

Aus der Klinik für
Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

**Einfluss von HCV auf die basale und durch pro-inflammatorische Mediatoren
induzierte Chemokinexpression der Wirtszelle**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christoph Roland Seifert

2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Bode

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. Reifenberger

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Als Posterbeitrag:

Christina Gröpper, Nadja Triller, Sabine Eisenbürger, Christoph Seifert, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Hepatitis C Virus modulates TNF α -induced chemokine production and enables EGF to induce chemokine production in its host cell.* 30. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Januar 2014, Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS	I - II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III - V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI - VII
TABELLENVERZEICHNIS	VII

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Hepatitis-C-Virus (HCV)	1
1.1.1	Aufbau, Infektion und Replikation	2
1.1.2	Modellsysteme	5
1.1.3	Interferenz mit der Wirtszelle und dem Wirt	7
1.2	Chemokine	11
1.2.1	Nomenklatur und Bedeutung	11
1.2.2	Chemokine und Signaltransduktion	14
1.2.3	Chemokine und Hepatitis-C	15
1.3	Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF α) und Interleukin-1-Beta (IL-1 β)	18
1.4	Zielsetzung	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material, Substanzen und Lösungen	21
2.1.1	Materialien für die Zellkultur	21
2.1.2	Zellkulturmedien und Zusätze	21
2.1.3	Reagenzien und Feinchemikalien	21
2.1.4	Kits	21
2.1.5	PCR	21
2.1.6	Western Blot	21
2.1.7	Primärantikörper und Sekundärantikörper	22
2.1.8	Laborgeräte	22
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellbiologische Methoden	22
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	23
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	35
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Validierung und Qualitätskontrolle der Primer	38

3.2	Die TNF α -induzierte Expression von INF γ wird in Lebern NS3/4A-transgener Mäuse gehemmt.	40
3.3	Das subgenomische HCV-Replikon verstärkt sowohl die basale Expression von mCXCL8 als auch die TNF α -induzierte Expression auf Transkriptebeene	41
3.4	mCXCL9, mCXCL10 und mCXCL11 werden in Huh7- und Huh9-13-Zellen exprimiert und nach Stimulation mit TNF α induziert.....	44
3.5	mCXCL12 und mCXCR4 wird in Huh7- und in Huh9-13-Zellen exprimiert.	46
3.6	mCXCL2 wird in Huh7- und Huh9-13-Zellen exprimiert. Es findet eine Induktion unter Stimulation mit TNF α statt.	47
3.7	mCCL5 und mCCL17 werden in Huh7- und Huh9-13-Zellen exprimiert und durch TNF α und IL-1 β induziert.	47
3.8	Das subgenomische HCV-Replikon beeinflusst die TNF α -induzierte Aktivierung der p38 ^{MAPK} in Huh7- und Huh9-13-Zellen.....	49
3.9	Die Expression von mCXCL8 wird nicht direkt durch die p38 ^{MAPK} beeinflusst.....	50
4	DISKUSSION.....	52
4.1	Die Chemokinexpression wird durch das subgenomische HCV-Replikon beeinflusst.....	52
4.2	Die Rolle der p38 ^{MAPK} für die Chemokinexpression im Replikonsystem	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	62
7	DANKSAGUNG.....	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CCl₄	Tetrachlorid	kDa	Kilodalton
CD4⁺	<i>Cluster of differentiation 4 positive</i>	LDL	<i>low density lipoprotein</i>
CD8⁺	<i>cluster of differentiation 8 positive</i>	LPS	Lipopolysaccharid
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>	L-SIGN	<i>liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin</i>
CLDN1	Claudin-1	MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
CT	<i>cycle threshold</i>	MHC I/II	<i>major histocompatibility complex I/II</i>
DAG	1,2-Diacylglycerin	MIG	<i>monokine induced by interferon-gamma</i>
DC-SIGN	<i>dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin</i>	miRNA-122	<i>micro ribonucleic acid-122</i>
D-GalN	D-Galaktosamin	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
DNS	Desoxyribonukleinsäure	NKT-Zellen	Natürliche T-Killerzellen
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	NS	nicht strukturell
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	PAA	Polyacrylamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
EGF	<i>endothelial growth factor</i>	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
ELR	<i>E (glutamic acid), L (leucine),</i>	PKB	Proteinkinase B

R (arginine)

EMCV	Encephalomyokarditis-Virus	PKC	Proteinkinase C
EN	<i>envelope</i>	PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
FCS	<i>fetal calf serum</i>	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
FDA	Food and Drug Administration der USA	PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	PVDF	Polyvinylidenfluorid
gC1qR	<i>gC1q receptor</i>	p38^{MAPK}	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
GDP	Guanosindiphosphat	p7	p7 Viroporin
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein	rER	raues endoplasmatisches Retikulum
GTP	Guanosintriphosphat	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
G418	Geneticin	Rn	<i>reporter-dye</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus	ROX	<i>passive-dye</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom	SB203580	pharmakologischer Inhibitor der p38 ^{MAPK}
HCV	Hepatitis-C-Virus	SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	SDHA	Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A
HLT	<i>human lymphotoxin</i>	SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
IDSR	<i>interferon sensitivity determining region</i>	SR-B1	<i>scavenger receptor B1</i>
IFNγ	Interferon-Gamma	STAT1/2	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 1/2</i>
IL-1β	Interleukin-1 Beta	TEMED	Tetramethylethylendiamin

IL-1R I/II	Interleukin-1-Rezeptor I/II	TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline and Tween</i>
IL-8	Interleukin-8	TH1/2-Zellen	T-Helfer1/2-Zellen
IP-10	<i>IFN-γ-induced protein-10</i>	TLR4	<i>toll-like receptor 4</i>
IP₃	Inositoltrisphosphat	TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>	TNF-R1	<i>TNF receptor type 1</i>
I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i>	TNF-R2	<i>TNF receptor type 2</i>
JFH-1	<i>japanese fulminant hepatitis virus C 1</i>	TRIS	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
JNK	<i>c-Jun N-terminale Kinasen</i>	UTRs	<i>untranslated regions</i>
		VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	
1.1	Aufbau und Prozessierung des Hepatitis-C-Virus-Genoms	3
1.2	Zusammenfassung des Infektions- und Replikationszyklus von HCV	4
1.3	HCV-Genom und Integration des Replikons	5
1.4	Zusammenfassende Darstellung der HCV-Pathologie	10
1.5	Einteilung der Chemokine nach ihrer Struktur	12
1.6	Struktur eines Chemokinrezeptors und Signaltransduktion nach Bindung eines Liganden	15
2.	Material und Methoden	
2.1	Rn versus Cycle in der semiquantitativen PCR	28
2.2	Freisetzung vom <i>SYBER Green</i> aus einem DNS-Doppelstrang	29
2.3	Schmelzkurve der Produkte einer semiquantitativen PCR	30
2.4	Die Bildung von Primerdimeren	31
2.5	Schmelzkurven unspezifischer Amplifikate	32
2.6	Die Bildung von Haarnadeln (<i>hairpins</i>)	34
3.	Ergebnisse	
3.1	Schmelzkurven der PCR-Amplifikate der Primer von CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCR4, CCL5, CCL17 und SDHA	40
3.2	Die TNF α -induzierte IFN γ -Expression wird im Lebergewebe NS3/4A-transgener Mäuse gehemmt.	41
3.3	In Anwesenheit des subgenomische HCV-Replikons wird die Expression von mCXCL8 verstärkt.	42
3.4	Ab 1 ng/ml TNF α kommt es zu einer Induktion der Expression von mCXCL8 und mCXCL1 in Huh7-Zellen und Huh9-13-Zellen nach 80 und nach 160 Minuten Stimulation.	43
3.5	mCXCL8 wird von Huh7-Zellen geringer exprimiert als von Huh9-13-Zellen und nach Stimulation mit 2 ng/ml TNF α zu verschiedenen Zeitpunkten in beiden Zelllinien induziert. IL-1 β induziert die mCXCL8-Expression.	44
3.6	mCXCL9, mCXCL10 und mCXCL11 werden in Huh7- und Huh9-13-Zellen exprimiert.	45
3.7	CXCL12 wird in Huh7-Zellen stärker als in Huh9-13-Zellen exprimiert. CXCR4 verhält sich umgekehrt. Die Stimulation mit 1 μ M/l IL-1 β und 2 ng/ml TNF α ergibt keine Induktion der Expression von mCXCL12 und mCXCR4 in beiden Zelllinien im Zeitreihenversuch.	46
3.8	mCXCL2 wird durch Huh9-13-Zellen stärker exprimiert als in Huh7-Zellen und nach 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten Stimulation mit 2 ng/ml TNF α in beiden Zelllinien induziert.	47

3.9	mCCL5 und mCCL17 wird durch Huh7-Zellen und Huh9-13-Zellen exprimiert und nach Stimulation mit 2 ng/ml TNF α und 1 μ M/l IL-1 β in beiden Zelllinien induziert.	48
3.10	Die p38 ^{MAPK} ist in Huh9-13-Zellen basal aktiviert und die Aktivierung wird durch Stimulation mit TNF α konzentrationsabhängig verstärkt.	49
3.11	Die mCXCL8-Expression wird in Huh9-13-Zellen durch TNF α und durch Hemmung der p38 ^{MAPK} mittels SB203580 in Huh9-13-Zellen bei Stimulation mit IL-1 β verstärkt induziert und nach Stimulation mit TNF α in beiden Zelllinien vermindert exprimiert.	51
4.	Diskussion	
4.1	Zusammenfassende Darstellung der HCV-Pathologie unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Dissertation.	59

TABELLENVERZEICHNIS

2.1	Verwendete Zelllinien und ihre Kultivierung	23
2.2	Reagenzien der reversen Transkription	24
2.3	Reagenzien der Polymerasekettenreaktion für Template und 2 Primerpaare	25
2.4	Reagenzien einer semiquantitativen PCR für Template und 2 Primerpaare	32
2.5	Oligonukleotide für die semiquantitative PCR	34
2.6	Zusammensetzung eines 15 % Gels	35
2.7	Verwendete Puffersysteme	36

1 EINLEITUNG

1.1 Das Hepatitis-C-Virus (HCV)

Der britische Arzt F. O. MacCallum stellte in den 40er Jahren während seiner Arbeit an der Entwicklung eines Gelbfieber-Impfstoffes fest, dass durch ihn geimpfte Soldaten an einer Hepatitis erkrankten. Da er den Impfstoff unter Zuhilfenahme von Serum eines an einer Hepatitis erkrankten Patienten entwickelte, nahm er an, dass es sich um eine erregerbedingte Hepatitis handeln müsse. Er prägte die Begriffe „Hepatitis A“ als eine Form der über Nahrungsmittel und Trinkwasser verursachten Hepatitis und „Hepatitis B“ als der durch Blutbestandteile verursachten Leberentzündung. Mit der zunehmenden Anzahl von Bluttransfusionen zwischen 1939 und 1945 während des Zweiten Weltkrieges wurden gehäuft Ausbrüche damals sogenannter „homologer Serum-Hepatitis“ als Folge eines „ikterischen Agens“ berichtet^[1].

Mitte der 50er Jahre wurde ebenfalls beobachtet, dass nach Bluttransfusionen Leberentzündungen auftraten^[2]. Die Bedeutung Transfusions-assoziiierter Hepatitis begann Ende der 60er Jahre durch die Zunahme großer vor allem herzchirurgischer Operationen und damit verbundener umfangreicher Bluttransfusionen zuzunehmen. In den 70er Jahren wurde beschrieben, dass ein Virus als Erreger der transfusionsbedingten Hepatitis anzunehmen ist^[3]. Im Zuge weiterer Beobachtungen Mitte der 70er Jahre stellte sich heraus, dass es eine erregerbedingte Non-A/Non-B Hepatitis geben musste^[4], welche schließlich 1989 zu der Identifikation und Charakterisierung des Hepatitis-C-Virus führte. Das Hepatitis-C-Virus ist ein einzelsträngiges RNA-Virus, das zu den Flaviviridae, genauer zum Genus Hepacivirus gezählt wird^[5]. Der Name der Virusfamilie leitet sich von dem lateinischen Wort *flavus* (gelb) ab.

Basierend auf Sequenzanalysen kann das Hepatitis-C-Virus in 6 Hauptgruppen eingeteilt werden, und zu jedem Genotyp existieren weitere Subtypen^[6]. Die in Deutschland vorherrschenden Genotypen sind geordnet nach ihrer Häufigkeit Genotyp 1, 1b, 3, 1a, 2 und 4^[7]. Die Krankheitshäufigkeit lag zwischen 1998 und 2002 bei 48 % der Virusträger im Alter zwischen 20 und 59 Jahren in den Vereinigten Staaten bei Personen mit vergesellschaftetem intravenösem Drogenkonsum in ihrer Anamnese^[8]. Weltweit wird die Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus zu den häufigsten Ursachen für akute und chronische Lebererkrankungen gezählt und hat in Deutschland 2012 eine Prävalenz von ca. 410000^[7]. Die Bedeutung des Hepatitis-C-Virus wird mit der Betrachtung der Zahlen

der Weltgesundheitsorganisation deutlich. Weltweit sind 130 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert. Schätzungsweise 27 % der Leberzirrhosen und 25 % der hepatozellulären Karzinome sind durch das Virus verursacht und belegen dessen sozioökonomische Bedeutung^[9].

1.1.1 Aufbau, Infektion und Replikation

Das 55-65 nm messende ikosaedrische Virus beinhaltet einzelsträngige RNA in positiver Polarität (5'-3') mit einer Länge von 9600 Basen, welche für einen einzigen offenen Leserahmen kodiert. Das RNA-Genom wird sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende von nicht kodierenden Regionen flankiert, den sogenannten UTRs. Im Bereich des nicht kodierenden 5'-Endes liegt die IRES und dient der Bindung an die 40S-Untereinheit des der Translation dienenden Ribosoms. Das resultierende Produkt besteht aus einem einzigen ca. 3000 Aminosäuren umfassenden Protein, das im weiteren Verlauf enzymatisch in kleinere aktive Proteineinheiten gespalten wird, die unter anderem der Replikation des Virus in der Wirtszelle dienen und zu seinen Viruspartikeln organisiert werden. Zu den strukturgebenden Proteinen gehören das Core-Protein, das das virale Kapsid bildet, und die Proteine E1 und E2, die als Hüllproteine (*envelop*) ebenfalls dem Aufbau des Virus dienen. Das kleine Membranprotein p7, auch Viroporin genannt, ist ein Ionenkanal, dem eine Rolle bei der Freisetzung von Viruspartikeln zugesprochen wird. Es trennt die strukturgebenden Proteine von den nichtstrukturgebenden (NS) Proteinen. Dazu gehören NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, und NS5B. NS2/3 und NS3/4A sind die viralen Proteasen, die neben den zellulären Proteasen das Vorläuferprotein an spezifischen Stellen schneiden (Abbildung 1.1)^[10]. NS5A wird auch als IDSR bezeichnet, da es mit dem Ansprechverhalten auf Interferone in der Therapie der Hepatitis-C in Verbindung gebracht wird^[11]. NS5B ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Da das Enzym keine Fehlerkorrektur (*proofreading*) besitzt, entstehen während der Replikation Quasispezies, die die Erschöpfung der T-Zellantwort (*T-cell exhaustion*) mitbedingen und eine gerichtete Immunantwort fehlleiten^[12, 13].

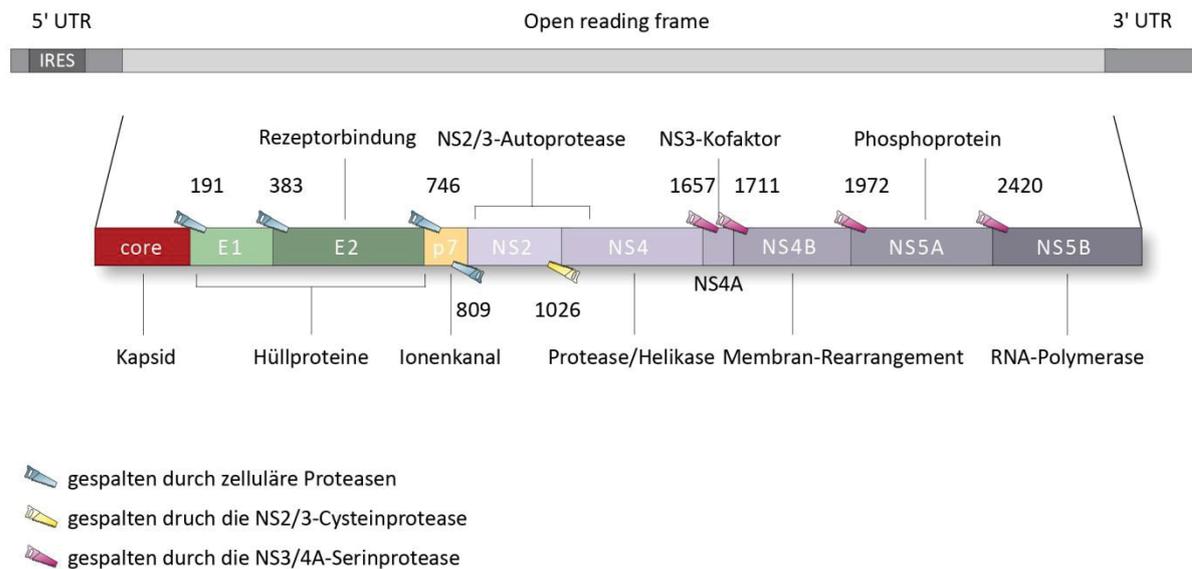


Abbildung 1.1: **Aufbau und Prozessierung des Hepatitis-C-Virus-Genoms:** Das Genom ist 9600 Basen groß, positiver Polarität und einzelsträngig. Die Bindung der 40s-Ribosomenuntereinheit vermittelt die IRES-Sequenz und führt damit zu einem Polyprotein von ungefähren 3000 Aminosäuren Länge, das durch zelluläre und virale Protease prozessiert wird. Es entstehen vier strukturelle (Core, E1, E2, p7) und sechs nichtstrukturelle (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) Proteine. Die Proteine Core, E1, E2 und p7 werden von zellulären Proteasen gespalten. Die Spaltung an der Position NS2/NS3 erfolgt durch die virale NS2/3-Cysteinprotease und die der weiteren nichtstrukturellen Proteine durch die virale NS3/4A-Serinprotease. Die Nummern geben die Position der zu spaltenden Aminosäuren an (modifiziert nach Moradpour^[14]).

Die einzigen bekannten Wirte für das Hepatitis-C-Virus sind der Mensch und der Schimpanse^[15]. Kommt es zu einer Infektion, findet sich das Hepatitis-C-Virus in verschiedenen Formen im Blut seines Wirtes wieder. Dabei werden infektiöse von nicht infektiösen Formen unterschieden. Die mit LDL und VLDL assoziierten HCV-Virionen stellen die infektiöse Form von HCV dar. Daneben existieren noch an Immunglobuline gebundene sowie freie Virionen. Den viralen Replikationszyklus umfassen die Anhaftung, den Eintritt, die Entfaltung des Genoms, die IRES-abhängige Translation und Replikation, die Prozessierung des Proteins, den Zusammenbau neuer Viruspartikel und deren Ausschleusung aus der infizierten Zelle. Der Eintritt der Virionen in den Hepatozyten kommt durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Oberflächenproteine zustande. Dazu zählen der EGF-Rezeptor, der LDL-Rezeptor, CD81, der SR-B1, die Mannose-bindenden-Lektine DC-SIGN, L-SIGN und Claudin-1^[16, 17]. Nach Abfangen der HCV-Partikel in der Leber durch dort exprimiertes DC-SIGN und L-SIGN in Interaktion mit dem LDL-Rezeptor folgt

die Einschleusung durch Clathrin-abhängige Endozytose. Durch den zytoplasmatischen pH-Wert werden die Partikel entfaltet, sodass es zur Freisetzung der RNA kommt^[18]. Dabei kommt es durch die miRNA-122 zu einer Stimulation der Replikation in Folge einer Verstärkung der Bindung von Ribosom und HCV-RNA^[19]. Während der darauf folgenden Translation des Genoms wird das Ribosom zum rauen Endoplasmatischen Retikulum transportiert und gebildete Proteine werden in dessen Membran eingebunden, darunter NS4B, das wesentlich der Umstrukturierung der Membran des rER im Sinne eines „*membranous web*“ bedingt^[20]. Diese Veränderungen der Membranarchitektur des endoplasmatischen Retikulums führen wiederum zur Anlagerung weiterer Replikationskomplexe. Nach wiederholter Anlagerung der Replikationskomplexe wird die Membran des rER eingedrückt, bis diese eingestülpt ist. Ein ähnlicher Vorgang wurde elektronenmikroskopisch bei infizierten Schimpansen bereits 1980 beobachtet und bildlich als „*sponge-like inclusion*“ beschrieben^[21]. Nach Transport durch den Golgi-Apparat und abschließender Glykolisierung der Membranproteine E1 und E2 und Fusion der Membran des Golgi-Apparates mit der Zellmembran werden die Viruspartikel freigesetzt (Abbildung 1.2)^[14].

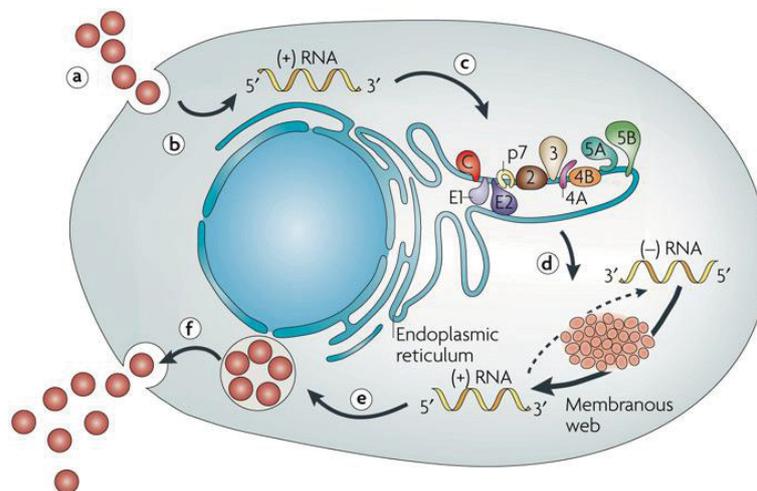


Abbildung 1.2: **Zusammenfassung des Infektions- und Replikationszyklus von HCV:** **a)** Virusbindung und Internalisierung; **b)** Zytoplasmatische Freisetzung und Entpackung der HCV-Partikel; **c)** IRES-vermittelte Translation und Prozessierung des Polyproteins; **d)** RNA Replikation; **e)** Zusammenbau des Virus; **f)** Freisetzung der Virionen (übernommen aus Moradpour^[14])

1.1.2 Modellsysteme

Zur effektiven und umfassenden Untersuchung des Hepatitis-C-Virus und seines Replikationszyklus wurde es zwingend erforderlich, Modellsysteme zu entwickeln, die möglichst viele Bestandteile des Virus und somit viele seiner Eigenschaften abbilden. Eine Infektion mit dem Virus findet nur beim Menschen und beim Schimpansen statt. Der Einsatz des Schimpansen in der tierexperimentellen Forschung ist ethisch umstritten und teuer, was die Suche nach alternativen Modellen anstieß. Weder die Kultur primärer Hepatozyten HCV-infizierter Patienten noch die Infektion primärer Hepatozyten von Schimpansen oder Menschen mit dem Hepatitis-C-Virus erbrachten stabile Systeme, die Untersuchungen des Replikationszyklus und die Suche nach Zielen antiviraler Medikamente zuließen^[22].

Der bahnbrechende Schritt in der Entwicklung von *in vitro*-Modellen auf Basis der Zellkultur war die Etablierung eines Replikonsystems durch die Arbeitsgruppe um Bartenschlager, das eine effiziente sowie reproduzierbare Replikation des HCV-Genoms ergab. Unter Verwendung des HCV-Isolates Con1 (Genotyp 1b) und Austausch der Genregion von Core bis p7 durch das Gen der Neomycin-Phosphotransferase als Selektionsmarker und die EMCV-IRES wurde das subgenomische Replikon generiert (Abbildung 1.3)^[23, 24].

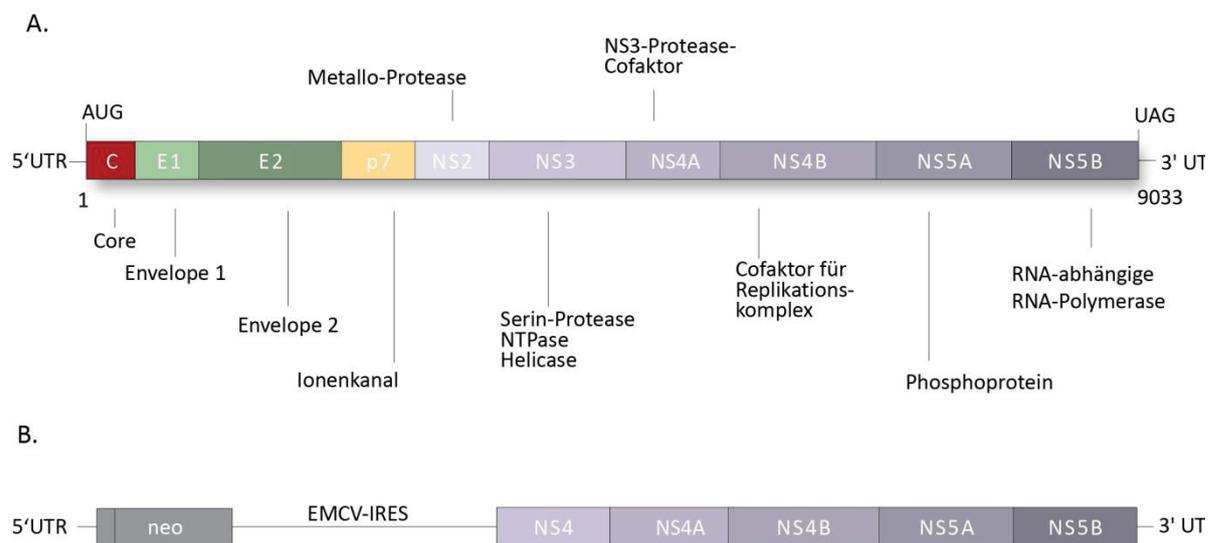


Abbildung 1.3: **HCV-Genom und Integration des Replikons:** A stellt das HCV-Genom dar. Es kodiert für die angegebenen Proteine (C bis NS5B). Unter B ist das Genom der Replikonzellen dargestellt. Hierbei sind die für das Core-Protein, das Envelope 1-Protein, das Envelope 2-Protein und das p7-Protein kodierenden Regionen durch das Genom der Neomycin-Phosphotransferase als Selektionsmarker und die EMCV-IRES ersetzt worden. Dieses Replikon wurde daraufhin in Huh7-Zellen transfiziert (modifiziert nach Moradpour^[14]).

Nach Transfektion von naiven Huh7-Zellen mit der veränderten Con1-RNA war es nun möglich, durch den Einsatz von G418 (Geneticin) Klone zu erhalten, in denen es zu einer Replikation von viraler RNA kam. Die Etablierung positiver Klone konnte allerdings nur durch adaptive Mutationen in der NS5A-Sequenz erreicht werden^[25]. Die transfizierten Huh7-Zellen wurden 1982 aus dem Karzinom eines japanischen Patienten isoliert und stellten mit die ersten hepatischen Zellen dar, die kontinuierlich replizierten^[26]. Die Weiterentwicklung des ursprünglichen subgenomischen Replikonsystems führte zur Entwicklung von Vollängenreplikons unterschiedlichen Genotyps mit gesteigerter Replikation. Allerdings hatten die anpassenden Mutationen die Inhibierung des Zusammenbaus von HCV-Partikeln zur Folge, so dass eine Produktion infektiöser Viruspartikel und somit eine Untersuchung des ganzen viralen Lebenszyklus unmöglich blieb. Erst durch das HCV-Isolat JFH-1 mit dem Genotyp 2a aus einem japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis gelang es, Huh7-Zellen zu transfizieren und ein Zellsystem zu generieren, in dem sowohl die HCV-Replikation als auch die Produktion infektiöser Viruspartikel effektiv ablaufen konnten^[27]. Die Bedeutung der Entwicklung des Replikonsystems wurde bereits zu Beginn der Etablierung dieser durch die Protagonisten in einer Vereinfachung der HCV-Forschung und der Möglichkeit der Entwicklung antiviraler Medikamente gesehen^[28]. Trotz der berechtigten Kritik an diesen Systemen, welche auf das Fehlen von Schritten im Lebenszyklus des Hepatitis-C-Virus, dem Eintritt in die Zelle und der Freisetzung der viralen Nukleinsäuren aus dem Capsid und das Fehlen von Systemen zur Untersuchung von Virus-Wirt-Beziehungen als Abbild der Immunität eines Organismus zielt, dürfen die Replikonsysteme als die Wegbereiter der Entwicklung der modernen antiviralen Medikamente mit ihrem klinischen Erfolg gesehen werden^[29]. Mit der 2012 stattgehabten Etablierung von Replikonsystemen des Genotyps 3a und 4a stehen weitere Replikonsysteme zur Verfügung^[30]. Entsprechend den genannten Vorteilen und dem Fehlen einer annehmbaren Alternative wurden für die Erstellung der vorliegenden Arbeit Hepatoma-Zellen mit einem Replikonsystem verwendet. Die für diese Arbeit genutzten Zelllinien sind in Tabelle 2.1 vermerkt.

1.1.3 Interferenz mit der Wirtszelle und dem Wirt

Bei einer Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus kann es nach einer Inkubationszeit von 6 bis 8 Wochen zu einer akuten Hepatitis kommen. Die meisten Fälle verlaufen jedoch in der Akutphase der Infektion unauffällig. Keine akute Infektion liegt vor, wenn über sechs Monate nach Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus HCV-RNA nachgewiesen werden kann. Definitionsgemäß handelt es sich um eine chronische Infektion. In ca. 50 % einer akuten symptomatischen Hepatitis-C kommt es zu einer spontanen Elimination des Virus durch den Wirt^[31]. Hierbei ist eine adäquate und andauernde T-Zell Antwort zu verzeichnen^[32, 33]. Die Immunantwort bei chronisch progredienter Hepatitis-C ist charakterisiert durch eine schwache bis fehlende Hepatitis-C-Virus spezifische CD4⁺T-Zell-Antwort im Sinne einer antigenspezifischen T-Zell-Proliferation und einer Bildung von zytotoxischen CD8⁺T-Zellen mit gestörter proliferativer Fähigkeit und verminderter Sekretion von INF γ ^[34, 35]. Darüber hinaus kommt es in der Leber zu einer 30-fachen Erhöhung der Zellzahl von defizienten CD8⁺T-Zellen im Vergleich mit peripheren Blutproben^[36]. Die Rekrutierung immunkompetenter Zellen in die Leber wird insbesondere durch chemotaktisch wirksame Zytokine, nämlich Chemokine, vermittelt. So führt die Stimulation von T-Zellen mit INF γ zur Freisetzung von CXCL10, welche wiederum eine verstärkte Rekrutierung von T-Zellen bedingt^[37, 38]. Die folgende Akkumulation von T-Zellen als Reaktion auf das persistierende Antigen und die Ausschüttung von Chemokinen verursachen eine Entzündungsreaktion im Lebergewebe, die wiederum bei 20 % der Infizierten zu einer Zirrhose führt^[39]. Die Störung der INF γ -Sekretion von HCV-spezifischen CD8⁺T-Zellen ist nicht nur für diese charakteristisch und unterscheidet sie von anderen aus infizierten Lebern isolierten T-Zellen^[35], sie hat auch weiterreichende Bedeutung für die Leber bei einer Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus. INF γ ist ein Faktor der Rekrutierung von T-Zellen und der Steigerung der Phagozytose-Effektivität von Makrophagen. Unter INF γ -Einfluss kommt es zu einer besseren Verschmelzung von Phagosomen mit Lysosomen und somit zu einer optimierten Präsentation von prozessiertem Antigen. Die Produktion des bakteriziden Stickstoffmonoxids und reaktiver Sauerstoffradikale wie dem Wasserstoffperoxid in den Lysosomen dient der Abtötung von Bakterien sowie der Zerstörung virusinfizierter Zellen. Dieser Vorgang wird ebenfalls durch INF γ gesteigert^[40, 41]. Andere Autoren sehen eine INF γ -vermittelte Inhibition von Virusprotein und die Inhibition der RNA-Replikation von genomischen und subgenomischen HCV-Replikons als führend an^[42]. Die chronische Inflammation und die konsekutive, massenhafte Infiltration

der Leber mit in ihrer Funktion defizienten CD8⁺-Leukozyten führt zu dem für eine chronisch progrediente Hepatitis-C typischen Verlauf über die Fibrose durch eine andauernde Entzündungsreaktion zur Zirrhose^[43]. Es ist bekannt, dass die Stärke und die Dauer der spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort als auch die Antwort der T-Helferzellen in der frühen Phase der Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus über die Elimination oder Persistenz des Virus im Organismus entscheiden^[44, 45]. Es wird angenommen, dass Veränderungen des Zytokinmilieus verantwortlich sind. Anfang der 90er Jahre ist festgestellt worden, dass TNF α bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Virus-Infektion erhöht ist. TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von Monozyten und ihren Verwandten nach einem inflammatorischen Stimulus freigesetzt wird. Von TNF α ist bekannt, dass bei einer Hepatitis-C-Infektion eine erhöhte Sekretion durch immunkompetente Zellen im menschlichen Organismus stattfindet^[46, 47]. Das Core-Protein des Hepatitis-C-Virus besitzt die Fähigkeit, durch Abspaltungen von Bestandteilen proapoptotischer Signalwege diese zu blockieren und so den für das Virus unentbehrlichen Wirt, den Hepatozyten vor der Apoptose zu bewahren^[48]. Die pathophysiologische Bedeutung der Protease NS3/4A für die Virus-Wirt-Interaktion wird anhand neuerer Untersuchungen mit einem stabilen NS3/4A-Mausmodell deutlich. NS3/4A-transgene Mäuse wurden mit CCl₄, LPS, TNF α und D-GalN als potente leberschädigende Substanzen behandelt. CCl₄ führt zu einer Schädigung der Leber mit einhergehender Freisetzung von TNF α ^[49]. LPS aktiviert über den TLR4 die Freisetzung von TNF α in Makrophagen und Kupfferschen-Sternzellen und bewirkt eine ausgeprägte Apoptose von Lebergewebe^[50]. TNF α führt schlussendlich über die Bindung an den TNF-R1 zur Aktivierung proapoptotischer Signalwege und damit zum Zelluntergang und wird als wichtiger Faktor für die Induktion eines Leberschadens beschrieben^[51]. D-Galaktosamin führt bei Ratten durch das Abfangen von Uridin-Phosphaten zu einer stark verminderten Bildung von Uridindiphosphat-Glukose (UDP-Glukose), Uridintriphosphat (UTP) und Uridindiphosphat (UDP) konsekutiv zur Störung der Bildung der Zellmembran und damit zu einer akuten Hepatitis^[52]. Die Kombination von LPS und D-GalN beziehungsweise TNF α und D-GalN ist ein *in vivo*-Modell einer akuten Hepatitis^[53]. Es ist beschrieben worden, dass nach einer Behandlung der nicht-transgenen Tiere mit einer tödlichen Dosis TNF α und D-GalN 80 % dieser Tiere an einer Leberschädigung verstarben, wohingegen die Tiere mit einer stabilen Expression von NS3/4A im Lebergewebe die gleiche Gabe überlebten. Darüber hinaus konnte festgestellt

werden, dass nach einer vorherigen Behandlung der NS3/4A-transgenen Tiere mit dem Inhibitor der p38^{MAPK}, SB203580, die Tiere die Gabe von TNF α und D-GalN wiederum nicht überlebten, was nahelegt, dass die Aktivierung der p38^{MAPK} in diesem Zusammenhang zur Generierung protektiver Signale führt. NS3/4A unterdrückt die LPS-induzierte Aktivierung von STAT1/2. Die durch IFN α - oder IFN γ -induzierte Aktivierung von STAT1/2 wird jedoch nicht unterdrückt. Die Resistenz der untersuchten Tiere gegen TNF α wird durch die Hemmung des sich anschließenden proapoptotischen JNK-Signalwegs mit Aktivierung der STAT1 erklärt. Bezeichnenderweise konnte in der gleichen Arbeit belegt werden, dass die p38^{MAPK} in NS3/4A-transgenen Tieren konstitutiv verstärkt exprimiert wird^[53]. Bemerkenswert ist auch, dass die p38^{MAPK} zu einer Stabilisierung der mRNA von Chemokinen, im konkreten Fall von CXCL8, führt und auf diese Weise die Expression beeinflusst^[54]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der immunmodulatorischen Eigenschaften des Hepatitis-C-Virus und beschreiben in einem *in vivo*-Modell eine wichtige Strategie, der TNF α -Wirkung und der T-Zell-vermittelten Immunantwort zu entgehen^[55]. Die Untersuchungen bieten ebenfalls einen Erklärungsansatz für die hohen TNF α -Spiegel bei HCV-infizierten Patienten bei einer hohen Replikationsrate^[47, 56] ohne, dass es zu einem endotoxischen Schock und Tod kommt. Es wird angenommen, dass TNF α im HCV-Kontext einen positiven Effekt auf die virale Replikation besitzt, denn infizierte Patienten profitieren von einer Anti-TNF α -Therapie in Kombination mit Ribavirin nachweislich^[57]. Analog zu der Beobachtung, dass HCV-infizierte Menschen einen erhöhten TNF α -Spiegel aufweisen, konnte im Mausmodell ebenfalls ein erhöhter TNF α -Spiegel bei NS3/4A-transgenen Tieren gefunden werden^[58]. Zusammenfassend konnte in bisherigen Arbeiten dargestellt werden, dass das Hepatitis-C-Virus mit der angeborenen Immunantwort durch die Unterbrechung intrazellulärer proapoptotischer Signalwege, die wesentlich für die hepatoprotektiven Effekte von NS3/4A relevant sind, interferiert^[53]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die erworbene Immunantwort durch intrazelluläre Veränderungen bedingt durch die NS5B-Polymerase und dem daraus resultierenden Fehlen eines spezifischen Antigens gestört ist^[12]. Diese Umstände erklären das gehäufte Auftreten von Leukozyten in der infizierten Leber nicht abschließend^[36]. Es bleibt anzunehmen, dass die interzelluläre Modulation der Immunantwort durch das Hepatitis-C-Virus mittels Chemokinen erfolgt. Die Abbildung 1.4 fasst die Erkenntnisse aus dem Mausmodell zusammen.

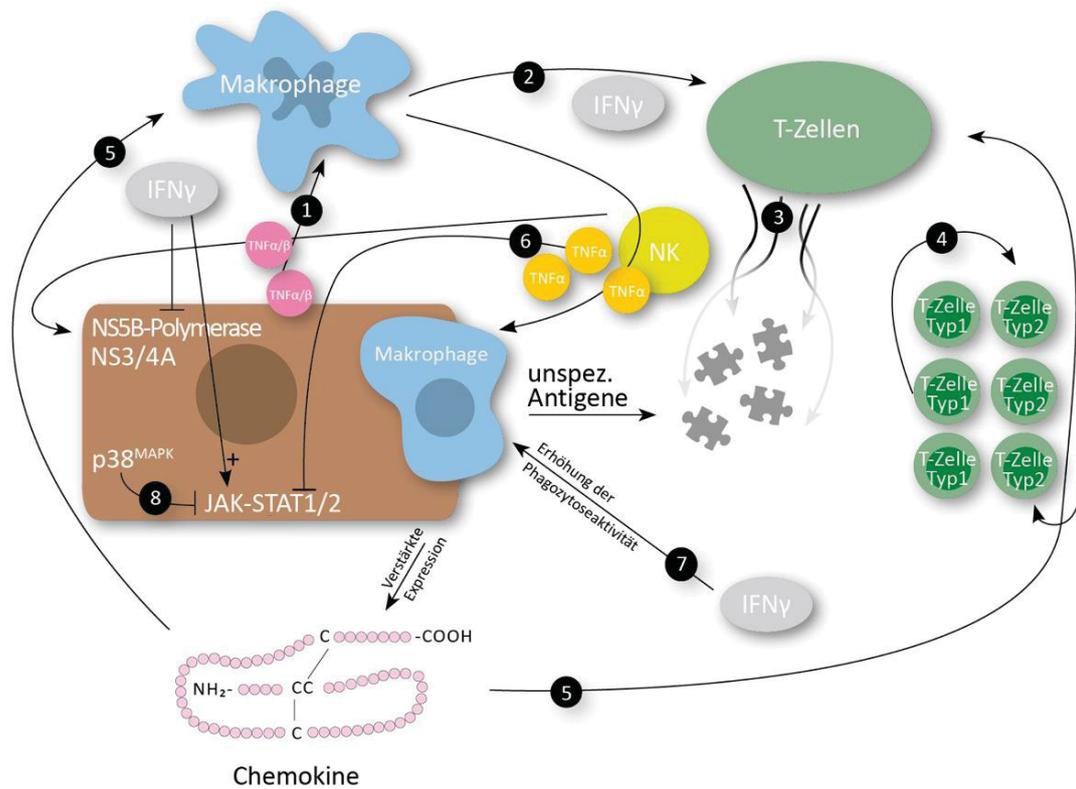


Abbildung 1.4: **Zusammenfassende Darstellung der HCV-Pathologie.** Infizierte Hepatozyten werden durch die angeborene Immunität repräsentiert durch Makrophagen erkannt. Dabei kommt es zur Ausschüttung von INF α und INF β durch die infizierten Zellen (1). Die Aktivierung der Makrophagen führt wiederum zur Ausschüttung von Interferon-Gamma (IFN γ) und die Phagozytose zur Präsentation von viralem Antigen (2). Auf Grund der NS5B-Polymerase mit ihrer fehlenden Fehlerkorrektur kommt es bei einem ständig wechselnden Antigen zu keiner suffizienten T-Zellantwort (3). Die Zellen akkumulieren im Lebergewebe und aktivieren sich gegenseitig durch die Ausschüttung von Chemokinen (4). Hepatozyten schütten ebenfalls Chemokine aus, die wiederum Effekte auf die anwesenden immunkompetenten Zellen haben (5). TNF α wird von den dendritischen Zellen (DC) und den Natürlichen Killerzellen (NK) bei einer Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus und der konsekutiven Inflammation vermehrt ausgeschüttet und hemmt wiederum die Aktivierung proapoptotischer Signalwege der infizierten Hepatozyten (6). IFN γ hat einen positiven Effekt auf die Phagozytoseaktivität der Makrophagen (7) und hemmt die Virusreplikation (8). Die p38^{MAPK} hemmt proapoptotische Signalwege (9).

1.2 Chemokine

1.2.1 Nomenklatur und Bedeutung

Chemokine werden von einigen Autoren zu den wichtigsten Regulatoren der Steuerung von Immunzellen im physiologischen wie auch im pathophysiologischen Kontext gezählt. Sie gehören zu einer großen Gruppe von Polypeptiden, die unterschiedliche Effekte über ihre Rezeptoren mit spezifischen G-Protein-gekoppelten Signalwegen vermitteln^[59]. Als eine der ersten Funktionen wurde die Chemotaxis von Leukozyten beschrieben, die ihnen auch den Namen gab: Chemokine = chemotaktische Zytokine^[60]. Bereits Ende der 80er Jahre wurden die ersten chemotaktischen Zytokine beschrieben. Es handelt sich um das zunächst als IL-8 bezeichnete CXCL8 und MCP-1^[61]. Im Laufe der folgenden Jahre wurden über 50 weitere Chemokine identifiziert und beschrieben. In den systematischen Nomenklaturen werden Chemokine wegen ihrer Vielzahl nach strukturellen Kennzeichen unterschieden. Die derzeit gültige Nomenklatur basiert auf der Anzahl und Position der Cysteinreste am Aminoterminus des jeweiligen Chemokins^[62]. Hiernach lassen sich „C“, „CC“, „CXC“, „CX3C“ Grundstrukturen unterscheiden. „X“ kennzeichnet hierbei eine beliebige zwischen den beiden Cysteinresten gelegene Aminosäure^[59]. Gelegentlich werden die griechischen Buchstaben α , β , γ und δ verwendet, um die Grundstruktur zu beschreiben (α = CXC, β = CC, γ = C, δ = CX3C). Dabei werden die Chemokine in ihrer Funktion als Liganden zusätzlich mit einem „L“ gekennzeichnet und ihre entsprechenden Rezeptoren mit einem „R“. Fußend auf der chronologischen Reihenfolge der Entdeckung der Chemokine wird die jeweilige Nummer angehängt^[63]. CX3CR1 und CX3C1 als Vertreter der „CX3C-Gruppe“ haben als Besonderheit einen mucinähnlichen und membranverankernden Abschnitt, der sie von den übrigen Chemokinen unterscheidet^[64]. Die strukturellen Unterscheidungen sind in der Abbildung 1.5 wiedergegeben.

Es gibt Chemokine, die die „CXC“ Grundstruktur aufweisen und anhand zusätzlicher struktureller Merkmale weiter unterteilt werden können. Die Unterteilung richtet sich nach dem Vorhandensein des sogenannten ELR-Motivs unmittelbar vor dem ersten Cysteinrest. Dabei handelt es sich um die Aminosäuresequenz Glycin-Leucin-Arginin, die den jeweiligen CXC-Chemokinen angiogenetische Potenz verleiht^[65]. Eines der am besten untersuchten Chemokine mit einem ELR-Motiv ist IL-8, früher MDNCF (*monocyte-derived neutrophil chemotactic factor*) und heute, der Nomenklatur entsprechend, CXCL8 genannt. Es ist ein Faktor der Angiogenese bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und

besitzt damit weit über seine chemotaktischen und proinflammatorischen Wirkungen hinausgehende Funktionen^[66]. Auf Grund neuerer Untersuchungen wird vermutet, dass die Dysregulation von CXCL8 und seine Rezeptoren CXCR1/2 maßgeblich an der Tumorprogression beteiligt sind^[67].

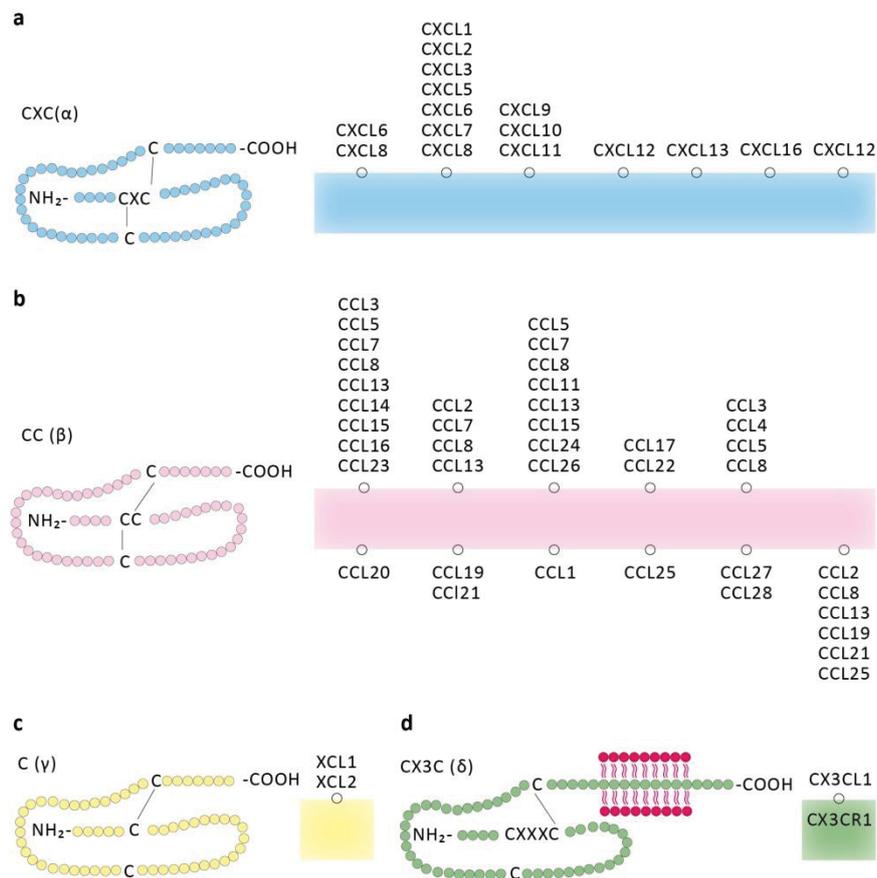


Abbildung 1.5: **Einteilung der Chemokine nach ihrer Struktur:** Die Anzahl und die Position der am N-Terminus des jeweiligen Chemokins stehenden Cysteinreste (C) bestimmen die Unterfamilie. Beliebige Aminosäuren sind zwischen den Cysteinresten zu finden (X). Die Chemokine werden in ihrer Funktion als Liganden zusätzlich mit einem „L“ und ihre entsprechenden Rezeptoren mit einem „R“ gekennzeichnet. Die Chronologie ihrer Entdeckungen wird numerisch festgehalten. **(a)** Chemokine und Rezeptoren der „CXC-Gruppe“ **(b)** Chemokine und Rezeptoren der „CC-Gruppe“ **(c)** Chemokine und Rezeptoren der „C-Gruppe“ **(d)** Chemokin und Rezeptor der „CX3C-Gruppe“ mit mucinähnlichem, membranverankertem Proteinstrang (modifiziert nach William Rostène, Patrick Kitabgi, Stéphane Mélik Parsadaniantz^[68])

Eine funktionelle Unterteilung der Chemokine erfolgt anhand der Eigenschaften inflammatorisch und homöostatisch. Inflammatorische Chemokine sind essentiell für die Chemotaxis von Leukozyten zum Ort des Entzündungsgeschehens und werden je nach Situation vor Ort differenziell exprimiert. Im Unterschied dazu stehen die für die Homöostase verantwortlichen konstitutionell exprimierten Chemokine. Sie sind

vornehmlich in lymphatischen Organen vorhanden und sorgen für die Migration von Lymphozyten^[69]. Ein Beispiel ist das Chemokin CCL21 mit seinem ursprünglichen Namen SLC (*secondary lymphoid organ chemokine*). Nach einer spontanen Mutation des für CCL21-kodierenden Gens wurde eine ausgeprägte Verminderung von T-Zellen in Lymphknoten von Mäusen beobachtet^[70]. Naive T-Lymphozyten exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7, von dem angenommen wird, dass CCL21 der aktivierende Ligand ist. CCR7^{-/-}-Knockout-Mäuse weisen ähnliche Funktionsstörungen der Lymphozytenmigration wie CCL21^{-/-}-Knockout-Mäuse auf, was diese These nachhaltig unterstützt^[71]. Über die Rekrutierung von Leukozyten hinaus spielen Chemokine eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von B- und T-Lymphozyten. CXCL12^{-/-}-Knockout-Mäuse versterben perinatal und weisen eine ausgeprägte Störung der B-Zell-Lymphopoese auf. Ähnliche Immundefekte treten bei CXCR4^{-/-}-Knockout-Mäusen auf. Das führt zur Schlussfolgerung, dass CXCL12 Ligand von CXCR4 ist^[72, 73].

Das gleichzeitige Auftreten von einerseits angiogenetischen und andererseits angiostatischen Chemokinen konnte bei experimentellen Untersuchungen hinsichtlich der Neovaskularisation von Kornealgewebe dargestellt werden. Unter anderem konnte die Rolle der Chemokine bei der Organisation der Blutversorgung, der Wundheilung, bei chronischer Entzündung und bei der Tumorentstehung belegt werden^[65]. Beschrieben wird ein vierstufiger Ablauf der von Chemokinen abhängigen Integration von Immunzellen in Endothelzellen und der weitere Übergang in rekrutierendes Gewebe. Im ersten Schritt rollen die im schnellen Blutstrom zirkulierenden Leukozyten an den Endothelzellen entlang und werden über die Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen aus der Gruppe der Selektine an die Gefäßwände gebunden. Im zweiten Schritt kommt es durch den agonistischen Effekt von endothelialen Chemokinen auf Chemokinrezeptoren von gebundenen Leukozyten zur Aktivierung von Transmembranproteinen der Gruppe der Integrine. Der dritte Schritt umfasst die folgende und endgültige Arrestierung der Leukozyten an der Endothelzellwand. Im letzten Schritt wandern die Leukozyten entlang einem Konzentrationsgefälle leukozytenrekrutierender Chemokine in das entsprechende Gewebe^[74]. Zusammenfassend belegen diese Beobachtungen, dass die Funktionen von Chemokinen weit über die ursprünglich beschriebene Chemotaxis und proinflammatorische Potenz hinausgehen und ihre Bedeutung sich auf Tumorgenese, Tumorprogression, Gewebeorganisation, Geweberegeneration und Angiogenese

ausweitet. Hieraus begründet sich das hohe wissenschaftliche Interesse an einem umfangreichen und detaillierten Wissen über Chemokine und ihren genauen Funktionen.

1.2.2 Chemokine und Signaltransduktion

Chemokinrezeptoren sind Rezeptoren, die die Fähigkeit besitzen, ein oder mehrere Chemokine als Liganden zu binden. Es sind 18 Rezeptoren bekannt, die diese Definition erfüllen^[75]. Die gängige Nomenklatur der Chemokinrezeptoren leitet sich von den jeweiligen Bindungspartnern, den Liganden und ihrer Grundstruktur (C, CC, CXC oder CX3C) ab. Sie werden am Ende mit einem „R“ für „Rezeptor“ und einer fortlaufenden Nummer versehen^[59]. Chemokinrezeptoren sind membranständige Proteine, die sieben Transmembrandomänen umfassen, drei intrazelluläre sowie drei extrazelluläre Schleifen aufweisen und G-Protein-gekoppelt sind. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$ ^[76]. Im inaktiven Zustand ist GDP durch das G-Protein gebunden. Nach Aktivierung durch die Bindung eines Liganden wird GDP durch GTP ausgetauscht. Infolge dessen dissoziiert das G-Protein in seine Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$. Die Untereinheiten $G\beta\gamma$ aktivieren wiederum die membranständige PLC. Die führt durch hydrolytische Spaltung von PIP_2 zur Bildung von DAG und IP_3 . IP_3 mobilisiert Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. DAG aktiviert im Zusammenspiel mit Ca^{2+} die PKC und weitere calciumsensitive Proteinkinasen, die die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine katalysieren^[77]. Kalzium selbst kann durch seine Freisetzung innerhalb der Zelle zu einer durch Integrine vermittelte Loslösung von Matirxproteinen und einer daraus resultierenden Steigerung der Migrationsfähigkeit Neutrophiler Granulozyten führen^[78]. Als weiterer Effektor der $G\beta\gamma$ -Untereinheit ist die $Pi3K\gamma$ beschrieben, die wiederum als Effektor der PKB dient^[79, 80]. Neutrophile Granulozyten $Pi3K\gamma$ -defizienter Mäuse zeigen *in vitro* eine verminderte, aber nicht aufgehobene Chemotaxis^[81]. Hieraus lässt sich ableiten, dass der Signalweg über DAG und die PKC als auch der Signalweg über die $Pi3K\gamma$ und die PKB für die durch Chemokine vermittelten Effekte Bedeutung haben. Die Abbildung 1.6 fasst den Signalweg zusammen.

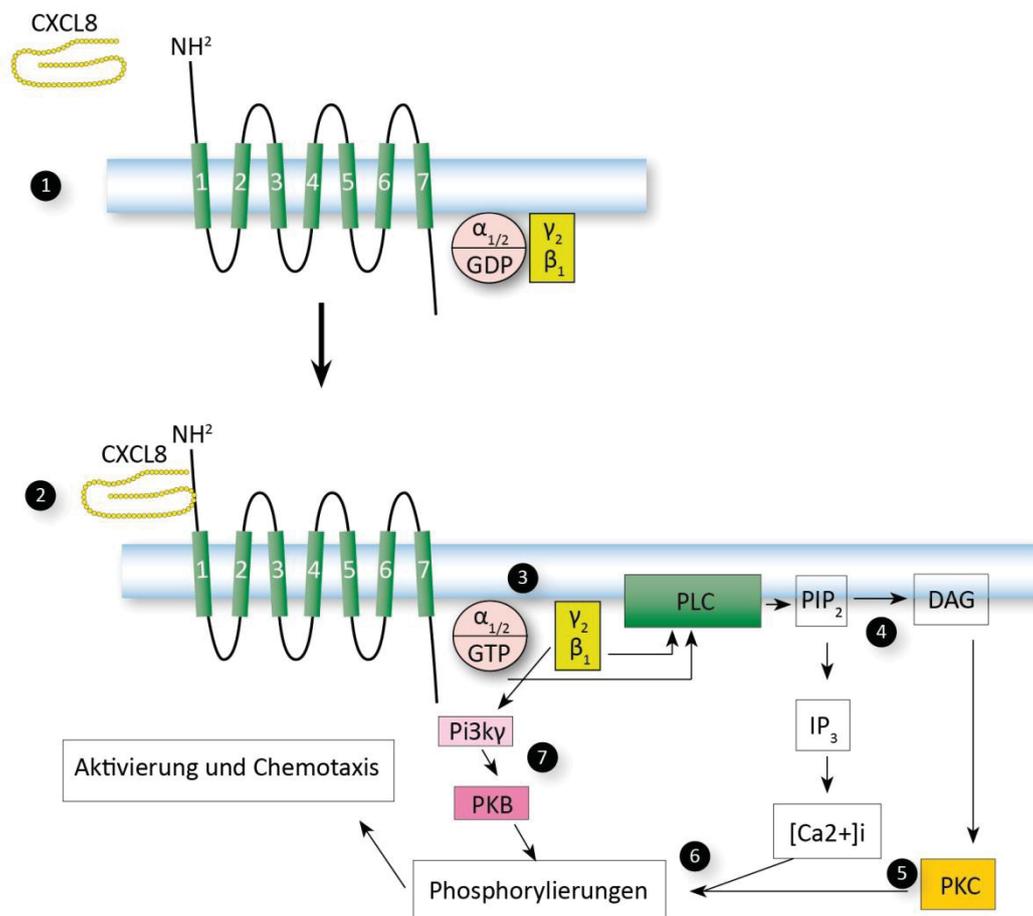


Abbildung 1.6: **Struktur eines Chemokinrezeptors und Signaltransduktion nach Bindung eines Liganden:** Der Chemokinrezeptor besteht aus sieben Transmembrandomänen, die in der Zellmembran liegen. Der N-Terminus liegt extrazellulär. Drei Schleifen des Rezeptors liegen intrazellulär und drei Schleifen extrazellulär. Der C-Terminus befindet sich intrazellulär (1). Ihm vorgelagert ist das G-Protein mit seinen drei Untereinheiten. (2) Im inaktiven Zustand ist GDP durch das G-Protein gebunden. Nach Aktivierung durch Bindung eines Liganden wird GDP durch GTP ausgetauscht. Es dissoziiert in seine Untereinheiten G α und G $\beta\gamma$ (3). G $\beta\gamma$ aktivieren die membranständige PLC und hydrolysiert die Spaltung von PIP₂ zu DAG und IP₃ (4). IP₃ mobilisiert Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern und aktiviert mit DAG die PKC (5), die die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteinekinasen (MAPK) initiiert (6). Die G $\beta\gamma$ -Untereinheit hat als Effektor PKB über die Pi3K γ (7) (modifiziert nach Murdoch^[76]).

1.2.3 Chemokine und Hepatitis-C

Chemokine dienen auch in der Leber als wichtiges Steuerungselement für Leukozyten. Durch die Chemotaxis von Leukozyten, im Speziellen zytotoxischer T-Zellen, können beispielsweise virusbefallene Zellen zerstört werden. Als Ursache für die Akkumulation von Lymphozyten in HCV-infiziertem Lebergewebe wird eine erhöhte Expression von CXCR3 auf Lymphozyten, die aus entzündetem Lebergewebe gewonnen wurden, beobachtet. Eine verstärkte Migration dieser Lymphozyten in das Lebergewebe wird durch eine erhöhte Sekretion von CXCL9 und CXCL10 hervorgerufen^[82]. Untersuchungen

der intrahepatischen Immunzellpopulationen von NS3/4A-transgenen Tieren stellten Alterationen von Lymphozyten heraus. Es konnte belegt werden, dass die CD4⁺-T-Zellen in ihrer Anzahl im Lebergewebe reduziert sind und es zu einer Veränderung in den Untergruppen von dendritischen Zellen (CD11c⁺/CD11b⁻/MHC-II int/Ly6C/G⁺ Population) kommt^[53]. Hinweise auf die Bedeutung von Chemokinen in der Pathogenese des Hepatitis-C-Virus in Zusammenhang mit der Alteration der Immunzellpopulation sind beschrieben worden, darunter die Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR3, dessen Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind^[82]. Bei chronisch verlaufender Hepatitis-C wird CXCR3 in sinusoidalen Endothelzellen exprimiert und führt zu einer anhaltenden Rekrutierung von TH1-Zellen in das Lebergewebe^[83]. Darüber hinaus wurden in Untersuchungen des Serums von HCV-infizierten Patienten, abgesehen von CXCL12, erhöhte Spiegel für die inflammatorischen Chemokine CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL21 gefunden^[84].

In der Literatur gibt es unterschiedliche Auffassungen bezüglich der Chemokine, dem histologischen Grad der Fibrose und der Aktivität der Hepatitis (mRNA, HCV-Genotyp) als Marker der Leberschädigung^[85]. Einerseits werden Verbindungen zwischen dem Expressionsniveau bestimmter Chemokine, zum Beispiel CXCL10, und dem Grad der Leberschädigung gesehen^[86], andererseits sehen Autoren die fehlende Korrelation des Expressionsniveaus bestimmter Chemokine mit dem Grad der Leberschädigung als ein Zeichen für die Spezifität der Infektion für Hepatitis-C-Virus in Bezug auf die jeweilige Chemokinexpression im Gegensatz zu einer Hepatitis-B-Virus-Infektion^[87]. Das Chemokin CXCL10 auch IP-10 wird auf verschiedenen Zelltypen, darunter Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Astrozyten, Monozyten und Hepatozyten unter INF γ -Einfluss exprimiert^[88]. CXCL10 fehlt im Vergleich zu anderen CXC-Chemokinen die chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, während es auf T-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten als Chemotraktant wirkt^[89]. Im Zusammenhang mit der Virus-Hepatitis-C als auch anderen chronischen Erkrankungen wie dem Diabetes Mellitus konnte beschrieben werden, dass CXCL10 zu einer gerichteten Infiltration des betroffenen Organs durch T-Zellen führt^[90]. Es gibt Hinweise darauf, dass CXCL10 nach Abspaltung des flexiblen Aminosäureterminus von CXCL10 durch Proteasen in einer antagonistisch wirkenden Form vorliegt und somit zu einer erschwerten Viruselimination bei Hemmung der Infiltration durch T-Zellen führt^[91]. Diese Ergebnisse könnten ein Grund dafür sein, dass

CXCL10 als ein negativer Prädiktor für HCV- und HCV/HIV-koinfizierter Patienten gesehen wird^[92]. Hervorzuheben ist das Ligand-Rezeptor-Paar CXCR4 auch SDF-1 und CXCL12. CXCR4 ist ein wichtiger Faktor bei der Wanderung hämatopoetischer Stammzellen in das Knochenmark sowie bei der Migration aus dem Knochenmark und wird bei systemischer Inflammation in Form einer Sepsis auf Lymphozyten vermehrt exprimiert^[93, 94]. Auch für einen Agonisten von CXCL2 ist eine Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen beim Rhesusaffen beschrieben worden^[95]. Es wird vermutet, dass das Ligand-Rezeptor-Paar CXCL12 und CXCR4 eine wichtige Rolle in der Leukozytenrekrutierung hin zu geschädigtem Gewebe und dessen Organisation spielt. Im Mausmodell konnte beschrieben werden, dass die Applikation von CXCL12 zur verstärkten Mobilisierung von Stammzellen und Migration in Wundgebiete und zum schnelleren Schließen von Wunden führt^[96]. Im Fall der chronischen Inflammation der Leber durch das Hepatitis-C-Virus wurde bei immunhistologischen Untersuchungen eine Reorganisation von CXCL12 in der Leber hin zu den Endothelien neu gebildeter Gefäße festgestellt. Die Ansammlung von CXCR4-exprimierenden Lymphozyten in der Leber ist ein Hinweis auf den effektiven Übertritt dieser in das umliegende Lebergewebe. In Patientenserum konnte darüber hinaus eine erhöhte Konzentration von CXCL12 gefunden werden, die als Hinweis auf die nicht ausschließlich die Leber betreffende Funktion dieses Chemokins bei Entzündungsgeschehen gilt^[84]. Es ist anzunehmen, dass es unter anderem durch die Änderung der Expression von CXCL12 zu einem für den Wirt schädlichen Versuch der Gewebeneubildung und einer überschießenden Organisation des Lebergewebes von einer Fibrose hin zur Zirrhose durch CXCR4-tragende Leukozyten kommen kann.

Die hohe Stellung dieses Rezeptor/Liganden Paares in der immunologischen Hierarchie wird deutlich infolge von Patientenuntersuchungen nach Knochenmarkstransplantationen. Die transplantierten hämatopoetischen Stammzellen wandern zur Leber und formen sich nach Rezeptor/Liganden-Kontakt zu phänotypisch ähnlichen Zellen um^[97]. Dieser Vorgang unterstützt die Annahme, dass CXCR4 und sein Ligand CXCL12 eine führende Rolle bei Umbauvorgängen der Leber spielen. CXCL8, ein Chemokin mit ELR-Motiv, wird mit der Leberregeneration nach schädlichen Einflüssen auf diese in Zusammenhang gebracht. Nach Applikation von Acetaminophen (Paracetamol) wurde eine signifikante Erhöhung histologischer und biochemischer Marker der Leberschädigung im Mausmodell gemessen. Die Applikation von CXCL8 erbrachte eine Begrenzung des Leberschadens, messbar

histologisch als auch anhand biochemischer Marker^[98]. Es kann eine enge Verbindung der HCV-bedingten Pathologie und Chemokinen angenommen werden. Zum Beispiel wird die Stabilität der mRNA von CXCL8 maßgeblich durch die p38^{MAPK} positiv beeinflusst^[54]. Diese wiederum wird in NS3/4A transgenen Tieren verstärkt exprimiert^[53]. Untersuchungen bei Patienten mit nicht-HCV-assoziiertes terminaler Leberzirrhose belegen, dass die Chemokine CXCL2, CXCL6 und CXCL8 im Vergleich zu Kontrollprobanden eine Induktion ihrer Expressionen erfahren^[99]. Ob es sich bei diesem Vorgang um einen Versuch der Protektion handelt oder dieser zu einer Aggravierung der Schädigung führt, ist unklar. Es erscheint notwendig, unterschiedliche Chemokine im HCV-Kontext zu untersuchen, um gegebenenfalls eine Veränderung des Expressionsmusters feststellen zu können, und nicht die Expression eines einzelnen Chemokins.

1.3 Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF α) und Interleukin-1-Beta (IL-1 β)

Der Tumornekrosefaktor-Alpha ist ein Zytokin, das bei systemischen Entzündungsprozessen im Rahmen der Akuten-Phase-Reaktion von Bedeutung ist. Seine Entdeckung geht zurück bis ins Jahr 1893, als William Bradley Coley feststellte, dass Tumorwachstum durch die Induktion eines Fiebers durch Applikation von Bakterien aus einer Bouillon-Kultur in das tumoröse Gewebe reduziert werden konnte. Ziel der Injektionen war ein möglichst lange anhaltendes Erysipel mit vergesellschaftetem Fieber. Coley formulierte in seinen Schlussfolgerungen sogar, dass der kurative Effekt der iatrogenen Erysipelle ein Faktum sei^[100]. 1968 stellte Gale Granger fest, dass Lymphozyten eine zytotoxische Aktivität *in vitro* nach Stimulation mit Phytohemagglutinin aufweisen. Er nannte das charakterisierte Protein *human lymphotoxin* (HLT)^[101]. 1975 wurde ein von Makrophagen produziertes Zytotoxin beschrieben, das zu Nekrosen bei Fibrosarkomzellen der Maus führte und TNF genannt^[102]. Mit Etablierung der Untersuchung der DNS konnte 1984 dargestellt werden, dass HLT und TNF sehr ähnliche Sequenzen aufweisen^[103]. TNF α bindet an zwei Rezeptoren, den TNF-R1 und den TNF-R2^[104]. Die Signaltransduktion führt hauptsächlich zur Aktivierung von NF- κ B, p38^{MAPK} und JNK1^[105-107]. Die Aktivierung des JNK-Signalweges ist ein Bindeglied von TNF α und der TNF α -vermittelter Apoptose^[108]. Die Interaktion zwischen TNF α und seinem Rezeptor auf T-Zellen ist notwendig für die Proliferation, die Funktionen von CD8⁺T-Zellen und die Kostimulation zwischen CD8⁺T-Zellen, deren antivirale Aktivität bei nicht zytopathogenen

Viren wie dem Hepatitis-C-Virus im Vordergrund der zellulären Immunantwort steht^[109, 110]. Hierbei wird angenommen, dass eine Hierarchie für TNF α , TNF-R1 und TNF-R2 besteht und nicht ein einzelner Teil der Signalkette als Effektor fungiert^[110]. TNF-R1 wird dabei als führend für die Induktion eines Leberschadens durch TNF α bei Applikation von LPS und D-GalN angesehen^[111]. Interleukin-1-Beta ist ein Zytokin mit hoher proinflammatorischer Potenz^[112]. IL-1 β vermittelt seinen Effekt über den Interleukin-1-Rezeptor I und den Interleukin-1-Rezeptor II, wobei die Wirkung hauptsächlich über den IL-1R I vermittelt wird^[113, 114].

1.4 Zielsetzung

Zentrales Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses des subgenomischen HC-Replikons auf die durch Entzündungsfaktoren induzierte Produktion von Chemokinen durch die Wirtszelle. Respektive der Entzündungsfaktoren lag der Fokus auf $\text{TNF}\alpha$ und zum Teil auch $\text{IL-1}\beta$. Der Schwerpunkt in Bezug auf die Analyse der Chemokine lag auf CXCL8 und den $\text{INF}\gamma$ -abhängigen Chemokinen, CXCL9 , CXCL10 und CXCL11 .

Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ vermittelte Aktivierung der p38^{MAPK} durch das subgenomische HCV-Replikon modifiziert wird und beispielhaft anhand von CXCL1 und CXCL8 geprüft werden, inwieweit diese Aktivierung für die Synthese des entsprechenden Chemokins essentiell ist.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material, Substanzen und Lösungen

2.1.1 Materialien für die Zellkultur

Gewebekulturflaschen 75 cm ²	Greiner; Solingen, Deutschland
Gewebeschalen 6 cm	Falcon; Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Conning inc.; NY, USA
Minisart Plus Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius; Göttingen, Deutschland

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

PBS/Dulbecco	Biochrom AG; Berlin, Deutschland
DMEM/Nutrient Mix-F12	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
G418 (Geneticin)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Cytogen; Sinn-Fleisbach, Deutschland
FCS (Fetales Kälberserum)	Percio; Bonn, Deutschland

2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim, DE
Tumor Necrosis Factoralpha (TNFα)	Roche; Mannheim, DE
Interleukin-1-beta (IL-1β)	Roche; Mannheim, DE
SB203580 MAP Kinase Inhibitor	Merck Chemicals; Nottingham, UK
Agarose	
Ethidium-Bromid	
Ethanol	
TAE-Puffer	
DMSO	

2.1.4 Kits

QIAshredder	Qiagen; Hilden, Deutschland
RNeasy Mini	Qiagen; Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription	Qiagen; Hilden, Detuschland
RNase-Free DNase	Qiagen; Hilden, Detuschland
VenorGeM Mycoplasma Detection	Minerva Biolabs; Berlin, Deutschland

2.1.5 PCR

SYBER Green PCR Master Mix	Applied Biosystems; Foster City, USA
Smart Ladder	Eurogentec; Köln, Deutschland
Primer (siehe Tabelle 3.4)	

2.1.6 Western Blot

Bovines Serumalbumin	PAA-Laboratories; Linz, Österreich
----------------------	------------------------------------

WL-Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer; Rodgau-Jügesheim, DE
PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran	Amersham; Freiburg, Deutschland
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell; Dassel, DE
Rainbow Molecular Weight Marker	Amersham; Freiburg, Deutschland
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG, Zeven, DE

2.1.7 Primärantikörper und Sekundärantikörper

IFNy-Ak	Abcam; Cambridge, USA
GAPDH-Ak	Abcam; Cambridge, USA
Hepatitis C Virus NS3-Ak	Abcam; Cambridge, USA
p38 MAP Kinase-AK	Cell-Signaling; Boston, USA
Phospho-p38 MAP Kinase-Ak	Cell-Signaling; Boston, USA

2.1.8 Laborgeräte

Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	NanoDrop products; Wilmington, USA
Reinraumbank HS 12	Heraeus; Gera, Deutschland
Brutschrank Cytoperm 2	Heraeus; Gera, Detuschland
Thermo Cycler PTC-200	MJ Research
Light-Cycler BA7500	Applied Biosystems
Kodak Image Station 440	Kodak; Stuttgart, Deutschland
Elektroblotting-Apparatur	Biometra
Gelkammer	
Kämme (4-20 Zähne)	
Elektrophoresekammer	
Transilluminator	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zelllinien

Die sterile Kultivierung der Zelllinien (Tabelle 2.1) erfolgte in DMEM F-12 supplementiert mit 10 % Hitze-inaktiviertem FCS in wassergesättigter Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C. Um die Sterilität der Zelllinien zu gewährleisten, wurden alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank durchgeführt. Zur Verwendung kamen nur sterilisierte Plastikwaren und Lösungen. Arbeitsflächen wurden sorgfältig desinfiziert.

Passagieren der Zellen

Nach Absaugen des Mediums aus einer konfluenten 75-cm²-Gewebe flasche wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA nach Absaugen von PBS. Die mit Trypsin überschichteten Zellen inkubierten für 5 Minuten bei 37 °C. Um eine vollständige Ablösung noch adhären ter Zellen zu erreichen, wurde gegen die Gewebekulturflaschen geklopft. Der Zugabe von 8 ml des jeweiligen Mediums folgte die Verteilung der gewonnenen Zellsuspension auf neue 75-cm²-Gewebe kulturflaschen und/oder auf 6-cm-Gewebe schalen.

Tabelle 2.1: **Verwendete Zelllinien und ihre Kultivierung**

Zelllinie	Beschreibung	Kultivierung in	Zusätze
Huh7	humane Hepatomazelllinie	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS
Huh9-13*	humane Hepatomazelllinie; subgenomisches Replikon (NS2-NS5B)	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS +1 mg/ml G418

* Zur Verfügung gestellt von R. Bartenschlager

Beide Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmenkontamination mittels PCR-basierter Screeningmethode (VenorGeM) getestet. Es wurden nur negativ getestete Zellen für weitere Versuche verwendet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Isolierung von RNA

Nach Kultivierung der Zellen in 6-cm-Gewebe kulturschalen nach Aussaat (Tag 1) und Medienwechsel (Tag 2) erfolgte die Ernte (Tag 3) nach Zugabe von 350 µl RLT-Puffer (Zugabe von 3,5 µl β-Mercaptoethanol) unter Zuhilfenahme eines Zellschabers. Die folgende Homogenisierung des Zellmaterials erfolgte im ersten Schritt mit dem *QIAshredder Kit* (Qiagen). Dazu wurde das gewonnene Lysat auf das entsprechende Säulensystem pipettiert und 2 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. Dem Durchfluss wurde anschließend das gleiche Volumen Ethanol (70 %) zugegeben und mittels Pipette

so lange vermischt, bis eine homogene Lösung entstanden war. Diese homogene Lösung erfuhr nun ihre Überführung auf die *RNeasy-Mini*-Säulen und wurde bei 10.000 U/min für 20 Sekunden zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses folgte der erste Waschschrift mit RW1-Puffer. 350 µl RW1 wurden dazu auf die Säulen gegeben und wieder bei 10.000 U/min zentrifugiert sowie der Durchfluss verworfen. Um eine reine RNA-Präparation frei von genomischer DNA-Kontamination zu erhalten, wurde die optionale Aufreinigung mittels des *RNase-Free DNase Kits* (Qiagen) durchgeführt. Dieser Verdau der DNA wurden nun mit 80 µl einer DNase-I-Lösung (10 µl DNase I + 70 µl RDD-Puffer) unter Auftragung auf die Säulen und Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur vorgenommen. Entsprechend dem Protokoll des Herstellers folgte ein Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer. Der letzte Schritt der RNA-Isolation, das Eluieren der RNA, erfolgte mittels 30 µl RNase-freiem auf Eis gekühltem Wasser. Nach Isolation der RNA wurde ihre Konzentration mittels des Spektralphotometers (NanoDrop) bei einer Extinktion von 260 nm / 280 nm gemessen.

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte aus 1 µg RNA mittels des Quantitect Reverse Transcription Kits (Qiagen). Die synthetisierte cDNA wurde je nach gewünschter Verdünnung mit H₂O versetzt. In einer Probe wurde das Enzym Reverse Transkriptase durch 1 µl H₂O ersetzt. Diese Kontrolle diente der Sicherstellung der Reinheit der Synthesereaktion. Das Gesamtreaktionsvolumen pro Probe betrug 20 µl (Tabelle 1.2).

Tabelle 2.2: **Reagenzien der reversen Transkription**

Reagenzien	Volumen/µl
RT-Puffer	4
Reverse Transkriptase	1
dNTP Primer Mix	1
gDNA Wipeout	2
1 µg RNA, variables Volumen je nach Konzentration	variabel
Nuclease-freies Wasser <i>ad</i> 20 µl	variabel

Alle Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert. Die Proben wurden 30 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach 30 Minuten wurden alle Proben für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die Proben wurden danach sofort auf Eis überführt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte (Mullis and Faloona, 1987). Um den zu amplifizierenden Abschnitt zu bestimmen, werden spezifischer Oligonukleotide (Primer) zu Hilfe genommen. Die Primer legen sich an die beiden Einzelstränge der DNA an und bestimmen die Startpunkte der Reaktion sowie deren Ende. Der Primer, der sich an den der jeweiligen Messenger-RNA komplementären DNA-Strang anlegt, wird als „sense“ bezeichnet, der Primer, der sich an den anderen Strang anlegt, wird „antisense“ genannt. Das thermostabile Enzym Polymerase katalysiert während der Reaktion nach einem Denaturierungsschritt und der Anlagerung der Primer an das DNA-Template (*primer annealing*) die Verlängerung (*extension*) der Primersequenz. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt. Dabei bleibt der Primer im Amplifikat erhalten und bildet den Anfang des neuen Einzelstrangs. Somit dient das Produkt des vorherigen Zyklus als Ausgangsprodukt für den sich anschließenden. Daraus resultiert eine exponentielle Zunahme der zu untersuchenden Matrize. Dies macht eine weitere Untersuchung zum Beispiel durch Auftrennung in einem Gel möglich. Als thermostabile Polymerase diente die *Taq-Polymerase* aus dem grampositiven Bakterium *Thermus aquaticus*. Das Gesamtreaktionsvolumen pro Probe betrug 50 µl und setzte sich aus den in Tabelle 2.3 vermerkten Reagenzien zusammen:

Tabelle 2.3: Reagenzien der Polymerasekettenreaktion für Template und 2 Primerpaare

Reagenzien	Volumen/µl
Primer I	5
Primer II	5
Polymerase	1
Nukleotide	2
10x Puffer	5
H ₂ O	30
Template	1
Gesamt	50

Alle Proben wurden auf Eis zusammenpipettiert.

Analytische Gelelektrophorese

Zur Visualisierung von DNA, gewonnen durch die PCR, dient unter anderem die analytische Gelelektrophorese. Diese Standardmethode trennt die DNA-Fragmente nach ihrer Größe in einem horizontalen Agarosegel auf. Dabei ist die Migrationsgeschwindigkeit dem Logarithmus des Molekulargewichts invers proportional. Die Konzentration des Agarosegels bestimmt dessen Porengröße und bietet kleineren Fragmenten einen geringeren Widerstand. Dementsprechend wandern kleinere Fragmente schneller durch das Gel. Anhand der Konzentration des jeweiligen Gels kann die Auflösung den zu untersuchenden Fragmenten angepasst werden. Dazu wurde Agarose in einer Konzentration je nach zu trennenden Nukleotid-Fragmentgrößen in TAE-Puffer (242 g/l Tris, 100 ml/l 0,5 M EDTA (pH 8,0), 57,1 ml/l Essigsäure) aufgekocht und durch vorsichtiges Schwenken vermischt, bis eine homogene Lösung entstand. Nach kurzem Abkühlen auf Handwärme wurde Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Das fertig vorbereitete Gel konnte anschließend in eine Gelkammer gegossen werden. Es wurde stets darauf geachtet, dass das Gel blasenfrei gegossen wurde. Durch Einsetzen eines Kammes entstanden die zur Aufnahme der Proben notwendigen Taschen im Gel. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Das Einbringen der zu untersuchenden Proben in die Taschen in einer Menge von 25 µl erfolgte nach dem Versetzen dieser mit Laufpuffer im Verhältnis 1:5. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde zusätzlich zu den Proben 1 µg eines DNA-Größenstandards auf die Agarosegele mit aufgetragen. In dieser Arbeit wurde eine 50-Basenpaar-Leiter der Firma Roche verwendet. Die eigentliche Elektrophorese wurde dann bei einer Spannung von 80 bis 140 Volt durchgeführt. Bis zum vollständigen Einlaufen der Proben in das Gel wurde eine Spannung von 80 Volt gewählt. Nach Einlaufen der Proben wurde die Spannung auf bis zu 140 Volt erhöht. Das in die doppelsträngige DNA eingelagerte Ethidiumbromid fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht im Transilluminator bei 280 nm. Das erhaltene Bandenmuster wurde mit Hilfe des Doc-Print-Geldokumentationssystems der Firma Peqlab dokumentiert.

Semiquantitative PCR

Nach der cDNA-Synthese wurde diese mittels der Real-Time-PCR semiquantitativ untersucht. Das Prinzip der semiquantitativen PCR beruht auf dem der herkömmlichen PCR. Anders als bei der herkömmlichen PCR kommt bei der semiquantitativen PCR der fluoreszierende DNA-Farbstoff *SYBR Green* zur Anwendung. Dieser Farbstoff bindet an die kleine Furche der DNA durch Interaktion mit den Basenpaaren und bildet den DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, dessen Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wird. Blaues Licht wird bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$, grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$ emittiert. Da die Fluoreszenz proportional zur Menge der DNA zunimmt, kann auf diese Weise die relative Menge durch Verrechnung mit einem internen Standard des jeweiligen Amplikons bestimmt werden. Die quantitative Zuordnung der Fluoreszenz erfolgte über den CT-Wert. Dieser Wert ist eine theoretische Größe, der die Anfangsphase des exponentiellen Wachstums einer Kurve beschreibt. Bei der Real-Time-PCR beschreibt dieser Wert den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt und sich die Proben im Bereich der exponentiellen Zunahme befinden. Der semiquantitativen PCR wurden $1,2 \mu\text{l}$ der 1:3 verdünnten cDNA und $12,5 \mu\text{l}$ *SYBR Green*-PCR-Mastermix gemäß den Angaben des Herstellers (*Applied Biosystems*) zugeführt. Die Reaktion erfolgte nach einem standardisierten Protokoll (*Annealing*: $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 40 Zyklen), an die sich die Analyse der Schmelzkurve anschloss.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in einem Graphen. R_n beschreibt die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes (*reporter-dye* in der vorliegenden Arbeit *SYBER Green*) dividiert durch die Fluoreszenz des Referenz-Farbstoffs (*passive-dye*, in dieser Arbeit *ROX*). R_n stellt somit eine Normalisierung von *SYBER Green* gegen den Grundfluoreszenz dar und wird den Zyklen der PCR gegenübergestellt (Abbildung 2.1).

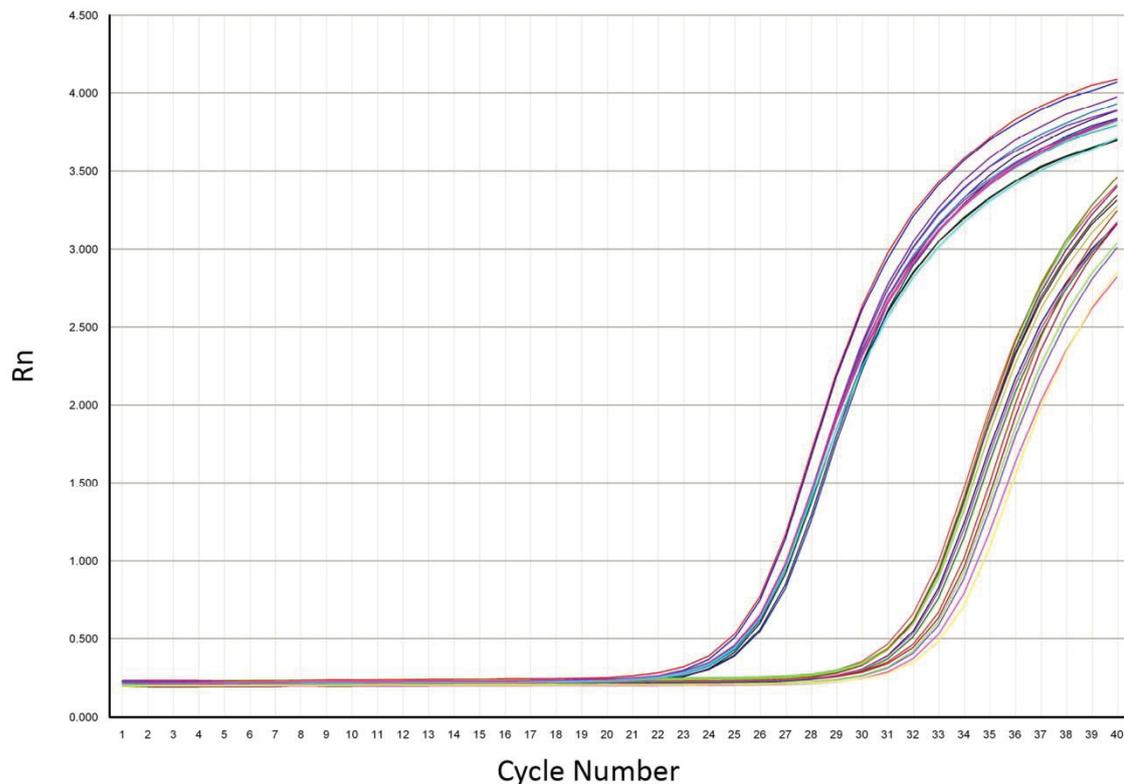


Abbildung 2.1: **Rn versus Cycle in der semiquantitativen PCR:** Zu sehen ist die graphische Darstellung der berechneten Rn-Werte gegen die Zyklen der semiquantitativen PCR aus Proben einer 96-Well-Platte und zwei unterschiedlichen Zelllinien mit einem spezifischen Primerpaar. Zu jeweils unterschiedlichen Zyklen des Experimentes kommt es zur Freisetzung von *SYBER Green* aus den einzelnen Proben.

Abhängig von der Menge der cDNA in der Probe und der damit verbundenen unterschiedlich ausgeprägten Amplifizierung durch die semiquantitative PCR wird dieser Wert früher oder später erreicht. Ist der CT-Wert klein, lag eine hohe cDNA-Menge in der untersuchten Probe vor und umgekehrt. Der Vergleich zweier Proben, eines internen Standards und des zu untersuchenden Genabschnitts erlaubt es, Rückschlüsse auf die relative Menge eingesetzter cDNA zu ziehen. Um methodische Störfaktoren wie z.B. Gewebe- und Matrixeffekte, die möglicherweise die Expressionsergebnisse hätten beeinflussen können, zu reduzieren, wurde in den Präparationen aus in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A) verwendet. Es ist ein sogenanntes nicht-reguliertes Gen und stellt den internen Standard dar. Ein nicht-reguliertes Gen („konstitutiv exprimiertes Gen“, *housekeeping gen*) ist ein Gen, welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen wie zum Beispiel der Einfluss von stimulierenden oder hemmenden Zytokinen, exprimiert wird. So

kann die Transkriptmenge der Zielgene auf die Transkriptmenge des Referenzgens normiert werden. Die Quantifizierung erfolgte mittels der Δ CT-Methode (Δ CT = CT target – CT SDHA). Um sicherzustellen, dass nur die gewünschten DNA-Abschnitte amplifiziert werden, ist es notwendig, spezifische Primer einzusetzen. Die Entwicklung der Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden, erfolgte mit Hilfe des Programms Primer-Express™ (Applied Biosystems). Diese Oligonukleotide sorgen für die Generierung eines spezifischen DNA-Produktes unter Vermeidung der Generierung unspezifischer Sekundärprodukte. Um die Qualität des generierten Amplikons zu untersuchen und um sicherzugehen, dass nur ein Amplifikat entstanden war, wurde im Anschluss an die letzte Elongationsphase der PCR die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse beruht auf dem Aufbau der untersuchten DNA. Die DNA besteht aus zwei komplementären Strängen. Diese sind aus den Desoxyribonukleotiden aufgebaut. Es werden die jeweils paarweise angeordneten Basen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C) unterschieden. Es ist zu beachten, dass nur Adenin mit Thymin und Cytosin mit Guanin eine Bindung eingehen. Die Bindung der Basenpaare untereinander erfolgt mittels Wasserstoffbrückenbindungen. Die Basen Adenin und Guanin stehen über zwei Bindungen, die Basen Thymin und Cytosin über drei Bindungen in Kontakt. Dementsprechend wird die Stabilität des DNS-Doppelstrangs über die Anzahl der Thymin- und Cytosinpaarungen definiert (Abbildung 2.2):

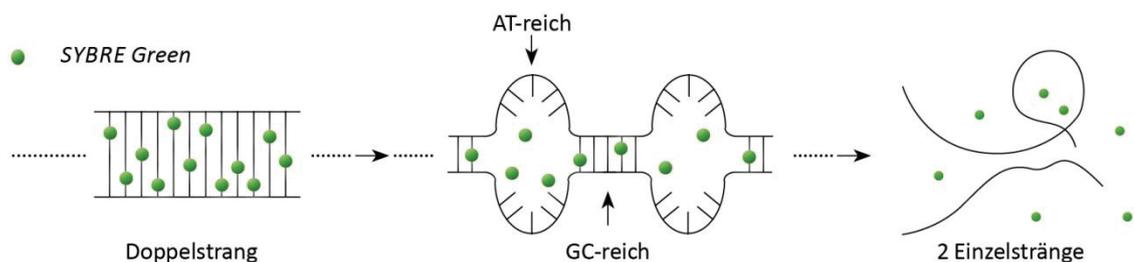


Abbildung 2.2: **Freisetzung von SYBR Green aus einem DNS-Doppelstrang:** Unter Zufuhr thermischer Energie lösen sich zunächst die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Adenin und Thymin (AT). Erst bei höherer thermischer Belastung des Doppelstrangs lösen sich auch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin (GC). Zuvor im Doppelstrang gebundenes SYBR Green wird somit bei Aufbrechen der Bindungen zwischen Guanin und Cytosin und dem Vorliegen der DNA als Einzelstränge freigesetzt.

Bei der Schmelzkurvenanalyse der Proben werden diese von 55 °C auf 95 °C Grad erhitzt und dabei die Fluoreszenz pro Anstieg um 0,2 °C gemessen. Jedes PCR-Produkt besitzt eine spezifische Schmelztemperatur T_M , die von seiner Länge und dem Gehalt an CG und den damit enthaltenen Wasserstoffbrückenbindungen abhängig ist. Die Temperatur an diesem Schmelzpunkt ist definiert als die Temperatur, bei der 50 % der vormals doppelsträngigen DNA einzelsträngig vorliegen. Liegt der Fluoreszenz-Farbstoff (*SYBR Green*) zu Beginn der Messung vollständig interkaliert in der cDNA vor, kommt es zu seiner Freisetzung aus der DNA bei deren Aufbrechen und damit zu einer Fluoreszenzabnahme. Zur verständlicheren Darstellung der Schmelzkurve wird diese zumeist als die erste Ableitung Fluoreszenzänderung pro Zeiteinheit gegen die Temperatur aufgeführt (Abbildung 2.3).

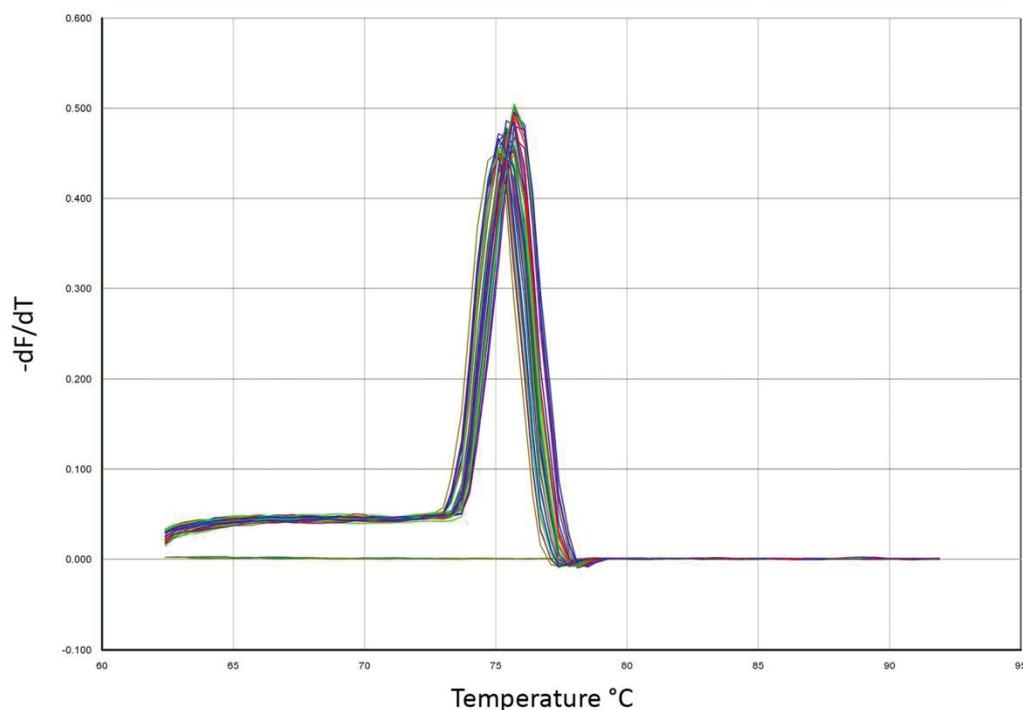


Abbildung 2.3: **Schmelzkurve der Produkte einer semiquantitativen PCR:** Die Y-Achse stellt die Fluoreszenzänderung pro Zeiteinheit dar. Die X-Achse gibt die Temperatur an. Für die Untersuchung der Proben ist ein Maximum der Fluoreszenz bei ca. 76 °C abzulesen. An diesem Punkt brechen die Wasserstoffbrücken der Amplifikate der Reaktionen einer 96-Well-Platte eines spezifischen Primerpaares zum größten Teil zeitgleich.

Das Amplifikat von spezifischen PCR-Produkten ist zumeist länger und hat somit einen höheren Schmelzpunkt als unspezifisch entstandene Primerdimere, die anhand der Schmelzkurve unterschieden werden können. Primerdimere sind Primer-Moleküle, die miteinander hybridisieren. Voraussetzung für die Bildung von Primerdimeren sind komplementäre Basen in den jeweiligen Strängen der verwendeten Primer. Nach Bildung der Primerdimere beginnt die DNA-Polymerase, diese zu amplifizieren (Abbildung 2.4). Im Zuge dessen kann es zum Verbrauch von Reagenzien kommen, die so der eigentlichen PCR-Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen und die Amplifikation des ursprünglich zu amplifizierenden DNA-Abschnitts beeinträchtigen. Da Primerdimere zumeist aus kürzeren Sequenzen bestehen als das eigentliche PCR-Produkt, liegt deren Schmelztemperatur niedriger. Sie können anhand der Schmelzkurven analysiert werden (Abbildung 2.5). Mit der Analyse der Schmelzkurve wird verhindert, dass gegebenenfalls zusätzlich amplifizierte Nebenprodukte die quantitative Analyse verfälschen. Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf der Analyse der Daten der semiquantitativen PCR, deren Schmelzkurven keinen Hinweis auf etwaige Nebenprodukte ergaben.

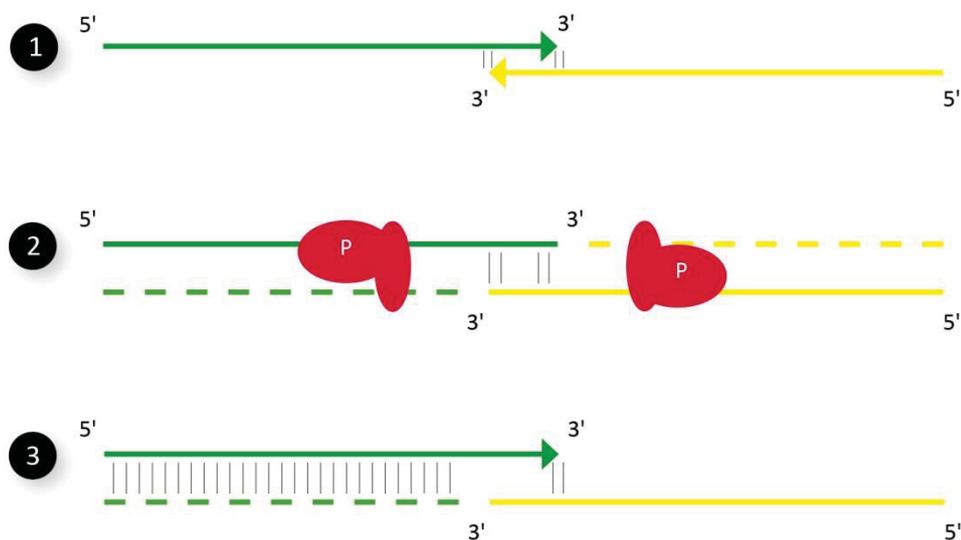


Abbildung 2.4: **Die Bildung von Primerdimeren:** Die Bildung von Primerdimeren erfolgt in drei Schritten: Im ersten Schritt **(1)** erfolgt die Bindung der komplementären Basen der beiden Primer. Entsteht ein Produkt mit ausreichend hoher Stabilität, wird es im zweiten Schritt **(2)** durch die Polymerase gebunden und amplifiziert. Im dritten Schritt **(3)** binden wiederum Primer-Moleküle an die neu gebildeten Enden (modifiziert nach Brownie^[115]).

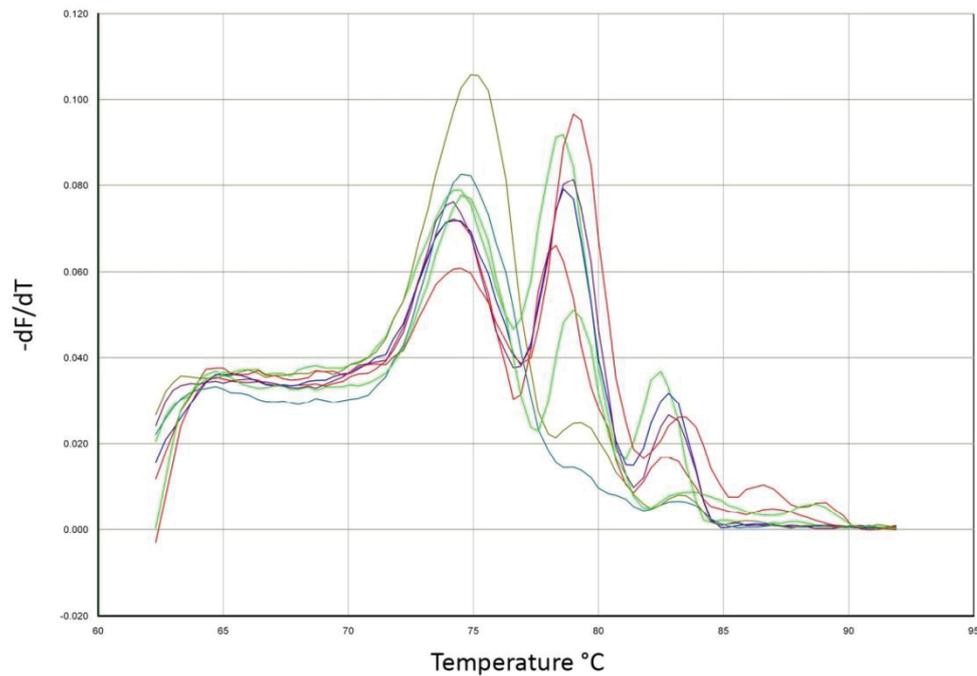


Abbildung 2.5: **Schmelzkurven unspezifischer Amplifikate:** Die Y-Achse stellt die Fluoreszenzänderung pro Zeiteinheit dar. Die X-Achse gibt die Temperatur an. Für die Untersuchung der Probe sind drei Maxima abzulesen. Es ist nicht zu der Bildung gleicher Amplifikate gekommen. Die Bindung der Primer erfolgte nicht spezifisch.

Der Versuchsansatz einer semiquantitativen PCR besteht aus der zu untersuchenden cDNA, auch Template genannt. Das katalysierende Enzym, die für die Elongation notwendigen Nukleotide, der *SYBR Green-Dye*, der die Hintergrundfluoreszenz senkende *ROX-Dye* und die notwendigen Puffer sind im *SYBR Green-Master-Mix* des verwendeten Kits enthalten. Der sense primer und der antisense primer werden dem Ansatz hinzugegeben. Das Gesamtreaktionsvolumen beläuft sich pro Reaktion auf 25 μl . Die Reagenzien sind in Tabelle 2.4 vermerkt.

Tabelle 2.4: **Reagenzien einer semiquantitativen PCR für Template und 2 Primerpaare**

Reagenzien	Volumen/ μl
cDNA-Template (Verdünnung 1:3)	1,2
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
SYBR-Green-Mastermix	12,5
H ₂ O	9,3
Gesamt für 1 well	25

Zur Steigerung der Genauigkeit der Messungen wurde jedes Ergebnis nach Doppelbestimmung verwendet. Die Spezifität der cDNA-Synthese und der quantitativen PCR wurde durch Kontrollen gewährleistet. Dazu dienten eine Probe ohne die Reverse Transkriptase im Reaktionsansatz und eine Probe ohne cDNA. Beide Kontrollen sollten dabei ohne ein spezifisches Amplifikat bleiben. In dieser Arbeit wurden nur Daten von Versuchsansätzen verwendet, die diese Kriterien erfüllten.

Design der verwendeten Primer

Die verwendeten Primer müssen so generiert werden, dass sie spezifisch hybridisieren. Das bedeutet, dass sie erstens lediglich an einer Stelle der DNA binden dürfen und zweitens nicht untereinander binden. Zur Erstellung eines spezifischen Primer-Paares für die PCR muss der zu amplifizierende Abschnitt der DNA bekannt sein. Die Spezifität der erstellten Primer hängt von der genauen Übereinstimmung mit dem Template ab, darüber hinaus von der Länge der Primer und deren Schmelztemperatur. Primer ab einer Länge von $17 \geq$ Nukleotide werden als spezifisch erachtet. Ab einer Länge von 25 Nukleotiden steigt die Spezifität für Primer nicht mehr. Man läuft Gefahr, dass die Möglichkeit der Bindung von Primern untereinander steigt und somit die Reaktion gestört wird. Die Schmelztemperatur der Primer hängt von ihrer Zusammensetzung ab. Ein hoher Gehalt an Guanin und Cytosin führt aufgrund der zwischen diesen Basen bestehenden drei Wasserstoffbrückenbindungen zu einem höheren Schmelzpunkt des Primers. Ein hoher Anteil von Thymin und Adenin mit jeweils zwei verbindenden Wasserstoffbrücken bedingt einen niedrigeren Schmelzpunkt des Primers. Ein Schmelzpunkt von 59 ± 1 °C wird für einen Primer der semiquantitativen PCR als günstig erachtet, da entsprechend dem PCR-Zyklus in der Phase des Annealings eine Temperatur von 59 °C im System vorherrscht und die Primer mit der Matrize binden können. Darüber hinaus ist es wichtig, dass die Primer untereinander nicht komplementär sind, da es sonst zu Bindungen untereinander kommen kann und somit zu einer Beeinträchtigung der Reaktion. Die Schmelztemperatur des Forward Primers und des Reverse Primers sollten möglichst gleich sein, damit eine spezifische Hybridisierung beider Primer vonstattengehen kann. Zusätzlich muss beachtet werden, dass das 5'-Ende nicht komplementär zum 3'-Ende ist, um die Bildung sogenannter Haarnadeln (*hairpins*) zu vermeiden (Abbildung 2.6).

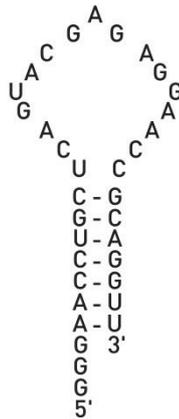


Abbildung 2.6: **Die Bildung von Haarnadeln (hairpins):** Die abgebildeten Basen des Primers sind am 5'-Ende und am 3'-Ende komplementär und binden aneinander. Die Primer können nicht mehr an die vorgesehene Matrize binden. Die PCR ist damit in ihrem Ablauf gestört (modifiziert nach Green^[116]).

Die für die Erstellung dieser Arbeit verwendeten Primer erfüllen die genannten Kriterien und sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5: **Oligonukleotide für die semiquantitative PCR**

Bezeichnung		Sequenz in 5' → 3' Richtung
hSDHA	sense	CCT GGA GAT AAA GTC CCT CCA A
	antisense	ACA GAT TCT TCC CCA GCG TTT
CXCL1	sense	CTG GCG GAT CCA AGC AAA T
	antisense	CAT TCC CCT GCC TTC ACA AT
CXCL2	sense	GGA ATC CAA GAA AAT GGC CA
	antisense	CAT ACA TTT CCC TGC CGT CAC
CXCL8	sense	AGA AGT TTT TGA AGA GGG CTG AGA
	antisense	CAG ACC CAC ACA ATA CAT GAA GTG
CXCL9	sense	CCA AGG GAC TAT CCA CCT ACA ATG
	antisense	GGT TTA GAC ATG TTT GAA CTC CAT TC
CXCL10	sense	AGC ACC ATG AAT CAA ACT GCC
	antisense	ATG CTG ATG CAG GTA CAG CGT
CXCL11	sense	AGG ACG CTG TCT TTG CAT AGG
	antisense	GGA TTT AGG CAT CGT TGT CC TT
CXCL12	sense	GCC ATG GAG GCA CTA ACA AAC
	antisense	TTT TTC GCT TCT GAT TTC GGA
CXCR4	sense	TGG GAT CAG CAT CGA CTC CT
	antisense	CAC CCT TGC TTG ATG ATT TCC
CCL5	sense	CAGTCGTCTTTGTCACCCGAA
	antisense	TACAAAAACGATGGCATCCC
CCL17	sense	AGTGCTGCCTGGAGTACTTCAA
	antisense	TACAAAAACGATGGCATCCC

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

SDS-PAGE und Western-Blotting

Das Western-Blotting ist eine Standardmethode zur Untersuchung von Proteinen. Es besteht aus zwei Hauptschritten: Im ersten Schritt werden die zu untersuchenden Proben in einem Gel aufgetrennt. Der zweite Schritt dient dem Übertragen (*Blotting*) der zuvor aufgetrennten Proben und der darin enthaltenen Proteine auf eine spezielle Trägermembran. Diese Trägermembran dient nachher in verschiedenen Schritten zur antikörperbasierten weiteren Untersuchung. In dieser Arbeit wurde die SDS-PAGE zur Auftrennung der zu untersuchenden Proteine verwendet. Das enthaltene Natriumdodecylsulfat hat die Funktion eines anionischen Tensides. Es überdeckt die Eigenladungen von Proteinen und führt somit zu einer reinen Auftrennung nach der Größe der Moleküle und nicht nach deren Ladungen. Das verwendete SDS-Polyacrylamid-Gel wurde je nach gewünschter Konzentration in seinem PAA-Gehalt (8 – 15 %) variiert. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: **Zusammensetzung eines 15 % Gels**

Reagenzien	Sammelgel/ml	Trenngel/ml
H ₂ O	6,8	6,9
Polyacrylamid Mix 30 %	1,7	15
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,25	7,5
SDS 10 %	0,1	0,3
Ammonium Persulfat 10 %	0,1	0,3
TEMED	0,01	0,012

Nach Herstellung des Gels mit gewünschter PAA-Konzentration wurde es in eine Gelkammer bestehend aus zwei Glasscheiben gegossen. Um einen scharfen Rand zwischen dem Trenngel (SDS-PAA-Gel) und dem Sammelgel zu erhalten, wurde Isopropanol auf das Trenngel gegeben, bis dieses ausgehärtet war. Nach Erstarren des Trenngels und Entfernung des Isopropanols mit Hilfe von destilliertem Wasser erfolgte der Guss des Sammelgels. Bevor es zur Aushärtung kommen konnte, wurde ein Kamm mit entsprechend der zu untersuchenden Proben bestückten Zahnzahl eingebracht. Nach Aushärten des Sammelgels konnten die Proben in die durch die Zähne des Kamms erhaltenen Aussparungen überführt werden. Zusätzlich zu den Proben wurde der Proteinstandard *Rainbow Molecular Weight Marker* (Amersham) mit eingebracht. Nach

erfolgreicher Auftrennung der Proteine bei einer Spannung von 120 Volt über 2 bis 4 Stunden oder bei 60 Volt über Nacht wurde das Gel zusammen mit einer PVDF-Membran (*Amersham*), Whatman-Papier (*Schleicher & Schuell*) und verschiedener Blottingpuffern (Tabelle 2.7) unterschiedlicher Ionenstärke beladen und in eine ElektrobloTTing-Apparatur (*Biometra*) überführt. Begonnen wurde mit einem Stapel Whatman-Papier. Dieser wurde mit Puffer durchtränkt und mit Hilfe einer Stripette von den Blottingprozess störenden Blasen befreit. Darauf wurde die PVDF-Membran gelegt. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde oben auf der PVDF-Membran platziert. Mit Puffer durchtränkte Whatman-Papiere bildeten den Abschluss. Der Deckel der Blottingapparatur wurde auf die ebenfalls mittels Stripette von Blasen befreiten Whatman-Papiere gesetzt. Die anzulegende Stromstärke berechnet sich aus der Fläche der Membran. Hierbei werden 1 mA/cm² angelegt. Die negativ geladenen Proteine wandern nun innerhalb von 1 bis 1,5 Stunden von der Anode zur Kathode und verbleiben dabei auf der PVDF-Membran.

Tabelle 2.7: **Verwendete Puffersysteme**

Anodenpuffer I	Anodenpuffer II	Kathodenpuffer
0,3 M TRIS	0,025 M TRIS	0,04 M 6-Amino-capronsäure
20 % Methanol	20 % Methanol	20 % Methanol

Detektion:

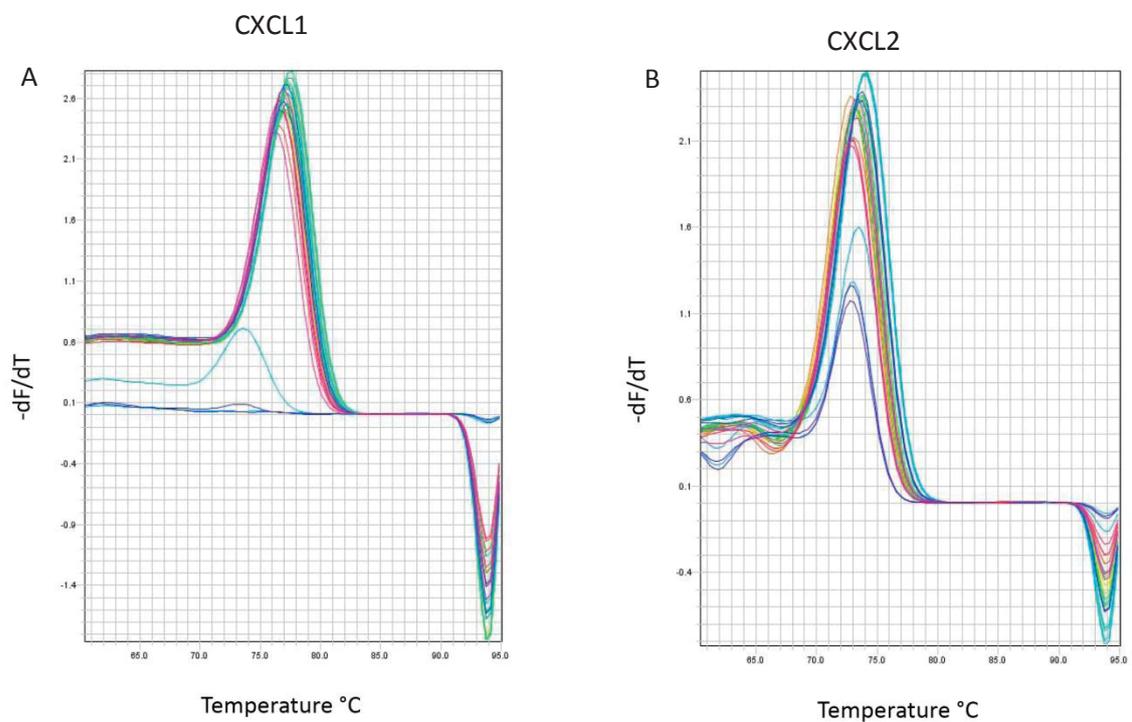
Die Detektion der geblotteten Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen mittels spezifischer gegen das Protein gerichteter Antikörper. Dafür wurde TBS-T (20 mM Tris/HCL (pH 7,4), 137 mM NaCl, 0,1 % Tween) mit 3 % BSA oder 5 % Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben und unspezifische Bindungsstellen wurden so gesättigt. Als Nächstes wurde der Primärantikörper auf die Membran in 3 % BSA oder 5 % Milchpulver aufgebracht in einer Verdünnung von 1:5000 bis 1:1000. Diese inkubierten bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran gründlich unter Verwendung von TBS-T gewaschen und die Zugabe des Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:10000 bis 1:4000 vorgenommen. Dieser verblieb eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran. Hiernach wurde die Membran gründlich mit TBS-T gewaschen und anschließend mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer) versehen. Die

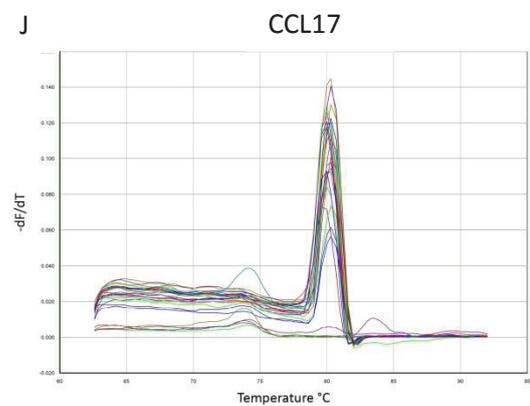
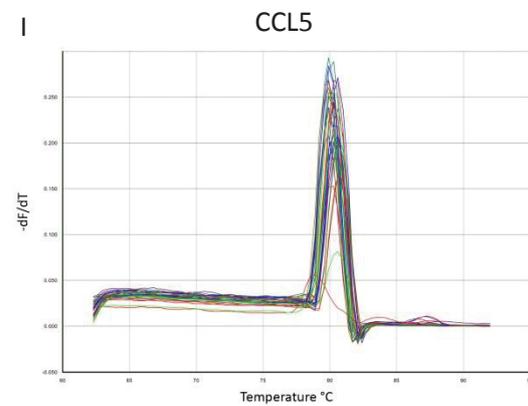
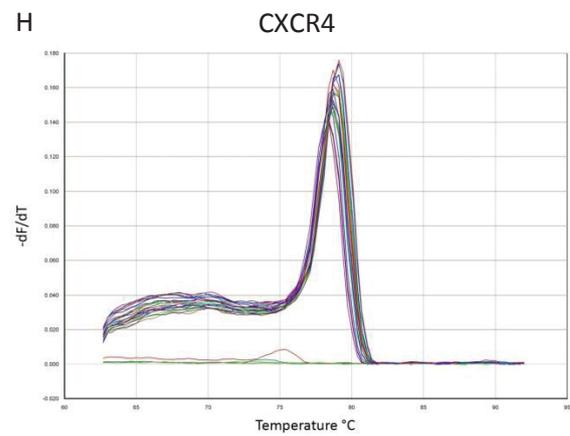
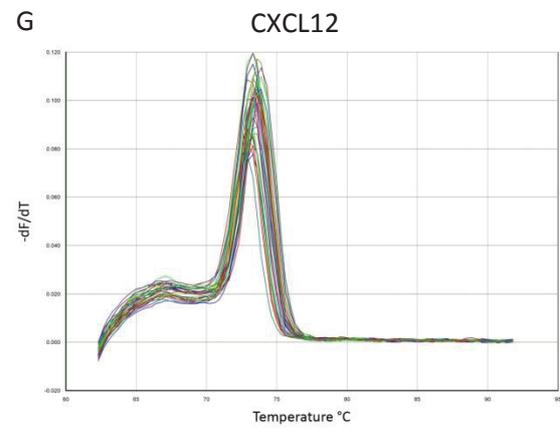
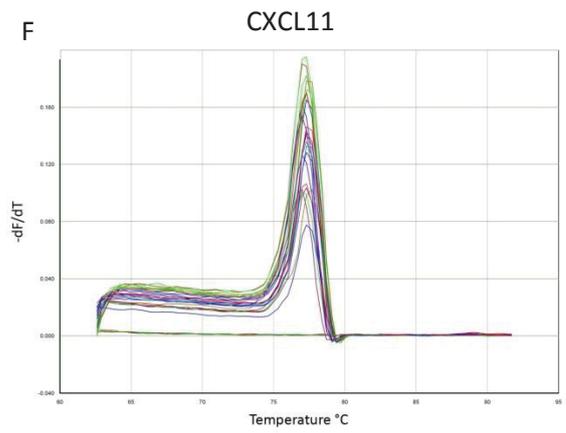
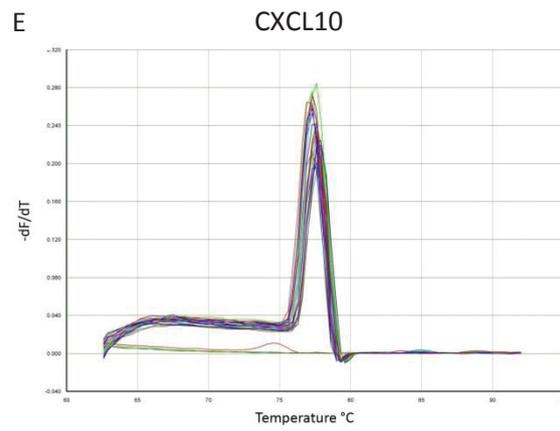
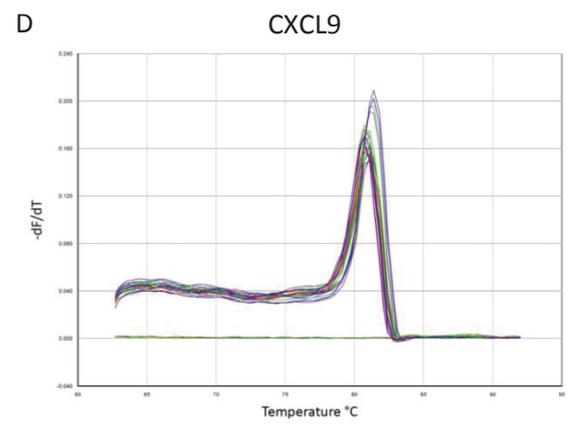
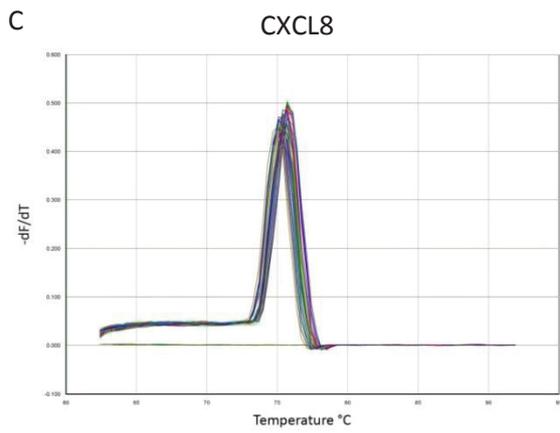
Detektion der Lichtemission der Chemilumineszenz von Luminol erfolgte im Detektor (Kodak-Station) bei unterschiedlich langen vorangegangenen Belichtungszeiten auf ECL-Filmen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Validierung und Qualitätskontrolle der Primer

Die Spezifität und Qualität der verwendeten Primer in der semiquantitativen PCR wurde anhand der Schmelzkurvenanalyse der Produkte der verwendeten Primer bestimmt. Verwendet wurden lediglich Primer, deren Amplifikate in der Schmelzkurvenanalyse keinen Hinweis auf Nebenprodukte ergaben. Zu jeder PCR wurden zusätzlich zu den Proben Kontroll- oder Leerproben hinzugegeben. Diese bestanden aus der *no enzyme*-Probe der cDNA-Synthese der isolierten RNA und der cDNA-freien Probe. Anhand dieser wurde überprüft, ob das Amplifikat der zu untersuchenden cDNA zuzuschreiben ist. Geht ein entsprechendes Amplifikat aus den Kontrollproben hervor, spricht dies für ein Nebenprodukt durch Verunreinigung mit genomischer DNA oder für fehlende Sauberkeit in der Verarbeitung der RNA und der cDNA. Die Schmelzkurvenanalysen der verwendeten Primer sind in Abbildung 3.1 dargestellt.





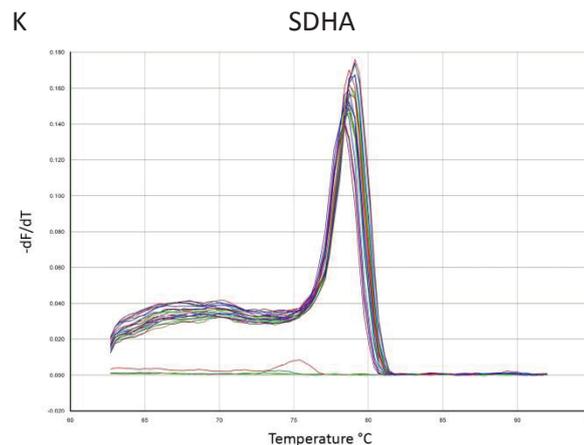


Abbildung 3.1: Schmelzkurven der PCR-Amplifikate der Primer von CXCL1 (A), CXCL2 (B), CXCL8 (C), CXCL9 (d), CXCL10 (E), CXCL11 (F), CXCL12 (G), CXCR4 (H), CCL5 (I), CCL17 (J) und SDHA (K): Die abgebildeten Schmelzkurven sind die Darstellung der Schmelzkurven aller Einzelproben einer 96-Well-Platte. Auf der Y-Achse ist die Fluoreszenzänderung pro Zeiteinheit aufgetragen. Auf der X-Achse die Temperatur in °C. Die Schmelzkurven der Produkte weisen eine Spitze auf. Die jeweiligen Amplifikate sind spezifisch für die verwendeten Primer. Nebenprodukte finden sich nicht.

3.2 Die TNF α -induzierte Expression von INF γ wird in Lebern NS3/4A-transgener Mäuse gehemmt.

Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Prof. Bode lassen annehmen, dass NS3/4A die TNF α -induzierte Aktivierung von STAT1 in Mäusen mit leberspezifischer Expression von NS3/4A hemmt, während die INF γ -induzierte STAT1-Aktivierung weiterhin stattfindet. Da TNF α selbst keine STAT1-Aktivierung bewirkt, ist davon auszugehen, dass die INF γ -induzierte STAT1-Aktivierung indirekt geschieht. Es sollte daher geprüft werden, inwieweit die TNF α -induzierte Freisetzung von INF γ in Lebern NS3/4A transgener Tiere beeinflusst wird. Es konnte dargestellt werden, dass in den Leberlysaten NS3/4A-transgener Tiere bereits basal eine verminderte Produktion von INF γ vorliegt. Auch bei Zugabe von TNF α zeigt sich eine wesentlich geringere Produktion von INF γ in den Lebern transgener Tiere (Abbildung 3.2). In Anbetracht des Umstandes, dass Hepatozyten INF γ nicht freisetzen, gewinnen die die Lebern der Tiere infiltrierenden potentiellen INF γ -freisetzenden Immunzellen und die sie steuernden Faktoren an Bedeutung.

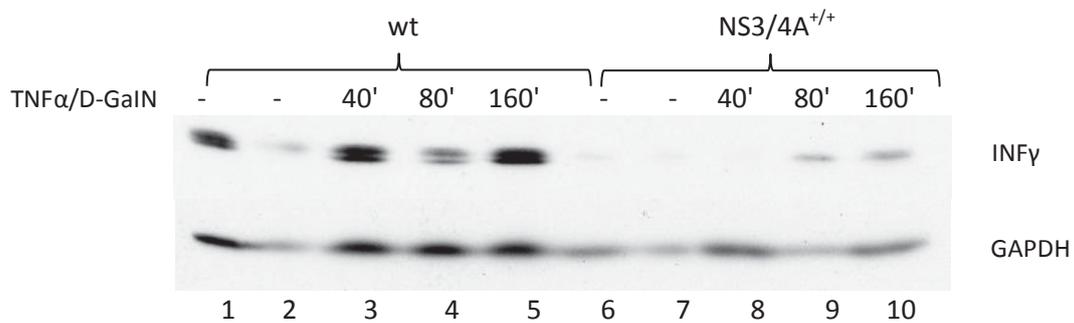


Abbildung 3.2: **Die TNF α -induzierte IFN γ -Expression wird im Lebergewebe NS3/4A-transgener Mäuse gehemmt.** Wildtyp-(Wt)-Mäuse und NS3/4A-transgene Mäuse wurden 40, 80 und 160 Minuten mit 15 ng/g Körpergewicht TNF α und 1 mg/g Körpergewicht D-GalN behandelt und Vollzellextrakte aus den Lebern der Tiere hergestellt. 80 μ g Protein/Spur wurde aufgetragen. Mittels Western Blot erfolgte die Auftrennung der Proben. Durch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen IFN γ und GAPDH und fluoreszierenden Sekundärantikörpern wurden IFN γ und die GAPDH detektiert. Die GAPDH diente als Beladungskontrolle.

3.3 Das subgenomische HCV-Replikon verstärkt sowohl die basale Expression von mCXCL8 als auch die TNF α -induzierte Expression auf Transkriptebene

Unter der zuvor formulierten Annahme, dass die HCV-Pathologie nicht auf intrazelluläre Mechanismen reduziert werden kann, standen als Vermittler von interzellulärer Kommunikation Chemokine als vielversprechend fest. Da IFN γ von Immunzellen und nicht von Hepatozyten selbst produziert wird und NS3/4A nur in Hepatozyten exprimiert wird, kann unter Kenntnis der Ergebnisse aus Abbildung 3.2 nämlich einer verminderten Produktion von IFN γ in Lebern NS3/4A-transgener Tiere, angenommen werden, dass Hepatozyten Botenstoffe freisetzen, die IFN γ -produzierende Immunzellen beeinflussen. In diesem Kontext kommt der Gruppe der Chemokine eine übergeordnete Rolle zu. Zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss des Hepatitis-C-Virus insbesondere auf die Expression von CXCL8 und in weiteren Experimenten auch auf die Expression der mRNA von CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL5, CCL17 und der mRNA des Rezeptor-Liganden-Paares CXCR4 und CXCL12 zu untersuchen.

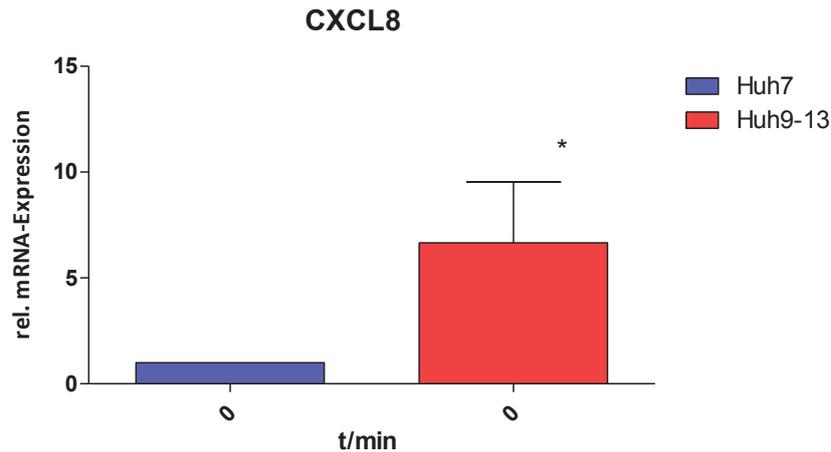
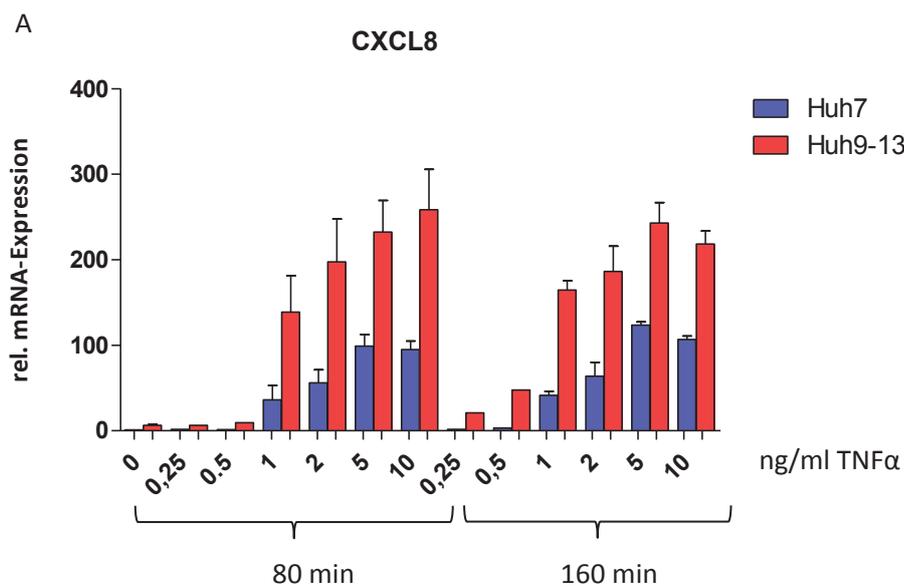


Abbildung 3.3: **In Anwesenheit des subgenomische HCV-Replikons wird die Expression von mCXCL8 verstärkt:** Mittels semiquantitativer PCR erfolgte die Untersuchung der mCXCL8-Expression. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Die Y-Achse gibt Änderung der Expression der mCXCL8 in Huh7- und Huh9-13-Zellen bezogen auf die nicht stimulierte wildtypische Kontrolle an. Die X-Achse gibt die Dauer der Stimulation in Minuten an. Die Standardabweichungen wurden auf Grundlage mindestens dreier unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests errechnet ($p < 0.05$).

mCXCL8 wird in Huh7-Zellen und in Huh9-13-Zellen exprimiert. Darüber hinaus erfährt mCXCL8 eine verstärkte Expression in Anwesenheit des subgenomischen HCV-Replikons (Abbildung 3.3). Es wurde eine Konzentrationsreihe angefertigt, um die optimale Konzentration von TNF α als Stimulanz zu ermitteln und dieses einzusetzen zu können. mCXCL1 wurde ebenfalls zur Ermittlung der notwendigen TNF α -Konzentration herangezogen.



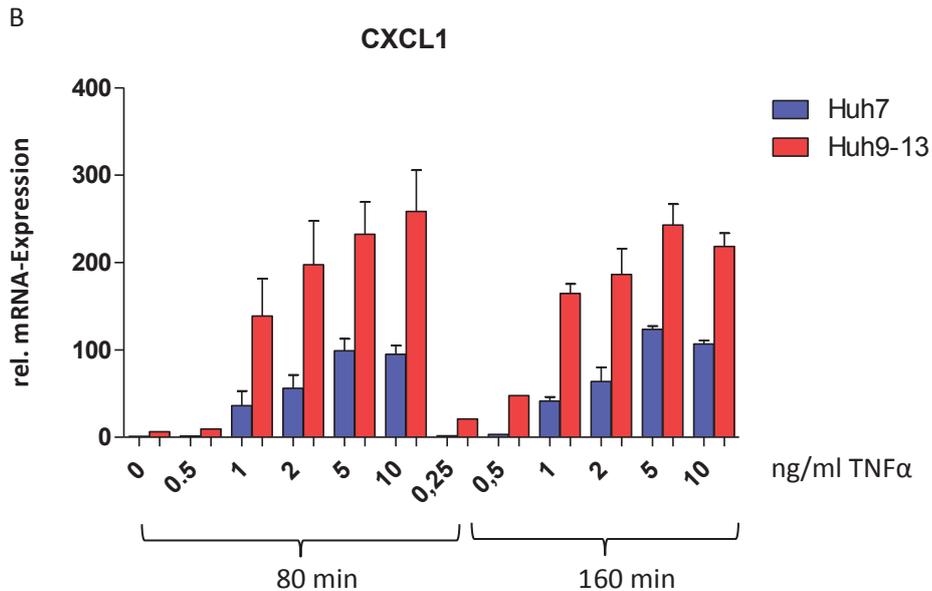
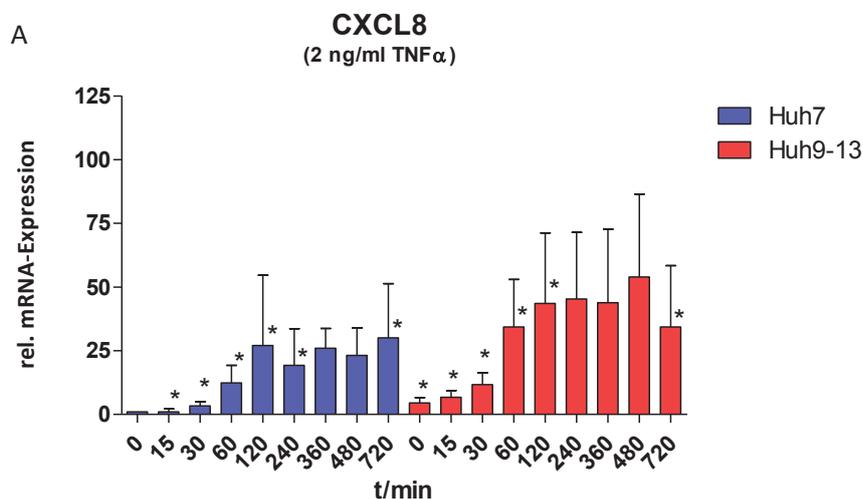


Abbildung 3.4: **Ab 1 ng/ml TNF α kommt es zu einer Induktion der Expression von mCXCL8 (A) und mCXCL1 (B) in Huh7-Zellen und Huh9-13-Zellen nach 80 und nach 160 Minuten Stimulation.** Mittels semiquantitativer PCR erfolgte die Untersuchung der mCXCL1-Expression (A) und der mCXCL8-Expression (B). Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Die Y-Achse gibt Änderung der Expression der mCXCL1 (A) und der mCXCL8 (B) bezogen auf die nicht stimulierte wildtypische Kontrolle an. Der Wert der Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die weiteren Werte darauf bezogen. Die X-Achse gibt die verwendete Konzentration von TNF α und die Dauer der Stimulation an. Die Standardabweichungen wurden auf Grundlage mindestens zweier unabhängiger Experimente erstellt.

2 ng/ml TNF α ergaben eine Induktion der Expression von mCXCL8 und mCXCL1 in Huh7-Zellen und in Huh9-13-Zellen die zwischen einem ersten Effekt bei 1 ng/ml und einem vergleichbaren Effekt ab 5 ng/ml liegt (Abbildung 3.4). Daher wurde für die weiteren Versuche 2 ng/ml TNF α eingesetzt. Zur genaueren Untersuchung einer Dynamik der Chemokinexpression nach der Stimulation mit TNF α wurde TNF α in der zuvor ermittelten Konzentration von 2 ng/ml in einer Zeitreihe eingesetzt und als weiteres inflammatorisches Zytokin IL-1 β verwendet (Abbildung 3.5).



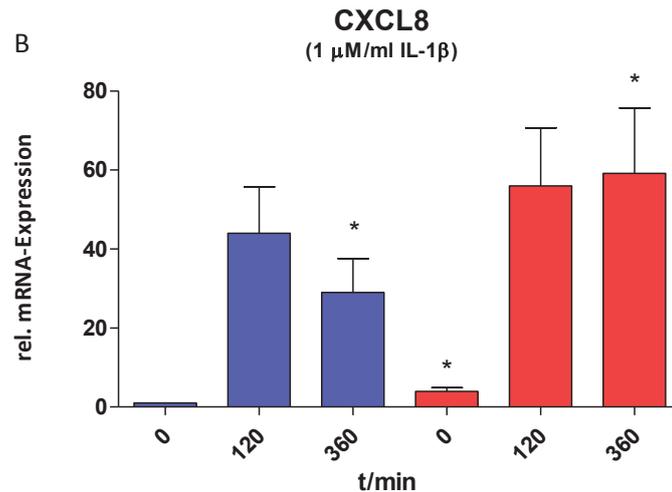
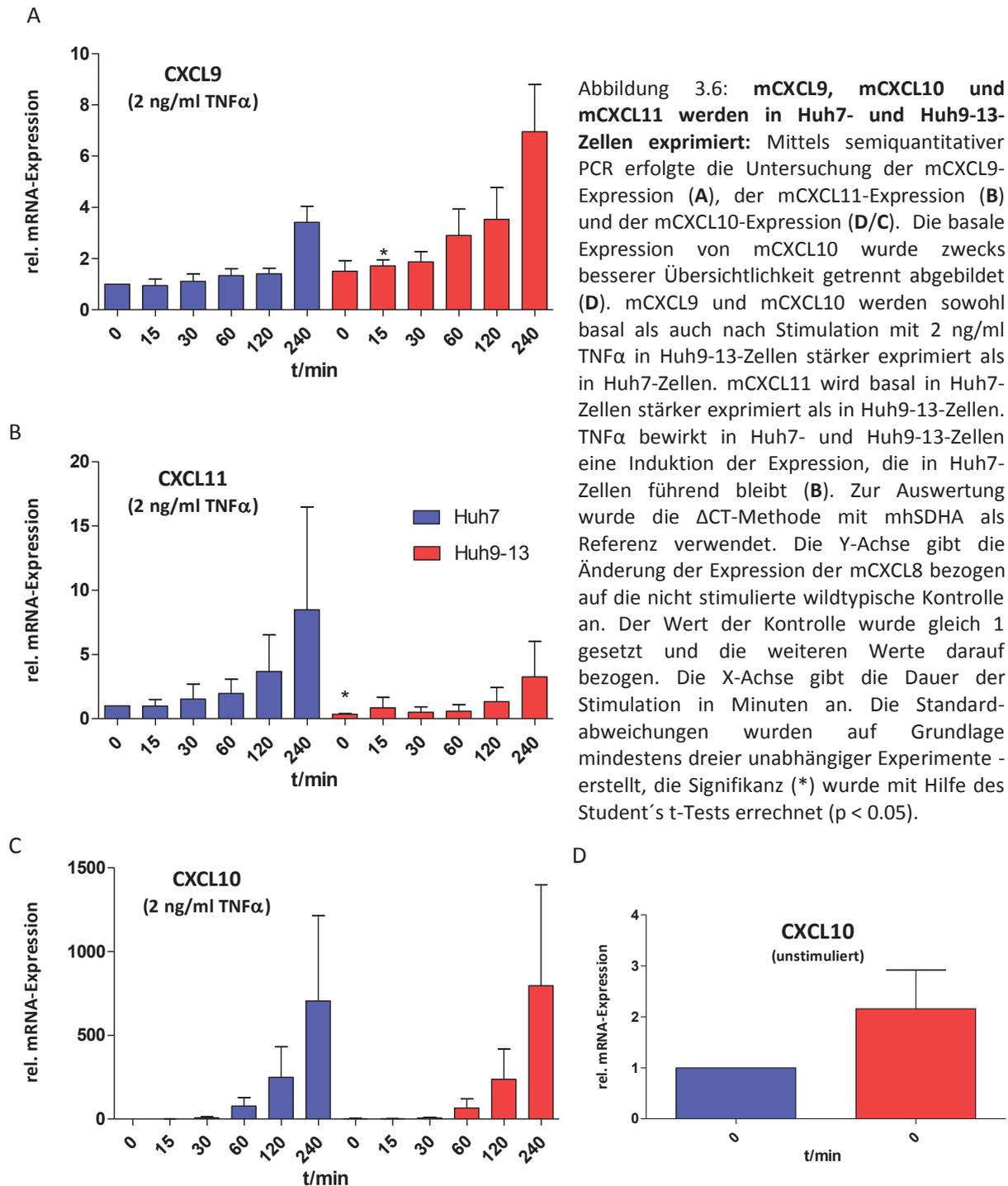


Abbildung 3.5: mCXCL8 wird von Huh7-Zellen geringer exprimiert als von Huh9-13-Zellen und nach Stimulation mit 2 ng/ml TNF α zu verschiedenen Zeitpunkten in beiden Zelllinien induziert (A). IL-1 β induziert die mCXCL8-Expression (B): Mittels semiquantitativer PCR erfolgte die Untersuchung der mCXCL8-Expression. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Die Y-Achse gibt Änderung der Expression der mCXCL8 bezogen auf die nicht stimulierte wildtypische Kontrolle an. Der Wert der Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die weiteren Werte darauf bezogen. Die X-Achse gibt die Dauer der Stimulation in Minuten an. Die Standardabweichungen wurden auf Grundlage mindestens dreier unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests errechnet ($p < 0.05$).

3.4 mCXCL9, mCXCL10 und mCXCL11 werden in Huh7- und Huh9-13-Zellen exprimiert und nach Stimulation mit TNF α induziert

CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind INF γ -assoziierte Chemokine. Da in Lebern transgener Mäuse eine verminderte Expression von INF γ ermittelt werden konnte (Abbildung 3.2), stellt sich die Frage nach der Expression dieser Chemokine in Hepatozyten, da im angenommenen Fall INF γ nicht im gleichen Maße die Chemokinexpression beeinflussen könnte. Darüber hinaus wurde die Expression von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in Zeitreihen mit TNF α als Stimulanz untersucht.



3.5 mCXCL12 und mCXCR4 wird in Huh7- und in Huh9-13-Zellen exprimiert.

Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird in Zellen mit dem HCV-Replikon stärker auf Transkriptebene exprimiert als in Huh7-Zellen, mCXCL12 wird hingegen von Huh9-13-Zellen geringer exprimiert. Auch diese Chemokine wurde im Zeitreihenversuch mit 2 ng/ml TNF α stimuliert. Es wird deutlich, dass es zu keiner nennenswerten Induktion der Expression durch TNF α kommt. Die Stimulation mit IL-1 β führt zu einer Induktion der Expression von mCXCR4. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

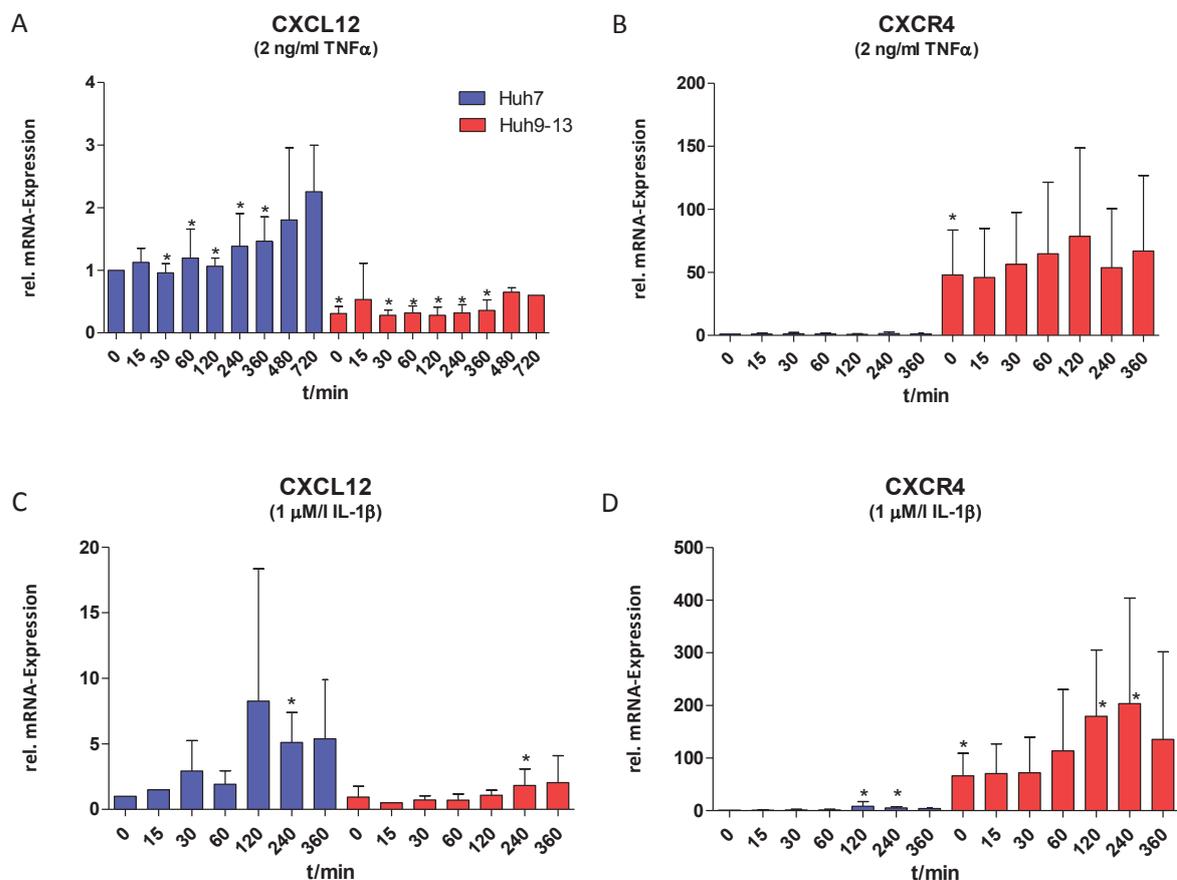


Abbildung 3.7: CXCL12 wird in Huh7-Zellen stärker als in Huh9-13-Zellen exprimiert. CXCR4 verhält sich umgekehrt. Die Stimulation mit 1 μ M IL-1 β und 2 ng/ml TNF α ergibt keine Induktion der Expression von mCXCL12 und mCXCR4 in beiden Zelllinien im Zeitreihenversuch. Mittels semiquantitativer PCR erfolgte die Untersuchung der mCXCL12-Expression (A) und der mCXCR4-Expression (B). Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Die Y-Achse gibt Änderung der Expression von mCXCL12 (A), mCXCR4 (B) durch Zugabe von 2 ng/ml TNF α und die Änderung der Expression von mCXCL12 (C), mCXCR4 (D) durch Zugabe von IL-1 β bezogen auf die nicht stimulierte wildtypische Kontrolle an. Der Wert der Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die weiteren Werte darauf bezogen. Die X-Achse gibt die Dauer der Stimulation in Minuten an. Die Standardabweichungen wurden auf Grundlage mindestens dreier unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests errechnet ($p < 0.05$).

3.6 mCXCL2 wird in Huh7- und Huh9-13-Zellen exprimiert. Es findet eine Induktion unter Stimulation mit TNF α statt.

Es findet sich eine basal erhöhte Expression von mCXCL2 in Huh9-13-Zellen und nach Stimulation mit TNF α eine erhöhte Expression in Huh7- und Huh9-13-Zellen (Abbildung 3.8).

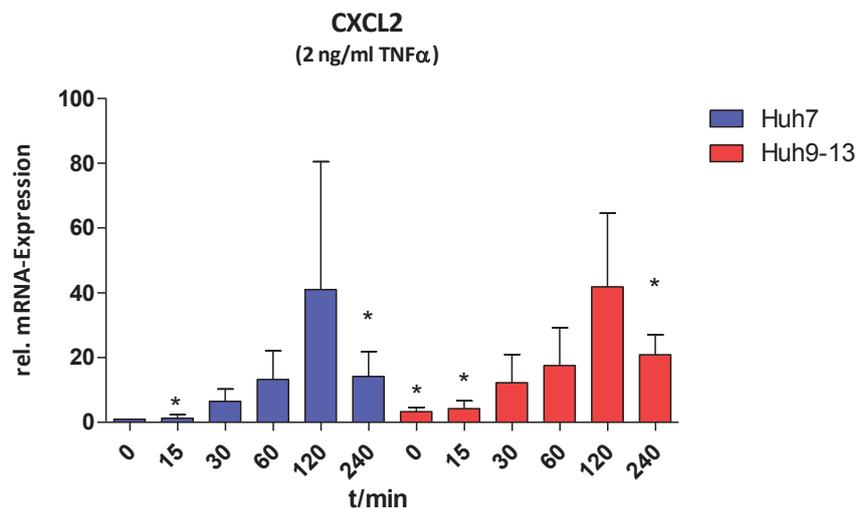


Abbildung 3.8: mCXCL2 wird durch Huh9-13-Zellen stärker exprimiert als in Huh7-Zellen und nach 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten Stimulation mit 2 ng/ml TNF α in beiden Zelllinien induziert. Mittels semiquantitativer PCR erfolgte die Untersuchung der mCXCL2-Expression. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Die Y-Achse gibt Änderung der Expression der mCXCL2 bezogen auf die nicht stimulierte wildtypische Kontrolle an. Der Wert der Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die weiteren Werte darauf bezogen. Die X-Achse gibt die Dauer der Stimulation in Minuten an. Die Standardabweichungen wurden auf Grundlage mindestens dreier unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests errechnet ($p < 0.05$).

3.7 mCCL5 und mCCL17 werden in Huh7- und Huh9-13-Zellen exprimiert und durch TNF α und IL-1 β induziert.

Die Untersuchungen ergaben, dass mCCL17 tendenziell in Huh9-13-Zellen weniger stark exprimiert wird. Gleiches gilt für mCCL5. Zu beachten ist, dass in beiden Fällen die Detektion von PCR-Amplifikaten erst bei Zyklus > 35 stattfand und von einer sehr geringen Menge Amplifikat angenommen werden muss (Abbildung 3.9).

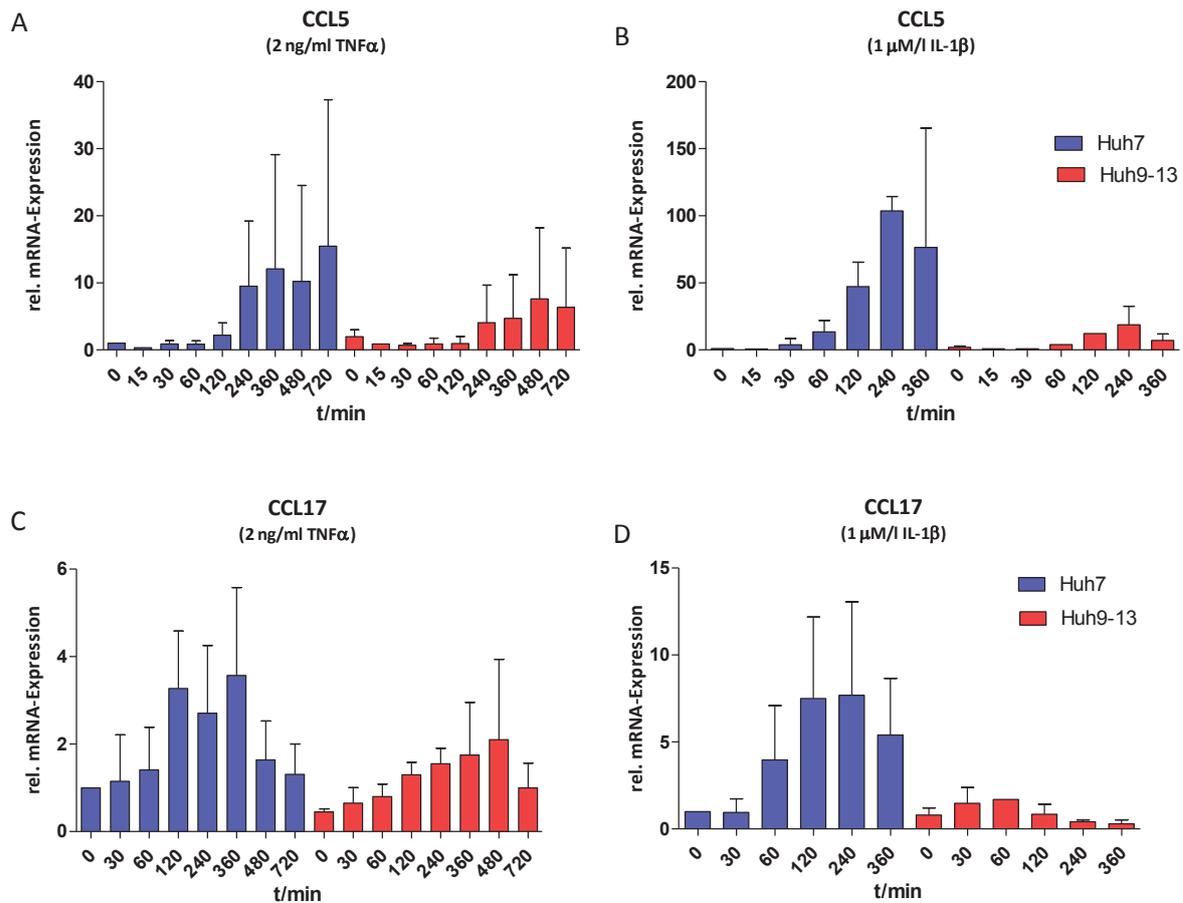


Abbildung 3.9: mCCL5 und mCCL17 wird durch Huh7-Zellen und Huh9-13-Zellen exprimiert und nach Stimulation mit 2 ng/ml TNF α und 1 μ M/IL-1 β in beiden Zelllinien induziert. Mittels semiquantitativer PCR erfolgte die Untersuchung der mCCL5-Expression nach Stimulation mit TNF α (A) und IL-1 β (B) sowie die Untersuchung der Expression von mCCL17 nach Stimulation mit TNF α (C) und IL-1 β (D). Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Die Y-Achse gibt Änderung der Expression der mCCL5 bezogen auf die nicht stimulierte wildtypische Kontrolle an. Der Wert der Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die weiteren Werte darauf bezogen. Die X-Achse gibt die Dauer der Stimulation in Minuten an. Die Standardabweichungen wurden auf Grundlage unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests errechnet ($p < 0.05$).

3.8 Das subgenomische HCV-Replikon beeinflusst die TNF α -induzierte Aktivierung der p38^{MAPK} in Huh7- und Huh9-13-Zellen

Um die intrazellulären Signalwege zu untersuchen und zu prüfen, ob das HCV-Replikon eine Veränderung der Aktivierung der p38^{MAPK} zur Folge hat und welchen Einfluss es auf die TNF α -induzierte Aktivierung der p38^{MAPK} nimmt, wurden Huh7-Zellen und Replikon-Zellen mit TNF α in unterschiedlichen Dosierungen zu jeweils zwei Zeitpunkten stimuliert. Detektiert wurden die phosphorylierte und die nicht-phosphorylierte Form der p38^{MAPK}. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, kommt es bereits basal zu einer leicht verstärkten Aktivierung der p38^{MAPK} und zu einer nachhaltigen Verstärkung der TNF α -induzierten Aktivierung der p38^{MAPK}.

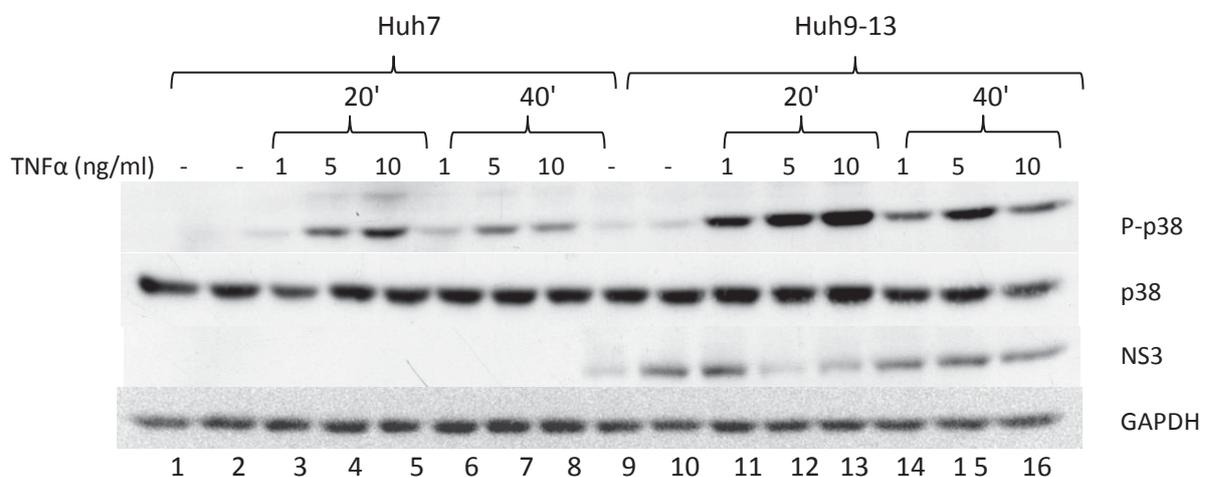
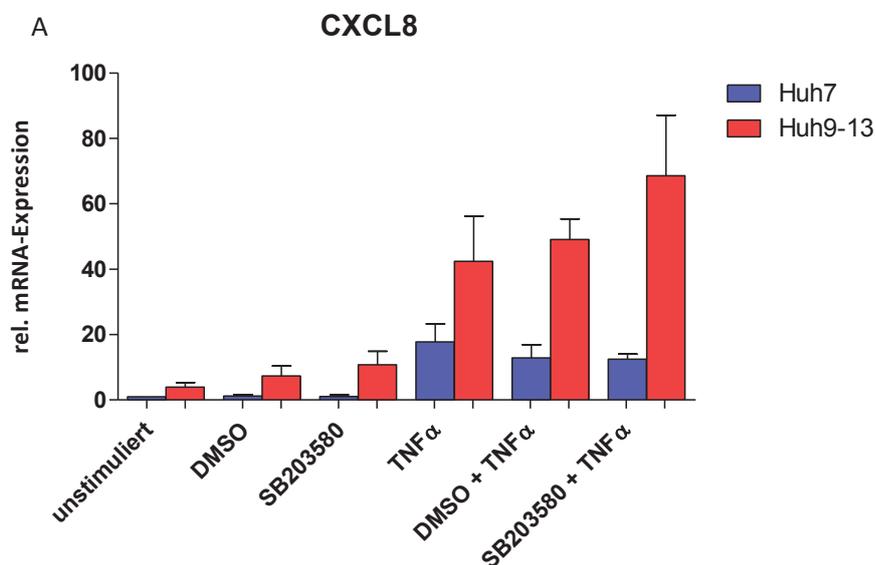


Abbildung 3.10: Die p38^{MAPK} ist in Huh9-13-Zellen basal aktiviert und die Aktivierung wird durch Stimulation mit TNF α konzentrationsabhängig verstärkt. Huh7- und Huh9-13-Zellen wurden in Konzentrationen von 1, 5 und 10 ng/ml TNF α 20 und 40 Minuten stimuliert. Im Western Blot wurden Antikörper gegen die phosphorylierte Form der p38^{MAPK} (P-p38), die nicht phosphorylierte p38^{MAPK} (p38), das nicht strukturelevante Protein NS3 (NS3) des HCV-Replikons und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Dabei dient die NS3 als interne Kontrolle für das Vorhandensein des HCV-Replikons. Die GAPDH diente als Beladungskontrolle und die nicht phosphorylierte Form der p38^{MAPK} als Indikator für die Aktivierung unter Simulation mit TNF α .

Die gewonnenen Ergebnisse untermauern, dass das subgenomische HCV-Replikon einen Einfluss auf die Expression von Chemokinen nimmt und, dass es zu einer verstärkten Expression der $p38^{\text{MAPK}}$ führt, deren Stellenwert für die HCV-Pathologie in vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe eindrucksvoll gezeigt werden konnte. Es stellt sich die Frage, ob der zuvor gezeigte Effekt des subgenomischen HCV-Replikons auf die Chemokinexpression über die $p38^{\text{MAPK}}$ vermittelt wird. Es wurde zu diesem Zweck der Inhibitor der $p38^{\text{MAPK}}$, SB203580, im Zellmodell verwendet.

3.9 Die Expression von mCXCL8 wird nicht direkt durch die $p38^{\text{MAPK}}$ beeinflusst

Die $p38^{\text{MAPK}}$ wurde aus zwei Gründen in diesem Kontext untersucht, da in dieser Arbeit belegt werden konnte, dass die Aktivierung durch das subgenomische HCV-Replikon und $\text{TNF}\alpha$ beeinflusst wird. Auf Grund dessen wurde die $p38^{\text{MAPK}}$ mit dem Inhibitor SB203580 inhibiert und die Expression des Chemokins CXCL8 in Huh9-13- und Huh7-Zellen untersucht. Es wurden $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ für 80 Minuten als Stimulanzen eingesetzt (Abbildung 3.11).



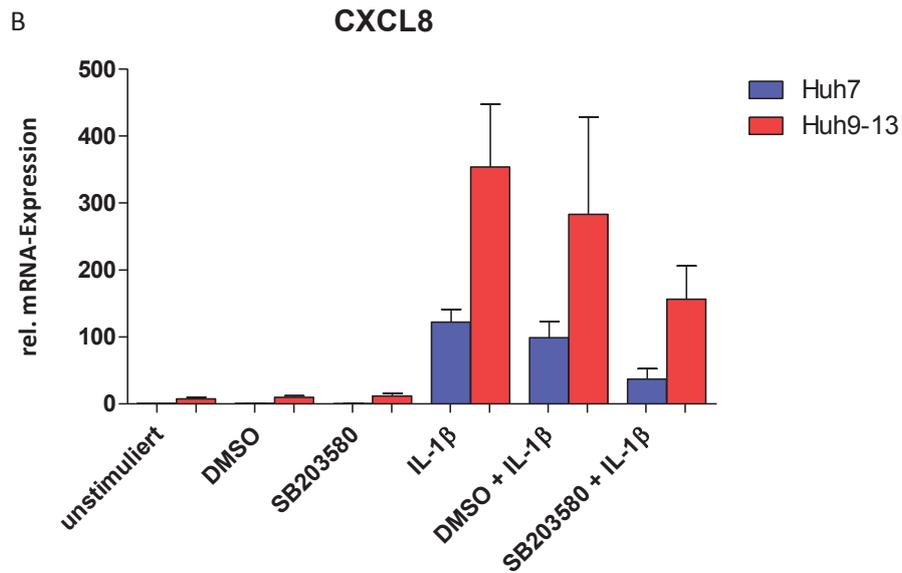


Abbildung 3.11: Die mCXCL8-Expression wird in Huh9-13-Zellen durch $\text{TNF}\alpha$ und durch Hemmung der p38^{MAPK} mittels SB203580 in Huh9-13-Zellen bei Stimulation mit IL-1 β verstärkt induziert und nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ in beiden Zelllinien vermindert exprimiert. Mittels semiquantitativer PCR erfolgte die Untersuchung der Expression von mCXCL8 nach 80 Minuten Stimulation mit 2 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ (A) und 10 μM IL-1 β (B) sowie dem Einsatz von 10 μM SB203580 als Inhibitor der p38^{MAPK} . Als Lösungsmittel für den Inhibitor SB203580 diente DMSO. Es wurde entsprechend einer Kontrolle mit DMSO angesetzt. Zur Auswertung wurde die ΔCT -Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Die Y-Achse gibt die Inhalte der Proben an. Die X-Achse gibt die relative RNA-Expression an. Der Wert der Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die weiteren Werte darauf bezogen.

4 DISKUSSION

4.1 Die Chemokinexpression wird durch das subgenomische HCV-Replikon beeinflusst

Transgene Tiere mit einer leberspezifischen Expression der viralen Protease NS3/4A weisen gegenüber letalen Dosen von LPS/D-GalN und TNF α /D-GalN eine erhöhte Resistenz auf^[53]. Unter Berücksichtigung dieses Befundes und der LPS/D-GalN-induzierten Leberschädigung mit der Aktivierung von STAT1, einem Signalelement der IFN γ -induzierten Signalkette, trat IFN γ zu Beginn der Arbeit in den Fokus^[117]. Es wurde daher in Leberlysaten von NS3/4A-transgenen Tieren, die mit LPS, TNF α und D-GalN behandelt wurden, die Expression von IFN γ untersucht. Als wegweisenden Befund konnte eine verminderte Sekretion von IFN γ in diesen Lebern erhoben werden (Abbildung 3.2). Dieser Effekt kann nicht direkt durch das virale Protein vermittelt sein, da IFN γ nicht von Hepatozyten, sondern vornehmlich von Typ-1-Helferzellen, NK-Zellen und NKT-Zellen sezerniert wird^[118]. Es stellt sich die Frage nach den interzellulären Vermittlern in diesem Kontext. Vor dem Hintergrund der Leukozytenwanderung^[60] in HCV-infiziertes Lebergewebe und der Abnahme von CD4⁺T-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen in Lebern NS3/4A-transgener Tiere^[53] schien die genauere Betrachtung der leukozytenrekrutierenden Faktoren als mögliche Erklärung für die verminderte Sekretion von IFN γ sinnvoll.

Chemokine, bekannt als chemotaktisch aktive Zytokine, wurden bereits bei der Migration von Leukozyten in Lebergewebe in ihrer Sekretion als gesteigert beschrieben^[82]. Angesichts des Vorliegens von Daten zu CXCL8 im HCV-Kontext und der Qualität der vorhandenen Primer in der PCR wurde dieses Chemokin ausgewählt und zu Beginn der vorliegenden Arbeit im Zellsystem untersucht. Bereits dieses Chemokin ließ erkennen, dass die basale Expression von mCXCL8 im Replikonsystem gegenüber der Expression in Huh7-Zellen erhöht ist (Abbildung 3.3). Da bekannt ist, dass bei einer chronischen Infektion des Menschen mit dem Hepatitis-C-Virus eine erhöhte Konzentrationen von TNF α im Serum zu finden ist^[46], was am ehesten mit einer gesteigerten Sekretion durch kompetente Zellen erklärt wird^[47], und auch bei NS3/4A-transgenen Tieren eine basal erhöhte TNF α -Konzentration nachgewiesen werden konnte^[58], wurde im untersuchten Zellmodell mittels TNF α stimuliert. Auf diese Weise erhält man einen neuen Untersuchungsansatz im Zellmodell. Die verwendete Konzentration von 2 ng/ml TNF α

wurde mittels Konzentrationsreihen in Hepatomazellen anhand der CXCL1- und CXCL8-mRNA-Expression bestimmt (Abbildung 3.4). mCXCL8 wird nach Stimulation mit TNF α in beiden Zelllinien verstärkt exprimiert, wobei die Expression in Huh9-13-Zellen führend bleibt. Ein Zeitreihenversuch mit TNF α als Stimulanz zeigt eine zeitabhängige Induktion der mCXCL8-Expression in beiden Zellreihen (Abbildung 3.5). Bemerkenswerterweise konnte nicht nur eine erhöhte CXCL8-Expression in Serumproben von Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C gefunden werden, sondern auch ein schlechteres Ansprechen auf eine antivirale Therapie mit Interferonen bei einer erhöhten CXCL8-Expression^[119, 120]. Die Ergebnisse liefern einen deutlichen Hinweis auf den Einfluss der viralen Proteine auf die mRNA-Expression von Chemokinen und zeigen Parallelen zwischen dem Zellmodell und Patientenuntersuchungen auf. CXCL8 besitzt durch sein ELR-Motiv die Fähigkeit zur Angiogenese. Chemokine mit ELR-Motiv haben in Experimenten nach Schädigung der Leber durch Acetaminophen einen leberprotektiven Effekt gezeigt^[98]. CXCL8 wird über CXCR1 und CXCR2 gebunden und findet sich vornehmlich auf der Oberfläche Neutrophiler Granulozyten^[121]. Daraus ergibt sich eine hohe Potenz zur Rekrutierung von Leukozyten^[122]. Welcher der Effekte überwiegt, bleibt offen, da CXCR2 nicht nur CXCL8, sondern auch CXCL1 und CXCL2 bindet^[123]. Die Expression von CXCL1 ist in der Konzentrationsreihe von TNF α basal und bei jeder TNF α -Konzentration in den Huh9-13-Zellen führend (Abbildung 3.4). Eine erhöhte Expression von CXCL1 wurde ebenfalls *in vivo* bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C beschrieben^[124]. CXCL2 verhält sich im Replikonsystem ähnlich CXCL1. Es wird basal stärker in Huh9-13-Zellen und nach Stimulation mit TN α stärker als in Huh7-Zellen exprimiert (Abbildung 3.8). CXCL1, CXCL2 und CXCL8 sind basal in Huh9-13-Zellen erhöht und erfahren eine Induktion ihrer Expression nach Stimulation mit TNF α verglichen mit Huh7-Zellen. Es kann eine ausgeprägte Potenz zur Rekrutierung von Zellen mit den Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 postuliert werden. Einen indirekten Hinweis liefert die Beobachtung, dass erhöhte CXCL8-Level mit der Schwere der histologischen Inflammation bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C korrelieren^[125].

Unter Berücksichtigung der verminderten IFN γ -Sekretion im Lebergewebe NS3/4A-transgener Tiere stellt sich im Kontext der Untersuchung von Chemokinen die Frage nach der Expression von IFN γ -abhängigen Chemokinen. Zu diesen zählt MIG (*monokin induced by interferon gamma*), auch CXCL9. Seine mRNA wird in dieser Arbeit zu Grunde

liegenden Zellmodell in Huh9-13-Zellen basal stärker und nach der Stimulation mit TNF α in beiden Zelllinien verstärkt exprimiert (Abbildung 3.6). CXCL9 spielt eine wichtige Rolle im Kontext der Infiltration der Leber durch immunkompetente Zellen, da es über seinen Rezeptor CXCR3 die zelluläre Immunität in Form von Typ-1-Helferzellen rekrutieren kann^[126]. Im untersuchten Zellmodell ist die Bewertung des Zusammenhangs von IFN γ und CXCL9-RNA schwierig, da es keine IFN γ -sezernierenden Zellen in diesem Modell gibt und die vorliegenden Ergebnisse als isolierte Effekte durch das applizierte TNF α gesehen werden müssen. Geht man davon aus, dass IFN γ entsprechend den Ergebnissen der *in vivo* Experimente vermindert sezerniert wird, scheint eine verstärkte CXCL9-RNA-Expression paradox. Um das Zytokinmilieu höher aufzulösen, wurden weitere IFN γ -abhängige Chemokine untersucht. mCXCL10, auch IP-10 (*Interferon gamma-induced protein 10*) wird wie mCXCL9 basal in Huh9-13-Zellen verstärkt exprimiert. Es erfährt darüber hinaus ebenfalls eine Induktion seiner Expression nach Stimulation mit TNF α (Abbildung 3.6). Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen der Leber infizierter Patienten^[82]. CXCL11, I-TAC (*Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant*), wird in den Huh9-13-Zellen basal geringer exprimiert als in den Huh7-Zellen. Nach Stimulation mit TNF α erfährt CXCL11 eine geringere Induktion in den Huh9-13-Zellen als in den Huh7-Zellen (Abbildung 3.6). Im untersuchten Zellmodell verhalten sich CXCL9, CXCL10 und CXCL11 bei Stimulation einer systemischen Inflammation analog den Ergebnissen von humanen Serumproben und den Ergebnissen aus Leberbiopsaten bei einer HCV-Infektion^[84, 127]. Es kommt zu einer Induktion der Expression, die in Anbetracht der gezogenen Vergleiche zu Beobachtungen anderer relevant erscheint. Es bleibt festzustellen, dass alle drei IFN γ -abhängigen Chemokine eine Induktion ihrer Expression im Modellsystem nach Stimulation mit TNF α erfahren. Bemerkenswerterweise wirken diese drei Chemokine lediglich über einen Rezeptor, CXCR3. Dieser Rezeptor konnte vermehrt auf Lymphozyten von chronisch HCV-infizierten Patienten nachgewiesen werden^[128], was die Relevanz der gezeigten Ergebnisse untermauert und auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Modellsystem und HCV-infizierten Patienten hinweisen kann. Als Folge der Veränderungen könnte es zu einer Verschiebung der Rekrutierung von Typ-2-Helferzellen, deren Rezeptor vornehmlich CCR3 ist, hin zu einer über CXCR3 vermittelten von Typ-1-Helferzellen geprägten Immunantwort kommen^[129]. Diese Verschiebung könnte für das Virus im Hinblick auf die schlechten Fehlerkorrektur

der NS5B-Polymerase, die viel unspezifisches Antigen produziert, das nicht durch Typ-1-Helferzellen effektiv bekämpft werden kann, einen positiven Effekt haben. Dadurch ist eine Erschöpfung der T-Zell-Antwort, die sogenannte *T-cell-exhaustion* möglich^[13]. Die Typ-1-Helferzellen werden zusätzlich durch das Core-Protein des Hepatitis-C-Virus über den Komplement-Rezeptor gC1qR in der Proliferation gestört^[130]. Somit führt die vermehrte Expression der IFN γ -abhängigen Chemokine zu einer Rekrutierung von Zellen in die Leber, die das Virus durch die oben beschriebenen Mechanismen nicht effektiv bekämpfen können. Auf der Grundlage dieser Annahme und den generierten Ergebnissen wurde CCL17 im Replikonsystem untersucht. CCL17 ist der Ligand von CCR4, der auf Typ-2-Helferzellen vorkommt und kann diese nach Aktivierung durch seinen Liganden rekrutieren^[131]. Es konnte in anderen Arbeiten dargestellt werden, dass die RNA von CCL17 in Lebern Hepatitis-C-Infizierter gesteigert exprimiert wird^[132]. Die Daten dieser Arbeit weisen hohe Streuungen der Werte einzelner Zeitpunkte auf. Nach Stimulation mit TNF α scheint es in Huh9-13-Zellen zu einer zeitabhängigen Induktion der Expression zu kommen und könnte in die Richtung der verfolgten Argumentation verwendet werden (Abbildung 3.9). Bemerkenswert ist, dass eine Detektion von PCR-Amplifikaten erst bei Zyklus > 35 stattfand. Die Menge der in den Proben vorliegenden cDNA respektive RNA von CCL5 und CCL17 ist entsprechend gering. Es bleibt daher zu prüfen, inwieweit der hier wiedergegebene Effekt auf Proteinebene nachvollziehbar ist und welche Relevanz diesem beizumessen bleibt.

Die chronische Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus ist ein Wechselspiel aus der chronischen Entzündungsreaktion bei Viruspersistenz und der Regeneration bei einer Abschwächung der Entzündungsreaktion oder sogar ein Sistieren im Rahmen der Viruselimination. Die Untersuchung des in diesem Zusammenhang bereits in anderen Arbeiten diskutierten Rezeptor-Liganden-Paares CXCR4 und CXCL12 erscheint vor diesem Hintergrund sinnvoll^[82]. Entsprechend wurden CXCL12 und CXCR4 in diesem Zellmodell auf mRNA-Ebene untersucht. mCXCL12 wird basal in den Huh7-Zellen stärker exprimiert als in den Huh9-13-Zellen. Nach Stimulation mit TNF α erfährt CXCL12 keine Induktion im Zeitreihenversuch. Die Huh9-13-Zellen erfahren ebenfalls unter Stimulation mit TNF α ebenfalls keine Induktion der Expression von CXCL12. Es ist eine konstitutive Expression dieses Chemokins in beiden Zellreihen anzunehmen. Für den Rezeptor von CXCL12, CXCR4, findet sich in dem untersuchten Zellmodell keine Induktion der Expression unter

Stimulation mit TNF α . Dabei ist die Expression von CXCR4 in den Huh9-13-Zellen deutlich f \ddot{u} hrend (Abbildung 3.7). Es ist entsprechend f \ddot{u} r das Rezeptor-Liganden-Paar von einer konstitutiven Expression auszugehen. Die erh \ddot{o} hte Expression von mCXCL12 und mCXCR4 im Zellmodell deckt sich mit Untersuchungen aus Leberpr \ddot{a} paraten von Patienten mit chronischer Hepatitis-C verglichen mit Kontrollgruppen^[133]. Die Annahme einer konstitutiven Expression wird durch weitere Versuchsreihen unter Stimulation mit IL-1 β gest \ddot{u} tzt (Abbildung 3.7). IL-1 β wurde verwendet, da es eine hohe proinflammatorische Potenz aufweist^[112]. Unter IL-1 β kommt es zu keiner \ddot{A} nderung der Expression im Zeitreihenversuch. Welche Bedeutung CXCL12 und CXCR4 f \ddot{u} r die Pathogenese der Hepatitis-C haben, ist schwer einzuordnen, da CXCL12 nicht nur ein Ligand von CXCR4 ist, sondern auch von CXCR7, CXCL12 eine h \ddot{o} here Bindungsaffinit \ddot{a} t zu CXCR7 als zu CXCR4 aufweist und dar \ddot{u} ber hinaus CXCR7 die von CXCL12 vermittelten Effekte durch die Bildung von Heterodimeren mit CXCR4 modulieren kann^[134, 135]. Vor diesem Hintergrund f \ddot{a} llt die Einordnung der erhaltenen Ergebnisse ungleich schwerer. Die Bedeutung von CXCR4 liegt in der Wanderung von Stammzellen in die gesch \ddot{a} digte Leber^[136]. Die erh \ddot{o} hte Expression von CXCR4-mRNA in der Hepatitis-C-infizierten Leber ist aus anderen Untersuchungen bekannt. 50 % der die Leber infiltrierenden T-Zellen, NKT-Zellen und NK-Zellen weisen CXCR4 als Oberfl \ddot{a} chenmarker aufweisen^[84]. Man k \ddot{o} nnte annehmen, dass durch die verminderte Expression von CXCL12-mRNA in den Huh9-13-Zellen diese Zellen die Leber schlechter infiltrieren und damit die Viruselimination erschwert ist. Ob ein solcher Zusammenhang besteht, bleibt auf Grund der oben dargelegten komplexen Interaktionen zwischen CXCL12, CXCR4 und CXCR7 spekulativ.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die aus dem dieser Arbeit zu Grunde liegenden Zellmodell gewonnenen Ergebnisse \ddot{U} bereinstimmungen mit Untersuchungen aus Patientenproben oder anderen Zellkultur-basierten Modellen aufweisen. Diese \ddot{U} bereinstimmungen sind als ein Beleg f \ddot{u} r die Relevanz der erhobenen Daten und der Relevanz des Zellmodells in der HCV-Forschung zu werten. Nimmt man die gewonnenen Erkenntnisse als Grundlage, w \ddot{a} re die erweiterte Untersuchung der Chemokine auf Proteinebene sinnvoll. Es bleibt die Frage, inwieweit sich die dargestellten Ver \ddot{a} nderungen der mRNA-Expression im Zellmodell in einem biologisch aktiven Protein niederschlagen und ob postulierte Effekte der Chemokine auch stattfinden k \ddot{o} nnen.

Darüber hinaus stellt sich die Frage nach den intrazellulären Mechanismen, die zu einer Beeinflussung der RNA-Expression der Chemokine führen.

4.2 Die Rolle der p38^{MAPK} für die Chemokinexpression im Replikonsystem

Das Expressionsmuster der erhaltenen Ergebnisse von CXCL8, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 nach TNF α -Stimulation lässt annehmen, dass es vorgeschaltete Signalwege geben muss. Im Falle dieser Chemokine kommt es mit einer zeitlichen Verzögerung zu einer Steigerung der mRNA-Expression nach Stimulation mit TNF α . Einen Hinweis auf die zu untersuchenden intrazellulären Signalwege geben die Ergebnisse der Untersuchungen der p38^{MAPK} im Model NS3/4A-transgener Tiere. In Anbetracht des ausgeprägten Effekts durch die p38^{MAPK} in Form einer erhöhten Resistenz der Tiere bei Applikation von TNF α und der Aufhebung des protektiven Effektes nach Applikation des p38^{MAPK}-Inhibitors SB203580 wurde die Aktivierung der p38^{MAPK} im Replikonsystem untersucht^[53]. In dieser Arbeit zu Grunde liegenden Replikonsystem wird die p38^{MAPK} in Huh9-13-Zellen stärker als in Huh7-Zellen aktiviert. (Abbildung 3.10). Dieses Ergebnis stellt sich analog den Ergebnissen im Tiermodell dar^[53]. Es wurde TNF α appliziert, um gleich den Experimenten zu den Chemokinen die Beobachtung erhöhter TNF α -Konzentrationen in Seren chronisch infizierter Patienten einzubringen. TNF α führt zu einer verstärkten Aktivierung der p38^{MAPK} in Huh7- und Huh9-13-Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration (Abbildung 3.10). Es lässt sich somit feststellen, dass das HCV-Replikon zu einer konstitutiven Aktivierung der p38^{MAPK} als auch zu einer gesteigerten Aktivierung durch die Stimulation mit TNF α führt. Es wird angenommen, dass die p38^{MAPK} proapoptische Signalwege inhibiert und diese inhibierten Signalwege wiederum die proapoptische Wirkung von TNF α -vermittelter Apoptose negativ beeinflussen^[137, 138].

Um den Zusammenhang der beobachteten Änderungen der Chemokinexpression im Replikonsystem versus den Wildtypzellen und der p38^{MAPK} zu beleuchten, wurde die p38^{MAPK} im Replikonsystem mittels des Inhibitors SB203580 inhibiert. Darüber hinaus erfolgte die Stimulation der Zellen jeweils mit TNF α und IL-1 β . Die Bedeutung der p38^{MAPK} für die differentielle Expression von Chemokinen leitet sich aus der Beobachtung ab, dass die p38^{MAPK} einen positiven Einfluss auf die Stabilität der mRNA von CXCL8 hat^[54]. Es stellt sich heraus, dass es nach Stimulation mit IL-1 β und Inhibition der p38^{MAPK} zu einer reduzierten Expression von mCXCL8 in beiden Zelllinien kommt (Abbildung 3.11). Es kann

angenommen werden, dass der vermittelte Effekt nicht spezifisch für das HCV-Replikon ist. Nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ ergibt sich eine Steigerung der Expression von CXCL8 für die Huh9-13-Zellen. In den Wildtypzellen kommt es zu keiner gesteigerten oder verminderten Expression. Es muss angenommen werden, dass die zuvor beobachtete gesteigerte Expression einiger Chemokine in Huh9-13-Zellen kein direkter Effekt der p38^{MAPK} ist, da in diesem Falle eine verminderte Expression von mCXCL8 zu erwarten gewesen wäre. Damit besteht ein Zusammenhang der Aktivierung der p38^{MAPK} im Replikonsystem mit der NS3/4A (Abbildung 3.10 und 3.11), jedoch kein direkter Zusammenhang der p38^{MAPK} mit der Expression von mCXCL8. Inwieweit diese Aussage für die anderen untersuchten Chemokine gilt, muss für diese jeweils untersucht werden. Darüber hinaus stellt sich die Frage nach dem regulierenden Element in der Signalkette, das eine verstärkte Expression von Chemokinen bedingt. Die Diskussion wird in Abbildung 4.1 zusammengefasst.

Inwieweit sich die gewonnenen Ergebnisse und ihre Interpretationen auf das Gesamtorgan und darüber hinaus auf den Menschen übertragen lassen, bleibt offen. Kein Zweifel besteht an der Künstlichkeit der dargestellten Daten in Anbetracht der Generierung in einem isolierten Zellmodell. Mit dem Wissen über die Leber als ein Organ mit immunologischer Kompetenz und dem vielfältigen Zusammenspiel der unterschiedlichen involvierten Zellen liegt es nahe, die dargestellten Daten zu den Chemokinen und deren Generierung im fehlenden immunologischen, vornehmlich dem interzellulären Kontext als insuffizient anzusehen. Dem steht die Tatsache gegenüber, dass die Daten zu den Chemokinen in dem einzigen routinemäßig nutzbaren Zellmodell für den Hepatitis-C-Virus, den von Bartenschlager entwickelten Huh9-13-Zellen, gewonnen wurden. Dieses Zellmodell gilt in der HCV-Forschung trotz der Verwendung eines Subgenoms als etabliert und wird zur Untersuchung der Pathogenese von HCV verwendet. Die Ergebnisse zur Chemokinexpression dieser Arbeit decken sich in mehreren Punkten mit Untersuchungen *in vivo* und mit Daten aus anderen Arbeiten, die auf Zellkulturen basieren. Die Ergebnisse der p38^{MAPK} dieser Arbeit stimmen in ihrer Aussage mit denen aus tierexperimentellen Untersuchungen überein. Daraus kann man ableiten, dass das Replikonsystem in dieser Fragestellung reproduzierbar ist und Relevanz besitzt. Darüber hinaus sind Arbeiten an den beiden möglichen Infizierten, dem Menschen und dem Schimpansen, methodisch schwierig und ethisch schwer zu vertreten.

Es ergibt sich als neue Fragestellung, inwieweit sich die Expression der untersuchten Chemokine in einem erweiterten Zellmodell unter Addition von immunkompetenten und in der Leber präsenten Zellen wie $CD4^+$ T-Lymphozyten und $CD8^+$ T-Lymphozyten ändert. Des Weiteren ist die Aussagekraft der dargestellten Ergebnisse bei Vorliegen dieser auf Transkriptebene eingeschränkt. Dementsprechend sollte eine weiterführende Prüfung auf Proteinebene stattfinden, um einen Hinweis auf die biologische Relevanz der dargestellten Daten zu erhalten. Es konnten zum Teil die vorgelegten Daten auf Proteinebene untermauert werden (Bode, unpublizierte Befunde).

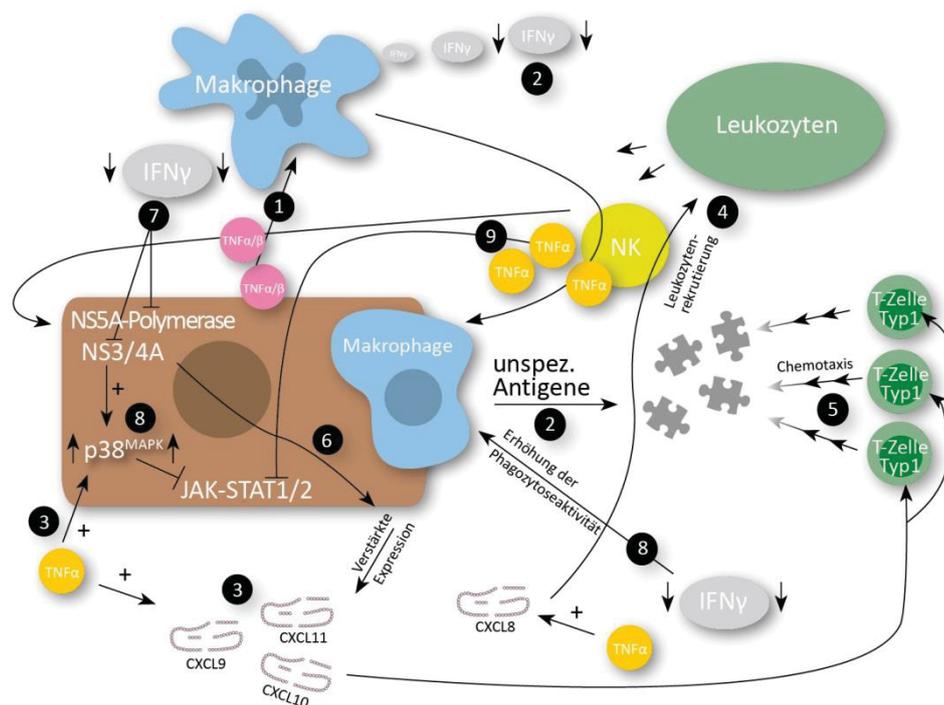


Abbildung 4.1: **Zusammenfassende Darstellung der HCV-Pathologie unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Dissertation:** Infizierte Hepatozyten werden durch die angeborene Immunität repräsentiert durch Makrophagen erkannt. Dabei kommt es zur Ausschüttung von IFN α und IFN β durch die infizierten Zellen (1). Die Aktivierung der Makrophagen führt wiederum zur Ausschüttung von Interferon-Gamma (IFN γ) und die Phagozytose zur Präsentation von viralem Antigen (2). TNF α als liegt bei einer HCV-Infektion vermehrt vor und bedingt eine verstärkte Aktivierung der p38^{MAPK} sowie einer gesteigerte Expression mehrerer Chemokine, unter anderem CXCL8 als starker Faktor der Leukozytenrekrutierung (3). Die T-Zellantwort auf unspezifische Antigene durch die NS5B-Polymerase wird durch eine gesteigerte Expression der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 verstärkt (4). Es kann eine vermehrte Rekrutierung von Typ-2-Helferzellen aus dem Expressionsmuster vermutet werden (5), die wiederum eingeschränkt in ihrer Funktion auf das unspezifische Antigen treffen. Die Veränderungen der Chemokinexpression sind abhängig vom viralen Protein, nicht aber von der p38^{MAPK} (6). Bei Übertragung der festgestellten verminderten IFN γ -Ausschüttung im Lebergewebe NS3/4A-transgener Tiere auf das Modell kann eine verminderte Hemmung der NS5B-Polymerase und der NS3/4A-Transferase angenommen werden (7). Die die Phagozytose stimulierenden Effekte durch IFN γ sind weniger stark ausgeprägt bei verminderter Expression von IFN γ (8). Im Replikonsystem wurde eine gesteigerte Expression der p38^{MAPK} und Aktivierung durch TNF α gefunden, welche wiederum synergistisch mit TNF α proapoptische Signalwege hemmt (9).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Hepatitis-C-Virus ist weltweit eine der führenden Ursachen chronischer Lebererkrankungen und führt in über 70 % der Infektionen zur Etablierung einer persistierenden Infektion, die mitunter Jahrzehnte inapparent verläuft und erst spät symptomatisch wird. Der trotz anhaltender Replikation mit hohen Virustitern schleichende Verlauf der Erkrankung legt nahe, dass das Virus im Laufe der Evolution die Fähigkeit erworben hat, die antivirale Wirtsantwort zu unterlaufen und den Verlauf von Entzündungsreaktionen nachhaltig zu beeinflussen. Dies wird auch durch transgene Mausmodelle nahegelegt bei denen bereits die leber-spezifische Expression der viralen Protease NS3/4A ausreicht, um den Verlauf einer andernfalls letalen Entzündungsreaktion nachhaltig zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang scheint insbesondere den bereits unter basalen Bedingungen erhöhten Serumkonzentrationen an TNF α eine besondere Bedeutung zuzukommen. Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeiten sollte geklärt werden inwieweit HCV Einfluss auf das interzelluläre Kommunikationsverhalten der Wirtszelle hat und ob HCV Einfluss auf die durch Entzündungsmediatoren wie TNF α hervorgerufene Chemokinantwort der Wirtszelle hat. Hierzu wurde an Huh7-Zellen, die das subgenomische Replikon des Hepatitis-C-Virus vom Genotyp 1b stabil exprimieren, die basale wie auch die durch induzierte Expression der Chemokine CCL5 und CCL17 sowie CXCL1, 2, 8, 9, 10, 11 und 12 auf Transkriptebene untersucht. Darüber hinaus wurde die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 analysiert. Die Daten belegen, dass HCV die basale Chemokinexpression wie auch die Chemokinantwort auf Entzündungsmediatoren nachhaltig beeinflusst, wobei die Expression der Chemokine CXCL1, 2, 8, 9 und 10 sowie der Chemokinrezeptor CXCR4 durch HCV verstärkt wird während die basal Expression der Chemokine CXCL11 und 12 vermindert wird und die Expression von CCL5 und 17 nicht signifikant beeinflusst wird. Die Stimulation von Huh7-Zellen mit TNF α führte mit Ausnahme von CXCR4 und CXCL12 bei allen untersuchten Transkripten zu einem Anstieg der Expression. Die TNF α -induzierte Expression dieser Transkripte wurde durch die Gegenwart des subgenomischen HCV-Replikons zum Teil nachhaltig verstärkt. Gleichmaßen wurde die IL-1 β induzierte Expression von CXCL8 durch HCV deutlich verstärkt. Soweit sich aus den am Beispiel von CXCL8 durchgeführten Inhibitorstudien schlussfolgern lässt, spielt die Verstärkung der basalen wie auch der

TNF α -induzierten Aktivierung der p38^{MAPK} keine Rolle für die beobachtete Hochregulation der Chemokinexpression durch HCV.

Die hier vorgelegten Daten legen zusammenfassend nahe, dass HCV sowohl die basale als auch die durch TNF α induzierte Chemokinexpression und hierdurch das interzelluläre Kommunikationsverhalten seiner Wirtszelle nachhaltig beeinflusst. Es ist davon auszugehen, dass dies die Rekrutierung von Immunzellpopulationen in die Leber mitbestimmt und beeinflusst. Ein Aspekt, der auch die beobachtbare Reduktion der Produktion von IFN γ im Lebergewebe NS3/4A-transgener Tiere erklären könnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Maccallum, F.O., *Homologous Serum Hepatitis*. Proc R Soc Med, 1946. **39**(10): p. 655-7.
2. Grady, G.F. and T.C. Chalmers, *Risk of Post-Transfusion Viral Hepatitis*. N Engl J Med, 1964. **271**: p. 337-42.
3. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*. Lancet, 1970. **1**(7649): p. 695-8.
4. Alter, H.J., et al., *Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis*. Lancet, 1975. **2**(7940): p. 838-41.
5. 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.
6. Simmonds, P., et al., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 962-73.
7. Bruggmann, P., et al., *Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries*. J Viral Hepat, 2014. **21 Suppl 1**: p. 5-33.
8. Armstrong, G.L., et al., *The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002*. Ann Intern Med, 2006. **144**(10): p. 705-14.
9. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2436-41.
10. Dubuisson, J., *Hepatitis C virus proteins*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2406-15.
11. Kurosaki, M., et al., *Sequences in the interferon sensitivity-determining region and core region of hepatitis C virus impact pretreatment prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis*. J Med Virol, 2011. **83**(3): p. 445-52.
12. Penin, F., et al., *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 5-19.
13. Martin, B., et al., *Restoration of HCV-specific CD8+ T cell function by interferon-free therapy*. J Hepatol, 2014.
14. Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice, *Replication of hepatitis C virus*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(6): p. 453-63.
15. Major, M.E. and S.M. Feinstone, *Characterization of hepatitis C virus infectious clones in chimpanzees: long-term studies*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **242**: p. 279-98.
16. Zeisel, M.B., et al., *Hepatitis C virus entry: molecular mechanisms and targets for antiviral therapy*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 3274-85.
17. Lupberger, J., et al., *EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 589-95.
18. Georgel, P., et al., *Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies*. Trends Mol Med, 2010. **16**(6): p. 277-86.
19. Jopling, C.L., et al., *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1577-81.
20. 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.
21. Pfeifer, U., et al., *Experimental non-A, non-B hepatitis: four types of cytoplasmic alteration in hepatocytes of infected chimpanzees*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1980. **33**(3): p. 233-43.
22. Duverlie, G. and C. Wychowski, *Cell culture systems for the hepatitis C virus*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2442-5.
23. Lohmann, V., et al., *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. Science, 1999. **285**(5424): p. 110-3.
24. Bartenschlager, R., *The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application*. J Hepatol, 2005. **43**(2): p. 210-6.

25. Lohmann, V., et al., *Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1437-49.
26. Nakabayashi, H., et al., *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
27. 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.
28. Bartenschlager, R., *Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(11): p. 911-6.
29. Horscroft, N., et al., *Replicon cell culture system as a valuable tool in antiviral drug discovery against hepatitis C virus*. Antivir Chem Chemother, 2005. **16**(1): p. 1-12.
30. Saeed, M., et al., *Efficient replication of genotype 3a and 4a hepatitis C virus replicons in human hepatoma cells*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(10): p. 5365-73.
31. Gerlach, J.T., et al., *Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 80-8.
32. Lechner, F., et al., *Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus*. J Exp Med, 2000. **191**(9): p. 1499-512.
33. Cooper, S., et al., *Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus*. Immunity, 1999. **10**(4): p. 439-49.
34. Ulsenheimer, A., et al., *Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1189-98.
35. Spangenberg, H.C., et al., *Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 828-37.
36. He, X.S., et al., *Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5692-7.
37. Boisvert, J., et al., *Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes*. J Hepatol, 2003. **38**(1): p. 67-75.
38. Zeremski, M., L.M. Petrovic, and A.H. Talal, *The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection*. J Viral Hepat, 2007. **14**(10): p. 675-87.
39. Sreenarasimhaiah, J., et al., *Lack of optimal T-cell reactivity against the hepatitis C virus is associated with the development of fibrosis/cirrhosis during chronic hepatitis*. Hum Immunol, 2003. **64**(2): p. 224-30.
40. Ehrt, S., et al., *Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1123-40.
41. Su, A.I., et al., *Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15669-74.
42. Frese, M., et al., *Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs*. Hepatology, 2002. **35**(3): p. 694-703.
43. Freeman, A.J., et al., *Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection*. Immunol Cell Biol, 2001. **79**(6): p. 515-36.
44. Diepolder, H.M., et al., *Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection*. Lancet, 1995. **346**(8981): p. 1006-7.
45. Thimme, R., et al., *Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15661-8.
46. Kallinowski, B., et al., *Induction of tumour necrosis factor (TNF) receptor type p55 and p75 in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection*. Clin Exp Immunol, 1998. **111**(2): p. 269-77.
47. Nelson, D.R., et al., *Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus infection*. Dig Dis Sci, 1997. **42**(12): p. 2487-94.
48. 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.

49. Morio, L.A., et al., *Distinct roles of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001. **172**(1): p. 44-51.
50. Liu, D., et al., *Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(46): p. 48434-42.
51. Kamiya, A. and F.J. Gonzalez, *TNF-alpha regulates mouse fetal hepatic maturation induced by oncostatin M and extracellular matrices*. *Hepatology*, 2004. **40**(3): p. 527-36.
52. Keppler, D., et al., *Changes in uridine nucleotides during liver perfusion with D-galactosamine*. *FEBS Lett*, 1969. **4**(4): p. 278-280.
53. Frelin, L., et al., *The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumour necrosis factor alpha mediated liver disease*. *Gut*, 2006. **55**(10): p. 1475-83.
54. Holtmann, H., et al., *Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 6742-53.
55. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 65-91.
56. Liu, C., et al., *CD8+ T-cell interaction with HCV replicon cells: evidence for both cytokine- and cell-mediated antiviral activity*. *Hepatology*, 2003. **37**(6): p. 1335-42.
57. Zein, N.N., *Etanercept as an adjuvant to interferon and ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus infection: a phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study*. *J Hepatol*, 2005. **42**(3): p. 315-22.
58. Brenndorfer, E.D., et al., *Anti-tumor necrosis factor alpha treatment promotes apoptosis and prevents liver regeneration in a transgenic mouse model of chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2010. **52**(5): p. 1553-63.
59. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. **42**: p. 469-99.
60. Stein, J.V. and C. Nombela-Arrieta, *Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview*. *Immunology*, 2005. **116**(1): p. 1-12.
61. Yoshimura, T., et al., *Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE*. *FEBS Lett*, 1989. **244**(2): p. 487-93.
62. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. *Immunity*, 2000. **12**(2): p. 121-7.
63. Bacon, K., et al., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. *J Interferon Cytokine Res*, 2002. **22**(10): p. 1067-8.
64. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. *Nature*, 1997. **385**(6617): p. 640-4.
65. Strieter, R.M., et al., *The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(45): p. 27348-57.
66. Smith, D.R., et al., *Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma*. *J Exp Med*, 1994. **179**(5): p. 1409-15.
67. Baird, A.M., S.G. Gray, and K.J. O'Byrne, *Epigenetics underpinning the regulation of the CXC (ELR+) chemokines in non-small cell lung cancer*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e14593.
68. Rostene, W., P. Kitabgi, and S.M. Parsadaniantz, *Chemokines: a new class of neuromodulator?* *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(11): p. 895-903.
69. Esche, C., C. Stellato, and L.A. Beck, *Chemokines: key players in innate and adaptive immunity*. *J Invest Dermatol*, 2005. **125**(4): p. 615-28.
70. Gunn, M.D., et al., *Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization*. *J Exp Med*, 1999. **189**(3): p. 451-60.

71. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
72. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-8.
73. Nagasawa, T., K. Tachibana, and T. Kishimoto, *A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection*. Semin Immunol, 1998. **10**(3): p. 179-85.
74. Lalor, P.F., et al., *Recruitment of lymphocytes to the human liver*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(1): p. 52-64.
75. Murphy, P.M., *International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 227-9.
76. Murdoch, C. and A. Finn, *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3032-43.
77. Bokoch, G.M., *Chemoattractant signaling and leukocyte activation*. Blood, 1995. **86**(5): p. 1649-60.
78. Mandeville, J.T. and F.R. Maxfield, *Effects of buffering intracellular free calcium on neutrophil migration through three-dimensional matrices*. J Cell Physiol, 1997. **171**(2): p. 168-78.
79. Stephens, L., et al., *A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits*. Cell, 1994. **77**(1): p. 83-93.
80. Didichenko, S.A., et al., *Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase*. Curr Biol, 1996. **6**(10): p. 1271-8.
81. Sasaki, T., et al., *Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration*. Science, 2000. **287**(5455): p. 1040-6.
82. Wald, O., et al., *Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics*. Cytokine, 2007. **39**(1): p. 50-62.
83. Shields, P.L., et al., *Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 6236-43.
84. Wald, O., et al., *Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus*. Eur J Immunol, 2004. **34**(4): p. 1164-74.
85. Apolinario, A., et al., *Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(11): p. 2861-70.
86. Kakumu, S., et al., *Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease*. Clin Exp Immunol, 1997. **109**(3): p. 458-63.
87. Bieche, I., et al., *Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection*. Virology, 2005. **332**(1): p. 130-44.
88. Luster, A.D. and J.V. Ravetch, *Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)*. J Exp Med, 1987. **166**(4): p. 1084-97.
89. Taub, D.D., et al., *Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1809-14.
90. Rhode, A., et al., *Islet-specific expression of CXCL10 causes spontaneous islet infiltration and accelerates diabetes development*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3516-24.
91. Casrouge, A., et al., *Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV*. J Clin Invest, 2011. **121**(1): p. 308-17.
92. Lagging, M., et al., *IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection*. Hepatology, 2006. **44**(6): p. 1617-25.

93. Peled, A., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*. Science, 1999. **283**(5403): p. 845-8.
94. Ding, Z., et al., *Up-regulation of functional CXCR4 expression on human lymphocytes in sepsis*. Crit Care Med, 2006. **34**(12): p. 3011-7.
95. King, A.G., et al., *Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRObeta*. Blood, 2001. **97**(6): p. 1534-42.
96. Restivo, T.E., et al., *Application of the chemokine CXCL12 expression plasmid restores wound healing to near normal in a diabetic mouse model*. J Trauma, 2010. **69**(2): p. 392-8.
97. Alison, M.R., et al., *Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 257.
98. Hogaboam, C.M., et al., *Novel CXCR2-dependent liver regenerative qualities of ELR-containing CXC chemokines*. FASEB J, 1999. **13**(12): p. 1565-74.
99. Napoli, J., G.A. Bishop, and G.W. McCaughan, *Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukins 2, 6, and 8 in human cirrhosis*. Gastroenterology, 1994. **107**(3): p. 789-98.
100. Coley, W.B., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases*. 1893. Clin Orthop Relat Res, 1991(262): p. 3-11.
101. Kolb, W.P. and G.A. Granger, *Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **61**(4): p. 1250-5.
102. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
103. Pennica, D., et al., *Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 724-9.
104. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
105. Carpentier, I., et al., *TRAF2 plays a dual role in NF-kappaB-dependent gene activation by mediating the TNF-induced activation of p38 MAPK and IkappaB kinase pathways*. FEBS Lett, 1998. **425**(2): p. 195-8.
106. Natoli, G., et al., *Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway*. Science, 1997. **275**(5297): p. 200-3.
107. Waetzig, G.H., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5342-51.
108. Liedtke, C. and C. Trautwein, *The role of JNK2 in toxic liver injury*. J Hepatol, 2006. **45**(5): p. 762-4.
109. Brown, G.R. and D.L. Thiele, *Enhancement of MHC class I-stimulated alloresponses by TNF/TNF receptor (TNFR)1 interactions and of MHC class II-stimulated alloresponses by TNF/TNFR2 interactions*. Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 2900-7.
110. Kafrouni, M.I., G.R. Brown, and D.L. Thiele, *The role of TNF-TNFR2 interactions in generation of CTL responses and clearance of hepatic adenovirus infection*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 564-71.
111. Dustin, L.B. and C.M. Rice, *Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 71-99.
112. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
113. Curtis, B.M., et al., *T-cell interleukin 1 receptor cDNA expressed in Chinese hamster ovary cells regulates functional responses to interleukin 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(9): p. 3045-9.
114. Heguy, A., et al., *A chimeric type II/type I interleukin-1 receptor can mediate interleukin-1 induction of gene expression in T cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10490-4.
115. Brownie, J., et al., *The elimination of primer-dimer accumulation in PCR*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(16): p. 3235-41.

116. Green, S.J., D. Lubrich, and A.J. Turberfield, *DNA hairpins: fuel for autonomous DNA devices*. *Biophys J*, 2006. **91**(8): p. 2966-75.
117. Kim, W.H., et al., *STAT1 plays an essential role in LPS/D-galactosamine-induced liver apoptosis and injury*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. **285**(4): p. G761-8.
118. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. *Adv Immunol*, 2007. **96**: p. 41-101.
119. Mihm, U., et al., *Association of serum interleukin-8 with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C*. *J Hepatol*, 2004. **40**(5): p. 845-52.
120. Polyak, S.J., et al., *Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy*. *J Virol*, 2001. **75**(13): p. 6209-11.
121. Bonecchi, R., et al., *Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s*. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 129-34.
122. Gilowska, I., *[CXCL8 (interleukin 8)--the key inflammatory mediator in chronic obstructive pulmonary disease?]*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2014. **68**(0): p. 842-50.
123. Le, Y., et al., *Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease*. *Cell Mol Immunol*, 2004. **1**(2): p. 95-104.
124. Nischalke, H.D., et al., *The CXCL1 rs4074 A allele is associated with enhanced CXCL1 responses to TLR2 ligands and predisposes to cirrhosis in HCV genotype 1-infected Caucasian patients*. *J Hepatol*, 2012. **56**(4): p. 758-64.
125. Shimoda, K., et al., *Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 1998. **28**(1): p. 108-15.
126. Qin, S., et al., *The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(4): p. 746-54.
127. Helbig, K.J., et al., *Differential expression of the CXCR3 ligands in chronic hepatitis C virus (HCV) infection and their modulation by HCV in vitro*. *J Virol*, 2009. **83**(2): p. 836-46.
128. Larrubia, J.R., et al., *The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection*. *J Hepatol*, 2007. **47**(5): p. 632-41.
129. Loetscher, P., et al., *The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(5): p. 2986-91.
130. Kittlesen, D.J., et al., *Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(10): p. 1239-49.
131. Imai, T., et al., *The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(23): p. 15036-42.
132. Riezu-Boj, J.I., et al., *Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection*. *J Hepatol*, 2011. **54**(3): p. 422-31.
133. Hong, F., et al., *Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor-1alpha-mediated stellate cell activation*. *Hepatology*, 2009. **49**(6): p. 2055-67.
134. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. *J Exp Med*, 2006. **203**(9): p. 2201-13.
135. Levoye, A., et al., *CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling*. *Blood*, 2009. **113**(24): p. 6085-93.
136. Hatch, H.M., et al., *SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats*. *Cloning Stem Cells*, 2002. **4**(4): p. 339-51.
137. Avdi, N.J., et al., *A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(43): p. 40687-96.
138. Ray, R.M., S. Bhattacharya, and L.R. Johnson, *Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in intestinal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(35): p. 31091-100.

7 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes Bode unter dessen Leitung und Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde.

Herrn Professor Dr. Dieter Häussinger danke ich für die tatkräftige Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe und die ständige Bereitschaft wissenschaftliche Konzepte und Befunde zu diskutieren. Darüber hinaus bedanke ich mich insbesondere für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in den Laboratorien der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchführen zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme Zusammenarbeit und die gruppenübergreifend Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Patricia Cebulla, Erwin Brenndörfer und Juliane Karthe, die mich im Verlauf meiner Arbeit als Doktorand betreut haben.

Ich möchte mich bei Maike Talajlo und Sabine Eisenbürger für technische Unterstützung und die Daten zur Erstellung der Abbildungen 3.10 und 3.11 bedanken und bei Erwin Brenndörfer für die Einbindung in die Erstellung des IFN γ -Blots in Abbildung 3.2. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Patricia Cebulla, Erwin Brenndörfer und Juliane Karthe für ihr Mitwirken beim Design der verwendeten Primer (Tabelle 2.5).

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

22.07.2014, Christoph Roland Seifert