Sigma; München, Deutschland
Aprotinin	Sigma; München, Deutschland
Benzamidin	Sigma; München, Deutschland
β-Glycerolphosphat	Sigma; München, Deutschland
Bradford Protein-Assay	BioRad; Hercules, USA
BSA	PAA-Laboratories; Linz, Österreich
Chloramphenicol	Sigma; München, Deutschland
Mounting Medium	DAKO; Hercules, USA
D-Galaktosamin	Sigma; München, Deutschland
DTT	Sigma; München, Deutschland

HiPerFect™ Transfection Reagent	Qiagen; Hilden, Deutschland
Kanamycin	Sigma; München, Deutschland
Leupeptin	Sigma; München, Deutschland
Lipofectamine 2000™	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Na-Pyrophosphat	Sigma; München, Deutschland
Pefabloc	Fluka; St. Gallen, Schweiz
PMSF	Roche; Mannheim, Deutschland
Triton X-100	Merck; Darmstadt, Deutschland
WL Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer; Rodgau-Jügesheim, Deutschland

2.1.4 Kits

QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAshredder Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Luciferase Assay System	Promega; Madison, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
VenorGeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs; Berlin, Deutschland

2.1.5 PCR und Klonierung

dNTP Mix	Roche; Mannheim, Deutschland
High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs; Ipswich, USA
IPTG	Promega; Madison, USA
Oligonukleotide	MWG; Ebersberg, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs; Ipswich, USA
Sequenzierungen	MWG; Ebersberg, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec; Köln, Deutschland
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems; Foster City, USA
T4-DNA Ligase	Promega; Madison, USA
Taq-Polymerase	Roche; Mannheim, Deutschland

2.1.6 Plasmide

pcDNA3	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
--------	------------------------------------

pEGFP-C1	Clontech; Mountain View, USA
pEGFP-N1	Clontech; Mountain View, USA
pEYFP-C1	Clontech; Mountain View, USA
pRL-TK	Promega; Madison, USA

2.1.7 Primärantikörper und Sekundärantikörper

Tabelle 2.1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft	Erkanntes Epitop	Firma	Verwendung
Primärantikörper				
Adipophilin	Meerschwein, polyklonal	C-Terminus (aa 423-437) (human)	Progen (Heidelberg; DE)	IF (1:250)
ApoE	Kaninchen, monoklonal	C-Terminus (human)	Abcam (Cambridge; GB)	IF (1:100) WB (1:1000)
β -Aktin	Maus, monoklonal	6 Isoformen von β -Aktin (human, Maus, Ratte)	Abcam (Cambridge; GB)	WB (1:2000)
FLAG M1	Maus, monoklonal	Flag-tag MDYKDDDK	Sigma (München; DE)	WB (1:500)
GAPDH	Maus, monoklonal	Glycerinaldehyd-3-PDH (human, Maus, Ratte)	Biodesign (Saco; USA)	WB (1:5000)
GFP	Maus, monoklonal	grün-fluoreszierendes Protein; auch CFP/YFP	Roche (Mannheim; DE)	WB (1:1000)
GFP	Maus, monoklonal	grün-fluoreszierendes Protein; auch CFP/YFP	Santa Cruz (Santa Cruz; USA)	WB (1:1000)
GM130	Kaninchen, polyklonal	Golgi, N-Terminus (human)	Cell Signaling (Danvers; USA)	IF (1:50) WB (1:1000)
HCV Core	Maus, monoklonal	Core Protein (aa 21-40)	ABR (Rockford; USA)	IF (1:50) WB (1:1000)
HCV NS3	Maus, monoklonal	NS3 Protein (aa 1252-1477)	Abcam (Cambridge; GB)	IF (1:150) WB (1:2000)
HCV NS4A	Maus, monoklonal	NS4A Protein (aa1689-1735)	US Biological (Swampscott; USA)	IF (1:100)
HCV NS5A	Maus, monoklonal	NS5A Protein	Abcam (Cambridge; GB)	IF (1:150) WB (1:1000)
HCV NS5B	Maus, monoklonal	NS5B Protein (aa372 - 382)	Apotech Corporation (Genf; Schweiz)	IF (1:150) WB (1:1000)
His (C-terminal)	Maus, monoklonal	6x His-tag	Invitrogen (Karlsruhe; DE)	WB (1:1000)
Sekundärantikörper				
HRP-anti-Kaninchen	Ziege, polyklonal	konstanter Bereich von Kaninchen-Ig	DAKO (Hercules; USA)	WB (1:6000)
HRP-anti-Maus	Kaninchen, polyklonal	konstanter Bereich von Maus-Ig	DAKO (Hercules; USA)	WB (1:6000)

Antikörper	Herkunft	Erkanntes Epitop	Firma	Verwendung
Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper	abhängig v. Primärantikörper: Ziege, Esel	konstanter Bereich von Ig der Spezies des eingesetzten Primärantikörpers	Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove; USA)	fitc (1:100) cy3 (1:500) cy5 (1:250)

2.1.8 Fluoreszierende Farbstoffe

Bodipy Lipid Probe	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 34580	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland

2.1.9 Materialien für den Phage-Display

ABTS Tabletten/Puffer	Roche; Mannheim, Deutschland
Complete, Mini-EDTA-free	Roche; Mannheim, Deutschland
ELISA-Platten: 96 well Costar	R&D Systems; Minneapolis, USA
HCV Core Antigen rekombinant	Mikrogen; München, Deutschland
HCV NS3 Antigen rekombinant	Sigma; München, Deutschland
Lysozym	Sigma; München, Deutschland
Jak/Stat-Peptide	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat	Sigma; München, Deutschland
Polyethylenglykol	Merck; Darmstadt, Deutschland
Restriktionsenzym: Sfil	New England Biolabs; Ipswich, USA
VCSM13 Helferphagen	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland

Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) und Fluka (St. Gallen, Deutschland) in *p. A.*-Qualität verwendet.

2.1.10 Computerprogramme und Datenbanken zur Datenauswertung

BioEdit Sequence Alignment Editor	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit
ClustalX	http://www.clustal.org
Ig-Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast
PrimerExpress™	Applied Biosystems; Foster City, USA
V-Base	http://www.vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien (Tab. 2.2) erfolgte in DMEM (supplementiert mit 10 % Hitze-inaktiviertem FCS) in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37°C.

Tabelle 2.2: Verwendete Zelllinien und ihre Kultivierung

Zelllinie	Beschreibung	Kultivierung in:	Zusätze
HepG2	humane Hepatomazelllinie	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS
Huh7	humane Hepatomazelllinie	DMEM/Nutrient Mix F-12 oder DMEM/High Glucose (4500 mg/l Glukose)	10 % FCS
Huh7 Core-NS3*	humane Hepatomazelllinie; stabile Expression von HCV Proteinen (Core-NS3)	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS + 5 µg/ml Zeocin
Huh 9-13*	humane Hepatomazelllinie; subgenomisches Replikon (NS2-NS5B)	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS + 1 mg/ml G418
HepG2 mock/NS3-4A	humane Hepatomazelllinie; konstitutive Expression von HCV NS3/4A	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS + 350 µg/ml Zeocin

* zur Verfügung gestellt von R. Bartenschlager

Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen mittels PCR-basierten Screeningmethoden (VenorGeM) getestet.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese bei 80 %iger Konfluenz trypsiniert, pelletiert, in Einfriermedium (DMEM, 10 % DMSO, 20 % FCS) aufgenommen und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Transfektion von DNA

Das transiente Einbringen von Nukleinsäuren in Zellkulturzellen erfolgte adhärent oder in Zellsuspension mittels Lipofektion. Die Transfektion über Liposomen (Lipofektion) wurde entweder mit Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) oder HiPerFect™ (Qiagen) durchgeführt.

Transfektion in Zellsuspension. Für die Transfektion wurde je Ansatz 2,5 µg DNA in 50 µl OptiMEM (serumfrei) aufgenommen. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 4 µl

Lipofectamine 2000TM mit 246 µl OptiMEM versetzt. Beide Ansätze wurden zusammengeführt, gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zwischen DNA und Liposomenoberfläche zu ermöglichen. In der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen (75 cm² Zellkulturflasche mit 70-80 % Konfluenz) trypsinisiert, pelletiert (Zentrifugation 1000 rpm, 5 min, 4°C) und anschließend in 5 ml Medium aufgenommen. Jedem Transfektionsansatz wurden daraufhin 400 µl Zellsuspension zugegeben, auf ein Endvolumen von 1,6 ml mit Medium adjustiert und der vollständige Ansatz in eine Gewebekulturschale (6 cm) überführt. Nach 4 Stunden Inkubation der Zellen bei 37°C im Brutschrank erfolgte ein Medienwechsel mit 2 ml frischem Kulturmedium. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen lysiert und wie in den nachfolgenden Abschnitten ausgeführt, bearbeitet.

Transfektion adhärenter Zellen. Bei der Transfektion adhärenter Zellen mit Lipofectamine 2000TM oder HiPerFectTM wurden ebenfalls zwei separate Ansätze vorbereitet: ein Ansatz mit DNA und serumfreien OptiMEM-Medium und ein weiterer Ansatz mit Lipofectamine 2000TM bzw. HiPerFectTM und OptiMEM. Die verwendeten DNA-, Transfektionsreagenz- und Medium-Mengen wurden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt und der Größe der verwendeten Gewebekulturschale bzw. der eingesetzten Gewebekulturplatten angepasst.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Isolierung von RNA

Nach der Kultivierung der Zellen auf 6 cm Schalen wurden diese mit PBS gewaschen und in 350 µl RLT-Puffer (Zugabe von 3,5 µl β-Mercaptoethanol) lysiert. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte den Herstellerangaben entsprechend mittels des QIAshredder Kits (Qiagen) und die weitere Isolierung und Aufreinigung der RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen). Optional wurde ein DNaseI-Verdau zur Eliminierung genomischer DNA durchgeführt. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm / 280 nm bestimmt.

cDNA-Synthese

Die cDNA wurde aus 1 µg RNA mit Hilfe des Quantitect Reverse Transcription Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers synthetisiert, in 100 µl sterilem H₂O aufgenommen und anschließend in der Real-Time-PCR eingesetzt. Durch entsprechend durchgeführte Kontrollen u. a. ohne DNA und ohne Reverse Transkriptase wurde die Reinheit der Synthesereaktion überprüft.

Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion. Der entscheidende Vorteil liegt hier in der Quantifizierung des PCR-Produktes während des Ablaufes des Amplifikationsprozesses im exponentiellen Bereich. Für die Real-Time-PCR wurde der Reporterfarbstoff SYBR Green eingesetzt, der die Fähigkeit besitzt spezifisch an doppelsträngige DNA, durch Interkalation zwischen den Basenpaaren, zu binden. Der SYBR Green Farbstoff fluoresziert nur bei Bindung an DNA, dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des Amplikons zu. Da der SYBR Green Farbstoff nicht nur das Amplikon, sondern auch andere unspezifische, doppelsträngige DNA-Produkte detektieren kann, ist es notwendig die Oligonukleotide (Primer) so zu designen, dass diese nur ein einziges spezifisches Produkt generieren und keine unspezifischen Sekundärprodukte wie z. B. Primer-Dimere ausbilden, welche mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse identifiziert werden können. Die Entwicklung der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms Primer-Express™ (Applied Biosystems). Die eingesetzten Primer hatten eine Schmelztemperatur von $59^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, weniger als 3 G/C-Basen am 3'-Ende und sollten eine Amplikonlänge von 100-150 Basenpaaren generieren. Als Ausgangsmaterial der Real-Time-PCR wurde 5 μl der 1:5 verdünnten cDNA eingesetzt und 50 μl SYBR Green PCR Mastermix nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems) zugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte nach standardisierten Parametern (Annealing: 59°C , 40 Zyklen), an die sich eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Reaktionen anschloss. Für die Quantifizierung wurde die ΔCT -Methode verwendet ^[133], dabei ergibt sich der CT-Wert aus der Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt. Als Referenz wurde bei der Bestimmung der Cox2 Expression humanes HPRT1 (Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase 1) und bei der Bestimmung der ApoE Expression humanes SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A) verwendet.

Tabelle 2.3: **Verwendete Oligonukleotide für die Real-Time-PCR**

Bezeichnung	Nukleotidsequenz in 5' → 3'	
humanes HPRT1	sense antisense	GCT TTC CTT GGT CAG GCA GT GCT TGC GAC CTT GAC CAT CT
humanes SDHA	sense antisense	CCA CTC GCT ATT GCA CAC CTT TCC TCT ATG CAC AGT GCG ATG
humanes Cox2	sense antisense	TGC TCC TCT TGA TTC CTG GTT CTG TCT TTG ACC CTG AGC CA
humanes ApoE	sense antisense	TGG GTC GCT TTT GGG ATT AC GGC CTT CAA CTC CTT CAT GGT

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion ^[134]. Als hitzestabile DNA-Polymerase wurde wahlweise die *Taq*-Polymerase der Firma Roche oder die High-Fidelity DNA-Polymerase der Firma New England Biolabs eingesetzt. Die High-Fidelity DNA-Polymerase besitzt eine so genannte *proofreading*-Aktivität, das bedeutet dass sie aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität fehlerhaft eingebaute Nukleotide korrigiert und ersetzt. Diese spezielle *Taq*-Polymerase wurde hauptsächlich in Klonierungsexperimenten eingesetzt. Jede PCR-Reaktion beinhaltete: 2,5 mM dNTPs, je 10 pmol sense- und antisense-Primer, 1-2,5 Einheiten der Polymerase und 10-80 ng Template. Die PCR-Reaktionen wurden mit Mg²⁺-haltigem Puffer und sterilem H₂O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Der PCR-Zyklus erfolgte in den typischen Schritten: Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges (94°C), Primer-Hybridisierung (*annealing*) an der einzelsträngigen DNA (Temperatur anhängig von der Primer-Sequenz) und anschließender Verlängerung der Primer (*extension*, 72°C). Die Vervielfältigung der DNA-Matrize wurde durch mehrfaches Wiederholen der einzelnen Zyklen (20-35 Zyklen) erreicht. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler PTC-200 der Firma MJ-Research durchgeführt.

Tabelle 2.4: **Verwendete Oligonukleotide für PCR**

Bezeichnung	Nukleotidsequenz in 5' → 3'	
Sc42DNA3	sense	GTC AAG CTT ACC ATG GCG GAC TAC A
	antisense	TGA TAG CGG CCG CCT AAT GAT GGT GAT G
Sc/YFP/C1/	sense	GCT CGA GAT ATG GCG GAC TAC AAA GA
	antisense	AGA ATT CGA CTA AAT TCG GCC CCC GAG
HCV191/YFP/C1	sense	CGA CCA TGG CAA GCA CGA AT
	antisense	TGA TAG CGG CCG CCT AAT GAT GGT GAT GAT GGT GTT GGT AGG C
HCV191/CFP/C1	sense	CCG AAT TCT AGC ACG AAT CCT AAA
	antisense	CAC GGA TCC GCT TGG TAG GCT GAA

Elektrophoretische Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurden Agarosegele verwendet, deren Agarosekonzentrationen abhängig von der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente variierten ^[135]. Als Lauf- und Gelpuffer wurde TAE-Puffer (242 g/l Tris, 100 ml/l 0,5 M EDTA pH 8,0, 57,1 ml/l Essigsäure) verwendet. Das Anfärben der DNA in den Agarosegelen erfolgte beim Gießen durch Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml). Zur Größen-

bestimmung wurde bei der elektrophoretischen Trennung der Größenstandard SmartLadder der Firma Eurogentec mit aufgetrennt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit Orange G-haltigem Auftragspuffer (3,7 g/l EDTA, 150 g/l Ficoll, 1 g/l Orange G) in einem Verhältnis von 1:5 versetzt. Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte mit Hilfe des Doc-Print-Geldokumentationssystems der Firma Peqlab.

Aufreinigung und Extraktion von DNA

Die Aufreinigung von PCR-Produkten bzw. DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits. Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mittels Ethidiumbromid im Agarosegel angefärbt und anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits.

Restriktionsverdau

Die Spaltung der DNA erfolgte mittels der Restriktionsendonukleasen des Typs II, die an palindromen Sequenzen schneiden. Alle eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. Die Reaktionsbedingungen (Puffer, Zugabe von BSA, Temperatur) der Restriktionsendonukleasen wurden gemäß der Herstellerangaben gewählt. Die Hydrolyse der DNA erfolgte entweder im analytischen oder im präparativen Maßstab. Für analytische Ansätze wurden 0,5-1 µg DNA und 10-20 Einheiten Enzym mit dem entsprechenden Puffer auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt und für 1-2 Stunden bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Für präparative Reaktionsansätze wurden 10 µg DNA und 30-40 Einheiten des Restriktionsenzym verwendet, auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und 3-4 Stunden oder über Nacht inkubiert. Die Überprüfung des Restriktionsverdau erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen.

Ligation von DNA-Fragmenten

Als DNA-Ligase wurde die T4-Ligase der Firma New England Biolabs verwendet. Die Ligationen wurden in einem molaren Vektor : Insert-Verhältnis von 1:3 angesetzt und wahlweise bei Raumtemperatur für 2 Stunden oder bei 16°C über Nacht im Wasserbad inkubiert.

Klonierung der DNA-Fragmente in Vektoren

Die Klonierung von Plasmiden erfolgte nach Sambrook *et al.* ^[217]. Zunächst wurden mittels PCR und entsprechend gewählter Primer DNA-Fragmente erzeugt, die an ihren Enden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen aufwiesen. Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt, mittels Restriktionsendonukleasen verdaut und in einer Ligationsreaktion in den entsprechenden Vektor, der zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen

hydrolysiert wurde, zusammengefügt. Der Ligationsansatz wurde in kompetente Bakterien (JM109 oder Top10F') transformiert und auf antibiotikahaltige Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht wurden einzelne Bakterienkolonien in Nährmedium kultiviert, ihre Plasmid-DNA isoliert und mittels eines analytischen Restriktionsverdau überprüft. Positive Klone wurden sequenziert und mit den Referenzsequenzen der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen.

Folgende Klonierungen wurden vorgenommen:

- Zur Herstellung von HCV Core pcDNA3 wurde virale HCV Core DNA aus dem ORFIII (Genotyp 1a) (zur Verfügung gestellt von T. Heintges) mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pcDNA3 der Firma Invitrogen kloniert.
- Zur Herstellung von 191-CFPC1 wurde virale HCV Core DNA aus dem ORFIII (Genotyp 1a) mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pECFP-C1 der Firma Clontech kloniert.
- Zur Herstellung von 191-YFPC1 wurde virale HCV Core DNA aus dem ORFIII (Genotyp 1a) mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pEYFP-C1 der Firma Clontech kloniert.
- Zur Herstellung der scFvs in pEYFP-C1 wurden die kodierenden DNA-Abschnitte aus den prokaryotischen Plasmiden pAK100 mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pEYFP-C1 der Firma Clontech kloniert.
- Zur Herstellung von Sc42pcDNA3 wurde der kodierende DNA-Abschnitt aus dem prokaryotischen Plasmid pAK100 mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pcDNA3 der Firma Invitrogen kloniert.

Bakterienstämme und ihre Kultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.5 aufgelistet. Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden wahlweise die *E. coli*-Stämme JM109 (Promega) und Top10F' (Invitrogen) verwendet, deren Kultivierung in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5; bei Agarplatten: zusätzlich 15 g/l Agar) erfolgte. Für Versuche, bei denen die Proteinexpression im Vordergrund stand, wurden die *E. coli* Stämme XL1 blue MRF' und HB2151 verwendet, deren Kultivierung in 2-fach YT-Medium (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5; bei Agarplatten: zusätzlich 15 g/l Agar) durchgeführt wurde. Die Selektionsmedien enthielten zusätzlich 50 mg/l Ampicillin, 25 mg/l Kanamycin oder 25 mg/l Chloramphenicol. Zur Konservierung der Bakterien wurden Glycerolstammkulturen (Bakteriensuspension mit 20 % Glycerol) angelegt und bei - 80°C gelagert.

Tabelle 2.5: **Verwendete *E. coli* Stämme mit Genotypbezeichnung**

Bakterienstamm	Genotyp
Top 10F'	F' [<i>lacI</i> ^q Tn10 (Tet ^r)], <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80/ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15 <i>ΔlacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> (Str ^r), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>
XL1 blue MRF'	Δ (<i>mcrA</i>)183, Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i> ⁻ 1, <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacIq</i> Z Δ M15, Tn10 (Tet ^r)]
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (rk., mk+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqlq</i> Z Δ M15]
HB2151	<i>nalr</i> , <i>thi-1</i> , <i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>), [F', <i>proAB</i> + <i>lacIq</i> , <i>lacZ</i> Δ M15]

Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Ausgehend von den ursprünglichen Glycerolstammkulturen JM109 (Promega) wurde zur Vereinzelung der Bakterienkolonien ein Verdünnungsausstrich (12 h, 37°C) auf einer LB-Agarplatte durchgeführt. Daraufhin wurde eine Einzelkolonie in LB-Nährmedium überführt und über Nacht bei 37°C vorkultiviert. Die Vorkultur wurde zu 250 ml LB-Medium (supplementiert mit 20 nM MgSO₄) gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (Zentrifugation 4000 rpm, 5 min, 4°C), in TFB-1-Puffer (30 mM Kaliumazetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 5,8) aufgenommen und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in TFB-2-Puffer (100 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 6,5) resuspendiert. Nach anschließender Inkubation auf Eis (15-60 min) wurde die Bakterienzellsuspension aliquotiert und bei - 80°C gelagert.

Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Für die Transformation wurden zunächst 100 µl kompetenter Zellen JM109 auf Eis aufgetaut, die gewünschte Menge der DNA bzw. des Ligationsansatzes zu den Bakterien gegeben und 10-30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C und nachfolgend schloss sich sofort eine 2-minütige Inkubation auf Eis an. Der Transformationsansatz wurde dann mit 900 µl SOC-Medium (0,5 g/l Hefeextrakt, 2 g/l Trypton, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose, pH 7,0) aufgefüllt und für 1 Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden 80-100 µl des Transformationsansatzes auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Transformation der *E. coli* Top10F' (Invitrogen) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte entweder im kleinen Maßstab mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits oder im großen Maßstab mit Hilfe des QIAprep Spin Maxiprep Kits. Die Konzentrationsbestimmung der DNA wurde spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm durchgeführt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Zellyse

Die auf Gewebekulturschalen (6 und 10 cm) kultivierten Zellen wurden nach Versuchsabbruch einmal mit kaltem PBS (supplementiert mit 0,1 mM Na_3VO_4) gewaschen und unter Zugabe von Triton-Lysispuffer (1 % Triton X-100, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 4 mM Benzamidin, 2 mM EDTA, 10 % Glycerol, 50 mM β -Glycerolphosphat, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 136 mM NaCl, 20 mM Natrium-Pyrophosphat, 1 mM Na_3VO_4 , 0,2 mM Pefabloc, 0,2 % SDS) (für 6 cm Schalen: 100-120 μl ; für 10 cm Schalen: 150-200 μl) mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Die geernteten Zellen wurden gut mit dem Lysispuffer vermischt, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend einer Ultraschallbehandlung von zweimal 20 Sekunden unterzogen, um auch membranständige Proteine wie die HCV Proteine bei der Lyse zu gewinnen. Nach dem Ultraschall schloss sich ein kurzer Zentrifugationsschritt an (14000 rpm, 2 min, 4°C). Die Lysate wurden auf ihren Proteingehalt hin quantitativ mittels des Protein-Assays von Biorad überprüft und anschließend bei - 20°C gelagert.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach dem Prinzip Bradford mit Hilfe des Protein-Assays von Biorad nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei dieser Quantifizierung wird der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau verwendet, der mit basischen Aminosäuren reagiert und dessen Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm verschiebt. Die Messung der Extinktion erfolgt bei dieser Wellenlänge und wird zur Berechnung der Proteinkonzentration verwendet.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 4-mal SDS-Auftragspuffer nach Lämmli (250 mM Tris/HCl pH 6,8, 40 % Glycerol, 5 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau, kurz vor Gebrauch Zugabe von 8 % β -Mercaptoethanol) versetzt, bei 98°C für 5 Minuten denaturiert und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden dann auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und in dem Gelelektrophoresesystem der Firma Biometra in Abhängigkeit der Gelgröße bei 140 V für 3-4 h oder bei 70 V über Nacht aufgetrennt. Die Sammelgele der Polyacrylamidgele wiesen immer die gleiche PAA-Konzentration (5 %) auf, wohingegen die Konzentration der Trenngele (8-15 %) an die Größe der zu detektierenden Proteine angepasst wurde. Als

Proteinstandard zur Größenbestimmung wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Biorad) verwendet. Nach Beendigung des Gellaufs erfolgte der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach der Semidry-Blotting-Methode in einer Elektrobloitingapparatur der Firma Biorad auf PVDF-Membran (Amersham) bei einer Stromstärke von 1 mA pro cm² für 60-90 Minuten abhängig von der Größe, der zu transferierenden Proteine. Der Stromfluss zwischen den Elektroden wurde durch flüssigkeitsgetränkte Papiere (Whatman, Schleicher & Schuell) gewährleistet. Dabei wurden Blottingpuffer (Anodenpuffer 1: 0,3 M Tris, 20 % Methanol; Anodenpuffer 2: 0,025 M Tris, 20 % Methanol; Kathodenpuffer: 0,04 M 6-Aminocaprinsäure, 20 % Methanol) unterschiedlicher Ionenstärke verwendet.

Um die transferierten Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurde die Methode des Western Blots (Immundetektion) angewandt. Dazu wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 3 % BSA oder 10 % Milchpulver in TBS-T (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:5000 in 3 % BSA-TBS-T für wahlweise 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Um unspezifisch gebundenen Primärantikörper zu eliminieren, schlossen sich Waschschrte (3x) von 20 Minuten mit TBS-T bei Raumtemperatur an. Nach dem Waschen wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen konnte dann die Detektion des Signals mit Hilfe des WL Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer) und ECL-Filmen (GE Healthcare) in einer Entwicklermaschine der Firma Kodak erfolgen. Um die Membran für weitere Immundetektionen verwenden zu können, wurden nach der Detektion die Protein-Antikörper-Komplexe von der PVDF-Membran mit Hilfe des Stripping-Puffers (67 mM Tris pH 6,7, 2 % SDS, 7 % β-Mercaptoethanol) bei 70°C abgelöst.

Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

Nach elektrophoretischer Auftrennung besteht auch die Möglichkeit die Proteine mittels einer Coomassie-Färbelösung (400 ml/l Methanol, 200 ml/l Essigsäure, 2,5 g/l Coomassie Brilliant Blue) und anschließendem Waschen mit einer Entfärberlösung (10 % Essigsäure, 30 % Ethanol) direkt im Polyacrylamidgel zu visualisieren. Die Lufttrocknung der Gele erfolgte zwischen zwei Zellophanfolien (Roth), welche durch einen entsprechenden Rahmen der Firma Roth fixiert wurden.

Analyse muriner und humaner Leberproben

Murine Leberproben. 6-12 Wochen alte Mäuse mit leberspezifischer NS3/4A-Expression und entsprechenden Kontrolltieren (C57BL/6xCBA F1) wurden Lebern entnommen, die zuvor mit PBS (pH 7,4, 4°C) perfundiert wurden (durchgeführt von E. Brenndörfer in Kooperation mit AG Sällberg, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden). Die tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten unter Einhaltung des schwedischen Tierschutzgesetzes und standen im Einklang mit den Richtlinien für Tierversuche des Karolinska-Institutes. 100-125 mg Lebergewebe wurde zur Präparation von totalen Proteinlysaten eingesetzt. Die Leberstücke wurden in 1 ml Ripa-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 % Triton-X 100, 1 % Natriumdeoxycholat, 0,2 % SDS, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 0,2 mM Pefabloc, 0,5 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄) homogenisiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend einer Ultraschallbehandlung von zweimal 20 Sekunden unterzogen. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 5 min, 4°C) um nicht homogenisierte Zellfragmente aus der Präparation zu entfernen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Protein-Assays der Firma Biorad bestimmt. Anschließend wurde 100 µg Protein mit 4-mal SDS-Auftragspuffer nach Lämmli versetzt, bei 98°C für 5 Minuten denaturiert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt.

Humane Leberproben. Das Lebergewebe wurde entweder im Rahmen einer Leber- teilresektion (15 cm²) zur Entfernung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) bzw. einer Lebermetastase oder im Rahmen einer diagnostischen Leberbiopsie gewonnen (zur Verfügung gestellt von Prof. J. Schulte am Esch und Prof. R. Kubitz, Düsseldorf). Die Probenentnahme erfolgte nach schriftlicher Einwilligung der Patienten gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie der Deklaration von Helsinki. Die in dieser Arbeit eingesetzten Leberproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. 50-100 mg Lebergewebe wurde als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Proteinlysate eingesetzt. Die Präparation der humanen Leberproben erfolgte analog der Aufarbeitung der murinen Proben.

Reportergen-Assay

Die Zellyse der transient transfizierten HepG2-Zellen und die nachfolgende Durchführung der Reportergen-Assays erfolgte mit Hilfe von Luciferase-Systemen der Firma Promega. Die Aktivität der transient transfizierten Zellen mit den Reportergenprodukten wurde *in vitro* über die Luciferaseaktivität bestimmt, das heißt über die Messung der Biolumineszenzreaktion der Luciferase in den Zelllysaten. Die Firefly-Luciferase (aus *Photinus pyralis*) katalysiert die Umsetzung des Luciferins in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP sowie Mg²⁺ in Oxyluciferin und Kohlendioxid. Bei dieser Reaktion wird Licht der Wellenlänge 562 nm emittiert, welches mittels eines Luminoscans (GMI; Ramsey, USA) detektiert wurde.

Dual-Luciferase-System. Der Vorteil bei dem Dual-Luciferase-System liegt in der gleichzeitigen Expression des Reporterenzym und des Referenzenzym, das bedeutet das beide Enzymaktivitäten sequentiell in der gleichen Probe gemessen werden können. In diesem System wurde zur Berücksichtigung der Transfektionseffizienz die erhaltenen Werte der Firefly-Luciferaseaktivität gegen den kotransfizierten zweiten Reporter, die Renilla-Luciferaseaktivität (pRL-TK; aus *Renilla reniformis*) normalisiert. Nach der Quantifizierung der Firefly-Lumineszenz wird diese Reaktion gequencht, indem nach Zugabe der Stop- & -Glow-Reagenz die Reaktion der Renilla-Luciferase initiiert wird.

TCID₅₀-Assay

Der TCID₅₀-Assay dient zur Bestimmung der Viruskonzentration mit Hilfe der Methode der Endverdünnung und ist somit eine Methode zum quantitativen Nachweis infektiöser Virionen. Dabei wird die Verdünnungsstufe bestimmt, in welcher noch eine Infektion durch den Virus erfolgen kann. Naive Huh7.5-Zellen wurden in einer Konzentration von $1,1 \times 10^4$ Zellen/well in einer 96 well Gewebekulturplatte in einem Volumen von 200 µl ausgesät. Nach 24 Stunden wurden zu den naiven Huh7.5-Zellen fortlaufende Verdünnungsstufen der zuvor gesammelten Virusüberstände zugegeben (pro Verdünnungsstufe wurden acht wells verwendet). Nach den jeweiligen Inkubationszeiten (24, 48 und 72 Stunden) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 10 Minuten mit Paraformaldehydlösung (4 % PFA in PBS pH 10) fixiert und anschließend für 5 Minuten mit eiskaltem Methanol permeabilisiert. Danach wurden die 96 well Platten erneut mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen durch Zugabe einer 1 %igen BSA-Lösung. Zusätzlich wurde die endogene Peroxidase mit H₂O₂ (0,3 % v/v) für 5 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS wurde der primäre Anti-körper (HCV NS5A 9E10 1:400) für 1 Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Danach wurden die 96 well Platten erneut dreimal mit PBS über einen Zeitraum von 30 Minuten gewaschen um überschüssigen, nicht gebunden Antikörper zu entfernen. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde dann ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (1:200) eingesetzt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Peroxidaseaktivität mit Hilfe des Vector NovaRed Substrat Kit (Linaris Biologische Produkte GmbH) detektiert. Die infizierten Zellen wurden daraufhin mit Hilfe eines Lichtmikroskops analysiert und ausgezählt. Der Virus-Titer (TCID₅₀/ml) wurde anschließend basierend auf der Methode von Spearman und Kärber berechnet.

Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale *Laserscanning* Mikroskopie

Zellen der Hepatomazelllinien Huh7 wt, Huh7 Core-NS3 und Huh 9-13 wurden in 24 well Gewebekulturplatten auf Glasdeckgläsern ausgesät und bis zu einer 50-60 %igen Konfluenz

der Zellen kultiviert. Nach Erreichen der entsprechenden Konfluenz erfolgte entweder die Transfektion mittels HiPerFect™ (Qiagen) mit fluoreszierenden Fusionsproteinen (pEYFP/pEGFP-Konstrukte) oder die Fixierung der Zellen zur Färbung endogener Proteine. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf den Deckgläsern wahlweise mit eiskaltem Methanol (100 %) für 5 Minuten bei 4°C oder einer Paraformaldehydlösung (4 % PFA in PBS pH 10) für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Permeabilisierung der PFA-fixierten Zellen mittels einer 0,1 %igen Triton X-100-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Da Methanol nicht nur fixierende, sondern auch permeabilisierende Eigenschaften besitzt, war nach Anwendung dieser Fixierungsmethode keine Permeabilisierung mehr notwendig. Die Deckgläser wurden erneut mit PBS gewaschen, die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 1 %ige BSA-Lösung bzw. eine 3 %ige FCS-Lösung blockiert und die Zugabe des primären Antikörpers konnte erfolgen. Der primäre Antikörper wurde entweder nach Angaben des Herstellers oder 1:50-1:250 (siehe Tabelle 2.1) in Blockierungsreagenz verdünnt, auf die Deckgläser gegeben und diese für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Danach wurden die Deckgläser dreimal mit PBS über einen Zeitraum von 30 Minuten gewaschen um überschüssigen, ungebunden Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper, ebenfalls in Blockierungsreagenz verdünnt, auf die Deckgläser pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln in einer Feuchtkammer inkubiert. Zur Anfärbung des Nukleus wurde dem Sekundärantikörper der Kernfarbstoff Hoechst 34580 (Invitrogen) in einer Verdünnung 1:10000 zugegeben. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Deckgläser erneut dreimal mit PBS über einen Zeitraum von 30 Minuten sowie einmal mit destilliertem Wasser (zur Entfernung der PBS-Kristalle) gewaschen. Nach Fertigstellung der Färbung wurden die Deckgläser in Mounting Medium der Firma Dako konserviert. Die Spezifität der Färbungen wurde durch entsprechend durchgeführte Kontrollen (Färbung ohne Primärantikörper) und unter Beachtung der verwendeten Spezies überprüft.

Die Auswertung der Färbung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops des Typs LSM510META der Firma Zeiss in einem Multitrack-Modus (Trennung der Kanäle), um Interferenzen der verschiedenen Farbstoffe zu verhindern. Das Mikroskop ist mit einem Argon-Laser, zwei Helium-Lasern und einem AOTF (*Acousto-optic tunable filters*) ausgestattet, so dass folgende Wellenlängen zur Verfügung stehen: 405 nm, 458 nm, 488 nm, 514 nm, 543 nm und 633 nm. Die gemessenen Emissionen der verwendeten Fluorophore sind in der Tabelle 2.6 zusammengefasst (BP: Bandpass; LP: Longpass). Die Steuerung aller Komponenten und die Bildaufnahmen erfolgten über die Zeiss-Software AxioVision. Sofern nicht extra vermerkt, erfolgten die Bildaufnahmen mittels eines Objektivs mit 63-facher Vergrößerung.

Tabelle 2.6: **Verwendete Fluorophore**

Name	Anregung [nm]	Gemessene Emission [nm]
Hoechst	405 nm	420-480 nm (BP)
ECFP	405 nm	420-480 nm (BP)
EYFP	488 nm, 514 nm	505-530 nm (BP)
fitc	488 nm	505-530 nm (BP)
cy3	543 nm	560-615 nm (BP)
cy5	633 nm	640-750 nm (LP)

2.2.4 FRET

Zellen der Hepatomazelllinie Huh7 wurden auf MaTek-Schalen (50 mm Plastikschalen mit Glasboden) ausgesät und bis zu einer 50-60 %igen Konfluenz der Zellen in DMEM/High Glucose Medium (supplementiert mit 10 % FCS) kultiviert. Anschließend erfolgte die Transfektion mittels HiPerFect™ (Qiagen) mit fluoreszierenden Fusionsproteinen (pEYFP/pECFP-Konstrukte). Nach 4 Stunden wurde das Medium durch 2 ml frisches Medium (Phenolrot-frei) ersetzt und nach weiteren 48 Stunden wurden die transient transfizierten Zellen mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops des Typs LSM510META der Firma Zeiss hinsichtlich möglicher FRET-Effekte analysiert.

FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer Technique*). Die Methode der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfertechnik beruht auf dem Prinzip nach Förster der strahlungslosen Energieübertragung eines angeregten Fluoreszenzmoleküls (Donor-CFP) auf ein benachbartes Fluoreszenzmolekül (Akzeptor-YFP). Ursache dafür sind Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Fluorophore. Voraussetzung für den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ist die Überlagerung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (Abbildung 2.1 (A)). Die Emission des Akzeptors wird durch die Anregung des Donors verstärkt bei gleichzeitiger Reduzierung der Donor-Emission (Abbildung 2.1 B). Dabei sollte die Absorption des Donors bei einer höheren Wellenlänge als die des Akzeptors erfolgen. Diese Voraussetzung erfüllt das Fluoreszenzpaar CFP/YFP, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Interagieren die CFP/YFP-Fusionsproteine in einem Bereich unter 10 nm kann die Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden. Demzufolge wird die Fluoreszenz des Donors in Gegenwart des Akzeptors bei gleichbleibender Anregungsenergie schwächer und der Akzeptor kann Fluoreszenz abgeben, ohne dass er selbst angeregt wird. Die Abnahme der Donorfluoreszenz ist umso stärker, je effizienter der Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor erfolgt, d. h. je näher sich beide Fluorophore zueinander befinden.

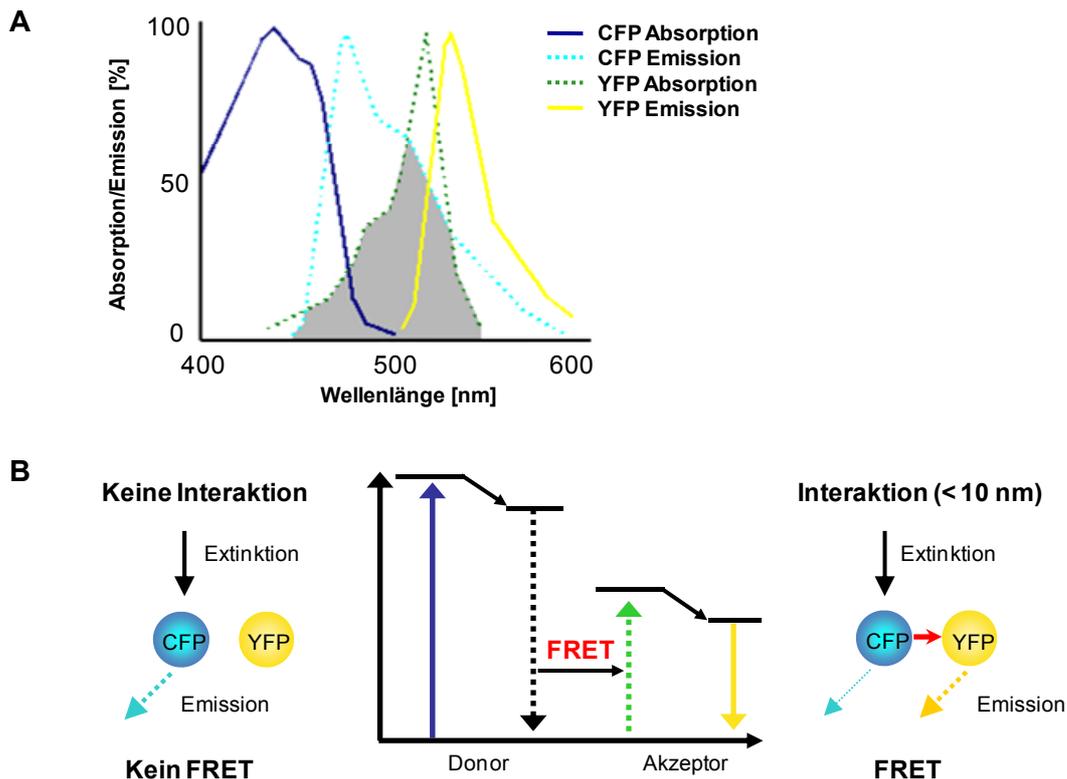


Abbildung 2.1: **Prinzip der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfertechnik am Beispiel des Donor / Akzeptor-Paares CFP / YFP.** A) Absorptions- und Emissionsspektrum von CFP und YFP B) Übertragung der Energie von CFP (Donor) auf YFP (Akzeptor) bei Interaktion der Fusionsproteine in einem Bereich von < 10 nm. (modifiziert nach S. Jähnichen)

Für die FRET-Messung wurden beide Fluorophore in einem Bereich der Wellenlänge 422-582 nm mit dem META-Scankopf detektiert. Dabei wurde CFP mit einer Wellenlänge von 405 nm angeregt. Mit Hilfe zuvor aufgenommener Spektren von Proben, die ausschließlich CFP oder YFP enthielten, konnte die Emission der reinen Fluorophore aus den entstandenen Bildern extrahiert werden.

2.2.5 Phage-Display

Klonierung einer Phagen-Bibliothek aus Plasmazellen HCV-infizierter Patienten

Knochenmarksaspirate von fünf chronisch HCV-infizierten Patienten wurde als Ausgangsmaterial für die Klonierung einer kombinatorischen Antikörperbibliothek der Größe 4×10^6 eingesetzt. Alle Patienten wiesen eine HCV Infektion entweder des Genotyps 1 oder des Genotyps 3 auf. Die Klonierung dieser Bibliothek erfolgte nicht im Rahmen dieser Arbeit ^[131, 132]. Die variablen Ketten humaner Antikörper (V_H und V_L) wurden mittels PCR aus Plasmazellen, nach RNA-Isolierung, amplifiziert, über einen flexiblen Aminosäurelinker $(Gly_4Ser)_3$ miteinander verbunden und über SfiI-Schnittstellen in den Phagemidvektor

pAK100 kloniert ^[136]. Durch die angewandte Klonierungsstrategie konnte eine Neukombination der schweren und leichten Antikörperketten, die so im menschlichen Organismus nicht vorliegen, gewährleistet werden. Dieser Phage-Display-Vektor erlaubte die Expression der Antikörperfragmente sowohl als Gen III-Fusionsprotein auf der Oberfläche filamentöser Phagen als auch die lösliche Expression der scFvs im Periplasma der Bakterien. Nach Transformation in den Bakterienstamm XL1 blue MRF' konnte die Antikörperbibliothek als Glycerinstammkultur bei - 80°C gelagert werden.

Anzucht der Helferphagen

Voraussetzung für den Phage-Display ist das Einbringen der Antikörperbibliothek in den Helferphagen. Dazu war es notwendig den kommerziell erhältlichen Helferphagen VCSM13 von Invitrogen, in entsprechenden Mengen zur Verfügung zu stellen. Zunächst wurde eine 8 ml Bakterienkultur des *E.coli* Stammes XL1 blue MRF' in LB-Medium (supplementiert mit 10 mg/l Tetrazyklin) mit 10¹² pfu/ml Helferphagen infiziert. Die Selektion auf Tetrazyklin diente der Anreicherung der episomtragenden Bakterien, was wiederum für den Infektionsvorgang durch die Phagen von entscheidender Bedeutung ist. Die Bakterien-Phagen-Suspension wurde für 2 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert, anschließend mit LB-Medium (supplementiert mit 10 mg/l Tetrazyklin, 70 mg/l Kanamycin) auf 500 ml aufgefüllt und bei 37°C über Nacht erneut inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz bei 65°C für 15 Minuten hitzeinaktiviert (Abtöten der Bakterien), zentrifugiert (3500 rpm, 15 min, 4°C) und der gewonnene Überstand über einen Falte-Filter (Whatman, Schleicher & Schuell) filtriert. Anschließend wurde der Phagentiter durch Herstellung verschiedener Phagen-Verdünnungen folgendermaßen bestimmt. 300 µl Bakterien XL1 blue MRF' wurden mit 1 µl der entsprechenden Phagen-Verdünnung infiziert und mit 100 µl 1M MgSO₄ sowie 100 µl 20 %iger Maltose zur Unterstützung der Phageninfektion supplementiert. Der Ansatz wurde bei 37°C für 30 Minuten schüttelnd inkubiert und mit 10 ml Top-Agarose versetzt. Vorgewärmte Agarplatten wurden daraufhin mit dem Agaroseansatz überschichtet und bei 37°C über Nacht inkubiert. Durch Auszählen der entstandenen Plaques wurde dann die Konzentration der Phagen (pfu/ml) ermittelt.

Einbringen der Antikörperbibliothek in die Phagen

Die Antikörperbibliothek wurde in Form von Glycerinstammkulturen (10⁹ Bakterien/ml) in 50 ml 2-fach YT-Medium (supplementiert mit 1 % Glukose, 10 mg/l Tetrazyklin, 25 mg/l Chloramphenicol) aufgenommen und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde mit dem gleichen Wachstumsmedium auf 100 ml aufgefüllt und 4-5 Stunden bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe des Helferphagen VCSM13 in einer Konzentration

10^{11} - 10^{12} pfu/ml. Weiterhin wurde der Kultur 1 mM IPTG zugesetzt und diese zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine optimale Infektion zu gewährleisten. Nach weiteren 3-4 Stunden wurde die Kultur mit 30 mg/l Kanamycin supplementiert und bei 30°C über Nacht (maximal 14 h) schüttelnd inkubiert.

Fällung der Phagen. Zur Gewinnung der Phagenpartikel, wurde am nächsten Tag die Übernachtskultur zentrifugiert (4500 rpm, 15 min, 4°C) und dem Überstand 1/5 Volumen einer PEG/NaCl-Lösung (20 % PEG; 15 % NaCl) zugegeben. Der Ansatz wurde für 3-4 Stunden auf Eis belassen und anschließend erneut zentrifugiert (5000 rpm, 20 min, 4°C), um die Phagen zu präzipitieren. Das Phagenpellet wurde dann in PBS gelöst und bei 4°C für nachfolgende Experimente aufbewahrt.

Titration der Phagen. Für die folgende Affinitätsselektion musste die Konzentration der Phagen ermittelt werden. Dazu wurde eine Bakterienkultur (200 µl) mit 1 µl der in PBS aufgenommenen Phagen für 30 Minuten bei 37°C infiziert und anschließend verschiedene Verdünnungsstufen dieser Kultur auf 2-fach YT-Agarplatten (supplementiert mit 10 mg/l Tetrazyklin, 25 mg/l Chloramphenicol) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Durch Auszählen der gewachsenen Plaques konnte die Anzahl der Phagen bestimmt werden.

Affinitätsselektion (Panning): Anreicherung spezifisch bindender Phagen

Eine 96 well Mikrotiterplatte (Nunc) wurde wahlweise mit synthetischen Peptiden (5 µg/well; Invitrogen) oder dem vollständigen HCV Strukturprotein Core des Genotyps 1b (1 µg/well; Mikrogen) bei 4°C über Nacht beschichtet. Die zum Panning ausgewählten Peptide wurden durch Literaturrecherche ermittelt. Es wurden zwei Regionen im HCV Core Protein ausgewählt, die für die Bindung von Core an die Proteine JAK (RAWAQPWPLYGN) und STAT3 (MGWAGWLLSPRGRPSWGPTDPR) verantwortlich gemacht werden (Abbildung 2.2).

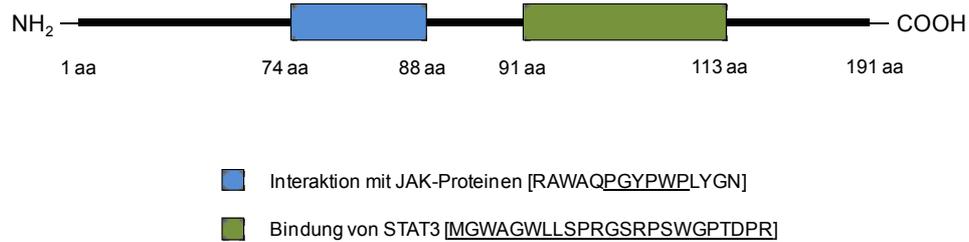


Abbildung 2.2: **Ausgewählte Peptide des HCV Core Proteins für die Affinitätsselektion.** Das HCV Core Peptid, das die Interaktionsdomäne mit JAK-Proteinen bildet (blau), ist 15 Aminosäuren groß und wurde basierend auf der Veröffentlichung Hosui A. *et al.* ^[1] ausgewählt. Es reicht von Aminosäure 74 bis zur Aminosäure 88 innerhalb des HCV Core Proteins. Das Peptid, das innerhalb des Core Proteins an Aminosäureposition 91 bis 113 liegt (grün), ist laut Literatur ^[3] für die Bindung von STAT3 verantwortlich. Die unterstrichenen Bereiche, der in Klammern eingefügten Proteinsequenz, kennzeichnen die Interaktionsdomänen von HCV Core mit diesen Proteinen.

Durch den Einsatz der Peptide konnte die Durchführung des aufwendigen Epitop-Mappings mit Hilfe des Ph.D.-7-Library Kits (New England Biolabs) umgangen werden. Das Epitop-Mapping erfolgte nur bei dem Antikörper Sc42 der gegen das vollständige HCV Core Protein selektioniert wurde. Diese Methode wurde von Frau M. Dalemann im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. Die Peptide wiesen mindestens zehn Aminosäuren auf, um zu gewährleisten, dass ein vollständiges Epitop präsentiert werden kann. Es erfolgte ein Abgleich der identifizierten Peptide mit der NCBI-Datenbank, um Homologien mit anderen Organismen auszuschließen. Die Peptide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert und im höchsten Reinheitsgrad geliefert, um falsch positive Bindungsreaktionen zu vermeiden. Die lyophilisierten Peptide wurden entsprechend der Angaben des Herstellers verdünnt.

Nach der Beschichtung der Platte erfolgten intensive Waschriffe 5-mal mit PBS. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Zugabe von 3 % BSA/PBS-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde die Platte erneut mit PBS gewaschen, 10^{11} - 10^{12} pfu/ml der zuvor isolierten Phagen zugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Daran schlossen sich 15 Waschriffe mit PBS (supplementiert mit 0,1% Tween) an. Die Elution der gebundenen Phagen erfolgte unter sauren Bedingungen mittels 50 µl Elutionspuffer (0,1 M Glycerin H₂O/HCl, pH 2,2) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Eluat in ein Reaktionsgefäß überführt, sofort mit 12 µl 1M Tris pH 7,0 neutralisiert und bei 4°C gelagert.

Reamplifizierung: Infektion von *E. coli* und Titration der Phagen

Die Reamplifizierung der Phagen erfolgte durch Zugabe von 50 µl Eluat aus dem Panning in eine 2 ml Bakterienkultur XL1 blue MRF'. Diese Kultur wurde dann für 30 Minuten bei 37°C belassen (Infektion der Bakterien durch die Phagen) und anschließend für weitere 30 min bei

37°C schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 8 ml 2-fach YT-Medium (supplementiert mit 1 % Glukose, 10 mg/l Tetrazyklin, 25 mg/l Chloramphenicol). Jeweils 1 µl und 10 µl des Ansatzes wurden, wie bereits beschrieben, zur Bestimmung der Phagenkonzentration auf Agarplatten titriert. Danach konnte die Durchführung einer weiteren Panning-Runde erfolgen. Das heißt, die Bakterienkultur wurde angezogen, die Helferphagen zugegeben, anschließend mittels einer PEG/NaCl-Lösung präzipitiert und zur erneuten Affinitätsselektion eingesetzt. Um keine Phagen, die an die Oberfläche des Plastiks der Mikrotiterplatte binden, zu selektionieren, erfolgte ein Wechsel der Mikrotiterplatten (Costar) nach der 2. Panning-Runde.

Insgesamt wurden drei Panning-Runden durchgeführt. Die selektionierten Phagen wurden bei 4°C gelagert. Zur weiteren Analyse erfolgte die Infektion verschiedener *E. coli* Bakterienstämme (XL1 blue MRF', HB2151) sowie ihre anschließende Konservierung durch Anlegen von Glycerinstammkulturen (-80°C).

Anzucht der monoklonalen Phagen

Nach Abschluss der Affinitätsselektion wurde das Phagen-Eluat zur Amplifizierung der monoklonalen Phagen eingesetzt. Dazu wurden 10 µl der in PBS gelösten Phagen in 1 ml XL1 blue MRF' angeimpft. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurde 4 ml 2-fach YT-Medium (+ 10 mg/l Tetrazyklin, 25 mg/l Chloramphenicol) zugegeben. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde dann der Helferphage in einer Konzentration von 10¹¹-10¹² pfu/ml sowie 0,5 mM IPTG zugegeben. Die Kultur wurde daraufhin für weitere 3-4 Stunden bei 30°C inkubiert, mit Kanamycin (30 mg/l) supplementiert und über Nacht bei 30°C weiter schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz zentrifugiert (4500 rpm, 15 min, 4°C), die Phagen mittels PEG/NaCl-Lösung, wie bereits beschrieben, präzipitiert und das Pellet in 100 µl PBS aufgenommen. Die Konzentration der Phagen wurde über Titrierung bestimmt und diese anschließend bei 4°C gelagert.

Zunächst sollte die Bindungsaffinität der monoklonalen Phagen direkt mit Hilfe eines Phagen-ELISAs überprüft werden. Allerdings gestaltete sich die Optimierung dieses ELISAs aufgrund des Auftretens unspezifischer Binder bzw. falsch positiver Phagen als sehr schwierig. Demzufolge wurde das Format der Phagen-tragenden Antikörper zugunsten der löslichen Expression der Antikörperfragmente verlassen.

Gewinnung löslicher Antikörperfragmente: Isolierung rekombinanter scFv-Proteine aus dem Periplasma

Die Gewinnung löslicher Antikörperfragmente erfolgte über das Einbringen der Phagen in den *nonsuppressor* Bakterienstamm HB2151. Dieser Bakterienstamm ermöglichte zum einen durch das Tragen eines Amber-Stoppkodons die periplasmatische Expression der

scFvs und zum anderen durch den Besitz eines F-Pilus die direkte Infektion mit den monoklonalen Phagen. Ohne den F-Pilus wäre es notwendig gewesen, die DNA aus den Phagen zu isolieren und anschließend durch Transformation in das Bakterium einzubringen. 200 µl der Bakterien HB2151 wurden mit 10-50 µl der Phagensuspension für 30 Minuten bei 37°C infiziert, auf Agarplatten (supplementiert mit 25 mg/l Chloramphenicol) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien (Monoklonale) gepickt und in 2 ml 2-fach YT-Medium (+ 0,1 % Glukose, 25 mg/l Chloramphenicol) überführt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde 1 mM IPTG zugegeben und bei 30°C über Nacht inkubiert. Nach 18 Stunden wurde die Kultur zentrifugiert (4000 rpm, 5 min, 4°C) und wahlweise mit dem Überstand oder mit dem Bakterienpellet weitergearbeitet.

Isolierung der scFvs aus dem Periplasma. Die Bakterienpellets wurden in 100 µl Spheroblast-Puffer (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 0,5 M Saccharose) aufgenommen und unter weiterer Zugabe von Lysozym (10 g/l) und 1/3 Volumen 1:2 verdünnten Spheroblast-Puffer resuspendiert ^[137]. Der Ansatz wurde daraufhin für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (10000 rpm, 15 min, 4°C). Der gewonnene Überstand wurde entweder im Dot Blot und Western Blot oder im ELISA zur Überprüfung der Bindungsaffinität gegenüber dem HCV Core Protein bzw. den Peptiden eingesetzt.

Untersuchung der Bindungsaffinität isolierter Antikörperfragmente

Die Bindungsaffinität der isolierten Antikörperfragmente wurde sowohl im Dot Blot (nativ) bzw. Western Blot (denaturierend) als auch im ELISA-Format überprüft.

ELISA. Eine 96 well Mikrotiterplatte (Costar) wurde wahlweise mit den Core Peptiden (25 µg/well) gerichtet gegen das JAK- und STAT3-Motiv bzw. mit dem rekombinanten HCV Core Protein (1 µg/well) bei 4°C über Nacht beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 3 %iger BSA-Lösung oder 2 %iger Magermilch-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Nach kurzem Waschen mit PBS wurde der Platte wahlweise der Überstand (90 µl Überstand mit 10 µl 10-fach PBS versetzt) oder 100 µl des periplasmatischen Extraktes der monoklonalen scFvs zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten mehrere Waschschritte (5-mal mit PBS, 0,05 % Tween) und anschließend die Inkubation mit dem Antikörper anti-Flag M1 (Sigma) 1:400 für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Bei der Verwendung des anti-Flag M1-Antikörpers musste beachtet werden, dass die weitere Durchführung des ELISAs unter Zugabe von CaCl₂ erfolgt, um die Bindung dieses Antikörpers an das Flag-Epitop aufrecht zu erhalten. Nach 6-maligem Waschen mit PBS (+ 0,05 % Tween, 1 mM CaCl₂) erfolgte die Zugabe des HRP-gekoppelten anti-Maus-Antikörpers 1:5000 für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der

ELISA erneut gewaschen (6-mal mit PBS, 0,05 % Tween, 1 mM CaCl₂) und es erfolgte die Zugabe des HRP-Substrates ABTS nach Angaben des Herstellers. Die Inkubation wurde im Dunkeln durchgeführt und die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 495 nm in einem ELISA-Platten-Reader nach 20 und 60 Minuten.

Dot Blot. Für den Dot Blot wurden 5 µl des Überstands oder des periplasmatischen Extraktes der monoklonalen scFvs auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman) pipettiert. Nach Trocknen der Membran wurde diese mit Blockierungsreagenz (3 % BSA-TBS-T) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (anti-Flag M1 + 1 mM CaCl₂) zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T (+ 1 mM CaCl₂) wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x; TBS-T + 1 mM CaCl₂) konnten die Signale durch Zugabe von WL Chemiluminescence Reagent Plus mit Hilfe von ECL-Filmen (GE Healthcare) detektiert werden.

Western Blot. Für den Western Blot wurde wahlweise 50 µg Zelllysat der Zelllinie Huh7 Core-NS3 oder rekombinantes HCV Core Protein (10 µg) mit 4-fach SDS-Auftragspuffer nach Lämmli versetzt, bei 98°C für 5 Minuten denaturiert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Um eine Aussage über die Bindung der scFvs unter denaturierenden Bedingungen zu erhalten, wurde als Primärantikörper hier entweder der Überstand der Bakterienkultur oder der periplasmatische Extrakt der isolierten Antikörperfragmente eingesetzt.

Sequenzierung, Sequenzalignment und Klassifizierung isolierter Antikörperfragmente

Die isolierten Einzelkettenantikörperfragmente wurden durch Sequenzierung (MWG) überprüft. Das Alignment der Nukleotidsequenzen erfolgte mit der Software V-base DNA Plot (www.mrc-cpe.cam.ac.uk) und BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>). Das multiple Proteinsequenzalignment wurde mit dem Programm ClustalX (<http://www.clustal.org>) erstellt. Die Bestimmung der Immunglobuline und deren Klassifizierung erfolgte nach Kabat *et al.* ^[4] mit Hilfe der NCBI-IgBlast-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) und des Programms V-Base (<http://www.vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>).

2.2.6 Statistische Auswertung

Die densitometrische Auswertung der aus den Western Blots erhaltenen Proteinbanden wurde mit Hilfe der Molecular Imaging Software (Version 4.0.3) der Firma Kodak durchgeführt. Der Quotient der Kontrolle wurde dem Wert 1 gleichgesetzt und der zweite Wert wurde relativ zur Kontrolle angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde der t-Test (zweiseitig; unter Normalverteilung) nach STUDENT herangezogen. Die Ergebnisse wurden als signifikant eingestuft bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % ($p < 0,05$).

3 ERGEBNISSE

3.1 Generierung und Charakterisierung humaner Hepatitis C Virus (HCV) -spezifischer Antikörperfragmente

Der Mangel an präventiver Immunisierung und effektiven antiviralen Therapiestrategien zur Bekämpfung einer Hepatitis C Infektion, führte zur Überlegung, humane intrazelluläre Antikörperfragmente gegen das hochkonservierte Strukturprotein Core zu generieren und diese zu charakterisieren. Die rekombinanten Einzelkettenantikörperfragmente (scFv) bilden eine vollständig funktionelle Antigenbindungseinheit, bedingt durch die variablen Domänen der schweren und leichten Kette, welche über einen Polypeptid-Linker verbunden sind. Solche Antikörperfragmente könnten das Potenzial besitzen, über eine Sequestrierung des HCV Core Proteins eine inhibitorische Wirkung auf das Hepatitis C Virus zu erreichen.

Mit Hilfe der Phage-Display-Technologie wurden zahlreiche humane Antikörperfragmente gegen Core isoliert, detailliert analysiert und auf ihre inhibitorische Funktion hin in verschiedenen Modellsystemen überprüft.

3.1.1 Affinitätsselektion (Panning) gegen HCV Core Peptide

Die Affinitätsselektion wurde mit einer kombinatorischen Antikörperbibliothek der Größe 4×10^6 , welche aus Knochenmarksaspiraten von fünf chronisch HCV-infizierten Patienten kloniert wurde, durchgeführt. Alle Patienten wiesen eine HCV Infektion des Genotyps 1 oder des Genotyps 3 auf. Ziel des Panning-Verfahrens war die Anreicherung von filamentösen Phagen, die auf ihrer Oberfläche Einzelkettenantikörperfragmente präsentieren, die gegen die Peptide Jak und Stat des HCV Core Proteins gerichtet sind. Die zum Panning ausgewählten Peptide entsprechen zwei Regionen des HCV Core Proteins, die für die Bindung von Core an die Proteine JAK (Jak-Peptid) ^[1] und STAT3 (Stat-Peptid) ^[3] verantwortlich gemacht werden.

Durch den Einsatz der Peptide wurde die Durchführung des aufwendigen Epitop-Mappings umgangen. Insgesamt konnten in drei Panning-Runden bindende Phagen selektiv angereichert (Abbildung 3.1) und ihre Titer durch Titration bestimmt werden (Tabelle 3.1). Vor jeder Affinitätsselektion wurde die Phagenpopulation durch Amplifikation angereichert, um mindestens 1×10^9 pfu/ml Phagen zur Erhöhung der Ausbeute einsetzen zu können.

Tabelle 3.1: **Anreicherung der selektionierten scFv Phagen gegen das Jak- und Stat-Peptid des HCV Core Proteins.** Bestimmung der Phagentiter (pfu/ml) vor und nach den durchgeführten Panning-Runden.

Affinitätsselektion	Phagentiter vor der Affinitätsselektion		Phagentiter nach der Affinitätsselektion	
	Jak-Peptid	Stat-Peptid	Jak-Peptid	Stat-Peptid
1	1×10^{12}	1×10^{12}	$2,5 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$
2	$3,7 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	6×10^3	2×10^3
3	$4,5 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	8×10^4	$1,5 \times 10^4$

Die Erhöhung der Anzahl der Panning-Runden führte zwar zur Selektion von weitaus affineren Antikörperfragmenten, ging allerdings mit einer Abnahme der Diversität der isolierten scFvs einher, so dass die Durchführung von drei Panning-Runden bevorzugt wurde.

Durch die Bestimmung der Titer der eluierten Phagen konnte eine stetige Anreicherung der bindenden Phagen gegenüber den Peptiden Jak und Stat des HCV Core Proteins erreicht werden (Abbildung 3.1).

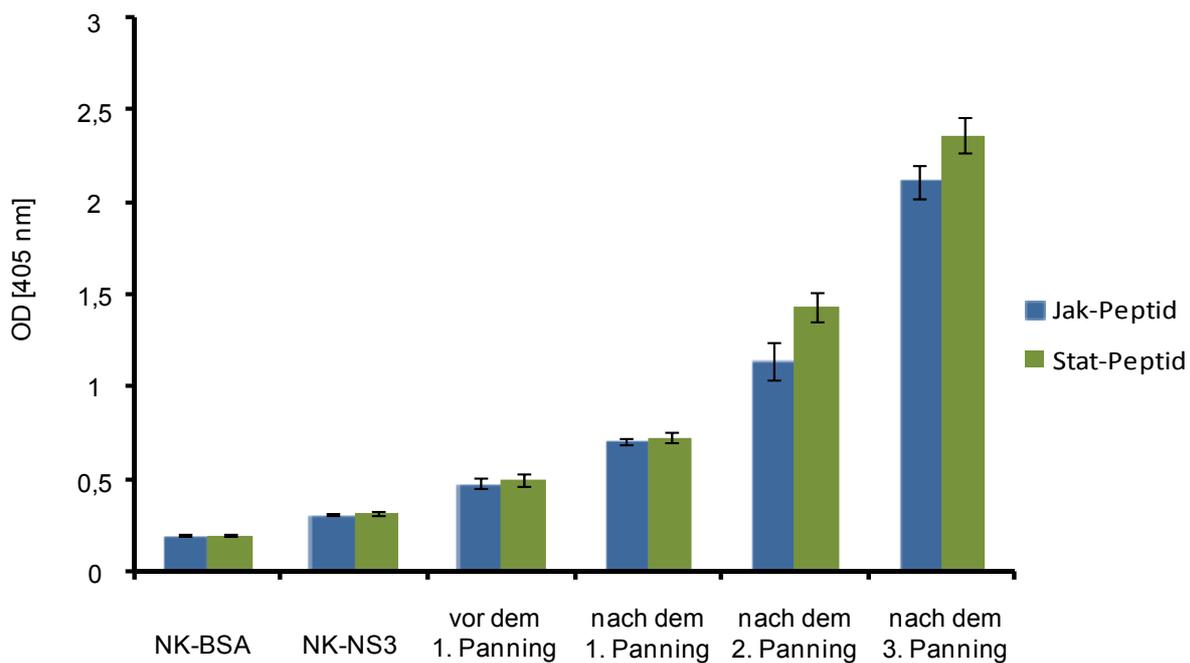


Abbildung 3.1: **Affinitätsselektion der Phagenpopulation, die spezifisch an das Jak- und Stat-Peptid des HCV Core Proteins binden.** Darstellung der Anreicherung der bindenden Phagen nach drei Selektionsrunden. Die Bindungsaffinität wurde im ELISA-Format bestimmt. Eine 96 well Platte wurde mit 5 µg/well Antigen (Jak/Stat-Peptid) beschichtet und mit der Phagenpopulation inkubiert. Nach intensiven Waschschrinen erfolgte der Nachweis der Phagenbindung mittels eines Phagen-spezifischen M13-Antikörpers (1:5000), der HRP-konjugiert eingesetzt wurde. Die Reaktion wurde nach Zugabe des Substrates ABTS bei einer OD von 405 nm im ELISA-Platten Reader gemessen. NK-BSA: Negativkontrolle = Beschichtung mit 3 % BSA; NK-NS3: Negativkontrolle = Beschichtung mit 1 µg/well rekombinanten HCV NS3

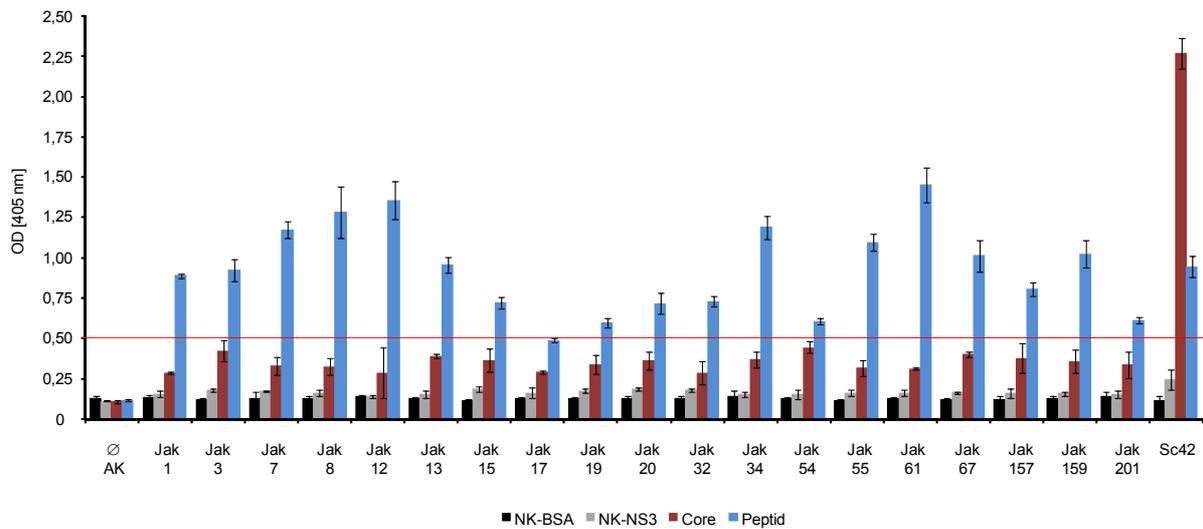
Nach der dritten Selektionsrunde wurden die selektionierten Phagen in den Bakterienstamm *E. coli* XL1 blue MRF' durch Infektion eingebracht und auf Agarplatten zur Gewinnung monoklonaler Phagen ausgestrichen. Pro Peptid wurden dann von den Platten stichprobenartig 50 Klone gepickt und mittels SfiI-Restriktionsverdau auf die Vollständigkeit der klonierten Genkassette der rekombinanten Antikörperfragmente hin überprüft.

3.1.2 Identifizierung und Klassifizierung hochaffiner humaner Antikörperfragmente gegen Peptide von HCV Core

Falls die Vollständigkeit der klonierten cDNA-Kassette der isolierten Antikörperfragmente bestätigt werden konnte, erfolgte die Untersuchung der Bindungsaffinität der monoklonalen Phagen. Dazu wurde zunächst ein ELISA-Format gewählt, in dem der Nachweis der Bindungsaffinität der einzelnen Antikörperfragmente über die Bindung der Phagen mit Hilfe des Phagen-spezifischen M13-Antikörpers nachgewiesen werden sollte. Die Optimierung

dieses ELISAs gestaltete sich jedoch aufgrund des Auftretens unspezifisch bindender bzw. falsch positiver Phagen als sehr schwierig. Daraufhin wurde das Format der Phagen-tragenden Antikörper zugunsten der löslichen Expression der Antikörperfragmente verlassen. Es wurden sowohl die löslichen scFvs im Kulturüberstand überprüft als auch die scFvs aus dem Periplasma der Bakterien, die mit Hilfe der Anwendung eines milden osmotischen Schocks ^[137] isoliert wurden, auf ihre Bindungsaffinität bezüglich der Jak- und Stat-Peptide des Core Proteins untersucht (Abbildung 3.2). Die Abbildung 3.2 zeigt eine Auswahl der untersuchten Einzelkettenantikörperfragmente, die aus dem Periplasma der Bakterien gewonnen wurden. Die Untersuchung der Stärke der Bindung der akkumulierten Antikörperfragmente in Kulturüberständen wurde ebenfalls im ELISA-Format durchgeführt und diente hauptsächlich der Verifizierung der ELISA-Ergebnisse der Abbildung 3.2. Mit dem Primärantikörper Flag M1, der den C-terminalen Flag-Tag der scFvs nachweist, konnte die Bindung der humanen Antikörperfragmente an die synthetischen Peptide Jak und Stat nachgewiesen werden. Um eventuelle Kreuzreaktionen der Antikörperfragmente auszuschließen, wurden Negativkontrollen mit 3 % BSA und dem HCV Protein NS3 durchgeführt. Insgesamt wurden pro Peptid 300 monoklonale Phagen bzw. lösliche Antikörper isoliert und analysiert.

A



B

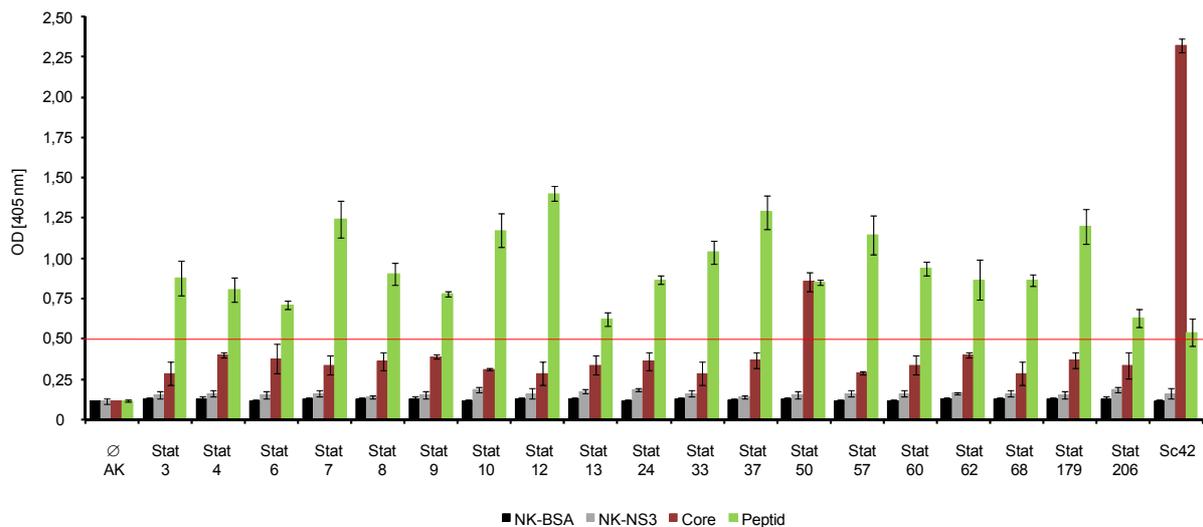


Abbildung 3.2: **Untersuchung der Bindungsaffinität der selektionierten Antikörperfragmente mittels ELISA.** **A)** Selektionierte Antikörperfragmente gegen das Jak-Peptid **B)** Selektionierte Antikörperfragmente gegen das Stat-Peptid. Die Bindungsaffinität wurde im ELISA-Format bestimmt. Eine 96 well Platte wurde mit 5 µg/well Antigen (Jak/Stat-Peptid) beschichtet, die unspezifischen Bindungsstellen mit 3 % BSA abgesättigt und mit den aus dem Periplasma isolierten scFvs inkubiert. Nach intensiven Waschschritten erfolgte der Nachweis der Bindung der löslichen scFvs mittels des Flag M1-Antikörpers und eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers. Die Visualisierung der Reaktion wurde nach Zugabe des Substrates ABTS bei einer OD von 405 nm im ELISA-Platten Reader gemessen. Ø AK: Negativkontrolle = kein Primärantikörper; NK-BSA: Negativkontrolle = Beschichtung mit 3 % BSA; NK-NS3: Negativkontrolle = Beschichtung mit 1 µg/well rekombinanten HCV NS3; Core: Beschichtung mit 1 µg/well rekombinanten HCV Core; Peptid: Beschichtung mit 5 µg/well Peptid; rote Linie: Festlegung der Grenze von OD > 0,5 = positiv bindende scFvs

Die Antikörperfragmente, deren Bindungsaffinität sich im ELISA durch eine Extinktion von über 0,5 auszeichnete, wurden zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Dabei wiesen die Antikörper Jak 7, 8, 12, 34 und 61 eine sehr gute Bindung an das Jak-Peptid, wohingegen sie nur eine geringe Affinität zum vollständigen HCV Core Protein aufwiesen. Auch die Antikörperfragmente Stat 7, 10, 12, 37, 57 und 179 führten zu einem starken Signal im ELISA, jedoch konnte bei beinahe allen Antikörperfragmenten nur eine sehr geringe Affinität bezüglich des vollständigen Core Proteins demonstriert werden. Lediglich der scFv Stat 50 wies eine ebenso starke Bindung an das Core Protein wie an das Peptid auf. Verglichen mit der Bindungsaffinität des Sc42, welcher gegen das gesamte HCV Core Protein selektioniert wurde, wiesen jedoch beinahe alle peptidbasierten Antikörperfragmente eine weitaus geringere Affinität gegenüber ihrem Zielantigen auf. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass der Sc42 im Vergleich zu dem Stat-Peptid eine höhere Reaktivität gegenüber dem Jak-Peptid (Abbildung 3.2) besaß.

Die im ELISA positiv getesteten humanen Jak/Stat-Antikörperfragmente wurden auf ihre Vollständigkeit bzw. strukturelle Integrität untersucht. Zur Optimierung ihrer löslichen Expression wurden zuvor IPTG-Konzentrationen von 0,1 bis 1 mM getestet. Die Untersuchungen ergaben, dass die scFvs überwiegend bei einer IPTG-Konzentration von 1 mM optimal exprimiert werden. Diese Konzentration wurde daraufhin standardisiert zur Induktion der Proteinexpression eingesetzt.

Die Antikörperfragmente wurden durch periplasmatische Extraktion aus den Bakterien isoliert und mittels Immundetektion über ihren integrierten Flag-Tag nachgewiesen. Die Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch die periplasmatischen Extrakte isolierter Jak/Stat-Antikörperfragmente mit und ohne Induktion der Proteinexpression durch IPTG.

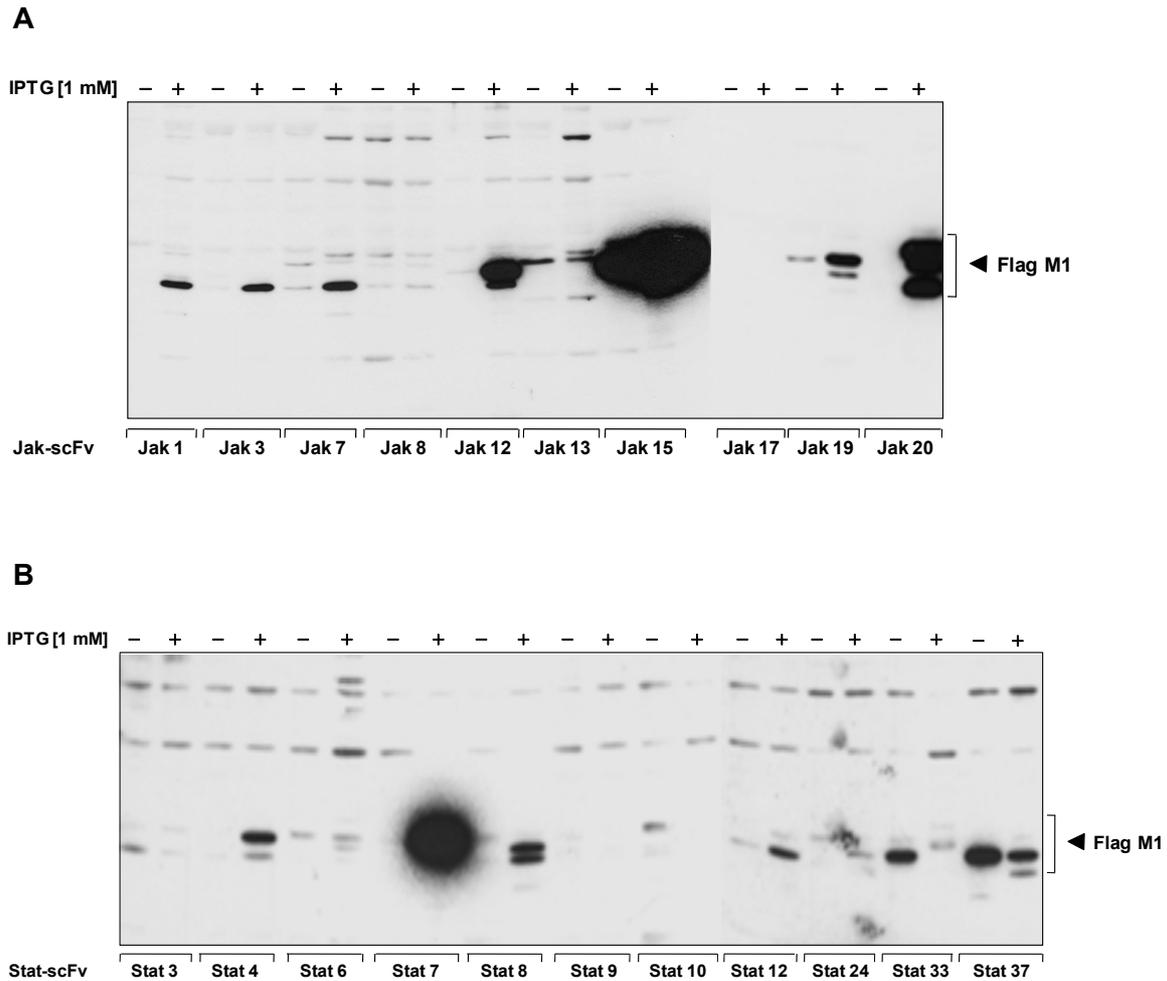


Abbildung 3.3: **Western Blot Analysen der aus dem Periplasma isolierten Antikörperfragmente.** **A)** Selektionierte Antikörperfragmente gegen das Jak-Peptid **B)** Selektionierte Antikörperfragmente gegen das Stat-Peptid. 1/8 des Volumens der periplasmatischen Extrakte wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit 3 % BSA-Lösung blockiert. Der Nachweis der isolierten Antikörperfragmente erfolgte mittels des Flag M1-Antikörpers sowie eines HRP-konjugierten Maus-Antikörpers.

Da sich die rekombinanten Antikörperfragmente aus den variablen Domänen der leichten und schweren Ketten zusammensetzen, sollten vollständig exprimierte Antikörperfragmente eine Größe von 32 kDa aufweisen. Die Western Blot Analysen ergaben überwiegend eine prominente Bande bei 32 kDa, die unter Zugabe von IPTG induziert bzw. verstärkt wurde. Bei 12 % der im ELISA positiv getesteten Antikörperfragmente konnte die richtige Größe nicht nachgewiesen werden. Auffällig waren zusätzliche Banden bei etwa 60 und 90 kDa, die vermutlich auf eine Multimerisierung der scFvs zurückzuführen sind. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass unterhalb der 32 kDa Bande weitere Proteine mit dem Flag-Tag detektiert wurden, die allerdings bei der erneuten Detektion des c-myc-Tags, welcher im

N-terminalen Bereich der scFvs liegt, nicht visualisiert werden konnten. Vermutlich handelte es sich um proteolytische Abbauprodukte der isolierten Antikörperfragmente.

Um die Bindungseigenschaften der isolierten Jak/Stat-Antikörperfragmente genauer zu charakterisieren, wurden die scFvs im Immunoblot als primäre Detektionsantikörper eingesetzt. Diese Methode sollte Erkenntnisse darüber liefern, ob die scFvs an denaturiertes HCV Core Protein binden und dementsprechend lineare Epitope im Core Protein erkennen. Für die Immunoblotanalysen wurden sowohl die jeweiligen Kulturüberstände als auch die periplasmatischen Extrakte der Antikörperfragmente als Primärantikörper zur Detektion von HCV Core-enthaltenden Zellextrakten der Hepatomazelllinie Huh7 Core-NS3, welche mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten hier Zellextrakte der Hepatomazelllinie Huh7. Die gebundenen Antikörper sollten dann über ihren Flag-Tag detektiert werden. Die Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch eine Auswahl der untersuchten Antikörperfragmente, die gegen die Peptide Jak und Stat selektioniert wurden.

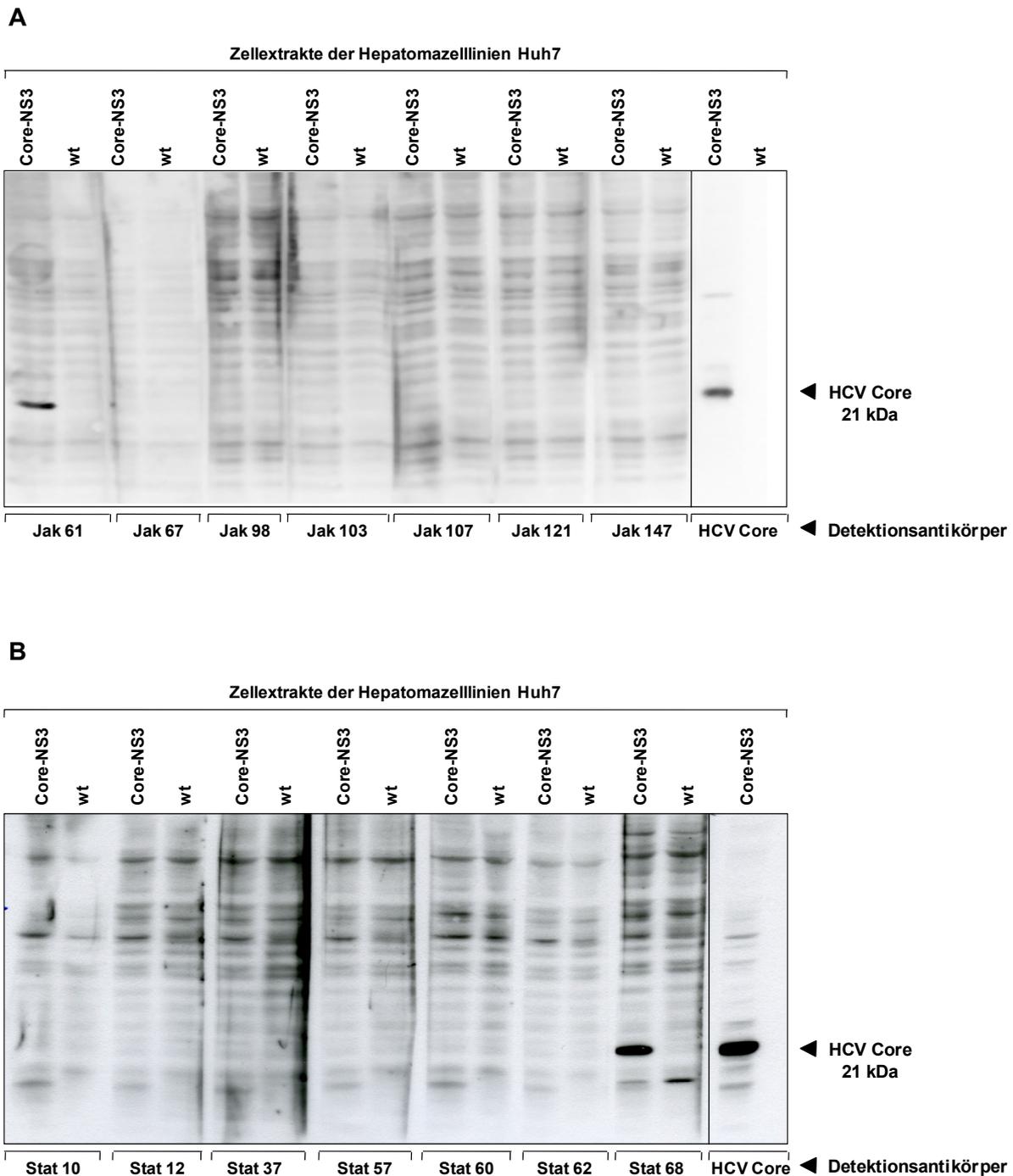


Abbildung 3.4: **Nachweis der Bindung der selektierten Jak/Stat-Antikörperfragmente an HCV Core.** **A)** Selektierte Antikörperfragmente gegen das Jak-Peptid **B)** Selektierte Antikörperfragmente gegen das Stat-Peptid. 50 µg der Zellextrakte der Hepatomazelllinien Huh7 wt und Huh7 Core-NS3 wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit 3 % BSA-Lösung blockiert. Als primärer Detektionsantikörper wurden die rekombinanten scFvs in Form periplasmatischer Extrakte eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen Antikörperfragmente erfolgte mittels des Flag M1-Antikörpers sowie einem HRP-konjugierten Maus-Antikörpers. Als Positivkontrolle wurde ein Teil der Membran mit dem C750-Antikörper für den Nachweis des HCV Core Proteins inkubiert.

Durch den Einsatz der isolierten Antikörperfragmente als primäre Detektionsantikörper sollte das HCV Core Protein mit einer Größe von 21 kDa nachgewiesen werden. Überraschenderweise konnte nur bei einem geringen Anteil der scFvs eine Bindung an das denaturierte Core Protein beobachtet werden. Eine spezifische Bindung wurde bei 6 % (17/300) der Jak- und bei 3 % (9/300) der Stat-Antikörperfragmente nachgewiesen. Insgesamt konnte bei 4 % der selektionierten Einzelkettenantikörperfragmente eine Bindung an die linearen Jak- und Stat-Epitope innerhalb des denaturierten HCV Core Proteins nachgewiesen werden.

Die positiv selektionierten Jak/Stat-Antikörperfragmente, welche zum einen eine starke Bindung im ELISA und Western Blot und zum anderen das richtige Molekulargewicht von 32 kDa aufwiesen, wurden zur Sequenzierung ausgewählt. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden in die entsprechenden Aminosäuresequenzen übersetzt und ein Alignment mit Hilfe der Software BioEdit erstellt. In der Abbildung 3.5 und 3.6 wurde von den selektionierten scFvs ein Alignment erstellt, die für weitere Untersuchungen, wie z. B. fluoreszenzbasierte Kollokalisationsstudien, ausgewählt wurden. Die Aminosäuresequenzen wurden mit den bekannten humanen leichten und schweren Ketten der Immunglobuline verschiedener Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) verglichen und analysiert.

-----Leichte Kette-----			
Antikörper: scFv	-----FR1-----	-----CDR1-----	-----FR2-----
Jak 1/61	DIQMTQSPGTTLSLSPGERATLSC	RASQS--VS-G-NYLT	WYQQKPGQAPRLLLF
Jak 3/7/8/17	EIVLTQSPPLSLPVTPEPASISCS	RSSQSLLSNGDNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY
Jak 12	EIVLTQSPVTTLSLSPGERATLSC	RASQ-----GISSFLA	WYQQKPGQAPRLLIY
Jak 13/67	DVVMTQYPLSLPVTGLQPASISCS	RSSQRLETCHGNIWFN	WFQQRPQGCTGRLIY
Jak 15/34/55	ETTLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQS--V---SSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY
Jak 19	EITITQSPPLTSLVSPGETASISCS	RSSQS--V---RALH	-----
Jak 20	DIILMTQSPVSLSLSPGERATLSC	RASQS--VS-G-NYVT	CYQHRHGQTPRLLLY
Jak 32	ETTLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQS--V---SSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY
-----Leichte Kette-----			
Antikörper: scFv	--CDR2--	-----FR3-----	--CDR3--
Jak 1/61	NAFK-RAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDAAMYIC	QQYSRSPPP
Jak 3/7/8/17	LGSN-RAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQALQTP--
Jak 12	DASI-RAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC	QQ-----
Jak 13/67	KVSN-RDP	GVPDRFSGSGSGTNFTPKISRIEAEDVGVYYG	MQSVYWP--
Jak 15/34/55	DASN-RAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC	QQRSNWPLA
Jak 19	-----	-----	-----
Jak 20	FIAFIMAS	GIPHRFTGRGSGTYITLTINTQDPENAALYYC	HQYSRSPPP
Jak 32	DASN-RAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC	QQRSNWPLA
-----Leichte Kette-----			
Antikörper: scFv	-----FR4-----	-----LINKER-----	
Jak 1/61	WTFGGGTKVEIKR	GGGGSGGGSGGGSSGGGS	
Jak 3/7/8/17	RTLGGGTKVEIKR	GGGGSGGGSGGGSSGGGS	
Jak 12	RAFGGGTKVDIKR	GGGGSGGGSGDGGSSGGGS	
Jak 13/67	LTFGGGKPEIQG	GGGGFGGGSGGGSSGGGS	
Jak 15/34/55	LTFGGGTRLEIKR	GGGGFGGGSGGGSSGGGS	
Jak 19	-----	-----	
Jak 20	WTFGGGTKVEIKR	GGGGSGGGSGGGSSGGGS	
Jak 32	LTFGGGTRLEIKR	GGGGFGGGSGGGSSGGGS	

-----Schwere Kette-----			
Antikörper: scFv	-----FR1-----	-CDR1--	----FR2-----
Jak 1/61	EVQLVESGPRLVLPSETLSLTCTVSGGSIS	QNY--WN	WIRQPAG-KGLEWIG
Jak 3/7/8/17	QVQLQESGVRGHRLETRHRLTEHTGLWGTE	WGT--W-	-LTGHTGSQGTQTRG
Jak 12	QVQLQESGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS	NYAIS--	WVRQASG-QGLEWVG
Jak 13/67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASG--FS	FRKYAMT	WVHQAPGKLEWVSG
Jak 15/34/55	QVQLLESGLVQPGGSLRLSCEASG--FS	SRRYYWS	WIRQPPG-KGLEWIG
Jak 19	-----	-----	-----
Jak 20	EVQLVESGPRLVLPSETLSLTCTVSCGSVS	QNY--WN	WIRQPAG-KWTGVDW
Jak 32	QVQLQESGPRLVLPSETLSLTCTVSGGSIS	SRRYYWS	WIRRPQG-RAWGLD
-----Schwere Kette-----			
Antikörper: scFv	-----CDR2-----	-----FR3-----	
Jak 1/61	RIYSGRPNYNPSLKS-	RVTMSTDSQSQFYLTLSVTAADTAVYYCAR	
Jak 3/7/8/17	AHRLMGHTDSRGTEAH-	GAQSHGVHRLMGHRLTGHRVTGHTDSVWTGS-	
Jak 12	GIIPMFPTTNYAQKFKG	RVTFTADKSSNTAYTELTSLRSEDSAVYYCAR	
Jak 13/67	ISGNGGRTYYAESVKG-	RFTISRDNKNTLYLQMNFRVEDTAVYYCAK	
Jak 15/34/55	YIYSGSTFYNPSLKS-	RVTISLDTPKAQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	
Jak 19	-----	-----	
Jak 20	AYLWDWNA-----	-----	
Jak 32	TSITVGAFFTRPSGV-	ELPYH-TLPSPVLPAAALCDCRN-TAVYYCAR	
-----Schwere Kette-----			
Antikörper: scFv	-----CDR3-----	-----FR4-----	
Jak 1/61	DPVSGWNYFDH-----WG	QGTLVTVSSASGAE	
Jak 3/7/8/17	-----	QGTLVTVSSASGAE	
Jak 12	RPSDRDWESEYYYGL-DVWG	QGIPGHRLLGLGGR	
Jak 13/67	TSSAWVEAATPYNGL-DVWG	QGTLVTVSSASGAE	
Jak 15/34/55	ATAVLGYFDWPKTNTFDIWA	QGHGHRLLGLGGR	
Jak 19	-----	-----	
Jak 20	AYLWDWNA-----	-----	
Jak 32	-----	-----	

Abbildung 3.5: Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen Jak-Antikörperfragmente nach Kabat ^[4].

-----Leichte Kette-----			
Antikörper: scFv	-----FR1-----	-----CDR1-----	----FR2-----
Stat 3/4/7etc.	DIQMTQSPSLSPVTLGQPASISC	RSSQSLVYSDGNTYLN	WFQQRPGQSPRRLIY
Stat 10	DVVMTQSPSSLSASIGERTITC	RASQ-----DISSWLA	WYQQNPEKAPKSLIY
Stat 12/50	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RAS-----ENINNALA	WYQQRPGQAPRLVIS
Stat 37	QSVLTQPPSVSGAP-GQRVTISC	TGSSSNI--GAGYDVH	WYQQLPGAAPKLLIY
Stat 57	DVVMTQSPVTLSPGERATLSC	RASQGI-----SSFLA	WYQQKPGQAPRLIY
Stat 62	DIQMTQSPSLSPVTLGQPASISC	RSSQSLVYSDGNTYLN	WFQQRPGQSPRRLIY
Stat 206	NFMLTQPHSVSESP-GKTITISC	TRSSGSI---TSNFVH	WYQQCPGNSLTMIY
-----Leichte Kette-----			
Antikörper: scFv	--CDR2--	-----FR3-----	-----CDR3-----
Stat 3/4/7etc.	KVSNRDS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEA--EDVGVYYC	MQGTHPY---
Stat 10	GTSSLHS	GVPSRFSGGSGTDFTLTISSLQP--EDVGTYYC	QQYSSFPF--
Stat 12/50	DASNRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEP--EDSAVYYC	QQR-----
Stat 37	GNNRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQA--EDEADYYC	QSYDSSLGWS
Stat 57	DASIRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP--EDFAVYYC	QQR-----
Stat 62	KVSNRDS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEA--EDVGVYYC	MQGTHPY---
Stat 206	DHHRPS	GVPDRFSGSIDRSSNSASLTISGLKTEADYYC	SYDRGVM---

-Leichte Kette-		
Antikörper: scFv	-----FR4-----	-----LINKER-----
Stat 3/4/7etc.	TFGQGTKLEIKR	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Stat 10	TFGQGTKVDIKR	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Stat 12/50	AFGGGTKLEIKR	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Stat 37	VFGGGTKVTVLG	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Stat 57	AFGGGTKVDIKR	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Stat 62	TFGQGTKLEIKR	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Stat 206	VLGGGTQLTVLG	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
-----Schwere Kette-----		
Antikörper: scFv	-----FR1-----	-CDR1- -----FR2-----
Stat 3/4/7etc.	QVNLRESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLS	DYYWS WIRQPAGKGLEWIG
Stat 10	GVVDPRCSCRSREQRETLTSLTCTVSGGSIS	SYYS WIRQPAGKGLEWIG
Stat 12/50	QVSWCSLGLGVKKPGSSVKVSKASGGTFS	SYAIS WIRQPAGKGLEWIG
Stat 37	EVQLVESGAEVKPKGSSVKVSKASGGTFG	NYGIS WVRQAPQGLEWIMG
Stat 57	QVNLRESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLS	DYYWS WIRQPAGKGLEWIG
Stat 62	QVNLRESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLS	DYYWS WIRQPAGKGLEWIG
Stat 206	QVQLQESGPRLRVPSSETLSLTCTVSGGSIS	SYYS WIRQPAGKGLEWIG
-----Schwere Kette-----		
Antikörper: scFv	-----CDR2-----	-----FR3-----
Stat 3/4/7etc.	RVYNSGTTLSNPSLKS-	RLIMPIDMSRNRFSLQVTSLSLTAADTAVYYCAR
Stat 10	RIYSGRPNYNPSLKS-	RVTMSTDTSKSQFYLTLSVTAADTAVYYCAR
Stat 12/50	GIIPIFGTANYAQKFOG	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
Stat 37	GIIPLFGIADYAQKFOG	RVTITADKSTSTAYMDLSSLRSEDVAVYYCAR
Stat 57	RIYTSGSTNPNPSLKS-	RVTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
Stat 62	RVYNSGTTLSNPSLKS-	RLIMPIDMSRNRFSLQVTSLSLTAADTAVYYCAR
Stat 206	RIYSGRPNYNPSLKS-	RVTMSTDTSKSQFYLTLSVTAADTAVYYCAR
-----Schwere Kette-----		
Antikörper: scFv	-----CDR3-----	---FR4---
Stat 3/4/7etc.	ERTHPADGQF----DFWG	PGTLVTVSS
Stat 10	DPVSGWNY-F----DHWG	QGTTLVTVSS
Stat 12/50	-----GYSGSYYPDYWG	QGTTLVTVSS
Stat 37	ASIAPPGTLYYYGLDVWG	QGTTLVTVSS
Stat 57	AKLLQYPTYYYYGMDVWG	QGTTLVTVSS
Stat 62	ERTHPADGQF----DFWG	PGTLVTVSS
Stat 206	DPVSGWNY-F----DHWG	QGTTLVTVSS

Abbildung 3.6: Charakterisierung der Aminosäuresequenzen der humanen Stat-Antikörperfragmente nach Kabat^[4].

Einige Klone, die entweder nicht die richtige Größe von 32 kDa im Western Blot zeigten oder nicht zur Expression gebracht werden konnten, wurden teilweise zur Überprüfung der Vollständigkeit der Nukleotidsequenz analysiert. Die Sequenzierung ergab, dass oftmals nach dem Glycin-Serin-Linker eine Unterbrechung des Leserasters vorlag oder die Nukleotidsequenzen Basenvariationen aufwiesen, die ebenfalls zur Unterbrechung des Leserasters führten.

Die Diversität der selektierten Jak-Antikörperfragmente war deutlich höher, als die der Stat-Antikörperfragmente. Die typischen humanen V_H und V_L Merkmale konnten in allen analysierten scFv Sequenzen identifiziert werden. Wie zu erwarten, traten insbesondere in

den CDR-Regionen der Antikörper Längenpolymorphismen auf, da diese Bereiche für die Antigenbindung verantwortlich sind und damit den höchsten Variabilitätsgrad aufweisen sollten.

Die anschließende Einordnung der Sequenzen erfolgte nach Kabat ^[4], welche in den Tabellen 3.2 und 3.3 aufgeführt ist. Zur weiteren Charakterisierung wurden die einzelnen Klassen und Subgruppen der leichten und schweren Kette bestimmt. Weiterhin wurden die V- und J-Segmente der leichten Kette und die V-, D- und J-Segmente der schweren Kette, soweit dies durch bereits beschriebene Keimbahngene der Immunglobuline möglich war, durch Datenbankabgleich zugeordnet.

Tabelle 3.2: Einteilung der V_L und V_H der humanen Jak-scFv in Klassen, Subgruppen und Zuordnung der ursprünglichen Keimbahngene der einzelnen Segmente. Die Klassen- und Subgruppenbestimmung erfolgte nach Kabat ^[4].

Antikörper scFv	Leichte Kette				Schwere Kette			
	Klasse	Subgruppe	V-Segment	J-Segment	Subgruppe	V-Segment	D-Segment	J-Segment
Jak 1/61	κ	III	A27	JK1	VH4	VH4-4	D6-19	JH4b
Jak 3/7/8/17	κ	II	A19/A3	JK1	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Jak 12	κ	III	L6	JK4	VH1	VH1-69	D2-21	JH6
Jak 13/67	κ	II	A17	JK4	VH3	VH3-23	D2-15	JH5a
Jak 15/34/55	κ	III	L6	JK5	VH4	VH4-31	D3-9	JH3
Jak 19	κ	III	L6	JK5	VH4	VH4-55P	D2-8	JH3
Jak 20	κ	III	A27	JK1	VH4	VH4-4	D3-16	JH2
Jak 32	κ	III	L6	JK5	VH4	VH4-61	D3-9	JH3b
Jak 54	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Jak 159/201	λ	V	V4-1	JL3b	VH3	VH3-30	D1-26	JH2

N.D. = nicht bestimmbar; V_L : variable Region der leichten Kette; V_H : variable Region der schweren Kette

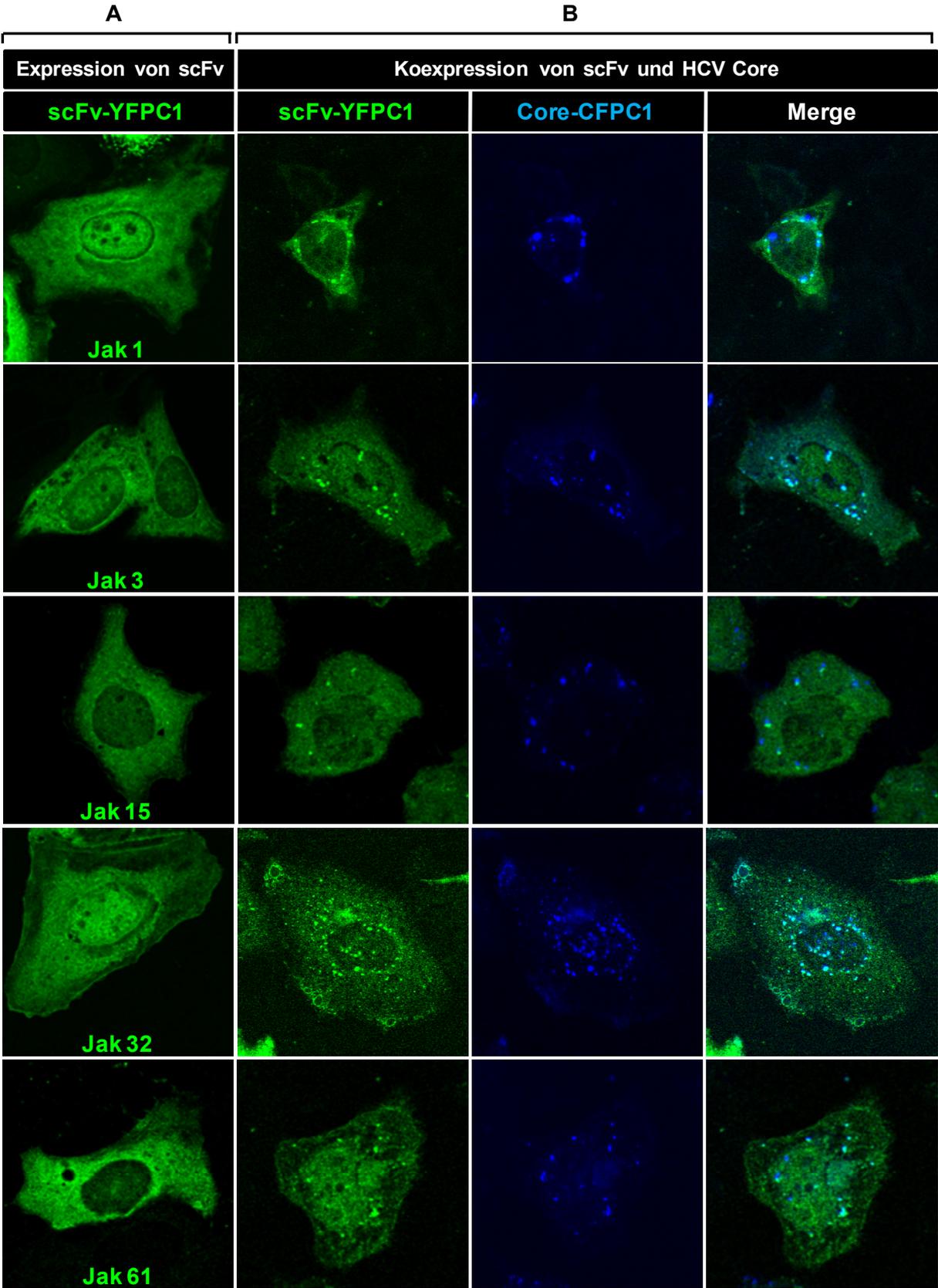
Tabelle 3.3: Einteilung der V_L und V_H der humanen Stat-scFv in Klassen, Subgruppen und Zuordnung der ursprünglichen Keimbahngene der einzelnen Segmente. Die Klassen- und Subgruppenbestimmung erfolgte nach Kabat ^[4].

Antikörper scFv	Leichte Kette				Schwere Kette			
	Klasse	Subgruppe	V-Segment	J-Segment	Subgruppe	V-Segment	D-Segment	J-Segment
Stat 3/4/6/7/9/33/60	κ	II	A17	JK2	VH4	VH4-4	D1-14	JH4b
Stat 8	κ	II	A17	JK3	VH5	VH5-51	D6-19	JH3b
Stat 10	κ	I	L15	JK3	VH5	VH5-51	D6-19	JH3b
Stat 12/50	κ	III	L6	JK4	VH1	VH1-69	D5-5	JH4b
Stat 13	λ	VI	V1-22	JK2	VH4	VH4-55P	D1-1	JH5
Stat 24	κ	II	A19/A3	JK3	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Stat 37	λ	I	V1-13	JL3b	VH1	VH1-69	D6-13	JH6b
Stat 57	κ	III	L6	JK4	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Stat 62	κ	II	A17	JK3	VH4	VH4-4	D1-14	JH4b
Stat 68	λ	VI	V1-22	JL2/JL3a	VH4	VH4-4	D6-19	JH4b
Stat 206	κ	III	L6	JK2	VH5	VH5-51	D6-19	JH3b

N.D. = nicht bestimmbar; V_L : variable Region der leichten Kette; V_H : variable Region der schweren Kette

Die Sequenzierung und die Einordnung der Jak/Stat-Antikörperfragmente nach Kabat ^[4] zeigen, dass Antikörper selektioniert wurden, die unterschiedliche Identitäten besitzen. Das Ziel der Affinitätsselektion (Panning), ein breites Spektrum an diversen scFvs zu isolieren, wurde somit erreicht.

Die Antikörperfragmente, welche gegen das Jak- und Stat-Peptid des HCV Core Proteins selektioniert wurden und vielversprechend erschienen, wurden zur Untersuchung ihrer intrazellulären Interaktion mit dem HCV Core Protein in humanen Hepatomazelllinien verwendet. Ihre kodierende DNA-Sequenz wurde mit dem Fluorophor YFP durch entsprechende Klonierung fusioniert und zusammen mit dem HCV Core Protein, welches an das Fluorophor CFP gekoppelt wurde, transient in die Zelllinie Huh7 wt eingebracht. Zur Analyse der intrazellulären Verteilung beider Proteine wurde ein konfokales *Laserscanning* Mikroskop verwendet und die Fluorophore entsprechend ihrer Absorptionsspektren angeregt. In Abbildung 3.7 sind exemplarisch einige der untersuchten scFvs dargestellt, unter anderem auch der Sc42, der gegen das HCV Core Vollängenprotein selektioniert wurde.



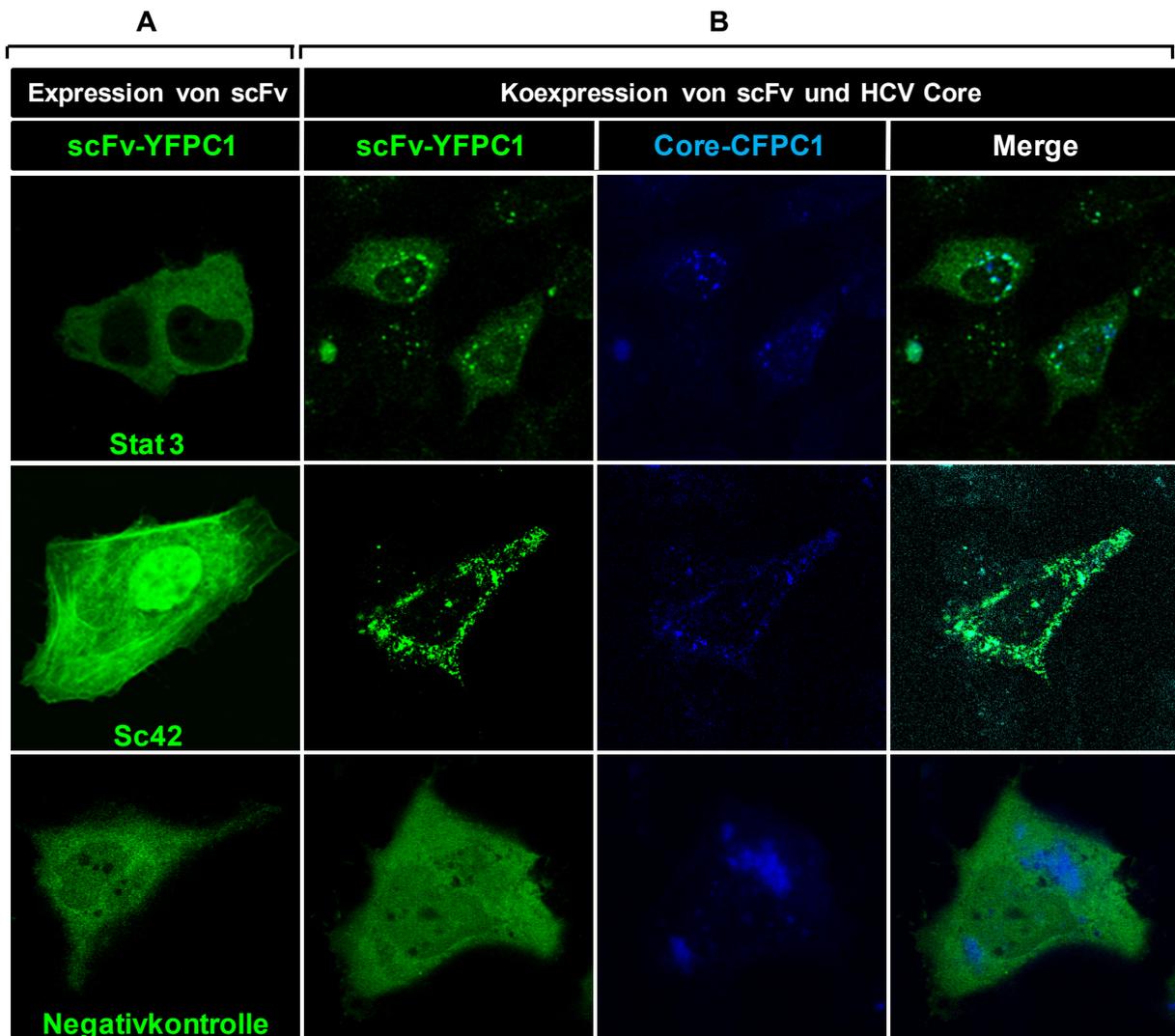


Abbildung 3.7: **Kolokalisation der selektierten Antikörperfragmente mit HCV Core in der Hepatomazelllinie Huh7 wt.** Huh7 wt-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, mit den scFv-YFPC1-Konstrukten (A und B) und mit dem HCV Core-CFPC1-Konstrukt (B) transient transfiziert und nach 48 Stunden mittels Paraformaldehydlösung fixiert. **A)** Expression der scFvs. **B)** Koexpression der scFvs und HCV Core. Zur Analyse wurde ein konfokales *Laserscanning* Mikroskop verwendet. Die Anregung der Fluorophore CFP und YFP erfolgte bei 405 nm und 488 nm. Als Negativkontrolle wurde ein unspezifisches Antikörperfragment, welches HCV Core nicht erkennt, eingesetzt.

Aus der Abbildung 3.7 ist in den untersuchten Hepatomazelllinien sowohl die vesikuläre, perinukleäre Verteilung des HCV Core Proteins als auch die partielle Kolokalisation der transfizierten Antikörperfragmente mit dem Core Protein ersichtlich. Die Kolokalisation wird dabei bei der Betrachtung der übereinander gelagerten Fluoreszenzen der scFv-YFPC1-Konstrukte und des Core-CFPC1-Konstruktes deutlich (Abbildung 3.7, Spalte: Merge). Durch die Gegenüberstellung der Expressionsmuster der einzeln eingebrachten scFvs (Abbildung 3.7 A) mit den Expressionsmustern der kotransfizierten scFvs (Abbildung 3.7 B) ist eine deutliche Umverteilung der Antikörperfragmente bei Anwesenheit des HCV Core Proteins

erkennbar, insbesondere im Falle des Antikörpers Sc42. Die Lokalisation des HCV Core Proteins bleibt dabei durch die koexprimierten Antikörperfragmente unverändert. Auffällig war, dass vor allem Antikörperfragmente, die gegen das Jak-Peptid selektioniert wurden, mit dem Core Protein kolokalisierten. Nur ein einziges Stat-Antikörperfragment (Abbildung 3.7: Stat 3) wies die Veränderung der zytoplasmatischen Lokalisation in Anwesenheit von HCV Core auf. Dass es sich dabei um spezifische Effekte handelt, konnte durch die Negativkontrolle, das heißt die Verwendung eines für HCV Core unspezifischen Antikörperfragments, belegt werden.

3.1.3 Identifizierung des Bindungsmotivs des Sc42

Die stärkste Kolokalisation eines Einzelkettenantikörperfragments mit dem HCV Core Protein konnte bei dem Antikörperfragment Sc42, das gegen das vollständige HCV Core Protein selektioniert wurde, beobachtet werden. Auch dessen zytoplasmatische Umverteilung in Anwesenheit von Core war bei diesem scFv am deutlichsten ausgeprägt (Abbildung 3.7). Zur Identifizierung und genauen Charakterisierung des Epitops, welches durch das Antikörperfragment Sc42 erkannt wird, wurde ein Epitop-Mapping Kit verwendet ^[2]. Die Phagen, die an den Sc42 gebunden hatten, wurden sequenziert und ihre Aminosäuresequenz bestimmt. Das Aminosäurealignment der identifizierten Mimotope ergab das Konsensusbindungsmotiv PLXG (Abbildung 3.8).

HCV Core Protein													
HCV Core aa 79-88	P	G	Y	P	W	P	L	Y	G	N			
HCV Core aa 133-142	L	M	G	Y	I	P	L	V	G	A			
HCV Core aa 138-147	P	L	V	G	A	P	L	G	G	A			
<hr/>													
Identifizierte Mimotope													
Mimotop A				P	F	P	L	G	G	G	S	A	
Mimotop B			Y	L		P	L	P	G	G	G	S	A
Mimotop C			P	L		P	L	G	G	G	G	S	A
Mimotop D		P	T	L		P	L	T	G	Y	L	S	A
Mimotop E		P	K	H		T	L	I	G	S	E	F	
Mimotop F			K	P		P	L	S	G	G	G		
Mimotop G			T	L		P	L	T	G	Y	S		
Mimotop H			K	P		P	L	S	G	G	G		
Konsensus/Mimotop			X	L		P	L	X	G	G	G	S	A
<hr/>													
Konsensus/Motiv		X	X			P	L	X	G	X	X		

Abbildung 3.8: **Identifizierung des putativen Bindungsmotivs des Antikörperfragments Sc42 innerhalb des HCV Core Proteins.** Mit Hilfe des Ph.D. -7-Library Kits (New England Biolabs) konnten 8 Phagenklone (Mimotope), die spezifisch an Sc42 binden, isoliert und sequenziert werden^[2]. Die Aminosäuresequenzen der Mimotope wurden in einem Alignment mit Hilfe des Programms BioEdit verglichen und eine Konsensussequenz wurde erstellt.

Durch den Vergleich der ermittelten Konsensussequenz des putativen Sc42-Bindungsmotivs mit der Aminosäuresequenz des HCV Core Proteins konnten Sequenzhomologien innerhalb von HCV Core an den Aminosäurepositionen 84 (aa 84-87), 138 (aa 138-141) und 143 (aa 143-146) identifiziert werden (Abbildung 3.8). Zwei der acht Mimotope enthielten die Sequenz PFPLGGG (Mimotop A) und PLPLGGG (Mimotop C), welche mit der Aminosäuresequenz PWPLYG innerhalb des Core Proteins (Position 82 bis 87) an bestimmten Positionen Übereinstimmungen zeigen und verglichen mit dem Konsensusbindungsmotiv PLXG einen weiteren Prolinrest aufweisen. Diese drei Bereiche könnten dementsprechend für die Interaktion des Antikörpers mit dem HCV Core Protein in Frage kommen.

Die HCV Core Region, die die Aminosäuren 84 bis 87 ausmacht, ist laut Literatur^[1] für die Bindung von JAK-Proteinen verantwortlich, wohingegen die Sequenzbereiche der Aminosäurereste 138-141 und 143-146 maßgeblich an der Bindung von Core an die Lipidtröpfchen beteiligt sind^[31, 138]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde zum einem die Bindung von HCV

Core an Lipidtröpfchen mittels Kolokalisationsstudien überprüft (Abbildung 3.9) und zum anderen versucht, diese Interaktion durch Einbringen des Sc42 wieder aufzuheben.

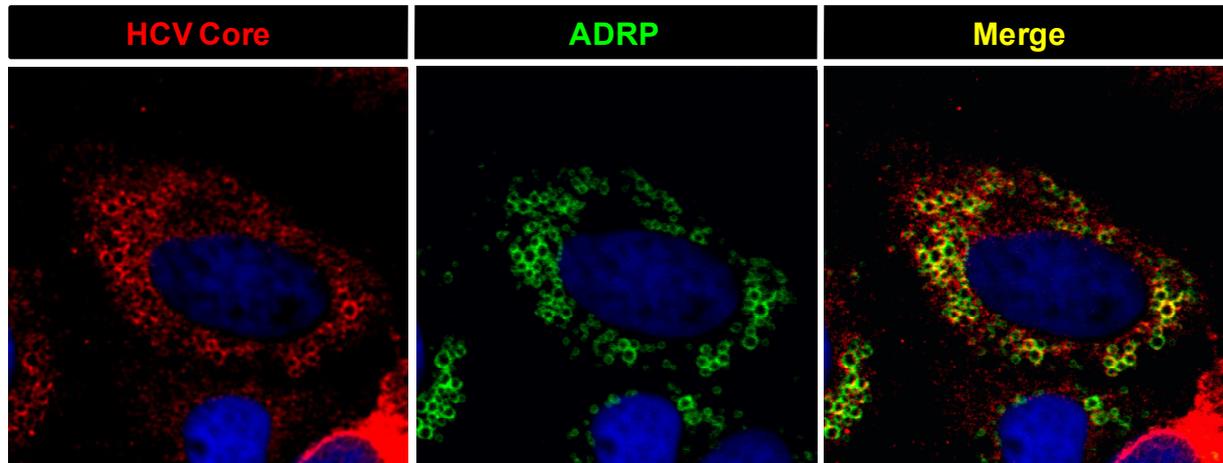


Abbildung 3.9: **Kolokalisation des HCV Core Proteins mit Adipophilin (ADRP) in der Hepatomazelllinie Huh7 wt.** Huh7-Zellen wurden auf Glasdeckgläsern ausgesät, mit HCV Core transfiziert und nach 48 Stunden mit Methanol fixiert. HCV Core wurde über den Primärantikörper C750 und einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (Anregung bei 543 nm) und ADRP über den Adipophilin-Primärantikörper und einem Fitc-konjugierten Sekundärantikörper (Anregung bei 488 nm) visualisiert. Die Färbung wurde mittels eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops analysiert. Merge: Übereinanderlagerung der roten und grünen Aufnahme.

In der Abbildung 3.9 ist sowohl eine deutliche Kolokalisation des HCV Core Proteins mit dem Lipidtröpfchen-Marker Adipophilin (ADRP) als auch das schon zuvor beobachtete perinukleäre, globuläre Expressionsmuster von Core erkennbar. Um die aus der Literatur bekannte Interaktion von Lipidtröpfchen und HCV Core zu unterbinden, wurde HCV Core zusammen mit dem Sc42 in die Hepatomazelllinie Huh7 wt kotransfiziert. Allerdings konnte zu keinem Zeitpunkt eine Störung dieser Interaktion beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

3.1.4 Nachweis der intrazellulären Interaktion zwischen den Antikörperfragmenten und dem HCV Core Protein mittels FRET

Aus den Kollokalisationsstudien konnten erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen den isolierten Antikörperfragmenten und dem HCV Core Protein gewonnen werden. Um nun die intrazelluläre Interaktion zwischen beiden Proteinen zu untersuchen, wurde die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfertechnik (FRET) angewandt. Dazu wurden Zellen der Hepatomazelllinie Huh7 wt auf MaTek-Schalen ausgesät, mit den scFv-YFP-Konstrukten und dem Core-CFPC1-Konstrukt transient kotransfiziert und nach 48 Stunden lebend, ohne Fixierung, mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops analysiert. Für ein positives FRET-Signal dürfen beide Proteine nicht weiter als 10 nm voneinander entfernt sein und sollten dementsprechend miteinander interagieren.

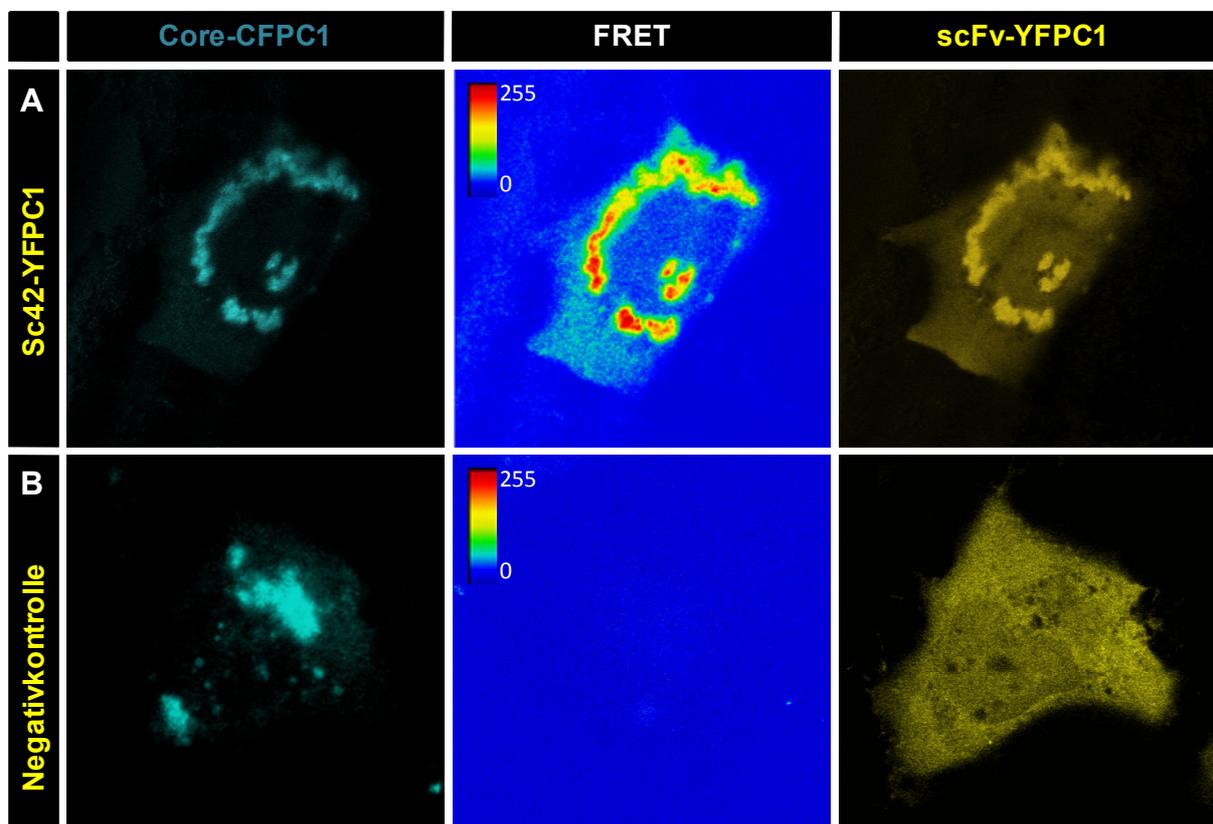


Abbildung 3.10: **Nachweis der intrazellulären Interaktion des Sc42 mit dem HCV Core Protein mittels FRET-Analyse.** Huh7 wt-Zellen wurden auf MaTek-Schalen ausgesät, transient mit dem Sc42-YFPC1-Konstrukt **(A)** bzw. mit einem irrelevanten ScFv-YFPC1-Konstrukt (Negativkontrolle) **(B)** und dem Core-CFPC1-Konstrukt kotransfiziert und nach 48 Stunden lebend mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops analysiert. Für die FRET-Messung wurden beide Fluorophore in einem Bereich der Wellenlänge 422-582 nm mit dem META-Scankopf detektiert. Dabei wurde CFP mit einer Wellenlänge von 405 nm angeregt. Mit Hilfe zuvor aufgenommener Spektren von Proben, die ausschließlich CFP oder YFP enthielten, konnte die Emissionen der reinen Fluorophore aus den entstandenen Bildern extrahiert werden.

In der Abbildung 3.10 ist ein deutliches FRET-Signal zwischen den koexprimierten Proteinen Sc42 und HCV Core erkennbar. Insbesondere in der perinukleären Region konnte ein intensives FRET-Signal verzeichnet werden. Nur eine Interaktion beider Proteine ermöglicht eine Energieübertragung vom angeregten Donor CFP (Core-CFPC1) auf den Akzeptor YFP (Sc42-YFPC1) und damit dessen Detektion in einem Wellenlängenbereich von 420-580 nm ohne dass der Sc42-YFPC1 selbst angeregt wird. Die Untersuchungen hinsichtlich eines möglichen FRET-Effektes wurden auch mit einer Reihe von Jak/Stat-Antikörperfragmenten durchgeführt, allerdings konnte bei keinem der gegen die Peptide Jak und Stat selektionierten scFvs eine intrazelluläre Interaktion mit Hilfe der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfertechnik beobachtet werden.

3.1.5 Anwendung verschiedener Systeme zur Untersuchung der funktionellen Relevanz des Sc42

Der Nachweis der intrazellulären Interaktion zwischen dem Antikörperfragment Sc42 und dem HCV Core Protein führte zur Frage nach der funktionellen Relevanz des Sc42. Die Überlegung, ob durch das Einbringen dieses Antikörperfragments HCV Core-spezifische Effekte wieder aufgehoben werden können, war Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen.

Um zu untersuchen, ob HCV Core inhibitorische Wirkung auf den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg über die Induktion von SOCS3 vermittelt ^[139], wurde die transkriptionelle Kontrolle des humanen SOCS3-Gens in Abhängigkeit des HCV Core Proteins mit Hilfe von Reporterassays überprüft. Hierzu wurde ein Reportergenkonstrukt verwendet, das für die 5'-regulatorischen Region des humanen SOCS3-Promotors kodiert. Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, führt HCV Core zu einer gesteigerten Expression der Luciferase und demzufolge zu einer transkriptionellen Aktivierung des SOCS3-Promotors. Die HCV Core-vermittelte Aktivierung des SOCS3-Promotors wurde durch Kotransfektion von HCV Core und dem Antikörperfragment Sc42 wieder aufgehoben, ein Effekt der jedoch auch durch Kotransfektion eines irrelevanten scFv vermittelt wird, so dass die inhibitorische Wirkung des Sc42 Antikörperfragments nicht auf einer spezifischen Wechselwirkung mit HCV Core beruht.

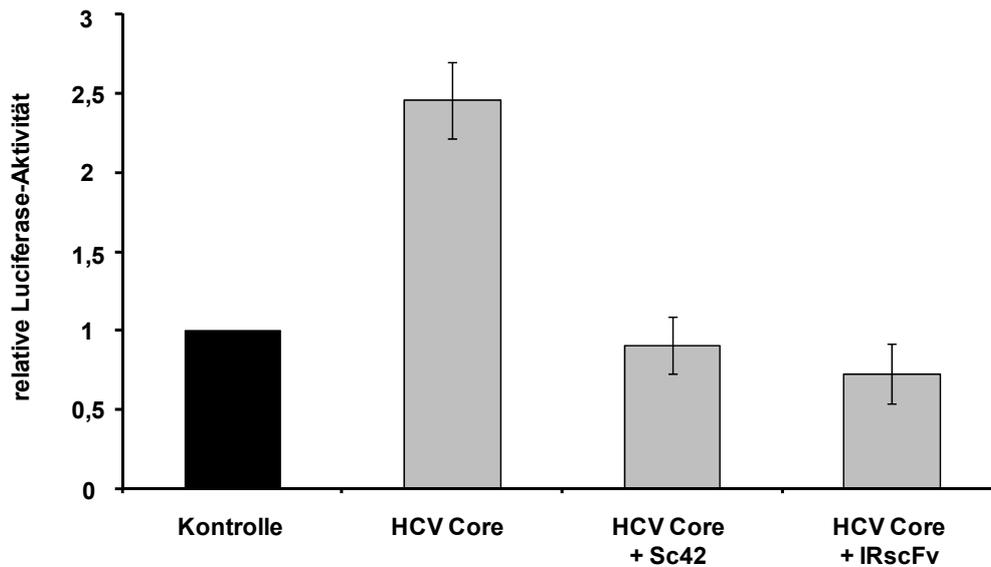


Abbildung 3.11: **HCV Core-induzierte transkriptionelle Aktivierung des SOCS3-Promotors und die Überprüfung der inhibitorischen Wirkung des Antikörperfragments Sc42.** HepG2-Zellen wurden mit 1,0 µg des pGL3-SOCS3 (-2757 bis +929) Luc-Reportergenkonstruktes und 1,5 µg des HCV Core-kodierenden Plasmids transient kotransfiziert. Weiterhin wurde der Renilla-Expressionsvektor pRL-TK zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und 7,5 µg des Sc42-kodierenden Plasmids transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten bestimmt und auf die Kontrolle (Leervektor) normalisiert.

Da aus diesen Experimenten keine Aussage bezüglich der inhibitorischen Wirkung des Sc42 getroffen werden konnte, wurden weitere HCV Core-induzierte Effekte aus der Literatur aufgegriffen. Einige Veröffentlichungen legen nahe, dass Core die Cyclooxygenase 2 sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene spezifisch hemmt^[50]. Wie in Abbildung 3.12 ersichtlich, inhibiert HCV Core die mRNA-Expression der Cyclooxygenase 2. Dieser Effekt kann durch das Einbringen des Sc42 aufgehoben werden. Da bei Verwendung des irrelevanten scFv ebenfalls die Hemmung der Cox2 aufgehoben wird, scheint auch diese Wirkung des Sc42 Antikörperfragments nicht auf einer spezifischen Interferenz mit dem HCV Core Protein zu beruhen.

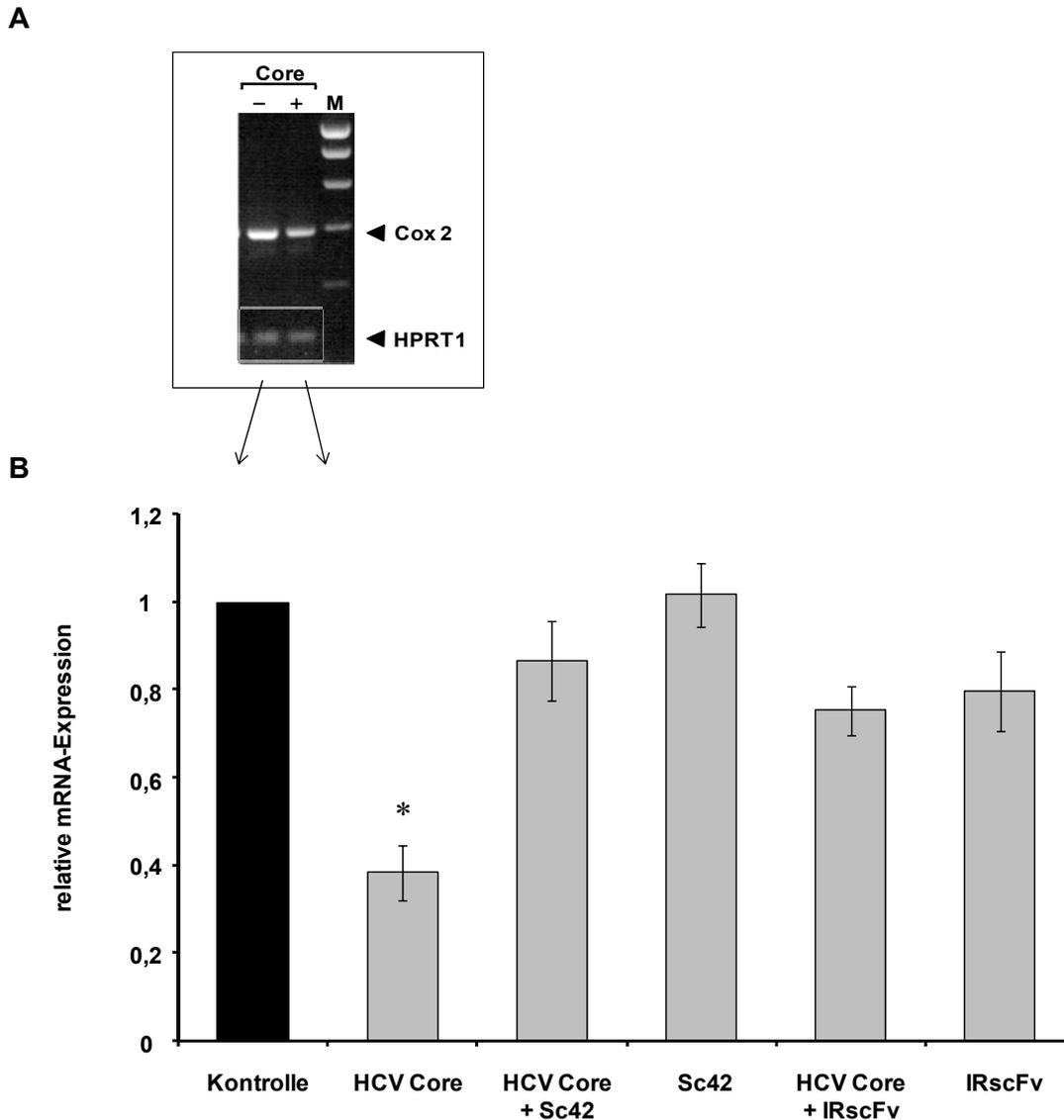


Abbildung 3.12: **HCV Core-supprimierte mRNA-Expression der Cyclooxygenase 2 und Überprüfung der inhibitorischen Wirkung des Antikörperfragments Sc42.** **A)** Huh7 wt-Zellen wurden mit dem HCV Core-kodierenden Plasmid und dem entsprechenden Leervektor transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die RNA-Isolierung und unter Verwendung des SuperScript-One-Step RT-PCR Kit (Invitrogen) wurde die cDNA-Synthese, die RT-PCR mittels genspezifischer Primer durchgeführt und in einem Agarosegel visualisiert. **B)** Huh7 wt-Zellen wurden mit dem HCV Core-kodierenden Plasmid und dem Sc42-kodierenden Plasmid bzw. dem IRscFV-kodierenden Plasmid transient kotransfiziert. Nach 48 Stunden erfolgten die RNA-Isolierung und anschließend die cDNA-Synthese. Die mRNA-Expression von Cox2 wurde durch Real-Time-PCR mittels genspezifischer Primer bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit HPRT1 als Referenz verwendet. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Kontrolle (Leervektor) normalisiert. Die Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von vier unabhängigen Experimenten erstellt. Die Signifikanz (*) wurde mittels des Student's t-Tests berechnet ($p < 0,05$).

Um zu überprüfen, ob der Sc42 die Vermehrung bzw. die Infektiosität des Hepatitis C Virus beeinflusst, wurden Versuche mit dem infektiösen JFH1/adpt1-Virus^[140] in Kooperation mit

der Arbeitsgruppe von Prof. Ralf Bartenschlager (Heidelberg) durchgeführt. Dazu wurde die Hepatomazelllinie Huh7.5 zunächst transient mit dem Sc42 Antikörperfragment transfiziert und anschließend mit dem JFH1-Virus infiziert, bevor zu verschiedenen Zeitpunkten die Infektiosität bestimmt wurde. Wie in Abbildung 3.13 ersichtlich, konnte keine inhibitorische Wirkung des Sc42 beobachtet werden. 72 Stunden nach der Infektion ist die höchste Infektiosität des JFH1/adpt1-Virus zu verzeichnen. Diese erfährt durch das transiente Einbringen des Sc42 allerdings keine Veränderung.

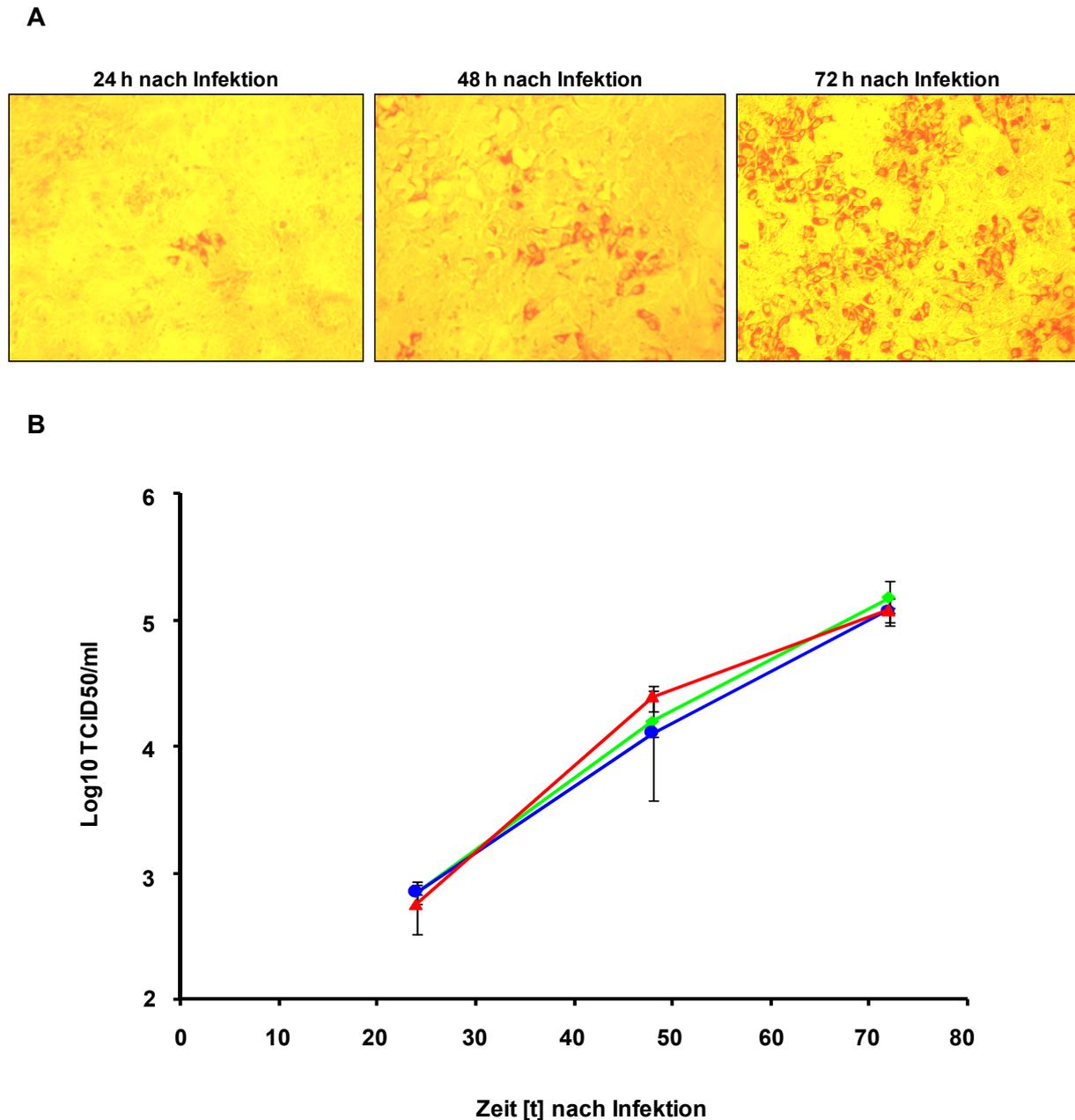


Abbildung 3.13: **Bestimmung der Infektiosität von Zellkulturüberständen des Hepatitis C Virus JFH1/adpt1.** Zellen der Hepatomazelllinie Huh7.5 wurden in einer 6 well Platte ausgesät ($2,5 \times 10^5$ Zellen/well) und mit dem Sc42-kodierenden Plasmid bzw. dem IRscFV-kodierenden Plasmid transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen mit dem JFH1/adpt1-Virus mit einer MOI von 0,3 TCID₅₀/Zellen infiziert. Die Überstände wurden nach 24, 48 und 72 Stunden gesammelt und ihre Virus-Titer mittels eines TCID₅₀-Assays durch Reinfektion von Huh7.5-Zellen bestimmt. **A)** Mikroskopische Aufnahmen des TCID₅₀-Assays zur Bestimmung der Infektiosität und der Ausbreitung des JFH1/adpt1-Virus. **B)** Zeitlicher Verlauf der Infektiosität 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion der transient transfizierten Huh7.5-Zellen mit dem JFH1/adpt1-Virus. grün: nicht transfiziert; blau: transfiziert mit dem IRscFV-kodierenden Plasmid; rot: transfiziert mit dem Sc42-kodierenden Plasmid

Da zu diesem Zeitpunkt die Möglichkeit weiterer Untersuchungen an vollständig genomisch replizierenden HCV Replikonsystemen, welche die Durchführung in einem S3-Labor voraussetzen, nicht zur Verfügung stand, wurden die nachfolgenden Experimente mit dem Hepatitis C Virus JFH1 in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jisu Li (Liver Research Center, Rhode Island Hospitals, Brown Universität, Providence, USA) durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die intrazelluläre Interaktion des Einzelkettenantikörperfragments Sc42 mit dem HCV Core Protein eine inhibitorische Wirkung auf dessen Funktion ausübt. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, wird die Proteinexpression von HCV Core fast vollständig gehemmt (Abbildung 3.14 B). Auch das Einbringen des Sc42 in das genomische Replikonsystem JFH1 führte zu einer Hemmung der Expression des Core Proteins (Abbildung 3.14 C). Diese Daten belegen auch, dass das Antikörperfragment Sc42 das Core Protein verschiedener Genotypen erkennt, da es sich bei dem JFH1-Virus um den Genotyp 2a handelt. Um eine mögliche inhibitorische Wirkung des Sc42 auf die HCV Replikation zu überprüfen, wurde in chronisch HCV-infizierten Huh7.5-Zellen (JFH1-Virus) das Antikörperfragment durch Elektroporation eingebracht. Allerdings konnte mittels Northern-Blot-Verfahren nach 3 Tagen kein Effekt auf die virale RNA Replikation nachgewiesen werden (Abbildung 3.14 D). In früheren Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Jisu Li beweisen, dass die Expression des HCV Core Proteins mit einer gesteigerten Zellproliferation einhergeht ^[141]. Um zu untersuchen, ob der Sc42 durch die Sequestrierung von Core dessen wachstumssteigernden Effekt aufzuheben vermag, wurde die Zellproliferationsrate in An- und Abwesenheit des Antikörpers bestimmt. Wie in Abbildung 3.14 E deutlich erkennbar, führt die Expression von HCV Core zu einem signifikanten Anstieg der Zellproliferation, der durch den Sc42 inhibiert werden kann. Die Spezifität der inhibitorischen Wirkung des Sc42 wurde durch die Verwendung eines irrelevanten Antikörperfragments (ScIR; Abbildung 3.14 E) validiert.

Somit konnte erstmalig die inhibitorische Wirkung des Einzelkettenantikörperfragments Sc42, welche aus dessen intrazellulärer Bindung an das HCV Core Protein resultiert, nachgewiesen werden.

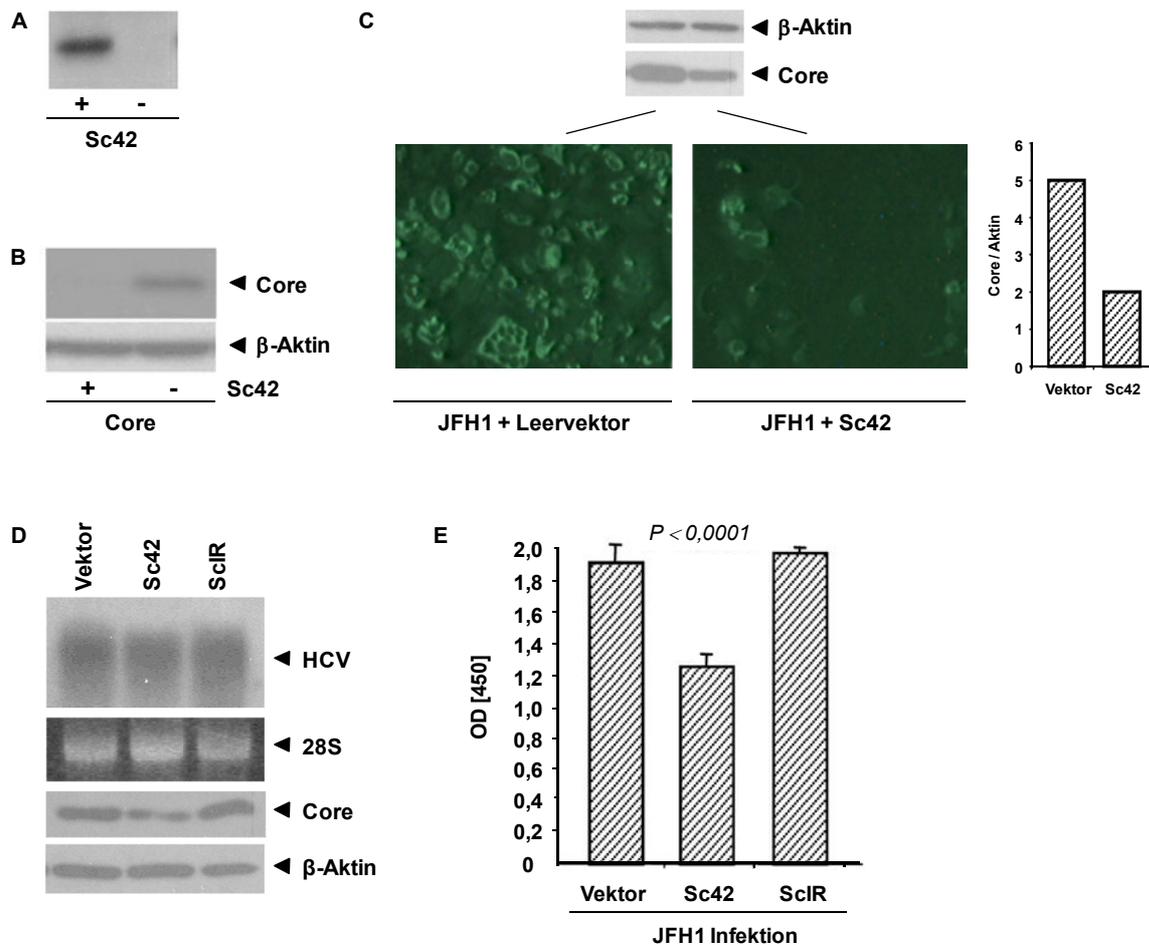


Abbildung 3.14: **Inhibitorische Wirkung des Sc42-Antikörperfragments auf die HCV Core Expression, die HCV Replikation und die Zellproliferation.** **A)** Intrazelluläre Expression des Sc42. Huh7-Zellen wurden mit dem Sc42-kodierenden Plasmid bzw. dem Leervektor transient transfiziert und nach 48 Stunden lysiert. Die Analyse der Expression des Sc42 erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines His-Antikörpers. **B)** Wirkung des Sc42 auf die HCV Core Expression. Huh7-Zellen wurden mit den Plasmiden Sc42-pEF und/oder Core-pcDNA3 kotransfiziert und nach 48 Stunden lysiert. Die Expression des Core Proteins wurde durch Verwendung eines HCV Core-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot Verfahren analysiert. Die Detektion von β -Aktin diente als Beladungskontrolle. **C)** Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot Analyse des HCV Core Proteins des genomischen JFH1-Replikons. In Huh7.5-Zellen wurde Replikon-RNA (5 μ g) und Plasmide des Sc42-pEF (2 μ g) bzw. des Leervektors durch Elektroporation eingebracht. Die Zellen der 24 well Platte wurden nach 72 Stunden fixiert, mit einem HCV Core-spezifischen Antikörper angefärbt und mittels eines Ultraviolett-Mikroskops ausgewertet. Die Aufbereitung und Analyse der Zellen der 6 well Platte erfolgte nach 72 Stunden und mittels Western Blot Verfahren. Die densitometrische Auswertung der HCV Core Proteinexpression wurde auf die entsprechenden Werte der Beladungskontrolle β -Aktin bezogen und die Ergebnisse auf die Kontrolle (Leervektor) normalisiert. **D)** Wirkung des Sc42 auf die HCV Replikation. In Huh7.5-Zellen wurde Replikon-RNA (5 μ g) durch Elektroporation eingebracht und für 76 Tage unter subkonfluenten Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden dann mit Plasmiden Sc42-pEF bzw. IRscFV-pEF (ScIR) bzw. des Leervektors elektroporiert. Anschließend erfolgte die Analyse der virale Replikation mittels Northern Blot Verfahren. **E)** Wirkung des Sc42 auf die Zellproliferation. Huh7.5-Zellen wurden wie in D) behandelt, in einer 96 well Platte nach der Elektroporation ausgesät und die Zellproliferationsrate nach 48 Stunden bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus sechs unabhängigen Experimenten errechnet. Die Signifikanz wurde mittels des Student's t-Tests bestimmt.

3.2 Einfluss von HCV auf die Expression zellulärer Proteine

Über 80 % der HCV-infizierten Patienten entwickeln aus bisher nicht verstandenen Gründen einen chronischen Verlauf der HCV Infektion, die zahlreiche Lebererkrankungen wie beispielsweise Steatose, Fibrose, Zirrhose oder ein hepatozelluläres Karzinom verursachen kann. Der langwierige Verlauf der Krankheitsmanifestation deutet darauf hin, dass das Hepatitis C Virus effektive Schutzmechanismen bezüglich der antiviralen Immunantwort des Wirtes entwickelt haben muss. Obwohl in den letzten Jahren eine Vielzahl von Mechanismen aufgeklärt wurden, durch die HCV mit wirtseigenen Faktoren interagiert, um einen effektiven Ablauf des viralen Lebenszyklus zu gewährleisten und die zur Pathogenese von HCV beitragen, sind zahlreiche Aspekte der Interaktion von HCV mit dem Wirt nur unvollständig verstanden.

Hierbei ist insbesondere das nichtstrukturelle Protein NS3/4A von Interesse, das für die Polyproteinprozessierung und damit für die Etablierung des Replikationskomplexes essentiell ist. Weiterhin konnte belegt werden, dass die NS3/4A-Protease auch nichtvirale Substrate wie Cardif, TC-PTP und TRIF spaltet ^[64, 65, 218]. Durch proteolytische Spaltung von Cardif und TRIF, die in die Induktion von Typ I-Interferonen involviert sind, greift NS3/4A in die antivirale Immunantwort des Wirtes ein, während die Spaltung von TC-PTP eine Sensitivierung der EGFR-Signalvermittlung und eine Verstärkung der Akt-Aktivierung hervorruft und somit die Zellproliferation und Apoptoseregulation beeinflusst ^[218].

Vor diesem Hintergrund sollte in einem zweiten Teil der Arbeit eine Analyse des Proteinexpressionsprofils von Lebergewebe NS3/4A-transgener Mäuse im Vergleich zu Leberproben entsprechender Kontrolltiere mit Hilfe der 2D-DIGE-Gelelektrophoresetechnik der Firma TopLab durchgeführt werden. Hierzu wurden je drei Leberstücke von NS3/4A-transgenen bzw. entsprechenden Kontrolltieren lysiert und über analytische 2D-Gele aufgetrennt. Nachfolgend wurden über präparative Gele die differentiell exprimierten Proteine ausgestanzt und mittels massenspektrometrischer Analyse (MALDI/TOF-MS) weiter charakterisiert. Ziel dieser Untersuchungen war die Identifizierung zellulärer Proteine, die in Gegenwart des multifunktionellen NS3/4A-Proteins des Hepatitis C Virus differentiell reguliert werden.

3.2.1 Vergleichende Proteomanalyse von NS3/4A-transgenen Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen

Mittels fluoreszenzbasierter 2D-Gelelektrophoresetechnik und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse differentiell exprimierter Banden konnten in den Leberlysaten NS3/4A-transgener Tiere 18 Proteine identifiziert werden, die im Vergleich zu Kontrolltieren differentiell reguliert werden. In Abbildung 3.15 ist die Klassifizierung der identifizierten Proteine bezüglich ihrer Funktion dargestellt. Weiterhin sind die einzelnen Proteine in

Tabelle 3.4 zusammen mit ihren aus der Literatur bekannten Funktionen aufgeführt. Es konnten drei Hauptgruppen durch NS3/4A differentiell regulierter Proteine identifiziert werden, darunter sind mit 44 % Stoffwechsel-assozierte Proteine, mit 28 % Proteine des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels und mit 17 % Proteine der ER-Homöostase vertreten. Weiterhin konnten Proteine identifiziert werden, die Funktionen bezüglich des Zytoskeletts übernehmen und ein Protein, welches als Raf-Kinase-Inhibitor bekannt ist.

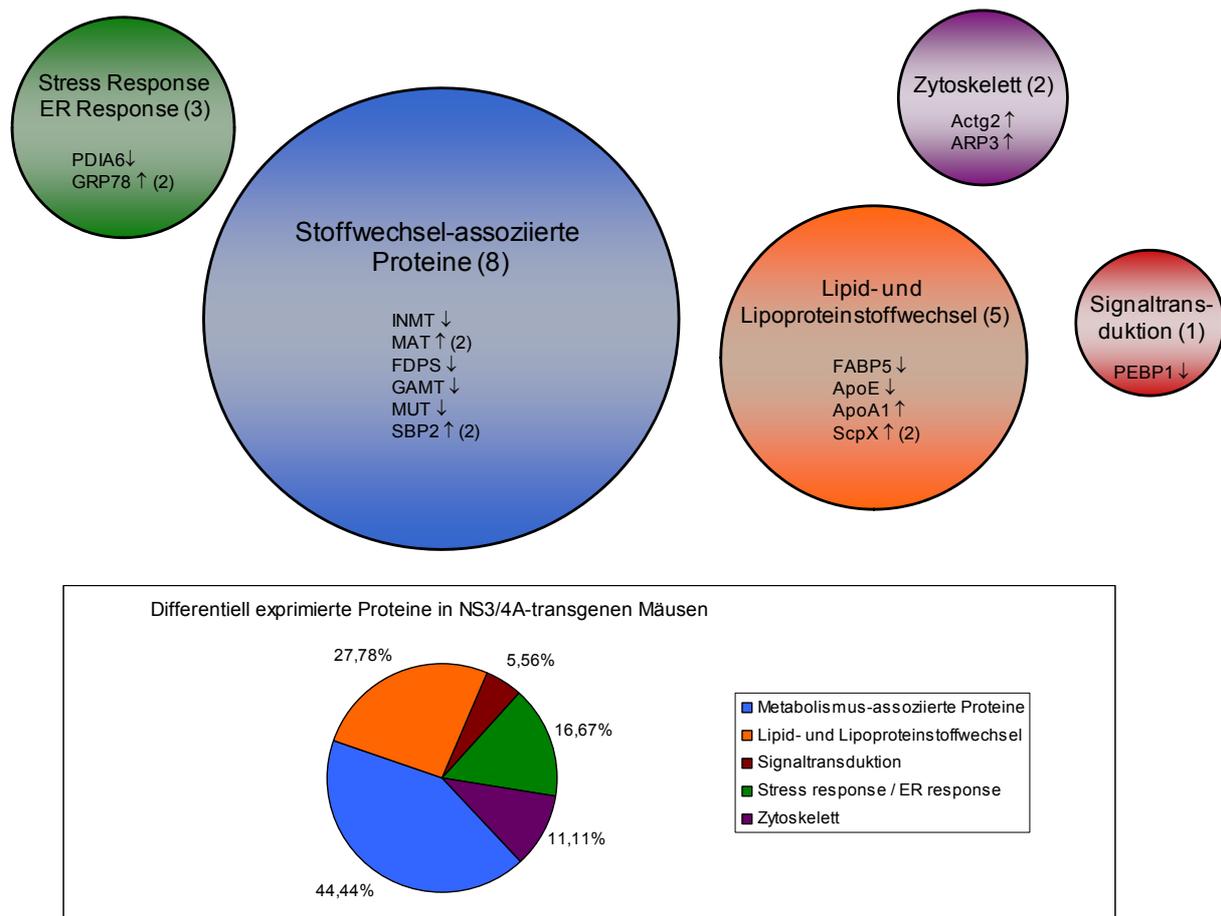


Abbildung 3.15: **Klassifizierung der differentiell exprimierten Proteine aus Lebergewebe von NS3/4A-transgenen Mäusen.** Je drei Leberstücke von NS3/4A-transgenen bzw. wildtypischen Mäusen wurden lysiert und vereinigt. Durch die Firma TopLab wurden die Leberlysate mit Hilfe der 2D-DIGE-Gelelektrophoresetechnik aufgetrennt, die differentiell exprimierten Spots ausgestanzt und massenspektrometrisch (MALSI-TOF-MS) analysiert. Die Einteilung der Proteine erfolgte in fünf Kategorien, die durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet sind. In Klammern ist die Anzahl der Proteine aufgeführt, welche für die entsprechende Kategorie identifiziert wurden. Die Pfeile demonstrieren die erhöhte (↑) bzw. verringerte (↓) Expression in NS3/4A-transgenen Mäusen. Abkürzungen: Actg2: Gamma-Aktin; ApoA1: Apolipoprotein A1; ApoE: Apolipoprotein E; ARP3: Aktinverwandtes Protein 3; FABP5: Fettsäure-bindendes Protein 5; FDPS: Farnesyldiphosphatsynthetase; GAMT: Guanidinacetatmethyltransferase; GRP78: Hitzeschockprotein 5; INMT: Indolethylamin-N-Methyltransferase; MAT: Methioninadenosyltransferase I; MUT: Methylmalonyl-Coenzym A-Mutase; PDIA6: Proteindisulfidomerase 6; PEBP1: Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein 1; SBP2: Selen-bindendes Protein 2; ScpX: Sterolcarrierprotein X

Tabelle 3.4: Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine aus Lebergewebe von NS3/4A-transgenen Mäusen und ihre Funktionen. Der Regulationsfaktor gibt das Verhältnis der Fluoreszenzwerte der einzelnen Spots an, welche durch die 2D-DIGE-Gelelektrophoresetechnik bestimmt wurden (Wildtyp *versus* Transgen). In grün sind die hochregulierten und in rot die herabregulierten Proteine in NS3/4A-transgenen Mäusen dargestellt. Die Farbwahl der Proteine ergibt sich aus der Klassifizierung der Proteine in Abbildung 3.15.

Protein	Abb.	Funktion	Regulationsfaktor
Indolethylamin-N-Methyltransferase	INMT	N-Methylierung von Indolen	0,47
Methioninadenosyltransferase I, alpha	MAT	Schlüsselenzym der Transmethylierung und Transsulfonierung, Biosynthese von Polyaminen	0,60
Fettsäure-bindendes Protein 5	FABP5	Aufnahme, Transport und Metabolismus von Fettsäuren	0,48
Farnesyldiphosphatsynthetase	FDPS	Cholesterolfstoffwechsel	0,61
Apolipoprotein E	ApoE	Synthese von VLDL-Partikeln	0,61
Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein 1	PEBP1	Raf-Kinase-Inhibitor	0,49
Guanidinacetatmethyltransferase	GAMT	Kreatininstoffwechsel	0,59
Methylmalonyl-Coenzyme A-Mutase	MUT	Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA	0,65
Proteindisulfidisomerase 6	PDIA6	Katalyse der Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken	0,64
Gamma-Aktin	Actg2	Zellmotilität	1,86
Hitzeschockprotein 5	GRP78	Zentraler Regulator der Homöostase des ERs	2,02
Aktin-verwandtes Protein 3	ARP3	Aktin-Polymerisation	2,58
Methioninadenosyltransferase I, alpha	MAT	Schlüsselenzym der Transmethylierung und Transsulfonierung, Biosynthese von Polyaminen	2,58
Apolipoprotein A1	ApoA1	HDL-Stoffwechsel	2,02
Selen-bindendes Protein 2	SBP2	Entgiftung von Acetaminophen	2,05
Hitzeschockprotein 5	GRP78	Zentraler Regulator der Homöostase des ERs	2,51
Sterolcarrierprotein X	ScpX	Oxidation und Transfer von verzweigten Fettsäuren	2,58
Selen-bindendes Protein 2	SBP2	Entgiftung von Acetaminophen	3,19

3.2.2 Identifizierung zellulärer Zielproteine des Hepatitis C Virus

Zur Bestätigung der erhaltenen Daten aus den 2D-Gelelektrophoreseuntersuchungen sollten die identifizierten Proteine zunächst auf RNA- und auf Proteinebene sowohl in NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zellen als auch in Zellen, die das subgenomische HCV Replikon tragen, untersucht werden. Weiterhin sollte eine Aussage über ihre subzelluläre Lokalisation getroffen werden, um auf diesem Wege weitere Hinweise hinsichtlich einer potenziellen Interaktion mit der NS3/4A Protease/Helikase von HCV zu erhalten.

Da für NS3/4A nachgewiesen werden konnte, dass es zelluläre Proteine des Wirtes wie TC-PTP und Cardif proteolytisch spaltet, wurden zunächst Proteine wie PEBP1 und ApoE ausgewählt, welche den Proteomanalysen zufolge in den transgenen Mäusen eine verringerte Proteinexpression aufweisen.

Bei der Analyse des Raf-Kinase-Inhibitors PEBP1 konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene keine Verringerung beobachtet und damit keine Bestätigung der 2D-Gelelektrophoresedaten erreicht werden (Daten nicht dargestellt).

Als ein weiteres vielversprechendes differentiell exprimiertes Protein wurde Apolipoprotein E analysiert, da es der aktuellen Literatur zufolge essentiell für die Infektiosität des Hepatitis C Virus ist ^[142]. Interessanterweise fand sich im Gegensatz zu dem erwarteten Regulationsmuster hier eine verstärkte Expression in Gegenwart von NS3/4A alleine, welche in Gegenwart des subgenomischen HCV Replikons, das weitere nichtstrukturelle Proteine wie NS5A und NS5B enthält, noch deutlich verstärkt wird. Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, konnte eine gesteigerte mRNA-Expression sowohl in den NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zellen als auch in den Replikonzellen Huh 9-13 beobachtet werden. Auch auf Proteinebene konnte in beiden Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (HepG2 mock und Huh7 wt) eine verstärkte Expression von ApoE beobachtet werden (Abbildung 3.17).

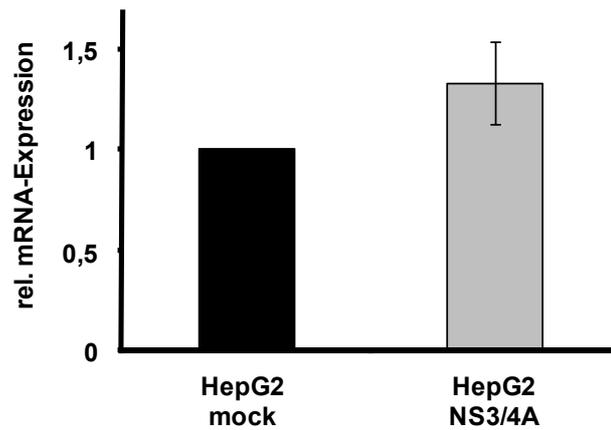
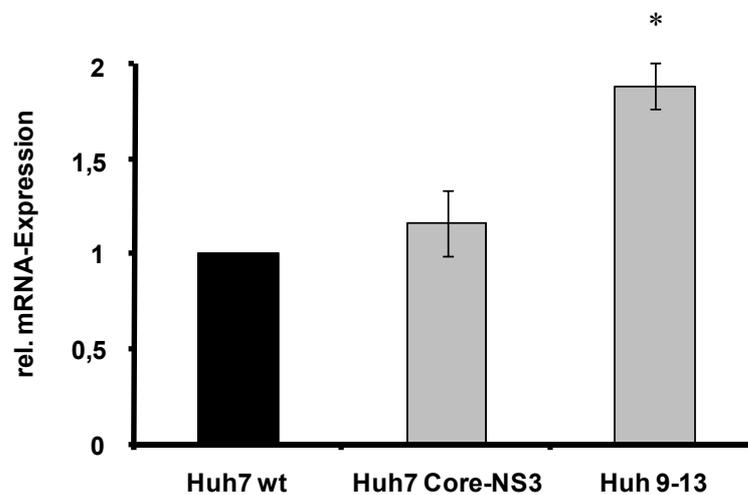
A**B**

Abbildung 3.16: **Erhöhte mRNA-Expression von Apolipoprotein E sowohl in NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zellen als auch in subgenomischen HCV Replikonzellen.** Aus HepG2 mock- und HepG2 NS3/4A-Zellen (**A**) bzw. aus Huh7-, Huh7 Core-NS3- und Huh 9-13-Zellen (**B**) wurde RNA isoliert und durch Real-Time-PCR die Expression von Apolipoprotein E bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Kontrolle (Leervektor) normalisiert. Die Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von vier unabhängigen Experimenten erstellt. Die Signifikanz (*) wurde mittels des Student's t-Tests berechnet ($p < 0,05$).

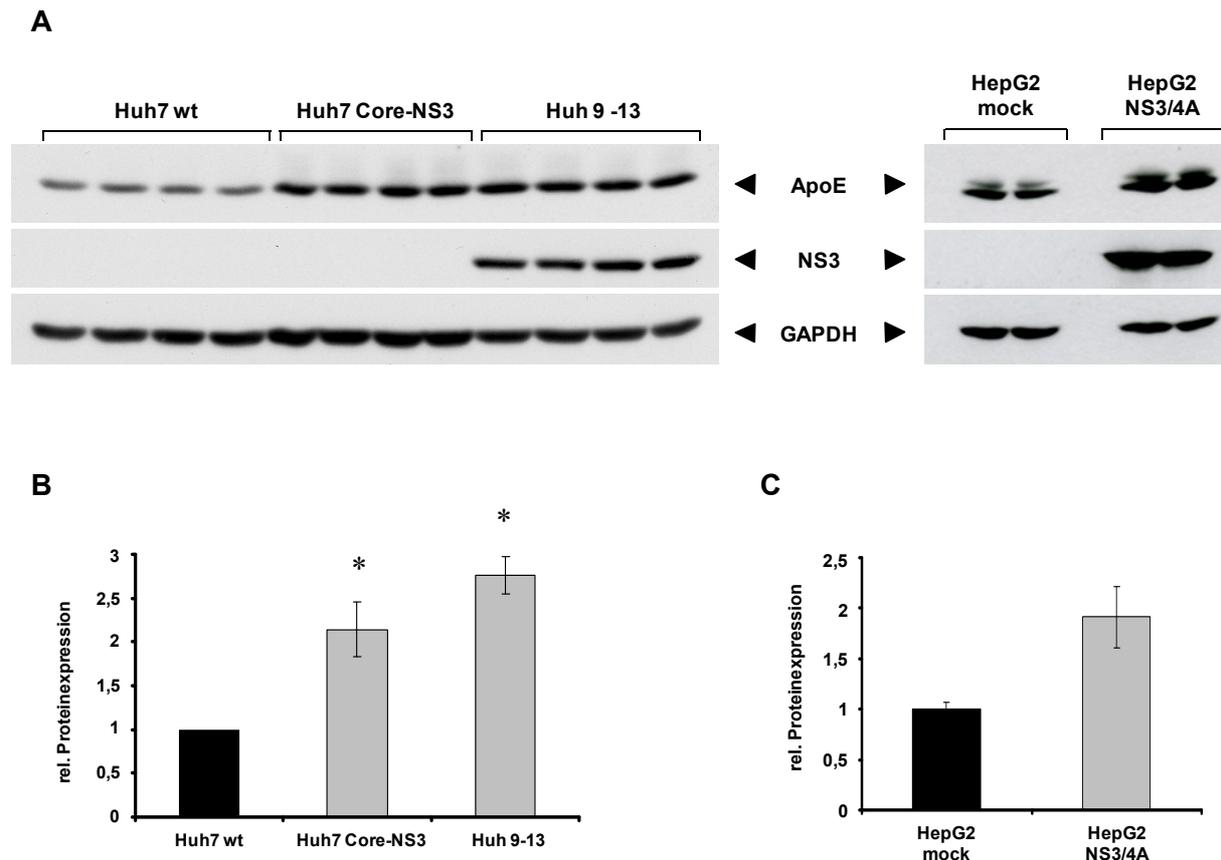


Abbildung 3.17: Erhöhte Proteinexpression von Apolipoprotein E sowohl in NS3/4A-exprimierenden HepG2 Zellen als auch in subgenomischen HCV Replikanzellen. A) Huh7 wt-, Huh7 Core-NS3- bzw. Huh 9-13-Zellen sowie HepG2 mock- bzw. HepG2 NS3/4A-Zellen wurden bei Erreichen einer 80 %igen Konfluenz lysiert. Jeweils 40 µg Protein/Spur wurden im Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden ApoE, HCV NS3 und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. **B)** und **C)** Die Quantifizierung erfolgte durch densitometrische Auswertung. Normalisiert wurde gegen GAPDH. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von vier unabhängigen Experimenten erstellt. Die Signifikanz (*) wurde mittels des Student's t-Tests berechnet ($p < 0,05$).

Dass die ApoE Expression in Gegenwart von HCV eine Erhöhung erfährt, sollte durch die Analyse von Proben HCV-infizierter Patienten unterstützt werden (Abbildung 3.18). In der Analyse von Proteinextrakten aus sieben chronisch HCV-infizierten Patienten konnte zwar in vier der untersuchten Proben im Vergleich zur durchschnittlichen Expression von ApoE in Proben von HCV-negativen Patienten tendenziell eine Steigerung der Expression beobachtet werden, während bei den anderen drei Proben eher eine Hemmung der Expression zu beobachten war, so dass sich zur Regulation der ApoE Expression in HCV-infizierten Patienten keine Aussage ableiten lässt. Hier ist die Analyse einer größeren Probenzahl notwendig, um eine Aussage zur differentiellen Expression treffen zu können.

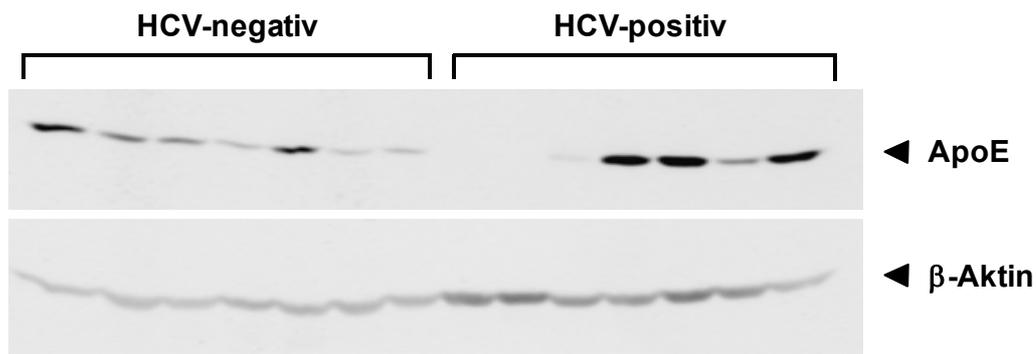


Abbildung 3.18: **Proteinexpression von Apolipoprotein E in Patienten mit chronischer HCV Infektion.** Aus Lebergewebe von HCV-infizierten Patienten sowie den entsprechenden Kontrollen wurden Vollzelllysate hergestellt. 30 µg Protein/Spur wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden ApoE und β-Aktin (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

Da die Lokalisation eines Proteins auch maßgeblich seine Funktion und Wirkung in der Zelle bestimmt, wurde zunächst die subzelluläre Verteilung von Apolipoprotein E in den Hepatomazelllinien Huh7 wt, Huh7 Core-NS3 und Huh 9-13 analysiert. Hierbei ergab sich, in naiven Huh7-Zellen und in Huh7-Zellen, die den Core-NS3 Proteinkomplex exprimieren, ein zytoplasmatisches und perinukleäres Verteilungsmuster von ApoE, während in Zellen, die ein funktionstüchtiges subgenomisches Replikon exprimieren (Huh 9-13) eine fokale, perinukleär lokalisierte Kondensation von ApoE nachzuweisen war (Abbildung 3.19).

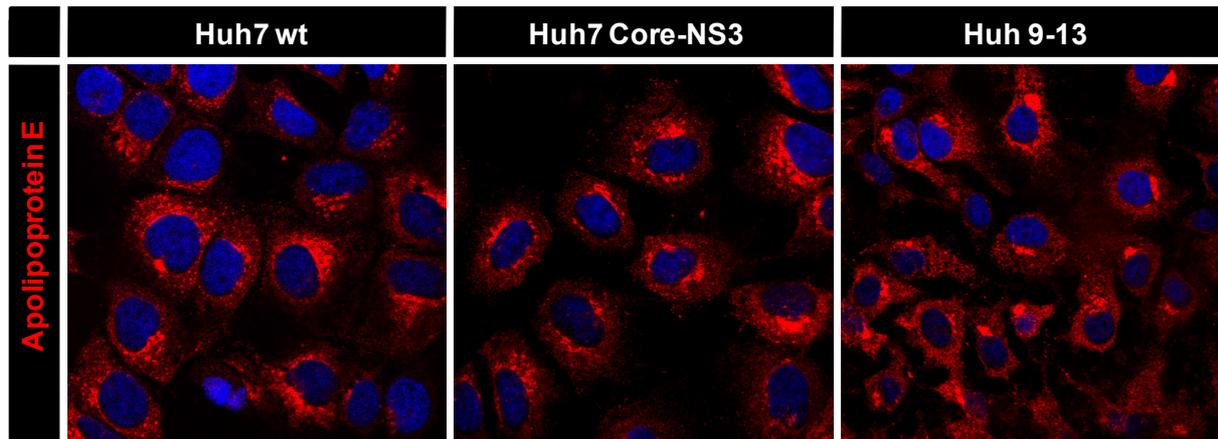


Abbildung 3.19: **Subzelluläre Lokalisation von Apolipoprotein E in den Hepatomazelllinien Huh7 wt, Huh7 Core-NS3 und Huh 9-13.** Huh7 wt-, Huh7 Core-NS3- und Huh 9-13-Zellen wurden auf Glasdeckgläsern ausgesät und nach Erreichen einer 60 %igen Konfluenz mit Methanol fixiert. ApoE wurde mittels eines ApoE-spezifischen Primärantikörpers und eines Cy3-konjugierten Sekundärantikörpers (Anregung bei 543 nm) visualisiert. Die Färbung wurde mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops analysiert.

Um einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion von Apolipoprotein E mit den Proteinen des Hepatitis C Virus zu erhalten, wurden Kolokalisationsstudien in den HCV Replikon enthaltenen Huh 9-13 und in den Huh7 Core-NS3-Zellen durchgeführt. Die Immunfluoreszenz-Analyse der Doppelfärbungen des strukturellen HCV Proteins Core und des Apolipoproteins E ergab eine partielle Kolokalisation beider Proteine, insbesondere im perinukleären Bereich der Zellen (Abbildung 3.20).

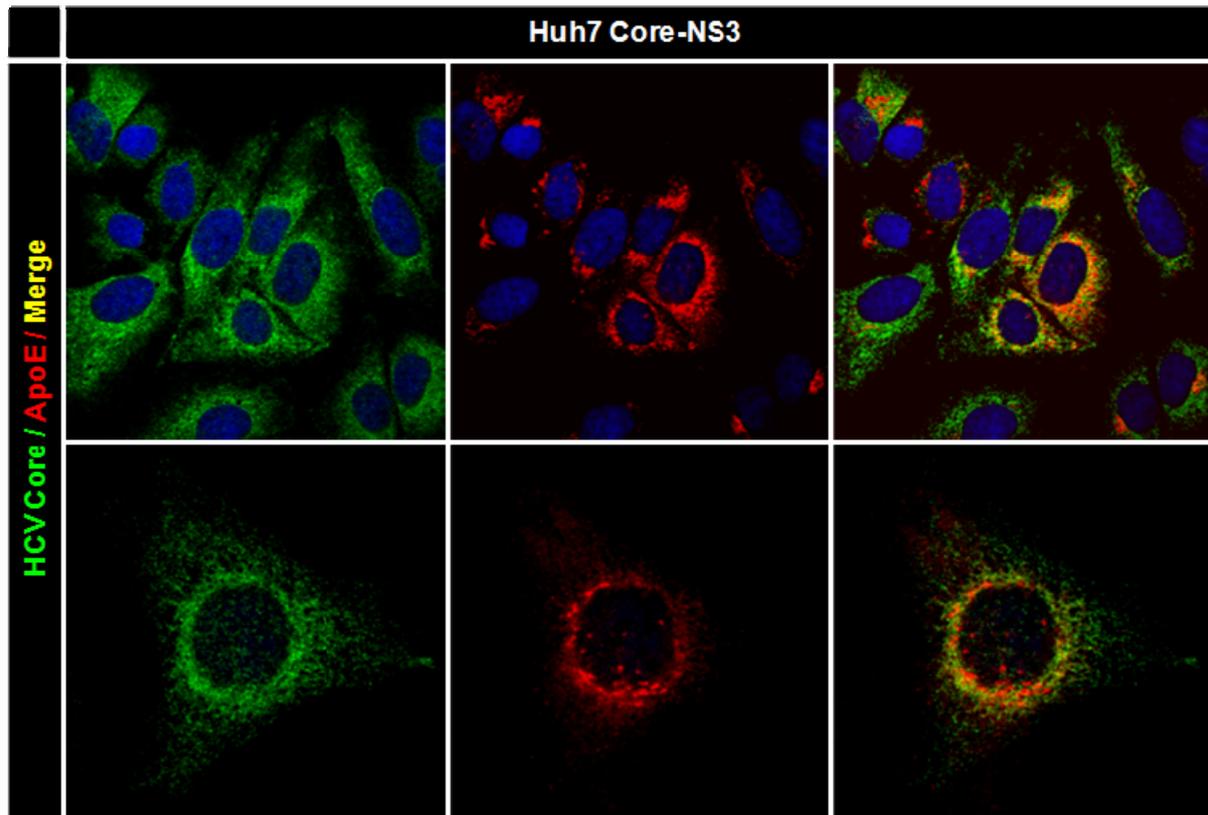


Abbildung 3.20: **Kolokalisation von Apolipoprotein E mit dem strukturellen HCV Protein Core.** Huh7 Core-NS3-Zellen wurden auf Glasdeckgläsern ausgesät und nach Erreichen einer 60 %igen Konfluenz mit Methanol fixiert. ApoE wurde mittels eines ApoE-spezifischen Primärantikörpers und eines Cy3-konjugierten Sekundärantikörpers (Anregung bei 543 nm) und HCV Core über den Primärantikörper C750 und eines Cy5-konjugierten Sekundärantikörpers (Anregung bei 633 nm) angefärbt. Die Cy5-Färbung wurde hier zur besseren Visualisierung der Kolokalisation grün dargestellt. Die Färbung wurde mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops analysiert. Merge: Übereinanderlagerung der roten und grünen Aufnahme.

In der Analyse der Kolokalisation von ApoE mit den verschiedenen nichtstrukturellen Proteinen von HCV in Huh-Zellen die das subgenomische Replikon exprimieren, ließ sich ein divergentes Muster für die verschiedenen HCV Proteine belegen (Abbildung 3.21). Während NS3 und NS4A im Vergleich zu ApoE ein ähnliches subzelluläres Verteilungsmuster aufwiesen und damit eine deutliche Kolokalisation, ließ sich für die beiden weiteren Bestandteile des subgenomischen Replikons NS5A und NS5B bei eher diffusem, prominent perinukleären Verteilungsmuster nur eine geringe Kolokalisation mit ApoE nachweisen.

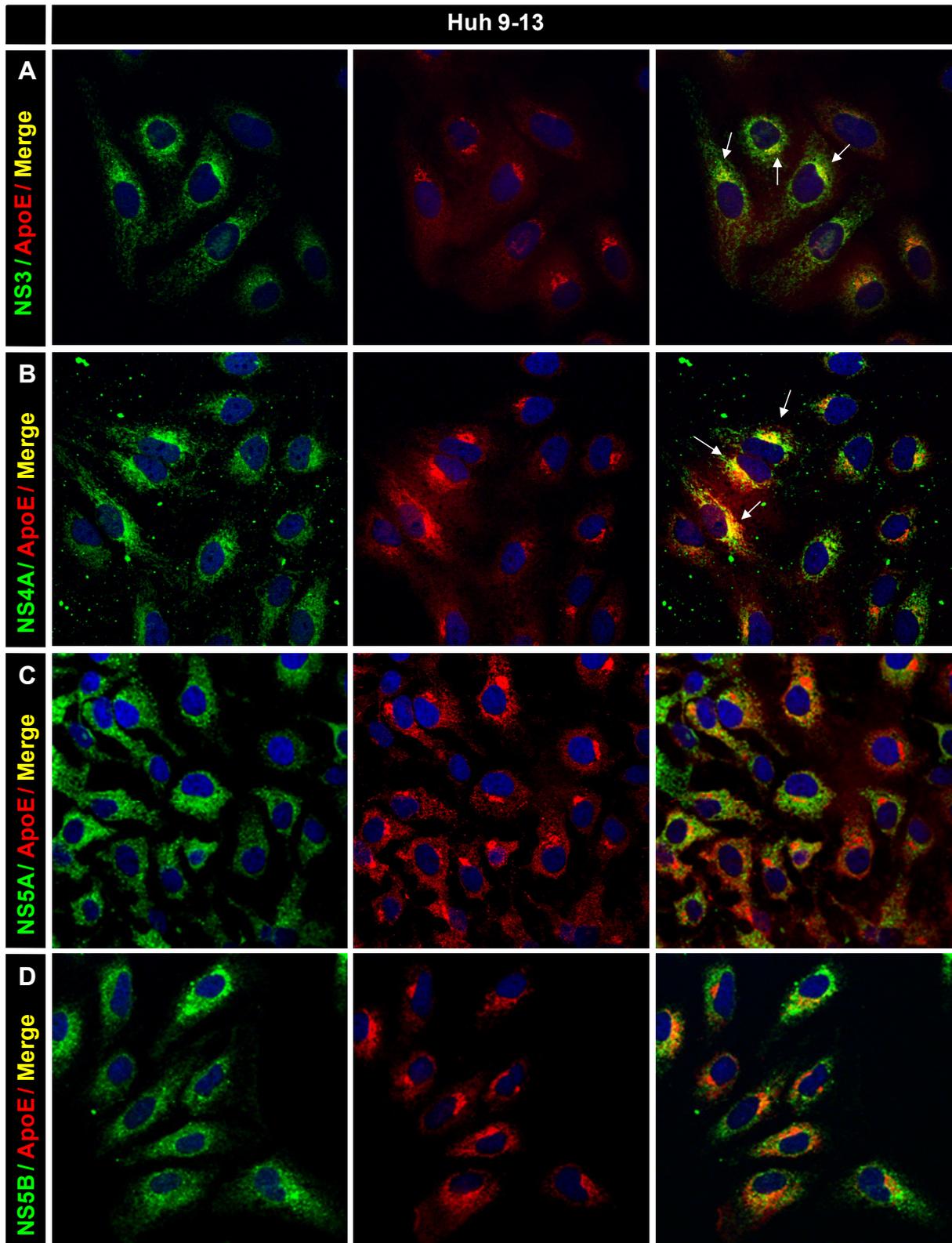


Abbildung 3.21: **Kolokalisation von Apolipoprotein E mit den nichtstrukturellen HCV Proteinen.** Huh 9-13-Zellen wurden auf Glasdeckgläsern ausgesät und nach Erreichen einer 60 %igen Konfluenz mit Methanol fixiert. ApoE wurde mittels eines ApoE-spezifischen Primärantikörpers und eines Cy3-konjugierten Sekundärantikörpers (Anregung bei 543 nm) und die nichtstrukturellen HCV Proteine NS3, NS4A, NS5A und NS5B mittels ihrer spezifischen Primärantikörper und eines Fitc-konjugierten Sekundärantikörpers (Anregung bei 488 nm) angefärbt. Die Färbung wurde mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops analysiert. Merge: Übereinanderlagerung der roten und grünen Aufnahme.

Bei der Analyse des subzellulären Verteilungsmusters von NS3 und ApoE und der ausgeprägten Kolokalisation beider Proteine wird deutlich, dass sowohl NS3 als auch ApoE in dem gleichen intrazellulären Kompartiment akkumulieren. Durch weitere Immunfluoreszenz-Analysen konnte dieses Kompartiment als Golgi-Komplex identifiziert werden (Abbildung 3.22).

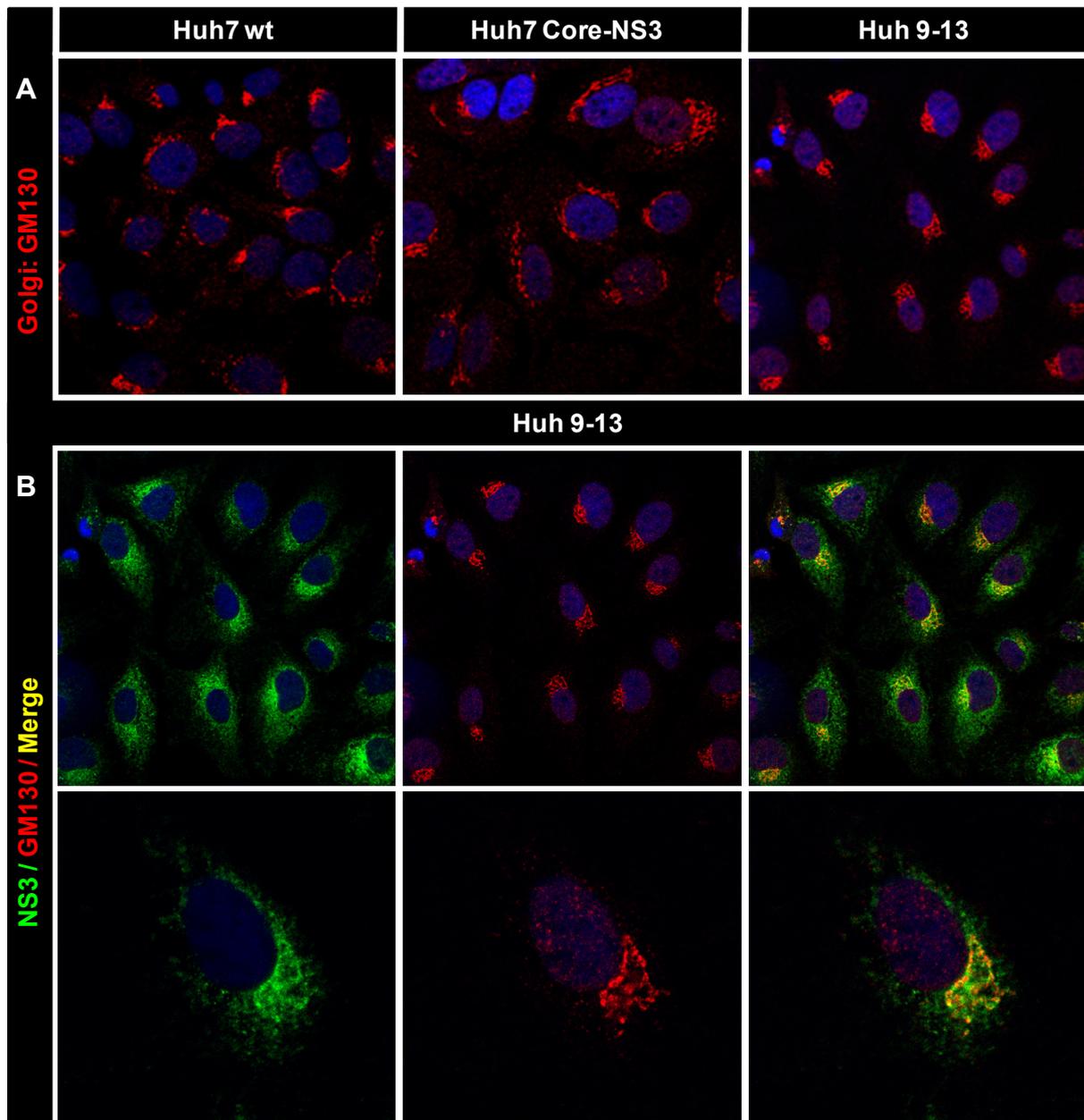


Abbildung 3.22: **Kolokalisation des Golgi-Markers GM130 mit dem nichtstrukturellen HCV Protein NS3.** Huh 9-13-Zellen wurden auf Glasdeckgläsern ausgesät und nach Erreichen einer 60 %igen Konfluenz mit Methanol fixiert. Der Golgi wurde mittels eines GM130-spezifischen Primärantikörpers und eines Cy3-konjugierten Sekundärantikörpers (Anregung bei 543 nm) und NS3 mittels eines NS3-spezifischen Primärantikörpers (Abcam) und eines Fitc-konjugierten Sekundärantikörpers (Anregung bei 488 nm) angefärbt. Die Färbung wurde mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops analysiert. Merge: Übereinanderlagerung der roten und grünen Aufnahme.

Die 2D-Gelelektrophoresetechnik ergab 18 differentiell exprimierte Proteine in den transgenen NS3/4A-Mäusen. Ein Protein, das in den transgenen Tieren herabreguliert war und damit ein potenzielles Substrat der Protease des NS3/4A-Komplexes sein könnte, war Apolipoprotein E. Untersuchungen auf RNA- und Proteinebene ergaben allerdings eine erhöhte Expression in den HCV Replikon tragenden Huh 9-13-Zellen und in den konstitutiv NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zellen. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Analysen konnte belegt werden, dass Apolipoprotein E mit den nichtstrukturellen Proteinen NS3 und NS4A, aber nicht mit NS5A und NS5B kolokalisieren. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass diese Kolokalisation in bestimmten Strukturen der Replikonzellen zu beobachten war, die daraufhin als Golgi-Komplex identifiziert werden konnten.

4 DISKUSSION

4.1 Generierung und Charakterisierung humaner Hepatitis C Virus (HCV)-spezifischer Antikörperfragmente

Weltweit leiden schätzungsweise 170 Millionen Menschen an einer chronischen HCV Infektion. Mehr als 80 % der Patienten, die mit diesem RNA Virus infiziert werden, entwickeln eine persistierende Infektion. Eine HCV Infektion ist damit eine der führenden Ursachen für chronisch entzündliche Leberschädigungen, die in ihrem Verlauf zu Entwicklung einer Leberzirrhose, und in der Folge auch zu einem hepatozellulären Karzinom führen können. Obwohl in der medikamentösen Therapie der chronischen HCV Infektion Fortschritte gemacht wurden, ist es weiterhin nur begrenzt möglich, bestimmte Subgruppen, wie Patienten mit Infektion des Genotyps 1, mit hoher Virämie oder dem Vorliegen einer Zirrhose, erfolgreich zu behandeln. Vor diesem Hintergrund könnte die intrazelluläre Expression Virus-spezifischer Antikörperfragmente eine vielversprechende, molekularbiologische Strategie zur Therapie der HCV Infektion darstellen. Rekombinante Antikörperfragmente haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie können zur präventiven Immunisierung, Diagnostik und Behandlung eines breiten Spektrums verschiedener Erkrankungen wie Infektionskrankheiten, Krebserkrankungen, neurologischen Funktionsstörungen und Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden ^[143]. Rekombinante Einzelkettenantikörperfragmente besitzen aufgrund der geringen Größe, der einfachen Herstellung und der verbesserten sowie homogenen Gewebepenetration entscheidende Vorteile gegenüber vollständigen Antikörpern, was durch *in vivo* Untersuchungen experimentell belegt werden konnte ^[116]. Das Einzelkettenantikörperfragment stellt somit als kleinste antigenbindende Einheit möglicherweise ein geeignetes Format für die intrazelluläre Immunisierung dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden humane monoklonale Antikörperfragmente, die gegen spezifische Bereiche des HCV Core Proteins gerichtet sind, mit Hilfe der Phage-Display-Technologie isoliert, charakterisiert und detailliert analysiert. Die Verwendung der Phage-Display-Technologie ermöglicht die Präsentation einer kombinatorischen Antikörperbibliothek, die aus Knochenmarksaspiraten von chronisch HCV-infizierten Patienten generiert wurde. Mittels Affinitätsselektion, die gegen ausgewählte Peptide verschiedener Regionen des HCV Core Proteins erfolgte, gelang die Anreicherung hochaffiner Antikörperfragmente (Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1). Für die Affinitätsselektion wurden Peptide ausgewählt, deren Aminosäuresequenz für die Bindung von HCV Core an die Signalproteine JAK (Jak-Peptid) ^[1] und STAT3 (Stat-Peptid) ^[3] verantwortlich gemacht werden. Die Arbeiten der Arbeitsgruppe um Yoshimura legen darüber hinaus nahe, dass die direkte Protein-Protein-Interaktion von STAT3 und HCV Core zu einer konstitutiven

Aktivierung von STAT3 und der Induktion STAT3-abhängiger Gene führt ^[3]. Insgesamt wurden je 300 monoklonale Jak- und Stat-Einzelkettenantikörperfragmente isoliert und auf ihre Bindungseigenschaften hinsichtlich des Zielproteins HCV Core untersucht. Für die Mehrzahl der isolierten Antikörperfragmente wurde im ELISA-Format eine gute Bindungsaffinität gegenüber den zur Selektion eingesetzten Peptide nachgewiesen, wohingegen die Bindung an das vollständige HCV Core Protein nur bei einer geringen Anzahl der scFvs beobachtet werden konnte (Abbildung 3.2). Die Untersuchung der Bindung der Antikörperfragmente an denaturiertes HCV Core Protein mittels Western Blot Analysen bestätigte die Beobachtungen aus den ELISA-Untersuchungen (Abbildung 3.4). Da mit Hilfe des ELISAs und der Western Blot Analysen nur die Bindung der scFvs an linearisierte Epitope untersucht werden konnte, wurde nach Umklonierung der Antikörperfragmente in eukaryotische Expressionsvektoren die Bindung der Einzelkettenantikörperfragmente *in vivo* und damit die Bindung an natürlich vorkommende, konformationelle Epitope des HCV Core Proteins untersucht. Die Koexpression der Antikörperfragmente und des HCV Core Proteins führte zu einer Veränderung der Lokalisation der scFvs. Das zuvor zytoplasmatische Expressionsmuster der Einzelkettenantikörperfragmente wies in Anwesenheit von HCV Core eine vesikuläre, perinukleäre Lokalisation auf, wie es für das Core Protein typisch ist ^[29, 30] (Abbildung 3.7: B). Die intrazelluläre Umverteilung der Antikörperfragmente in Anwesenheit von Core legt nahe, dass diese *in vivo* an ihr Zielprotein binden. Die erfolgreiche intrazelluläre Expression der selektierten Antikörperfragmente lässt weiterhin den Schluss zu, dass die Antikörperfragmente intrazellulär stabil sind. Es ist bekannt, dass das reduzierende Milieu des Zytoplasmas zur Verhinderung der Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken und damit zu einem Stabilitätsverlust führen kann ^[144, 145]. Bei keinem der für die Koexpressionsstudien ausgewählten Einzelkettenantikörperfragmente konnte eine entsprechende Störung in der intrazellulären Expression beobachtet werden (Abbildung 3.7: A), so dass ein Verlust der Stabilität dieser Proteine unwahrscheinlich ist. Um die intrazelluläre Interaktion von Antikörperfragment und Antigen *in vivo* weiter zu untermauern, wurden zusätzlich Untersuchungen mittels der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik (FRET) durchgeführt. Trotz der beobachteten Antigen-induzierten Umverteilung der Antikörperfragmente in andere zelluläre Kompartimente ließ sich bei keinem der selektierten Jak- bzw. Stat-Antikörperfragmente ein positiver FRET-Effekt nachweisen, so dass anzunehmen ist, dass es *in vivo* zu keiner direkten bzw. nur zu einer schwachen Interaktion von Antikörper und Antigen kommt.

Der Vorteil in der Verwendung von Peptiden bei der Affinitätsselektion liegt einerseits in der Umgehung des aufwendigen Verfahrens des Epitop-Mappings und andererseits in der direkten Auswahl charakterisierter, funktioneller Proteinbereiche. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen antagonistische Antikörper zu erhalten, die tatsächlich mit einer

Beeinträchtigung des viralen Lebenszyklus einhergehen. Die erzielten Ergebnisse legen jedoch nahe, dass dieser Ansatz nur sehr eingeschränkt geeignet ist, Antikörper zu generieren, die auch im *in vivo* Kontext funktionell sind. Der verantwortliche Sequenzabschnitt für die Interaktion mit JAK bzw. STAT3 wurde durch Verkürzungs-mutanten ^[1, 3] definiert. Dieser Ansatz liefert jedoch keine Aussage über das vollständige Epitop und berücksichtigt nicht die dreidimensionale Faltung des Proteins. Die auf diese Weise generierten Antikörper erkennen somit zwar die verwendeten Peptidsequenzen, sind jedoch nicht in der Lage entsprechende Motive im Kontext des Gesamtproteins zu erkennen. Entsprechend konnten über den peptidbasierten Ansatz zwar Antikörper isoliert werden, die das gereinigte Peptid erkennen und auch binden, jedoch nicht das gesamte Core Protein. Die Funktionalität der verwendeten Antikörperbibliothek für die Isolierung inhibitorischer Antikörper wurde in vorangehenden Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe belegt ^[131, 132]. Für die Affinitätsselektion wurden hier die vollständigen HCV Proteine eingesetzt. Der Nachweis, dass dieser Ansatz effizienter in der Generierung inhibitorischer Einzelkettenantikörperfragmente ist, erfolgte durch die Isolierung des Antikörperfragmentes Sc42 ^[2], der gegen das vollständige HCV Core Protein gerichtet ist. Dieses, im Rahmen anderer Projekte der Arbeitsgruppe generierte Antikörperfragment bindet HCV Core *in vitro* wie auch *in vivo* ^[2]. Vergleichbar mit den Jak/Stat-Antikörperfragmenten weist dieses Antikörperfragment in Anwesenheit des Core Proteins ein verändertes zelluläres Verteilungsmuster auf – mit vesikulär, perinukleär betonter, dem HCV Core Protein vergleichbarer Lokalisation (Abbildung 3.7: B). Im Gegensatz zu den peptidbasierten Antikörperfragmenten lässt sich bei dem gegen das vollständige HCV Core isolierte Antikörperfragment jedoch auch die direkte intrazelluläre Protein-Protein-Interaktion mit Hilfe der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-technik (FRET) eindeutig nachweisen (Abbildung 3.10). In weiterführenden Untersuchungen konnte das Epitop innerhalb des Core Proteins bestimmt werden, das für die Interaktion des Sc42 verantwortlich ist und somit die inhibitorischen Effekte vermittelt (Abbildung 3.8). Das Bindungsmotiv des Sc42 beinhaltet im Wesentlichen die Aminosäuren an Position 82 bis 87 innerhalb des Core Proteins (PWPLYG) als Zielsequenz und ist überdies in allen sechs Genotypen des Hepatitis C Virus konserviert. Übereinstimmend mit der Beobachtung des konservierten Bindungsmotivs konnte belegt werden, dass der Sc42 sowohl das HCV Core Protein des Genotyps 1b als auch des Genotyps 2a erkennt und sequestriert (Abbildung 3.14). Interessanterweise überlappt das identifizierte Bindungsmotiv PWPLYG teilweise mit der putativen Interaktionsdomäne der JAK-Signalmoleküle innerhalb des HCV Core Proteins ^[1]. Es ist bekannt, dass JAK-bindende Proteine wie zum Beispiel humanes und murines gp130 ^[146], die IL-6 Rezeptoruntereinheit ^[147] und der humane Erythropoetinrezeptor^[148] über eine Prolin-reiche Sequenz PXXPPX (auch als Box 1 Motiv bezeichnet) mit JAK-Proteinen interagieren ^[147, 149]. Diese Region innerhalb des HCV Core

Proteins, die an Aminosäureposition 79-84 vorliegt, ist innerhalb der HCV Genotypen hochkonserviert und für die Interaktion von HCV Core mit JAK-Proteinen essentiell. Weiterhin wird diese Interaktion für die Modulation des JAK/STAT-Signalweges verantwortlich gemacht ^[1, 3]. Die Arbeitsgruppe von Hosui konnte belegen, dass HCV Core mit den JAK-Proteinen JAK1 und JAK2 direkt interagiert und somit den JAK/STAT-Signalweg unter Stimulation mit IL-6 differentiell reguliert ^[1]. Mutiertes HCV Core, dessen Box 1 Motiv verändert wurde und demzufolge nicht an die Januskinasen binden kann, war nicht mehr in der Lage, einen inhibitorischen Effekt auf den JAK/STAT-Signalweg unter IL-6 Stimulation auszuüben. Die HCV Core-vermittelte Hemmung des JAK/STAT-Signalweges resultiert demzufolge aus der direkten Interaktion zwischen HCV Core und den JAK-Proteinen. Dieser suppressive Effekt von Core könnte einerseits durch die kompetitive Inhibition der Interaktion von gp130 mit den JAK-Proteinen hervorgerufen werden, andererseits könnte die Bindung von Core an die JAK-Proteine zu einer konformationellen Änderung in der Struktur der JAK-Proteine führen und somit deren Kinaseaktivität vermindern. Weiterhin konnten auch andere Arbeitsgruppen modulatorische Effekte von HCV Core auf die JAK/STAT-Signaltransduktion demonstrieren. So führt die direkte Protein-Protein-Interaktion von HCV Core mit STAT3 zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT3 und hierdurch zu einer gesteigerten zellulären Transformation bzw. Proliferation der Zellen, hervorgerufen durch die Hochregulation von Bcl-XL und Cyclin D1 ^[3]. Als Zielgen von STAT3 kommt es neben einer Induktion von Bcl-XL und Cyclin D1 auch zu einer Induktion von SOCS3 durch HCV Core ^[3] und bedingt hierdurch erklärt sich möglicherweise auch der inhibitorische Einfluss von HCV Core auf die JAK/STAT-abhängige Signalübertragung von beispielsweise IFN α oder Insulin ^[139, 150, 151]. Die Aufhebung dieser modulatorischen Effekte von HCV Core auf die JAK/STAT-vermittelte Signaltransduktion durch das Antikörperfragment Sc42 könnte somit sowohl die Core-induzierte Proliferation und die sich daraus resultierende Entartung bzw. die Entwicklung eines HCCs verhindern als auch die wirtseigene Zytokinproduktion über den JAK/STAT-Signalweg, und damit die antivirale Immunabwehr wiederherstellen.

Das identifizierte Bindungsmotiv des Sc42 überlappt nicht nur mit der JAK-Interaktionsdomäne innerhalb des Core Proteins, sondern konnte auch in den Sequenzbereichen der Aminosäurereste 138-141 und 143-146 des Core Proteins, welche als D2-Domäne bekannt ist ^[29-31], wieder gefunden werden. Diese Regionen sind maßgeblich bei der Bindung von Core an die Lipidtröpfchen beteiligt ^[31, 138]. Die D2-Domäne ist dabei für die korrekte Faltung der D1-Region des HCV Core Proteins essentiell und spielt bei der Assoziation von Core an Membranstrukturen wie das ER oder die Lipidtröpfchen ^[30, 31] eine entscheidende Rolle. Die Arbeitsgruppe um Boulant konnte nachweisen, dass die hydrophoben Aminosäuren der D2-Domäne von HCV Core für die Assoziation an Lipidtröpfchen verantwortlich sind. Beobachtungen legen nahe, dass die Bindung von Core an LDs und die Beweglichkeit von

Core an diesen Membranstrukturen ^[138] mit einer effizienten Produktion infektiöser Viruspartikel einhergeht ^[36, 37] und die Beladung der LDs mit dem HCV Core Protein einen fortschreitenden Prozess während der HCV Infektion darstellt ^[36].

Mittels transientser Kotransfektionsuntersuchungen von Core und dem Sc42 in der Hepatomazelllinie Huh7 konnte die Bindung von Core an LDs nicht aufgehoben werden (Abbildung 3.9), wohingegen im JFH1-System eine verringerte Bildung viraler Partikel in Anwesenheit des Sc42 beobachtet werden konnte (Jisu Li, unveröffentlichte Daten). Die Assoziation von Core an Lipidtröpfchen tritt nicht nur in HCV-infizierten Hepatozyten von Schimpansen auf, sondern konnte auch in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen und transgenen Mausmodellen bestätigt werden ^[34, 35, 152, 153]. Eine starke Assoziation von HCV Core an die Lipidtröpfchen liegt ebenso in dem infektiösen Virusmodell JFH1 vor ^[154], was auf eine entscheidende Rolle der Lipidtröpfchen für den viralen Lebenszyklus von HCV hinweist. Weiterhin konnte belegt werden, dass die funktionelle Bedeutung des Core Proteins in der Rekrutierung der nichtstrukturellen Proteine an die Lipidtröpfchen liegt, insbesondere von NS5A sowie der HCV RNA. Aufgrund dieser Beobachtung wird angenommen, dass HCV Core vollständig aktive Replikationskomplexe an die LDs rekrutiert und somit eine Umgebung schafft, die für die Virusproduktion unerlässlich ist. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Core eine gesteigerte Produktion von LDs induziert und damit wahrscheinlich ursächlich zur Entstehung eines abnormalen Lipidmetabolismus ^[39] und einer Steatose ^[38] beiträgt, welches beides Krankheitsbilder sind, die durch eine chronische HCV Infektion verursacht werden ^[155]. Die intrazelluläre Interaktion des Sc42 mit dem Core Protein könnte demnach durch die Bindung an diese Regionen nicht nur die Interaktion mit den Lipidtröpfchen aufheben, sondern auch die korrekte Faltung des Core Proteins beeinflussen. Dies würde sich zum einen in einer verminderten Core Expression in Anwesenheit des Sc42 widerspiegeln und zum anderen die Bildung infektiöser Viruspartikel minimieren (Abbildung 3.14). Das Einbringen des Sc42 führte weiterhin zur Reduktion von Core-bedingten pathologischen Effekten wie die Verminderung der Zellproliferationsrate (Abbildung 3.14). Zwar beeinflusst der Sc42 nicht direkt die virale Replikation des Virus (Abbildung 3.14), aber ausgehend von der Funktion des Core Proteins könnte dieses Antikörperfragment zu einer Verringerung der Infektiosität durch Hemmung des Viruszusammenbaus führen. Die Bindung des Sc42 an das virale Core Protein könnte in die Nukleokapsid-Bildung und RNA Verpackung des Virus eingreifen. Das HCV Core Protein wird als bedeutender viraler Faktor bezüglich der HCV Pathogenese betrachtet. Seine Sequestrierung durch das intrazelluläre Antikörperfragment Sc42 kann zu einer Verringerung bzw. Milderung HCV-assoziiierter pathologischer Veränderungen wie Zelltransformation, Steatose und weiterführend des HCCs führen.

Das therapeutische Potential humaner monoklonaler Antikörperfragmente wird auch durch Untersuchungen, die zur Isolierung von scFvs gegen die nichtstrukturellen HCV Proteine NS3 und NS5B geführt haben, unterstützt. Für diese rekombinanten Antikörperfragmente wurde sowohl eine effiziente Bindung an ihr Zielprotein als auch die Inhibierung der enzymatischen Aktivität *in vitro* und *in vivo* demonstriert ^[127, 130-132]. Isolierte monoklonale Antikörperfragmente, die gegen die Polymerase des Hepatitis C Virus gerichtet sind, führen durch die spezifische Bindung an die Palm-Domäne von NS5B, die Teil des katalytisch aktiven Zentrums ist, zu einer starken Inhibierung der enzymatischen Aktivität von NS5B^[130]. In der eigenen Arbeitsgruppe wurden vor allem inhibitorische Antikörperfragmente gegen die Helikase NS3 des Hepatitis C Virus entwickelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die isolierten humanen Einzelkettenantikörperfragmente die Helikaseaktivität um nahezu 100 % inhibieren ^[132]. Weitere Veröffentlichungen legen nahe, dass die Inhibierung der Helikaseaktivität durch intrazelluläre Immunisierung eine Reduktion der HCV RNA Replikation und somit eine Hemmung der viralen Proteinexpression verursacht ^[156, 157]. Weiterhin wurden neutralisierende Antikörperfragmente gegen konservierte Epitope innerhalb der hypervariablen Region I des Hepatitis C Virus isoliert ^[158, 159]. Diese rekombinanten Antikörper wirken einerseits über das Abfangen von HCV durch die Bindung an die HVR1-Region und andererseits über die Blockierung der viralen Anheftung bzw. Bindung von HCV an die Zielzellen ^[160-164]. Obwohl der Nachweis der inhibitorischen Wirkung dieser Antikörper durch die Untersuchung in Mausmodellen und klinischen Studien noch aussteht, stellen sie doch vielversprechende Kandidaten für eine intrazelluläre Immunisierung gegen HCV dar. Erste monoklonale Antikörper gegen HCV wie Tarvacin (Bavituximab) und HepeX-C werden zurzeit in klinischen Studien der Phase I untersucht. Tarvacin bindet ein anionisches Phospholipid auf der Virus-infizierten Zelle und HepeX-C ist gegen das Hüllprotein E2 gerichtet.

Die Bedeutung rekombinanter Antikörperfragmente liegt darüber hinaus in der Anwendung auf dem Gebiet der Forschung und Diagnostik. Die Antikörper können dazu genutzt werden, ein besseres Verständnis über Mechanismen, die den Viruseintritt, die Virusneutralisierung und den viralen Lebenszyklus betreffen, beizutragen. Über 30 akademische Labore weltweit sind an der Entwicklung von humanen antiviralen Antikörpern beteiligt, die gegen insgesamt 20 verschiedene Viren, die 14 Virusfamilien repräsentieren, gerichtet sind.

Die Kopplung der isolierten Antikörperfragmente an Fluorophore und damit ihren Einsatz auf dem Gebiet der Diagnostik bzw. bei Untersuchungen des viralen Lebenszyklus durch *in vivo* Lebendmikroskopie erweitert die Bedeutung des isolierten Sc42 ^[165, 166].

Zurzeit befinden sich über 100 Antikörper als Proteintherapeutika in klinischer Erprobung ^[117]. Insbesondere aus den klinischen Studien der Phase II wird ersichtlich, dass therapeutische Proteine wie Antikörper und ihre Fusionsproteine zunehmend an Bedeutung gewinnen – so

werden rund 65 % der Proteinwirkstoffe durch Antikörper gestellt. Auf dem Gebiet der Virusforschung und der Onkologie wurden bereits intrazelluläre Einzelkettenantikörperfragmente in klinischen Studien untersucht und zeigten sich erfolgversprechend bezüglich einer klinischen Zulassung.

Ihre Wirkung beruht auf ihren neutralisierenden Eigenschaften, das heißt die Fähigkeit des Antikörpers, den Virus zu binden und zu inaktivieren. Dies konnte für zahlreiche rekombinante Antikörper nachgewiesen werden. Konformationelle Veränderungen der viralen Eintrittsproteine, insbesondere Veränderungen der Rezeptorbindung und der Rezeptor/Korezeptor-Bindung können sowohl die Anheftung des Virus als auch die Fusion des Virus mit der wirtseigenen Membran und damit den Viruseintritt in die Zielzelle blockieren^[167, 168]. Insbesondere für HIV konnten solche Antikörper entwickelt werden. So wurden zum Beispiel monoklonale Antikörper gegen die CD4-Bindungsstelle des gp120-Proteins^[169] des HI-Virus (KD-247: Phase I), gegen den Virusrezeptor^[170] in Form eines CD4-Antikörpers (TNX-355: Phase II) oder gegen den Korezeptor^[171] in Form eines CCR5/CXCR4-Antikörpers (PRO140: Phase I; HGS004/HGS101: Phase I vorklinisch) etabliert. Auch gegen andere humanpathogene Viren konnten neutralisierende Antikörperfragmente isoliert werden, unter anderem gegen die Rezeptor-Bindungsstelle des Hämagglutinins des Influenza-Virus^[172] sowie gegen die Rezeptorbindungsdomäne des SARS-Co-Virus^[173]. Die Antikörper, die gegen das Hämagglutinin des Influenza-Virus gerichtet sind, können nicht nur die Rezeptorbindung blockieren, sondern greifen auch in die durch niedrigen pH-Wert induzierte konformationelle Änderung des Hämagglutinin-Proteins ein und verhindern somit die Fusion von viraler und endosomaler Membran und damit die Internalisierung des Proteins durch Endozytose^[174, 175]. Der bisher einzige von der FDA freigegebene Antikörper zur Behandlung einer viralen Erkrankung ist Palivizumab (Synagis). Er ist gegen das Glykoprotein F des humanen respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) gerichtet und wird als passive Immunisierung zur Prophylaxe einer RSV-Infektion bei Kindern eingesetzt^[176, 177]. Auch dieser Antikörper verhindert den Viruseintritt durch Hemmung der Fusion des viralen Glykoproteins mit der Zielzelle.

Ein entscheidender Vorteil bei der intrazellulären Immunisierung mittels humaner monoklonaler Antikörper ist die Tatsache, dass es zu keiner ausgeprägten Immunreaktion kommt. Befunde aus Tiermodellen konnten belegen, dass die einmalige Gabe monoklonaler Antikörper zur Prophylaxe bzw. zur frühen Behandlung nach einer Infektion eine Erstinfektion bzw. das Fortschreiten der Erkrankung einer Vielzahl viraler Pathogene wie des SARS-Co-Virus^[178-180], des H5N1-Influenzavirus^[181] sowie des West-Nil-Virus^[182, 183] effizient verhindern kann. Eine passive Immunisierung auch zur Behandlung der Hepatitis C Virus Infektion könnte vor allem bei Personen mit hohem Infektionsrisiko wie beispielsweise Ärzte und Krankenhauspersonal zur Anwendung kommen. Eine passive Immunisierung gegen

HCV beinhaltet jedoch auch ein gewisses Risiko bezüglich der Patientensicherheit, da Impfstoffe gegen Viren zu einer antikörperabhängigen Steigerung der Infektion (*ADE = antibody dependent enhancement*) und somit zu einer Verstärkung der klinisch assoziierten Krankheitsbilder führen können. ADE wird durch Virus-spezifische Antikörper insbesondere bei einer Infektion mit Flaviviren ^[184, 185] ausgelöst, die zu einer Begünstigung des Virus-eintritts und damit der Virusaufnahme in Monozyten/Makrophagen und Granulozyten durch die Interaktion mit dem Fc γ -Rezeptor führen kann. Dies geschieht, wenn die Konzentration des Antikörpers unter den Titer, der für die Neutralisierung notwendig ist, fällt. ADE trat unter anderem *in vitro* bei der Verwendung von Antikörpern gegen das Dengue ^[186-188] - und das West-Nil-Virus ^[189] auf, wie auch in Affen, die eine Infusion mit Antikörpern gegen das Dengue-Virus erhielten ^[190]. Dieses Risiko könnte bei der Verwendung von Antikörperfragmenten, die ohne den Fc-Teil des Immunglobulins auskommen, wie im Falle der vorliegenden Arbeit beschrieben, jedoch umgangen werden. Durch das Fehlen des Fc-Teils wird allerdings auch die Eliminierung des Virus durch Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen unterbunden.

Für die therapeutische Anwendung der Antikörper kommt nicht nur die passive Immunisierung sondern auch die Gentherapie in Frage. Da es sich bei HCV um ein hepatotropes Virus handelt, sollten bei der Anwendung des Gentransfers vor allem infizierte Hepatozyten erreicht werden, was die Entwicklung eines sicheren und effektiven Vektors zur Gentherapie in der Leber voraussetzt. Das ideale System sollte sowohl spezifisch als auch effizient sein und dazu führen, dass eine ausreichende Expression des Antikörpers in der Zielzelle erreicht wird, um therapeutische Effekte erzielen zu können. Ein Gentransfer kann durch eine Vielzahl von Methoden erreicht werden. Zu den viralen Transfersystemen werden Retroviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren gezählt, wohingegen ein nichtviraler Transfer mit Hilfe von Liposomen und molekularen Konjugaten erreicht werden kann. Beide Systeme besitzen Vor- und Nachteile hinsichtlich der Patientensicherheit, der Effizienz, der Spezifität, der Immunogenität sowie der Toxizität ^[191]. Ein vielversprechender Ansatz für die Applikation von Antikörpern ist die Entwicklung von Protein-Transduktionsdomänen (PTD) und Membrantranslokationssequenzen (MTS). PTD/MTS sind Peptidsequenzen, die mit dem Antikörper fusioniert werden und somit die Zellmembran durchdringen können und das vollständige Protein in die entsprechende Zielzelle einbringen ^[192, 193]. Mit Hilfe dieser Methode konnte unter anderem die Suppression von Akt mittels eines Akt-spezifischen scFv in einer Reihe von Krebszelllinien, die eine für das Überleben der Zellen verantwortliche konstitutive Aktivierung von Akt aufweisen, erreicht werden ^[194].

Retrovirale und adenovirale Transfersysteme konnten bereits für einige Antikörper entwickelt werden. Adenoviren haben den Vorteil in hohen Dosierungen nahezu 100 % der Hepatozyten zu infizieren, eine Transduktion führt jedoch zur Induktion einer Hepatitis und die

Expression des Fremdgens erfolgt lediglich transient. Dagegen könnte der Einsatz von so genannten entbeinten (*gutless*) Adenoviren, die aufgrund der nur gering ausgeprägten T-Zellantwort eine längere Transgenexpression von bis zu einem Jahr gewährleisten, vielversprechend sein. Mit Hilfe des adenoviralen Gentransfersystems konnten bereits einige Antikörper auf dem Gebiet der Onkologie erfolgreich in ihren Zielzellen exprimiert werden ^[195-197]. Darunter befindet sich auch der ErbB2-Antikörper, der zur Behandlung von Patienten mit ovarialem Karzinom eingesetzt wird. Die Verwendung dieses Antikörpers hatte die Aufhebung des malignen Phänotyps des Ovarialkarzinoms zur Folge und ließ somit die Initiierung zur klinischen Erprobung (Phase I) mit Hilfe einer adenoviral-vermittelten Gentherapie zu ^[198]. Der Vorteil des Einsatzes von Retroviren zur Transgenexpression von humanen Antikörperfragmenten ist, dass dieser eine dauerhafte Expression des Transgens ermöglicht und zudem nicht mit einer nennenswerten Entzündungsreaktion verbunden ist. Der Nachteil konventioneller Retroviren, jedoch nicht der Subgruppe der Lentiviren, ist, dass sie nur die Fähigkeit besitzen, Zellen zu infizieren, die sich in der Teilungsphase befinden, da die Viren sonst nicht zur Integration in den Nukleus eindringen können ^[199-201]. Darüber hinaus bestehen bei Anwendung von integrierenden Retroviren Probleme der Patientensicherheit, was in der Studie von Hacein Bey-Abina *et al.* demonstriert wurde. Die retrovirale Vektorinsertion proximal zu dem LM02-Protoonkogen-Promotor führte drei Jahre nach dem Gentransfer zu einer unkontrollierten klonalen Proliferation von reifen T-Zellen ^[202]. Eine Weiterentwicklung hinsichtlich der Gentherapie stellen die Adeno-assoziierten Viren (AAV) dar. Die Vorteile der Adeno-assoziierten Viren gegenüber anderen viralen Vektorsystemen liegen in ihrer großen Sicherheit bei Anwendung am Menschen und in ihrer Fähigkeit, beinahe alle humanen Zelltypen, auch Hepatozyten und nicht proliferierende Zellen zu infizieren ^[203, 204]. Sie besitzen einen effizienten Mechanismus zur ortsgerichteten Insertion in das humane Chromosom 19, wodurch das onkogene Potential minimiert wird und eine stabile Expression des Transgens erreicht werden kann. Bisher erzielte Erfolge erscheinen insbesondere in Bezug auf die Langzeitexpression in verschiedenen Geweben vielversprechend. Therapeutisch bedeutende Befunde wurden mit dem Faktor IX ^[205] und unter Diabetes mellitus leidenden Mäusen ^[206] erreicht. In klinischen Studien der Phase II wurde mit Hilfe dieser Methode das Gen für den CFT-Rezeptor (*cystic fibrosis transmembrane receptor*) in Lungenepithelzellen transfiziert ^[207].

Um die therapeutische Relevanz des isolierten HCV Core-spezifischen Sc42 nachzuweisen, sind weitere Versuche hinsichtlich seiner neutralisierenden Eigenschaften notwendig. Erst wenn klar belegt werden kann, dass dieser Antikörper den Viruszusammenbau und somit die Infektiosität des Hepatitis C Virus vermindert, kann der nächste Schritt, d. h. die Überlegung, in welcher Form der Sc42 appliziert werden kann, erfolgen. Der Einsatz antiviraler Antikörper in Kombination mit niedermolekularen Substanzen, die den viralen Lebenszyklus nach dem

Viruseintritt wie beispielsweise die Polyproteinprozessierung oder die Replikation durch Inhibierung der viralen Enzyme NS3/4A oder NS5B des Hepatitis C Virus hemmen, könnte eine vielversprechende Therapieoption darstellen.

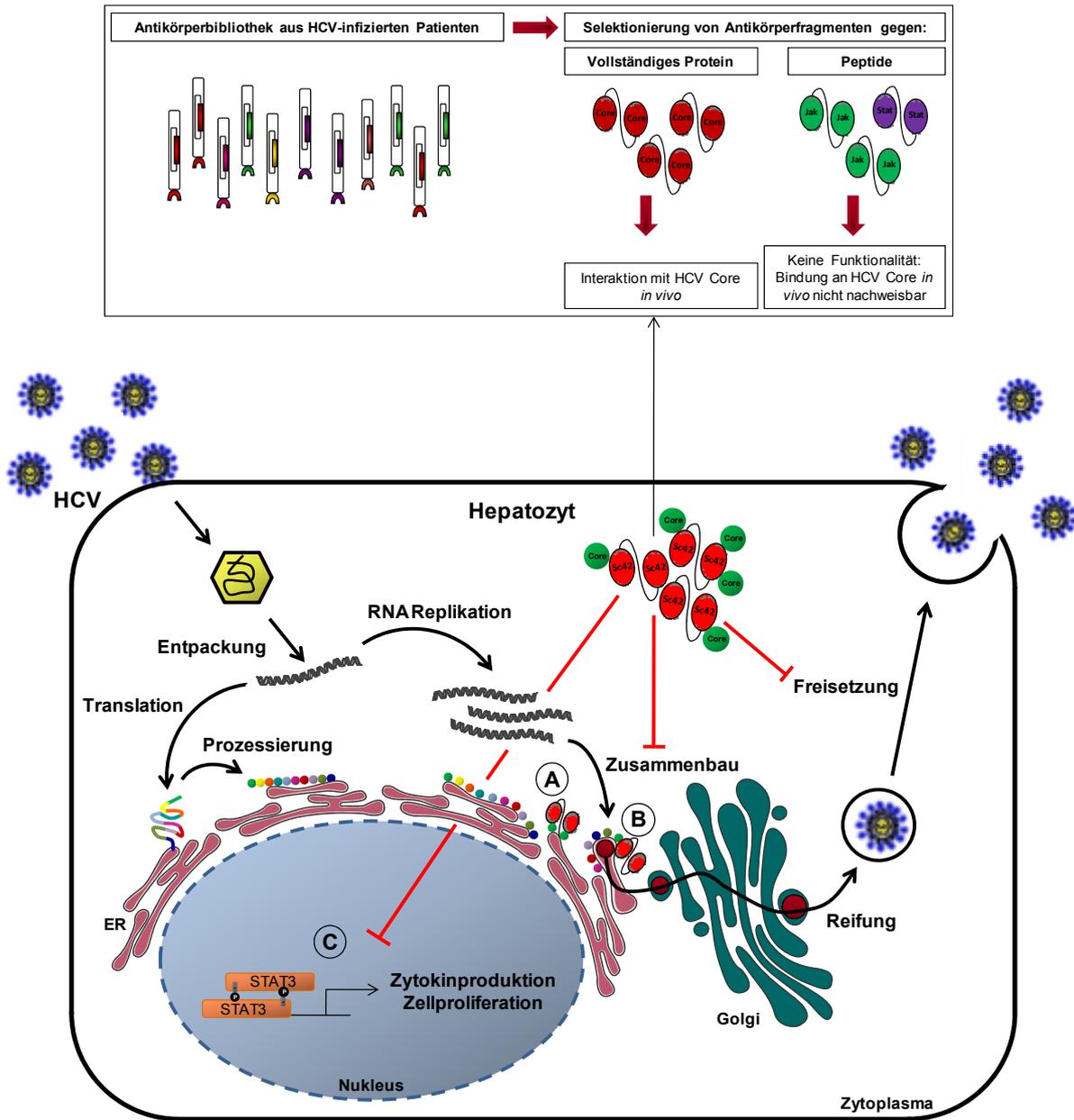


Abbildung 4.1: Zusammenfassende Darstellung der Isolierung humaner HCV Core-spezifischer Antikörperfragmente sowie der putativen, antiviralen Wirkung des Sc42. Durch die intrazelluläre Interaktion des Sc42 über eine Prolin-reiche Sequenz innerhalb des HCV Core Proteins wird sowohl die Core Proteinexpression (A) als auch die Core-bedingten, pathologischen Effekte, wie z. B. die Zellproliferationsrate (C), gehemmt. Das identifizierte Bindungsepitop ist für die Interaktion des Core Proteins mit den Januskinasen und den Lipidtröpfchen bekannt. Die Störung dieser Interaktion mit den JAK-Proteinen kann die Core-vermittelte JAK/STAT-abhängige Signalübertragung aufheben, was zu einer Normalisierung der antiviralen Zytokinproduktion (IFN α) in den HCV-infizierten Hepatozyten führen kann (C). Durch die Sequestrierung des Core Proteins mittels des Antikörperfragments Sc42 wird weiterhin die Ausbildung stabiler Replikationskomplexe an den Lipidtröpfchen unterbunden, und damit der Viruszusammenbau und die Bildung infektiöser Viruspartikel gestört (B).

Im ersten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe der Phage-Display-Technologie HCV Core-spezifische Antikörperfragmente isoliert, charakterisiert und detailliert analysiert. Die Affinitätsselektion, die gegen ausgewählte Peptide verschiedener Regionen des HCV Core Proteins erfolgte, führte zwar zur Anreicherung hochaffiner Antikörperfragmente, aber schlussendlich nicht zur erfolgreichen Isolierung von funktionell relevanten Antikörperfragmenten die das gesamte HCV Core Protein erkennen und sequestrieren. Effizienter in der Generierung inhibitorischer Einzelkettenantikörperfragmente zeigte sich die Affinitätsselektion gegen das vollständige HCV Core Protein, die ebenfalls innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. Es konnte das Antikörperfragment Sc42 isoliert werden, welches zu einer inhibitorischen Wirkung auf die Funktion seines Zielproteins führte, wie in den hier vorgestellten Daten belegt. So konnte nachgewiesen werden, dass der Sc42 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an das HCV Core Protein bindet. In Kollisionsstudien war deutlich erkennbar, dass der Sc42 in Anwesenheit des Core Proteins sein zytoplasmatisches Verteilungsmuster verliert und die gleiche intrazelluläre, vesikuläre, perinukleäre Lokalisation wie das HCV Core Protein aufweist. Weiterhin erfolgte der Nachweis der intrazellulären Protein-Protein-Interaktion mit Hilfe der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik (FRET) und die Identifizierung einer Prolin-reichen Sequenz innerhalb des Core Proteins (PWPLYG) als Bindungsmotiv des Sc42. Diese Aminosäuresequenz wird zum einen für die Interaktion von Core mit den Januskinasen und zum anderen für die Bindung von Core an die Lipidtröpfchen verantwortlich gemacht. Die intrazelluläre Interaktion des Sc42 mit dem HCV Core Protein führte sowohl zur Verminderung der Core Proteinexpression als auch zur Reduktion Core-bedingter, pathologischer Effekte wie der Verringerung der Zellproliferationsrate, und könnte somit die Ausgangsbasis für die Entwicklung eines HCV Wirkstoffes bilden.

4.2 Einfluss von HCV auf die Expression zellulärer Proteine

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Proteinexpressionsprofil von Lebergewebe NS3/4A-transgener Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Mäusen mit Hilfe der 2D-DIGE-Gelelektrophoresetechnik, durchgeführt durch die Firma TopLab, analysiert. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Mechanismen aufgeklärt, durch die das Hepatitis C Virus mit wirtseigenen Faktoren interagiert, um einen effizienten Ablauf des viralen Lebenszyklus zu ermöglichen und eine Persistenz in der Wirtszelle zu erreichen. Dennoch sind zahlreiche Aspekte der Interaktion von HCV mit dem Wirt nur unvollständig verstanden. Von besonderem Interesse ist hierbei der NS3/4A-Komplex, da dieser nicht nur für die Polyproteinprozessierung und für die Ausbildung der viralen Replikationskomplexe essentiell ist, sondern durch die proteolytische Spaltung nichtviraler Substrate wie Cardif, TC-PTP und TRIF auch in zentrale antivirale Effektormechanismen des Wirtes eingreift und mit der zellulären Signalübertragung von Wachstums- und Differenzierungssignalen interferiert.

Mittels 2D-DIGE-Gelelektrophorese und nachfolgender massenspektrometrischer Identifizierung entsprechender Proteine wurden insgesamt 18 differentiell exprimierte Proteine identifiziert, die aufgrund ihrer Funktion in fünf Klassen gruppiert werden können (Abbildung 3.15). Darunter sind mit 44 % Stoffwechsel-assoziierte Proteine, mit 28 % Proteine des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels und mit 17 % Proteine der ER-Homöostase vertreten. Eine untergeordnete Rolle spielten Proteine des Zytoskeletts und der Signaltransduktion.

Unter den differentiell regulierten Proteinen traten in NS3/4A-transgenen Mäusen Proteine mit verminderter bzw. erhöhter Expression gleichermaßen auf (Tabelle 3.4). Da die herabregulierten Proteine in den NS3/4A-transgenen Mäusen potenzielle Substrate der NS3/4A-Protease sein könnten, wurden diese für weitere Untersuchungen ausgewählt. Zunächst sollten die identifizierten Proteine auf ihre differentielle Expression in den für ein HCV Replikon-kodierenden Huh 9-13-Zellen im Vergleich zu den wildtypischen Huh7-Zellen und in der konstitutiv NS3/4A-exprimierenden HepG2-NS3/4A-Zelllinie im Vergleich zu der HepG2-Mock-Zelllinie überprüft werden. Die Schwierigkeit in der an sich einfachen Durchführung der Validierung der Ergebnisse der 2D-Gelelektrophoresetechnik lag in der Suche nach geeigneten Antikörpern zur Detektion der identifizierten Proteine. Für die Proteine Indoethylamin-Methyltransferase, Methioninadenosyltransferase I, fettsäure-bindendes Protein 5, Guanidinacetatmethyltransferase und Methylmalonyl-Coenzym A-Mutase konnte kein geeigneter, kommerziell erhältlicher Antikörper zum Nachweis der Proteine im Western Blot gefunden werden. Für das Apolipoprotein E (ApoE) und für das Phosphatidylethanolamin-bindende Protein 1 (PEBP1), das als Raf-Kinase-Inhibitor bekannt ist, konnte die Proteinexpression mittels geeigneter Antikörper in den HCV Replikonzellen überprüft

werden. Während die PEBP1 Proteinexpression sowohl in Huh 9-13 als auch in den stabil NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zellen verglichen mit den wildtypischen Kontrollzellen unverändert blieb, konnte für die ApoE Proteinexpression in den entsprechenden HCV-assoziierten Zelllinien eine Hochregulation sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene beobachtet werden (Abbildung 3.16, 3.17), ein Befund der im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der 2D-Gelelektrophorese steht, in welcher eine Herabregulation der ApoE Expression beobachtet wurde (Abbildung 3.15). Die kontroversen Ergebnisse der Western Blot Analysen und der 2D-Gelelektrophoresetechnik lassen sich möglicherweise auf die unterschiedliche Aufarbeitung des Lebergewebes bzw. der Proteinextrakte für die jeweils verwendete Methodik zurückführen. Bei der konventionellen Aufarbeitung für die 2D-Gelelektrophorese wird ohne Detergenzien gearbeitet, bedingt dadurch kann ein Großteil der membrangebundenen Proteine nicht extrahiert werden.

Die Proteinexpression von ApoE ist in den konstitutiv NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zellen und in den Huh7 Core-NS3-Zellen bereits erhöht, erfährt aber eine weitere Steigerung in den HCV Replikonzellen. Demzufolge ist anzunehmen, dass nicht nur der NS3/4A-Komplex, sondern auch weitere nichtstrukturelle HCV Proteine für die erhöhte Expression dieses Proteins verantwortlich sind. Um die *in vivo* Relevanz der gesteigerten ApoE Expression zu überprüfen, wurden Leberproben von HCV-infizierten Patienten untersucht, die jedoch keine eindeutige Aussage zuließen. Hier war allenfalls eine Tendenz, hin zu einer erhöhten ApoE Proteinexpression in HCV-infizierten Patienten, zu beobachten.

Da die Lokalisation eines Proteins maßgeblich seine Funktion und Wirkung in der Zelle bestimmt, wurde die intrazelluläre Proteinexpression von ApoE in Kollokalisationsstudien untersucht. Apolipoprotein E wird sowohl zytoplasmatisch als auch in kondensierten Bereichen um den Nukleus exprimiert. Diese kondensierten Bereiche konnten als Golgi-Komplex identifiziert werden (Abbildung 3.22) und wiesen insbesondere in den HCV Replikon-tragenden Zellen eine veränderte Form auf (Abbildung 3.19). Die Kollokalisationsstudien ergaben, dass ApoE sowohl mit den nichtstrukturellen Proteinen NS3 und NS4A in den kondensierten Bereichen des Golgi-Komplexes (Abbildung 3.21), als auch mit dem strukturellen Protein Core in der perinukleären Region des Zellkerns (Abbildung 3.20) stark kollokalisiert.

Die Relevanz von Apolipoprotein E für den Lebenszyklus des Hepatitis C Virus ist bisher nur unzureichend verstanden. Die zelluläre Expression von ApoE im Golgi-Komplex beruht sehr wahrscheinlich auf seiner Beteiligung an der VLDL-Synthese, da der entscheidende Schritt des Zusammenbaus der VLDL-Partikel sowohl im ER als auch im luminalen Golgi-Kompartiment erfolgt. Es konnte belegt werden, dass Apolipoprotein E ein struktureller Bestandteil der LDL- und VLDL-Partikel bzw. der Lipoviropartikel ist und den Lipidmetabolismus moduliert ^[208]. Dabei bindet das Hepatitis C Virus über wirtseigene Lipo-

proteine wie Apolipoprotein B und E an LDL- und VLDL-Partikel und in geringerem Maße auch an HDL-Partikel. Diese Assoziation an die LDL- und VLDL-Partikel erfolgt über die HCV RNA ^[75] und geht mit der Beobachtung einher, dass HCV im Komplex mit VLDL-Partikeln im Plasma von HCV-infizierten Patienten zirkuliert. Erste Befunde legen nahe, dass ApoE für die Produktion von Virionen und somit für die Infektiosität des Hepatitis C Virus essentiell ist ^[142].

HCV RNA-enhaltene Partikel können in der Serumfraktion niedriger Dichte (LDL/VLDL-Fraktion) detektiert werden, die als hoch infektiös gilt. Durch weitere Untersuchungen dieser Lipoviropartikel konnte nachgewiesen werden, dass diese effizient an Hepatozyten und Hepatomazellen binden und in diese eindringen können. Diese Internalisierung der Lipoviropartikel wird zu einem großen Anteil über die Interaktion der Apolipoproteine B und E mit dem LDL-Rezeptor vermittelt, dessen Hochregulation zu einer gesteigerten Virusaufnahme führt ^[74, 209]. Die Beobachtung, dass die Bindung bzw. die Aufnahme der Lipoviropartikel durch sowohl ApoB- als auch ApoE-Antikörper blockiert werden kann ^[75, 209], legt die funktionelle Relevanz beider Apolipoproteine nahe. Die Untersuchungen von Nielsen *et al.* legen weiterhin nahe, dass Apolipoprotein B und E beide in den Lipoviropartikeln niedriger Dichte (LDL-Partikel) vorkommen, wohingegen ApoE charakteristisch für die VLDL-Partikel ist. LDL- und VLDL-Partikel können zusätzlich über die Interaktion von ApoE mit weiteren Rezeptoren, wie dem VLDL-Rezeptor, dem ApoE-Rezeptor 2 und SR-B1 internalisiert werden ^[219].

Das ApoE-Gen weist verschiedene Polymorphismen auf, die zur Entstehung der drei Isoformen Apo-ε2, Apo-ε3 und Apo-ε4 mit funktionellen Unterschieden führen. Apo-ε3 gilt als die Isoform mit normaler Funktion, wohingegen Apo-ε2 gering affin gegenüber dem LDL-Rezeptor ist und Apo-ε4 eine Herabregulation des LDL-Rezeptors herbeiführt ^[210]. Eine Studie von Price *et al.* konnte eine Korrelation zwischen den verschiedenen ApoE-Isoformen und der Entwicklung einer persistierenden HCV Infektion aufzeigen. Während es in HCV-infizierten Patienten mit den Isoformen Apo-ε2 und Apo-ε4, am ehesten bedingt durch die verminderte Aufnahme der Lipoviropartikel über den LDL-Rezeptor und einer dementsprechend verringerten Replikation des Virus, überwiegend zu einer Ausheilung der Infektion kam, konnte eine Assoziation des Apo-ε3-Polymorphismus mit dem gehäuftem Auftreten einer persistierenden HCV Infektion beobachtet werden. Die gesteigerte Proteinexpression von ApoE in den HCV Replikon-tragenden Zellen könnte zu einer gesteigerten VLDL-Sekretion führen ^[211, 212], die durch Bereitstellung einer lipidreichen intrazellulären Umgebung ein optimales Milieu für den viralen Lebenszyklus schafft ^[77] und somit den Viruszusammenbau und dessen Sekretion infolge eines reduzierten Lipid-Exports ermöglicht ^[213, 214].

Obwohl die funktionelle Assoziation zwischen Apolipoprotein E und der Infektiosität des Hepatitis C Virus über die LDL/VLDL-Partikel mehrfach belegt werden konnte, ist doch

unklar, inwiefern ApoE mit HCV Proteinen wie zum Beispiel NS3 und NS4A interagiert. Apolipoprotein E spielt nicht nur bei der VLDL-Sekretion eine wichtige Rolle, sondern nimmt auch auf intrazelluläre Signalkomponenten, wie die cAMP-abhängige Proteinkinase A ^[215] und die Cyclooxygenase 2 ^[216] Einfluss, die für den Hepatitis C Virus essentiell sind, um sein Überleben in der Wirtszelle zu sichern. Hier besteht möglicherweise eine weitere wichtige Bedeutung der HCV-bedingten Erhöhung der Expression von ApoE. Ein möglicher Zusammenhang der Gegenstand künftiger Projekte ist.

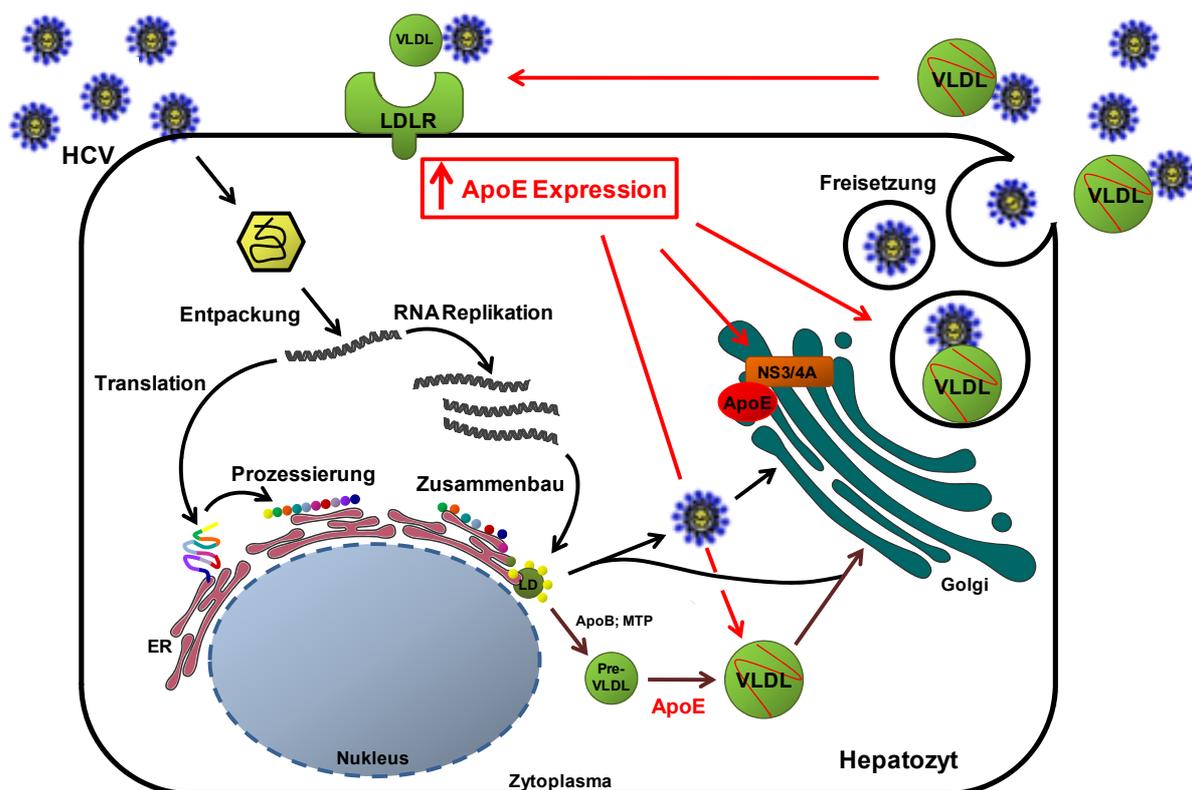


Abbildung 4.2: **Zusammenfassende Darstellung der funktionellen Relevanz von Apolipoprotein E für den viralen Lebenszyklus des Hepatitis C Virus.** Es ist bekannt, dass ApoE ein struktureller Bestandteil der VLDL-Partikel ist und dass diese im Golgi synthetisiert werden. Die erhöhte ApoE Expression, welche durch den Virus induziert wird, führt zu einer gesteigerten VLDL-Sekretion, die durch Bereitstellung einer lipidreichen intrazellulären Umgebung ein optimales Milieu für den viralen Lebenszyklus schafft und somit den Viruszusammenbau und dessen Sekretion infolge eines reduzierten Lipid-Exports ermöglicht. Durch die Bindung der Lipoviropartikel über das wirtseigene Apolipoprotein E wird auch die Internalisierung von HCV über den LDL-Rezeptor, und zusätzlich über weitere Rezeptoren wie dem VLDL-, dem ApoE2- und dem SR-B1-Rezeptor, vermittelt. Bedingt dadurch erhält der Virus die Möglichkeit, eine Vielzahl von weiteren Hepatozyten zu reinfizieren und eine persistierende Infektion auszubilden. ApoB: Apolipoprotein B; MTP: *microsomal triglyceride transfer protein*

5 ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit leiden schätzungsweise 170 Millionen Menschen an einer chronischen HCV Infektion. Obwohl in der medikamentösen Therapie zur Behandlung der chronischen HCV Infektion große Fortschritte gemacht wurden, ist es weiterhin nicht möglich, bestimmte Subgruppen, wie Patienten mit Infektion des Genotyps 1, mit hoher Virämie oder dem Vorliegen einer Zirrhose, erfolgreich zu behandeln. Das Hepatitis C Virus hat nicht nur effiziente Strategien zur Umgehung der antiviralen Immunantwort entwickelt, sondern interagiert auch mit einer Vielzahl von wirtseigenen Faktoren um einen effizienten Ablauf des viralen Lebenszyklus zu ermöglichen und hierdurch in seiner Wirtszelle zu persistieren. Obwohl in den letzten Jahren eine Vielzahl von Mechanismen aufgeklärt wurden, durch die HCV die zelluläre Infrastruktur für seine eigene Replikation nutzt, sind zahlreiche Aspekte der Interaktion von HCV mit dem Wirt nur unzureichend verstanden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe der Phage-Display-Technologie HCV Core-spezifische Antikörperfragmente isoliert, charakterisiert und detailliert analysiert. Die Affinitätsselektion, die gegen ausgewählte Peptide verschiedener Regionen des HCV Core Proteins erfolgte, führte zwar zur Anreicherung hochaffiner Antikörperfragmente, aber nicht zur erfolgreichen Isolierung von funktionell relevanten Antikörpern. Effizienter in der Generierung inhibitorischer Einzelkettenantikörperfragmente zeigte sich die Affinitätsselektion gegen das vollständige HCV Core Protein. Es konnte das Antikörperfragment Sc42 isoliert werden, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an das HCV Core Protein bindet. In Kolokalisationsstudien ist deutlich erkennbar, dass der Sc42 in Anwesenheit des Core Proteins sein zytoplasmatisches Verteilungsmuster verliert und die gleiche vesikuläre, perinukleäre Expression wie das HCV Core Protein aufweist. Hiermit übereinstimmend konnte auch mit Hilfe der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik (FRET) eine intrazelluläre Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden. In weiteren Analysen wurde eine Prolin-reiche Sequenz (PWPLYG) innerhalb des Core Proteins als putatives Bindungs-epitop des Sc42 identifiziert. Die intrazelluläre Interaktion des Sc42 mit dem HCV Core Protein führt sowohl zur Verminderung der Core Proteinexpression als auch zur Reduktion Core-bedingter, pathologischer Effekte, wie der Verringerung der Zellproliferationsrate und könnte somit die Ausgangsbasis für die Entwicklung eines HCV Wirkstoffes bilden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Proteinexpressionsprofil von Lebergewebe NS3/4A-transgener Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Mäusen mit Hilfe der 2D-DIGE-Gelelektrophoresetechnik analysiert. Insgesamt konnten 18 differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden, die aufgrund ihrer Funktion in fünf Klassen gruppiert wurden. Darunter sind mit 44 % Stoffwechsel-assoziierte Proteine, mit 28 % Proteine des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels und mit 17 % Proteine der ER-Homöostase vertreten. Eine untergeordnete Rolle spielten

Proteine des Zytoskeletts und der Signaltransduktion. Ein Protein, das in den transgenen Tieren herabreguliert war und damit als potenzielles Substrat der NS3/4A Protease in Frage kommt, war Apolipoprotein E. Untersuchungen auf RNA- und Proteinebene ergaben allerdings eine erhöhte Expression von ApoE in den HCV-assoziierten Zelllinien. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Analysen konnte belegt werden, dass Apolipoprotein E mit den nicht-strukturellen Proteinen NS3 und NS4A, aber nicht mit NS5A und NS5B im Golgi-Komplex kolokalisiert. Damit wurde erstmalig das zelluläre Wirtsprotein ApoE als putativer Interaktionspartner des viralen Proteinkomplexes NS3/4A identifiziert.

6 SUMMARY

About 170 million people worldwide are infected with Hepatitis C virus (HCV). Due to the lack of a preventive vaccine and effective antiviral therapies, HCV infection remains one of the major health problems worldwide. Even though great progress has been achieved in medical treatment of chronic HCV infection, subgroups such as patients infected with HCV genotype 1, with high viremia or liver cirrhosis are still very difficult to treat. The Hepatitis C virus has not only evolved strategies to circumvent the antiviral immune response, but is also able to interact with a variety of host factors enabling an efficient progress of the viral life cycle and development of persistence in hepatocytes. Although a multitude of these mechanisms were elucidated in the last years, numerous aspects of the interaction of HCV with the host are still incompletely understood.

In the first part of this thesis HCV core-specific single-chain Fv (scFv) antibody fragments were isolated, characterized and analyzed using phage display technology. Initially the affinity selection was carried out against selected peptides of different regions of the HCV core protein. This approach resulted in an enrichment of antibodies with high affinity, however these antibodies had no inhibitory properties. More promising for the generation of inhibitory single-chain antibodies was the affinity selection against the complete HCV core protein. This method led to the generation of the human monoclonal antibody fragment Sc42, which shows high affinity to the HCV core protein *in vitro* and *in vivo*. The sequence critical for Sc42 binding was mapped to a linear proline rich sequence (PWPLYG) using a phage display peptide library. Coexpression of Sc42 with the core protein shifted the Sc42 expression pattern to a vesicular, perinuclear distribution, which also was observed for the HCV core protein alone. Furthermore, the intracellular interaction of Sc42 with HCV core was confirmed by Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET) technology. Intracellular interaction of Sc42 with HCV core resulted in core protein depletion and/or sequestration, thus reducing the core protein related pathogenesis such as induction of cell proliferation. Sc42 may represent a promising antiviral agent to abrogate viral life cycle or mitigate HCV core protein associated pathogenesis.

In the second part of this thesis liver tissue from NS3/4A transgenic and wildtype mice was separated by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. The intention of this proteomic approach was to elucidate new cellular targets of the NS3/4A protease. The approach resulted in 18 differentially expressed proteins, which can be classified into five different functional categories. Most of these proteins are heat shock proteins, chaperons and enzymes, involved in fatty acid and lipid metabolism, such as apolipoprotein E (ApoE). Interestingly, ApoE not only plays an important role in the formation of very low density lipoproteins (VLDL), but is also essential for the production of infectious virus particles and

therefore the infectivity of Hepatitis C virus. HCV protein expressing cell lines showed an upregulation of ApoE both on mRNA and protein level. The localization of ApoE was studied by immunofluorescence and confocal laserscanning microscopy. A colocalization of ApoE with the non-structural HCV proteins NS3 and NS4A, but not with NS5A and NS5B was observed. The cellular compartment in which ApoE and NS3 colocalized was identified as Golgi complex. Hence, ApoE is a potential cellular host factor for interaction of the HCV protein complex NS3/4A.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Hosui, A., et al., *Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon-gamma stimuli*. J Biol Chem, 2003. 278(31): p. 28562-71.
2. Karthe, J., et al., *Specific targeting of hepatitis C virus core protein by an intracellular single-chain antibody of human origin*. Hepatology, 2008. 48(3): p. 702-12.
3. Yoshida, T., et al., *Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation*. J Exp Med, 2002. 196(5): p. 641-53.
4. Kabat, E.A., *Antibody complementarity and antibody structure*. J Immunol, 1988. 141(7 Suppl): p. S25-36.
5. Dubel, S., *Recombinant therapeutic antibodies*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. 74(4): p. 723-9.
6. Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice, *Replication of hepatitis C virus*. Nat Rev Microbiol, 2007. 5(6): p. 453-63.
7. Russel, M., *Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export?* Science, 1994. 265(5172): p. 612-4.
8. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. 244(4902): p. 359-62.
9. Cooper, S., et al., *Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus*. Immunity, 1999. 10(4): p. 439-49.
10. Palitzsch, K.D., et al., *Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. 11(11): p. 1215-20.
11. Thierfelder, W., et al., *[Prevalence of antibodies to hepatitis A, hepatitis B and hepatitis C viruses in the German population]*. Gesundheitswesen, 1999. 61 Spec No: p. S110-4.
12. Holland, J.J., J.C. De La Torre, and D.A. Steinhauer, *RNA virus populations as quasispecies*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. 176: p. 1-20.
13. Berg, T., et al., *Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters*. J Hepatol, 1997. 26(3): p. 484-91.
14. Goeser, T., et al., *[Significance of genotypes in chronic hepatitis C virus infection and hepatitis C virus induced liver cirrhosis in Germany]*. Dtsch Med Wochenschr, 1995. 120(31-32): p. 1070-3.
15. Driesel, G., et al., *Hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in German isolates: studies on the sequence variability in the E2 and NS5 region*. Arch Virol, 1994. 139(3-4): p. 379-88.
16. Goffard, A., et al., *Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. J Virol, 2005. 79(13): p. 8400-9.
17. Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset, *Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes*. J Exp Med, 2003. 197(5): p. 633-42.
18. Sakai, A., et al., *The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(20): p. 11646-51.
19. Lindenbach, B.D., et al., *Complete replication of hepatitis C virus in cell culture*. Science, 2005. 309(5734): p. 623-6.
20. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function*. Nature, 2005. 436(7053): p. 933-8.

21. Hugle, T., et al., *The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein*. Virology, 2001. 284(1): p. 70-81.
22. Egger, D., et al., *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex*. J Virol, 2002. 76(12): p. 5974-84.
23. Tan, S.L. and M.G. Katze, *How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A*. Virology, 2001. 284(1): p. 1-12.
24. Tellinghuisen, T.L. and C.M. Rice, *Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors*. Curr Opin Microbiol, 2002. 5(4): p. 419-27.
25. Macdonald, A. and M. Harris, *Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein*. J Gen Virol, 2004. 85(Pt 9): p. 2485-502.
26. Lesburg, C.A., et al., *Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site*. Nat Struct Biol, 1999. 6(10): p. 937-43.
27. Bressanelli, S., et al., *Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides*. J Virol, 2002. 76(7): p. 3482-92.
28. De Francesco, R. and G. Migliaccio, *Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C*. Nature, 2005. 436(7053): p. 953-60.
29. McLauchlan, J., *Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes*. J Viral Hepat, 2000. 7(1): p. 2-14.
30. Boulant, S., et al., *Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features*. J Virol, 2005. 79(17): p. 11353-65.
31. Boulant, S., et al., *Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets*. J Biol Chem, 2006. 281(31): p. 22236-47.
32. Hope, R.G. and J. McLauchlan, *Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein*. J Gen Virol, 2000. 81(Pt 8): p. 1913-25.
33. Martin, S. and R.G. Parton, *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. 7(5): p. 373-8.
34. Barba, G., et al., *Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(4): p. 1200-5.
35. Sato, S., et al., *Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein*. J Biochem, 2006. 139(5): p. 921-30.
36. Boulant, S., P. Targett-Adams, and J. McLauchlan, *Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus*. J Gen Virol, 2007. 88(Pt 8): p. 2204-13.
37. Miyanari, Y., et al., *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production*. Nat Cell Biol, 2007. 9(9): p. 1089-97.
38. Marusawa, H., et al., *Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation*. J Virol, 1999. 73(6): p. 4713-20.
39. Yamaguchi, A., et al., *Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver*. Dig Dis Sci, 2005. 50(7): p. 1361-71.
40. Moriya, K., et al., *Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in the liver of transgenic mice*. Jpn J Med Sci Biol, 1997. 50(4-5): p. 169-77.
41. Ray, R.B., et al., *Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein*. J Biol Chem, 1998. 273(4): p. 2256-9.
42. Ruggieri, A., et al., *Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein*. Virology, 1997. 229(1): p. 68-76.

43. Dumoulin, F.L., et al., *Hepatitis C virus core protein does not inhibit apoptosis in human hepatoma cells*. Eur J Clin Invest, 1999. 29(11): p. 940-6.
44. Machida, K., et al., *Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins*. J Biol Chem, 2001. 276(15): p. 12140-6.
45. Zhu, N., et al., *Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis*. J Virol, 1998. 72(5): p. 3691-7.
46. Matsumoto, M., et al., *Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor*. J Virol, 1997. 71(2): p. 1301-9.
47. Okuda, M., et al., *Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein*. Gastroenterology, 2002. 122(2): p. 366-75.
48. Machida, K., et al., *Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation*. J Virol, 2006. 80(14): p. 7199-207.
49. Steer, S.A. and J.A. Corbett, *The role and regulation of COX-2 during viral infection*. Viral Immunol, 2003. 16(4): p. 447-60.
50. Jhaveri, R., et al., *Effect of hepatitis C virus core protein on cellular gene expression: specific inhibition of cyclooxygenase 2*. J Infect Dis, 2005. 191(9): p. 1498-506.
51. Zhu, H., et al., *Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(6): p. 3932-7.
52. Janelle, M.E., et al., *Activation of monocyte cyclooxygenase-2 gene expression by human herpesvirus 6. Role for cyclic AMP-responsive element-binding protein and activator protein-1*. J Biol Chem, 2002. 277(34): p. 30665-74.
53. Yan, X.B., et al., *Mapping of the interacting domains of hepatitis C virus core protein and the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR*. Virus Res, 2007. 125(1): p. 79-87.
54. Deb, A., et al., *RNA-dependent protein kinase PKR is required for activation of NF-kappa B by IFN-gamma in a STAT1-independent pathway*. J Immunol, 2001. 166(10): p. 6170-80.
55. Hayashi, J., et al., *Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha*. Hepatology, 2000. 32(5): p. 958-61.
56. Ray, R.B., K. Meyer, and R. Ray, *Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein*. Virology, 1996. 226(2): p. 176-82.
57. Moriya, K., et al., *The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice*. Nat Med, 1998. 4(9): p. 1065-7.
58. Wolk, B., et al., *Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines*. J Virol, 2000. 74(5): p. 2293-304.
59. Tai, C.L., et al., *The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3)*. J Virol, 1996. 70(12): p. 8477-84.
60. Frick, D.N., et al., *The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently*. J Biol Chem, 2004. 279(2): p. 1269-80.
61. Ishido, S., T. Fujita, and H. Hotta, *Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 244(1): p. 35-40.
62. Lin, C., et al., *The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins*. J Virol, 1997. 71(9): p. 6465-71.

63. Foy, E., et al., *Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease*. Science, 2003. 300(5622): p. 1145-8.
64. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. Nature, 2005. 437(7062): p. 1167-72.
65. Li, K., et al., *Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(8): p. 2992-7.
66. Moriishi, K. and Y. Matsuura, *Host factors involved in the replication of hepatitis C virus*. Rev Med Virol, 2007. 17(5): p. 343-54.
67. Watashi, K., et al., *Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase*. Mol Cell, 2005. 19(1): p. 111-22.
68. Okamoto, T., et al., *Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90*. EMBO J, 2006. 25(20): p. 5015-25.
69. Hamamoto, I., et al., *Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B*. J Virol, 2005. 79(21): p. 13473-82.
70. Giese, S.I., et al., *Specific and distinct determinants mediate membrane binding and lipid raft incorporation of HIV-1(SF2) Nef*. Virology, 2006. 355(2): p. 175-91.
71. Brugger, B., et al., *The HIV lipidome: a raft with an unusual composition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(8): p. 2641-6.
72. Mannova, P., et al., *Modification of host lipid raft proteome upon hepatitis C virus replication*. Mol Cell Proteomics, 2006. 5(12): p. 2319-25.
73. Chen, B.J., M. Takeda, and R.A. Lamb, *Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly*. J Virol, 2005. 79(21): p. 13673-84.
74. Andre, P., et al., *Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles*. J Virol, 2002. 76(14): p. 6919-28.
75. Andre, P., et al., *Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism*. Semin Liver Dis, 2005. 25(1): p. 93-104.
76. Kapadia, S.B., et al., *Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I*. J Virol, 2007. 81(1): p. 374-83.
77. Kapadia, S.B. and F.V. Chisari, *Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(7): p. 2561-6.
78. Gibbons, G.F., et al., *Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein*. Biochem Soc Trans, 2004. 32(Pt 1): p. 59-64.
79. Huang, H., et al., *Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(14): p. 5848-53.
80. Price, D.A., et al., *Apolipoprotein epsilon3 allele is associated with persistent hepatitis C virus infection*. Gut, 2006. 55(5): p. 715-8.
81. Mercer, D.F., et al., *Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers*. Nat Med, 2001. 7(8): p. 927-33.
82. Lohmann, V., et al., *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. Science, 1999. 285(5424): p. 110-3.
83. Bartenschlager, R., *The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application*. J Hepatol, 2005. 43(2): p. 210-6.
84. Bukh, J., et al., *Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(22): p. 14416-21.

85. Blight, K.J., et al., *Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture*. J Virol, 2003. 77(5): p. 3181-90.
86. Kato, T., et al., *Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon*. Gastroenterology, 2003. 125(6): p. 1808-17.
87. Wakita, T., et al., *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome*. Nat Med, 2005. 11(7): p. 791-6.
88. Tam, R.C., et al., *Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile*. J Hepatol, 1999. 30(3): p. 376-82.
89. Perry, C.M. and B. Jarvis, *Peginterferon-alpha-2a (40 kD): a review of its use in the management of chronic hepatitis C*. Drugs, 2001. 61(15): p. 2263-88.
90. Baron, S., et al., *The interferons. Mechanisms of action and clinical applications*. JAMA, 1991. 266(10): p. 1375-83.
91. Manns, M.P., et al., *Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial*. Lancet, 2001. 358(9286): p. 958-65.
92. Parfieniuk, A., J. Jaroszewicz, and R. Flisiak, *Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus*. World J Gastroenterol, 2007. 13(43): p. 5673-81.
93. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 197-216.
94. Beutler, B., *Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. 43: p. 609-28.
95. Ollila, J. and M. Vihinen, *B cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. 37(3): p. 518-23.
96. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. 256(5517): p. 495-7.
97. Hwang, W.Y. and J. Foote, *Immunogenicity of engineered antibodies*. Methods, 2005. 36(1): p. 3-10.
98. Khazaeli, M.B., R.M. Conry, and A.F. LoBuglio, *Human immune response to monoclonal antibodies*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1994. 15(1): p. 42-52.
99. Jones, P.T., et al., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. 321(6069): p. 522-5.
100. Little, M., et al., *Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies*. Immunol Today, 2000. 21(8): p. 364-70.
101. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. 228(4705): p. 1315-7.
102. Webster, R., *Book Reviews*. J Dev Behav Pediatr, 2001. 22(5): p. 334.
103. Russel, M., *Moving through the membrane with filamentous phages*. Trends Microbiol, 1995. 3(6): p. 223-8.
104. Russel, M., et al., *Low-frequency infection of F- bacteria by transducing particles of filamentous bacteriophages*. J Bacteriol, 1988. 170(11): p. 5312-6.
105. Deng, L.W., P. Malik, and R.N. Perham, *Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli*. Virology, 1999. 253(2): p. 271-7.
106. Click, E.M. and R.E. Webster, *Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein*. J Bacteriol, 1997. 179(20): p. 6464-71.
107. Gao, C., et al., *Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(11): p. 6025-30.
108. Greenwood, J., A.E. Willis, and R.N. Perham, *Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from Plasmodium falciparum circumsporozoite protein as antigens*. J Mol Biol, 1991. 220(4): p. 821-7.

109. Lowman, H.B., *Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997. 26: p. 401-24.
110. Bass, S., R. Greene, and J.A. Wells, *Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties*. Proteins, 1990. 8(4): p. 309-14.
111. Lowman, H.B., et al., *Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display*. Biochemistry, 1991. 30(45): p. 10832-8.
112. Harwood, N.E. and F.D. Batista, *New insights into the early molecular events underlying B cell activation*. Immunity, 2008. 28(5): p. 609-19.
113. Bird, R.E., et al., *Single-chain antigen-binding proteins*. Science, 1988. 242(4877): p. 423-6.
114. Filpula, D., *Antibody engineering and modification technologies*. Biomol Eng, 2007. 24(2): p. 201-15.
115. Hudson, P.J. and A.A. Kortt, *High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies*. J Immunol Methods, 1999. 231(1-2): p. 177-89.
116. Wu, A.M. and P.D. Senter, *Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates*. Nat Biotechnol, 2005. 23(9): p. 1137-46.
117. Rothe, A., R.J. Hosse, and B.E. Power, *In vitro display technologies reveal novel biopharmaceutics*. FASEB J, 2006. 20(10): p. 1599-610.
118. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. 235(4785): p. 177-82.
119. Press, M.F., et al., *HER-2/neu oncogene amplification and expression in breast and ovarian cancers*. Prog Clin Biol Res, 1990. 354A: p. 209-21.
120. Marasco, W.A., W.A. Haseltine, and S.Y. Chen, *Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(16): p. 7889-93.
121. Maciejewski, J.P., et al., *Intracellular expression of antibody fragments directed against HIV reverse transcriptase prevents HIV infection in vitro*. Nat Med, 1995. 1(7): p. 667-73.
122. Levy-Mintz, P., et al., *Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase*. J Virol, 1996. 70(12): p. 8821-32.
123. Mhashilkar, A.M., et al., *Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies*. EMBO J, 1995. 14(7): p. 1542-51.
124. Kubota, S., et al., *Nuclear preservation and cytoplasmic degradation of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein*. J Virol, 1996. 70(2): p. 1282-7.
125. Yang, A.G., et al., *Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR-5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(21): p. 11567-72.
126. Chen, J.D., et al., *Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy*. Nat Med, 1997. 3(10): p. 1110-6.
127. Heintges, T., J. zu Putlitz, and J.R. Wands, *Characterization and binding of intracellular antibody fragments to the hepatitis C virus core protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 263(2): p. 410-8.
128. Zhong, Y.W., et al., *Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its identification in immunohistochemistry*. World J Gastroenterol, 2002. 8(5): p. 863-7.
129. Zemel, R., et al., *Inhibition of hepatitis C virus NS3-mediated cell transformation by recombinant intracellular antibodies*. J Hepatol, 2004. 40(6): p. 1000-7.
130. Moradpour, D., et al., *Functional properties of a monoclonal antibody inhibiting the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase*. J Biol Chem, 2002. 277(1): p. 593-601.

131. Tessmann, K., et al., *Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase*. J Virol Methods, 2002. 103(1): p. 75-88.
132. Artsaenko, O., et al., *Abrogation of hepatitis C virus NS3 helicase enzymatic activity by recombinant human antibodies*. J Gen Virol, 2003. 84(Pt 9): p. 2323-32.
133. Lang, R. and K. Heeg, *Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR*. Inflammopharmacology, 1998. 6(4): p. 297-309.
134. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. 239(4839): p. 487-91.
135. Sambrook, J. and M.J. Gething, *Protein structure. Chaperones, paperones*. Nature, 1989. 342(6247): p. 224-5.
136. Krebber, A., et al., *Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system*. J Immunol Methods, 1997. 201(1): p. 35-55.
137. Skerra, A. and A. Pluckthun, *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. Science, 1988. 240(4855): p. 1038-41.
138. Shavinskaya, A., et al., *The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly*. J Biol Chem, 2007. 282(51): p. 37158-69.
139. Bode, J.G., et al., *IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3*. FASEB J, 2003. 17(3): p. 488-90.
140. Kaul, A., et al., *Cell culture adaptation of hepatitis C virus and in vivo viability of an adapted variant*. J Virol, 2007. 81(23): p. 13168-79.
141. Fukutomi, T., et al., *Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression*. Hepatology, 2005. 41(5): p. 1096-105.
142. Chang, K.S., et al., *Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture*. J Virol, 2007. 81(24): p. 13783-93.
143. Souriau, C. and P.J. Hudson, *Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy*. Expert Opin Biol Ther, 2003. 3(2): p. 305-18.
144. Frisch, C., et al., *Contribution of the intramolecular disulfide bridge to the folding stability of REIv, the variable domain of a human immunoglobulin kappa light chain*. Fold Des, 1996. 1(6): p. 431-40.
145. Glockshuber, R., T. Schmidt, and A. Pluckthun, *The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in Escherichia coli*. Biochemistry, 1992. 31(5): p. 1270-9.
146. Hibi, M., et al., *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130*. Cell, 1990. 63(6): p. 1149-57.
147. Murakami, M., et al., *Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(24): p. 11349-53.
148. Yoshimura, M. and T. Jessell, *Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord*. J Physiol, 1990. 430: p. 315-35.
149. Tanner, J.W., et al., *The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases*. J Biol Chem, 1995. 270(12): p. 6523-30.
150. Rui, L., et al., *SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2*. J Biol Chem, 2002. 277(44): p. 42394-8.
151. Kawaguchi, T., et al., *Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3*. Am J Pathol, 2004. 165(5): p. 1499-508.

152. Moradpour, D., et al., *Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein*. *Virology*, 1996. 222(1): p. 51-63.
153. McLauchlan, J., et al., *Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets*. *EMBO J*, 2002. 21(15): p. 3980-8.
154. Rouille, Y., et al., *Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus*. *J Virol*, 2006. 80(6): p. 2832-41.
155. Moriya, K., et al., *Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice*. *J Gen Virol*, 1997. 78 (Pt 7): p. 1527-31.
156. Prabhu, R., et al., *Inhibition of hepatitis C virus nonstructural protein, helicase activity, and viral replication by a recombinant human antibody clone*. *Am J Pathol*, 2004. 165(4): p. 1163-73.
157. Sullivan, D.E., et al., *Construction and characterization of an intracellular single-chain human antibody to hepatitis C virus non-structural 3 protein*. *J Hepatol*, 2002. 37(5): p. 660-8.
158. Li, C., D. Candotti, and J.P. Allain, *Production and characterization of monoclonal antibodies specific for a conserved epitope within hepatitis C virus hypervariable region 1*. *J Virol*, 2001. 75(24): p. 12412-20.
159. Zhai, W., et al., *Human recombinant single-chain antibody fragments, specific for the hypervariable region 1 of hepatitis C virus, from immune phage-display libraries*. *J Viral Hepat*, 1999. 6(2): p. 115-24.
160. Esumi, M., et al., *Murine antibodies against E2 and hypervariable region 1 cross-reactively capture hepatitis C virus*. *Virology*, 1998. 251(1): p. 158-64.
161. Puntoriero, G., et al., *Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants*. *EMBO J*, 1998. 17(13): p. 3521-33.
162. Shang, D., W. Zhai, and J.P. Allain, *Broadly cross-reactive, high-affinity antibody to hypervariable region 1 of the hepatitis C virus in rabbits*. *Virology*, 1999. 258(2): p. 396-405.
163. Watanabe, K., et al., *The hypervariable region 1 protein of hepatitis C virus broadly reactive with sera of patients with chronic hepatitis C has a similar amino acid sequence with the consensus sequence*. *Virology*, 1999. 264(1): p. 153-8.
164. Zucchelli, S., et al., *Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer*. *J Virol*, 2000. 74(24): p. 11598-607.
165. Casey, J.L., et al., *Green fluorescent antibodies: novel in vitro tools*. *Protein Eng*, 2000. 13(6): p. 445-52.
166. Zeytun, A., et al., *Fluorobodies combine GFP fluorescence with the binding characteristics of antibodies*. *Nat Biotechnol*, 2003. 21(12): p. 1473-9.
167. Smith, A.E. and A. Helenius, *How viruses enter animal cells*. *Science*, 2004. 304(5668): p. 237-42.
168. Earp, L.J., et al., *The many mechanisms of viral membrane fusion proteins*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. 285: p. 25-66.
169. Parren, P.W. and D.R. Burton, *The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo*. *Adv Immunol*, 2001. 77: p. 195-262.
170. Kuritzkes, D.R., et al., *Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1*. *J Infect Dis*, 2004. 189(2): p. 286-91.
171. Reichert, J.M., *Trends in the development and approval of monoclonal antibodies for viral infections*. *BioDrugs*, 2007. 21(1): p. 1-7.
172. Skehel, J.J. and D.C. Wiley, *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin*. *Annu Rev Biochem*, 2000. 69: p. 531-69.

173. ter Meulen, J., et al., *Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants*. PLoS Med, 2006. 3(7): p. e237.
174. Imai, M., et al., *Fusion of influenza virus with the endosomal membrane is inhibited by monoclonal antibodies to defined epitopes on the hemagglutinin*. Virus Res, 1998. 53(2): p. 129-39.
175. Outlaw, M.C. and N.J. Dimmock, *IgG neutralization of type A influenza viruses and the inhibition of the endosomal fusion stage of the infectious pathway in BHK cells*. Virology, 1993. 195(2): p. 413-21.
176. Simoes, E.A., et al., *Palivizumab prophylaxis, respiratory syncytial virus, and subsequent recurrent wheezing*. J Pediatr, 2007. 151(1): p. 34-42, 42 e1.
177. Mansbach, J., et al., *Evaluation of compliance with palivizumab recommendations in a multicenter study of young children presenting to the emergency department with bronchiolitis*. Pediatr Emerg Care, 2007. 23(6): p. 362-7.
178. Traggiai, E., et al., *An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus*. Nat Med, 2004. 10(8): p. 871-5.
179. Zhu, Z., et al., *Potent cross-reactive neutralization of SARS coronavirus isolates by human monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(29): p. 12123-8.
180. Sui, J., et al., *Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(8): p. 2536-41.
181. Simmons, C.P., et al., *Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza*. PLoS Med, 2007. 4(5): p. e178.
182. Morrey, J.D., et al., *Humanized monoclonal antibody against West Nile virus envelope protein administered after neuronal infection protects against lethal encephalitis in hamsters*. J Infect Dis, 2006. 194(9): p. 1300-8.
183. Engle, M.J. and M.S. Diamond, *Antibody prophylaxis and therapy against West Nile virus infection in wild-type and immunodeficient mice*. J Virol, 2003. 77(24): p. 12941-9.
184. Roehrig, J.T., R.A. Bolin, and R.G. Kelly, *Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica*. Virology, 1998. 246(2): p. 317-28.
185. Heinz, F.X., *Epitope mapping of flavivirus glycoproteins*. Adv Virus Res, 1986. 31: p. 103-68.
186. Goncalvez, A.P., et al., *Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(22): p. 9422-7.
187. Morens, D.M., S.B. Halstead, and N.J. Marchette, *Profiles of antibody-dependent enhancement of dengue virus type 2 infection*. Microb Pathog, 1987. 3(4): p. 231-7.
188. Littaua, R., I. Kurane, and F.A. Ennis, *Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection*. J Immunol, 1990. 144(8): p. 3183-6.
189. Pierson, T.C., et al., *The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection*. Cell Host Microbe, 2007. 1(2): p. 135-45.
190. Halstead, S.B., *In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody*. J Infect Dis, 1979. 140(4): p. 527-33.
191. Kontermann, R.E., *Intrabodies as therapeutic agents*. Methods, 2004. 34(2): p. 163-70.
192. Joliot, A. and A. Prochiantz, *Transduction peptides: from technology to physiology*. Nat Cell Biol, 2004. 6(3): p. 189-96.

193. Matsushita, M. and H. Matsui, *Protein transduction technology*. J Mol Med, 2005. 83(5): p. 324-8.
194. Shin, I., et al., *Proapoptotic activity of cell-permeable anti-Akt single-chain antibodies*. Cancer Res, 2005. 65(7): p. 2815-24.
195. Jendreyko, N., et al., *Phenotypic knockout of VEGF-R2 and Tie-2 with an intradiabody reduces tumor growth and angiogenesis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(23): p. 8293-8.
196. Popkov, M., et al., *Targeting tumor angiogenesis with adenovirus-delivered anti-Tie-2 intrabody*. Cancer Res, 2005. 65(3): p. 972-81.
197. Deshane, J., et al., *Transductional efficacy and safety of an intraperitoneally delivered adenovirus encoding an anti-erbB-2 intracellular single-chain antibody for ovarian cancer gene therapy*. Gynecol Oncol, 1997. 64(3): p. 378-85.
198. Alvarez, R.D., et al., *A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial*. Clin Cancer Res, 2000. 6(8): p. 3081-7.
199. Blomer, U., et al., *Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector*. J Virol, 1997. 71(9): p. 6641-9.
200. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. 272(5259): p. 263-7.
201. Poeschla, E., P. Corbeau, and F. Wong-Staal, *Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11395-9.
202. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. Science, 2003. 302(5644): p. 415-9.
203. Mingozzi, F., et al., *Improved hepatic gene transfer by using an adeno-associated virus serotype 5 vector*. J Virol, 2002. 76(20): p. 10497-502.
204. Rohr, U.P., et al., *Primary human cells differ in their susceptibility to rAAV-2-mediated gene transfer and duration of reporter gene expression*. J Virol Methods, 2002. 105(2): p. 265-75.
205. Herzog, R.W. and J.N. Hagstrom, *Gene therapy for hereditary hematological disorders*. Am J Pharmacogenomics, 2001. 1(2): p. 137-44.
206. Murphy, J.E., et al., *Long-term correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by a single intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus encoding mouse leptin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(25): p. 13921-6.
207. Wagner, J.A., et al., *A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies*. Hum Gene Ther, 2002. 13(11): p. 1349-59.
208. Schwiigelshohn, B., et al., *Effects of apoprotein E on intracellular metabolism of model triglyceride-rich particles are distinct from effects on cell particle uptake*. J Biol Chem, 1995. 270(4): p. 1761-9.
209. Agnello, V., et al., *Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(22): p. 12766-71.
210. Mahley, R.W. and S.C. Rall, Jr., *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. 1: p. 507-37.
211. Maugeais, C., et al., *Hepatic apolipoprotein E expression promotes very low density lipoprotein-apolipoprotein B production in vivo in mice*. J Lipid Res, 2000. 41(10): p. 1673-9.
212. Huang, Y., et al., *Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia*. J Biol Chem, 1998. 273(41): p. 26388-93.
213. Lonardo, A., et al., *Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease*. Gastroenterology, 2004. 126(2): p. 586-97.

214. Napolitano, M., et al., *Very low density lipoprotein and low density lipoprotein isolated from patients with hepatitis C infection induce altered cellular lipid metabolism*. J Med Virol, 2007. 79(3): p. 254-8.
215. Zhu, Y. and D.Y. Hui, *Apolipoprotein E binding to low density lipoprotein receptor-related protein-1 inhibits cell migration via activation of cAMP-dependent protein kinase A*. J Biol Chem, 2003. 278(38): p. 36257-63.
216. Kothapalli, D., et al., *Antimitogenic effects of HDL and APOE mediated by Cox-2-dependent IP activation*. J Clin Invest, 2004. 113(4): p. 609-18.
217. Sambrook, J., et al., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000
218. Brenndörfer, E.D., et al., *The non-structural 3/4A protease of HCV activates EGF-induced signal-transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase*. Hepatology, 2009. 49(6): p. 1810-1820.
219. Nielsen, S.U., et al., *Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients*. J Virol, 2006. 80(5): p. 2418-28.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Johannes G. Bode, unter dessen Leitung und Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde. Weiterhin möchte ich mich für seine kontinuierliche Unterstützung, seine große Bereitschaft zur Diskussion, seine wertvollen Anregungen, für seinen ansteckenden, wissenschaftlichen Enthusiasmus bedanken und für das Vertrauen, dass er mir entgegengebracht hat.

Bei Herrn Professor Dr. Dieter Willbold bedanke ich mich außerordentlich für die Bereitschaft, meine Promotion als Gutachter in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen.

Herrn Professor Dr. Dieter Häussinger danke ich für die tatkräftige Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung eines konstruktiven, wissenschaftlichen Umfeldes und insbesondere für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in den Laboratorien seiner Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. T. Heintges danke ich für die Überlassung des Themas der humanen HCV-spezifischen Antikörperfragmente.

Herrn Professor Dr. R. Bartenschlager der Abteilung "Molekulare Virologie" am Universitätsklinikum Heidelberg danke ich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in seinem Labor, im Zuge der Revision, Versuche mit verschiedenen HCV Modellsystemen durchzuführen, um die funktionelle Relevanz des Antikörpers Sc42 zu überprüfen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Experimentellen Hepatologie, insbesondere der AG Bode für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ohne die intensive Diskussionsbereitschaft, stete Hilfe und Unterstützung von Ute Albrecht, Erwin D. Brenndörfer, Boris Görg, Verena Keitel, Andreas Kulawik und Natalia Qvartskhava wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Ihre freundschaftliche Unterstützung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Im besonderen Maße bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder, die mich zu jeder Zeit selbstlos unterstützt haben.

„ Der Weg ist das Ziel. “

– Konfuzius –

Mein größter Dank gebührt meinem Ehemann Matthias, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir in allen Dingen selbstlos und tatkräftig zur Seite stand.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Juliane Karthe, geb. Hebler
Geburtstag	02.05.1979
Geburtsort	Oranienburg
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schul Ausbildung

1985-1992	Oberschule Borna-West
1992-1997	Gymnasium Borna „Am Breiten Teich“

Studium

1997-2003	Studium der Diplom-Biologie an der Universität Leipzig Studienschwerpunkte: Genetik, Immunologie, Tierphysiologie, Biochemie
2002/2003	<u>Diplomarbeit zum Thema:</u> „Die genetische Diversität präkolonialer Orang-Utan-Populationen auf Borneo und Sumatra“ am Max-Planck-Institut für „Evolutionäre Anthropologie“, Leipzig

Promotion

2004-2009	<u>Promotion zum Thema:</u> „Generierung und Charakterisierung humaner Hepatitis C Virus (HCV) -spezifischer Antikörperfragmente und Analyse des Einflusses von HCV auf die Expression zellulärer Proteine.“ in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf und an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
-----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 05.08.2009

Juliane Karthe