



EINFLUSS DES HEPATITIS C VIRUS AUF DIE INDUKTION
DER CXCR2 LIGANDEN EXPRESSION IN SEINER WIRTSZELLE
SOWIE DEREN VERSTÄRKUNG UND BIOLOGISCHE RELEVANZ
IN ANTWORT AUF DEN EPIDERMALEN WACHSTUMSFAKTOR

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

VORGELEGT VON
CHRISTINA GRÖPPER

AUS ESSEN

APRIL 2016

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Mai 2016

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

In Originalarbeiten

Gröpper C, Triller N, Stindt S, Seifert C, Bartenschlager R, Häussinger D and Bode JG. *HCV enables EGF to induce the release of CXCR2 ligands from its host cell via an EGF dependent circuit* (Manuskript in Bearbeitung)

Als Posterbeiträge

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*. 30th Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver, Januar 2014, Tübingen

Christina Gröpper, Nadja Triller, Sabine Eisenbürger, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Hepatitis C Virus MEK1- and TC-PTP-dependently converts epidermal growth factor (EGF) into a potent inducer of CXCR2 ligand expression*. The International Liver Congress 2014, 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2014, London

Christina Gröpper, Nadja Triller, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Das Hepatitis C Virus modifiziert die Chemokinproduktion in Antwort auf den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) in seiner Wirtszelle*. 51. Kongress der Südwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Oktober 2014, Stuttgart; **Ausgezeichnet durch den Posterpreis der Südwestdeutschen Gesellschaft für innere Medizin e.V.**

Christina Gröpper, Nadja Triller, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *The interaction of the Hepatitis C Virus with intra-cellular signaling converts EGF into a potent inducer of the production of CXCR2-ligands by the infected host cell*. 31st Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver, Januar 2015, München

Christina Gröpper, Nadja Triller, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *The Hepatitis C Virus modifies CXC-chemokine expression induced by inflammatory cytokines and facilitates their production in response to epidermal growth factor*. The International Liver Congress 2015, 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2015, Wien

Sabine Eisenbürger, **Christina Gröpper**, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Hepatitis C Virus activates auto- and paracrine circuits to sway surface expression of ErbB family members*. The International Liver Congress 2015, 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2015, Wien

Christina Gröpper, Nadja Triller, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *The Hepatitis C Virus (HCV) facilitates CXCR2 ligand expression in response to the Epidermal Growth Factor (EGF) and is able to induce the EGF production by an autocrine circuit in its host cell*. 15th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Juni 2015, Berlin

Christina Gröpper, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *The Hepatitis C Virus (HCV) results in an increased attraction of human neutrophils to its host cell by a basal and EGF-induced CXCR2 ligand expression*. 32nd Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver, Januar 2016, Düsseldorf

MEINEN ELTERN MEINEM FREUND
IN LIEBE UND DANKBARKEIT

**„DOCH FORSCHUNG STREBT UND RINGT, ERMÜDEND NIE,
NACH DEM GESETZ, DEM GRUND WARUM UND WIE.“**

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis.....	11
Tabellenverzeichnis.....	16
Abkürzungsverzeichnis	18
1 Einleitung	26
1.1 Das Hepatitis C Virus	26
1.1.1 Genomklassifizierung und genetische Variabilität	27
1.1.2 Molekulare Genomorganisation.....	27
1.1.3 Polyprotein-Prozessierung und Funktion der Virusproteine.....	29
1.1.4 Struktur und Funktion des NS3/4A-Komplexes	30
1.1.5 Der Infektions- und Replikationszyklus	32
1.1.6 Interaktionen mit der Wirtszelle	36
1.1.7 Neue Therapiemöglichkeiten einer chronischen Hepatitis C Virus Infektion	40
1.1.8 Verwendete <i>in vitro</i> HCV Zellkulturmodelle	42
1.2 Der EGF-Rezeptor/EGF-Signalweg	45
1.2.1 Der epidermale Wachstumsfaktor.....	45
1.2.2 Die EGF-Rezeptor-Familie.....	46
1.2.3 Struktureller Aufbau der EGF-Rezeptor-Familie	47
1.2.4 Liganden-induzierte Dimerisierung des EGF-Rezeptors.....	48
1.2.5 EGFR-induzierte Aktivierung des MAPK-Signalweges	49
1.2.6 EGFR-induzierte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges	50
1.2.7 Negativregulation des EGF-Rezeptors	51
1.2.8 Die T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase	52
1.2.9 Einfluss des Hepatitis C Virus auf den EGF-Rezeptor	53
1.2.10 Einfluss des Hepatitis C Virus auf den MAPK-Signalweg	54

1.3	Zytokine	55
1.3.1	Das Interleukin-1 β	55
1.3.2	Das Interleukin-10	56
1.3.3	Einfluss des Hepatitis C Virus auf IL-1 β und IL-10.....	56
1.3.4	Chemokine	57
1.3.5	Einfluss des Hepatitis C Virus auf die CXCR2-Liganden CXCL1 bis CXCL3.....	59
1.3.6	Einfluss des Hepatitis C Virus auf den CXCR2-Liganden CXCL8	60
1.4	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B.....	60
1.4.1	Die NF- κ B/Rel-Protein-Familie.....	61
1.4.2	Die I κ B-Proteine	62
1.4.3	Aktivierung der NF- κ B-Signalwege	64
1.4.4	Interaktionen des Hepatitis C Virus mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B.....	66
1.5	Das Humane Immundefizienz Virus.....	67
1.5.1	Der Infektionszyklus.....	67
1.6	Das Immunsystem.....	69
1.6.1	Makrophagen als Teil der angeborenen Immunität	70
1.6.2	Neutrophile Granulozyten als Teil der angeborenen Immunität.....	72
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	73
2	Material und Methoden	75
2.1	Verwendete Geräte und spezielle Materialien	75
2.1.1	Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur.....	76
2.1.2	Medien und Zusätze für die Zellkultur	77
2.1.3	Reagenzien und Feinchemikalien	78
2.1.4	Kits für die Molekularbiologie.....	79
2.1.5	Inhibitoren und siRNA für die Zellkultur	80
2.1.6	PCR und <i>in vitro</i> Transkription.....	81

2.1.7	Antikörper	82
2.1.8	Beads zur Immunomagnetischen Zellseparation	84
2.1.9	Plasmide und Primer	84
2.1.10	Medien, Lösungen und Puffer.....	85
2.1.11	Verwendete Bakterienstämme von <i>Escherichia coli</i>	91
2.1.12	Verwendete Zelllinien.....	91
2.1.13	Humanes Zellmaterial	92
2.2	Methoden	93
2.2.1	Zellbiologische Methoden	93
2.2.2	Zucht von <i>Escherichia coli</i>	102
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	103
2.2.4	RNA Interferenz.....	106
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	107
2.2.6	Immunologische Methoden	110
2.2.7	Virus Hepatitis Systeme.....	117
2.2.8	Analyse von Genen und Proteine durch Bioinformatische Methoden.....	121
2.2.9	Statistische Analysen	121
3	Ergebnisse	122
3.1	HCV modifiziert die basale Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle	123
3.2	HCV verstärkt die basale Expression von CXCL8 auf Protein-Ebene.....	126
3.3	HCV verstärkt die basale Expression der CXCR2-Liganden auf Ebene der Transkription.....	128
3.4	HCV modifiziert EGF-vermittelt die Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle	130
3.5	HCV konvertiert EGF in einen potenten Induktor und Regulator der CXCR2-Liganden-Expression	133

3.6	HCV ko-konvertiert EGF und IL-1 β in potente Induktoren und Regulatoren der CXCR2-Liganden-Expression	137
3.7	Das virale Nicht-Strukturprotein NS3/4A ist in die HCV-vermittelte CXCL8-Expression involviert	139
3.8	HCV sensibilisiert den EGF-Rezeptor zur Induktion und Regulation der CXCR2-Liganden-Expression	141
3.9	Die HCV-vermittelte Suppression von TC-PTP ist an der Induktion der CXCL8-Expression beteiligt.....	144
3.10	Die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1 (MEK1) ist an der HCV-induzierten CXCL8-Expression beteiligt, die Expression von CXCL1 bis CXCL3 wird unabhängig von MEK1 reguliert	146
3.11	Akt ist an der HCV-induzierten CXCL1- bis CXCL3-Expression beteiligt, die Expression von CXCL8 wird unabhängig von Akt reguliert.....	151
3.12	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist an der HCV-vermittelten CXCR2-Liganden-Expression beteiligt.....	153
3.13	Die virale Replikation wird in Antwort auf EGF verstärkt.....	157
3.14	HCV induziert konstitutiv die Expression von EGF auf Ebene der Transkription und auf Ebene des Proteins	158
3.15	HCV reguliert die Induktion der CXCR2-Liganden-Expression durch einen autokrinen und parakrinen positiven EGF <i>feedback loop</i>	163
3.16	Der CXC-Rezeptor-2 führt zu keiner deutlichen Verstärkung der viralen Replikation.....	165
3.17	Die HCV-induzierte CXCR2-Liganden-Expression führt zu einer verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten	166
3.18	Das HCV-Replikon verhindert die verstärkte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche von humanen ko-kultivierten CD14 ⁺ Makrophagen im indirekten Transwellsystem	173
4	Diskussion.....	183
4.1	HCV modifiziert die basale Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle	183

4.2	HCV verstärkt die basale Expression der CXCR2-Liganden	184
4.3	HCV konvertiert EGF und IL-1 β in potente Induktoren der CXCR2-Liganden-Expression.....	186
4.4	HCV induziert die CXCR2-Liganden-Expression durch eine konstitutive EGF-Expression in seiner Wirtszelle.....	188
4.5	HCV reguliert die Induktion der CXCR2-Liganden-Expression durch einen autokrinen und parakrinen positiven EGF <i>feedback loop</i>	189
4.6	HCV sensibilisiert den EGF-Rezeptor durch eine HCV-vermittelte Suppression von TC-PTP zur Induktion und Regulation der CXCR2-Liganden-Expression	190
4.7	Die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1 ist an der HCV-induzierten CXCL8-Expression und die Proteinkinase B (Akt) an der Expression von CXCL1 bis CXCL3 beteiligt	192
4.8	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist an der HCV-vermittelten CXCR2-Liganden-Expression beteiligt.....	194
4.9	Die HCV-induzierte CXCR2-Liganden-Expression führt zu einer verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten	197
4.10	Das HCV-Replikon verhindert die verstärkte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche von humanen kultivierten CD14 ⁺ Makrophagen im indirekten Transwellsystem	203
5	Zusammenfassung	207
6	Summary	208
7	Literaturverzeichnis	209
8	Danksagung.....	256
9	Lebenslauf	257

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der molekularen Genomorganisation und Polyprotein- Prozessierung des Hepatitis C Virus.....	28
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Hepatitis C Virus Eintritts in den Hepatozyten.	34
Abbildung 3:	Zusammenfassendes Modell des Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis C Virus.	36
Abbildung 4:	Zusammenfassendes Modell der angeborenen Immunantwort auf das Hepatitis C Virus sowie dessen Regulation.	38
Abbildung 5:	Verwendete <i>in vitro</i> Hepatitis C Virus Zellkultursysteme.....	44
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des monomeren Aufbaus der Rezeptor-Tyrosinkinasen ErbB1 bis ErbB4.	47
Abbildung 7:	Modell der Bildung der Rezeptor-Dimerisierung von ErbB1.....	49
Abbildung 8:	Zusammenfassendes Modell der EGFR-induzierten Signalwege.....	51
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der Chemokin-Unterfamilien.	58
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der NF- κ B/Rel-Protein-Familie.....	62
Abbildung 11:	Modell der I κ B-Protein-Familie.	63
Abbildung 12:	Modell der NF- κ B-Signalwege.....	65
Abbildung 13:	Modell des HIV-Eintritts in die Wirtszelle durch Interaktion mit zellulären Oberflächenrezeptoren.	69
Abbildung 14:	Schema der Zielsetzung dieser Arbeit.	74
Abbildung 15:	Graphische Darstellung der Separation von PBMCs durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation.....	96
Abbildung 16:	Schematische Funktionsweise der positiven immunomagnetischen Zellseparation (MACS).....	97
Abbildung 17:	Prinzip der Separation neutrophiler Granulozyten aus peripherem Vollblut.	99

Abbildung 18:	Schema des Migrations-Assays mit WST-1.	102
Abbildung 19:	Schema des <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA).	115
Abbildung 20:	Schema der Schablone zur Analyse der Daten des <i>Proteome Profiler Human Chemokine Arrays</i>	117
Abbildung 21:	HCV modifiziert die basale Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle.	124
Abbildung 22:	HCV verstärkt fñhrend die basale Expression von CXCL8 in seiner Wirtszelle.	127
Abbildung 23:	HCV verstärkt fñhrend die basale Expression der CXCR2-Liganden in seiner Wirtszelle auf Ebene der Transkription.	130
Abbildung 24:	HCV modifiziert EGF-vermittelt die Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle.	132
Abbildung 25:	Die basal durch HCV-induzierte Überexpression von CXCL1 und CXCL8 wird in Antwort auf EGF verstärkt.	133
Abbildung 26:	Die HCV-induzierte CXCR2-Liganden-Expression wird in Antwort auf EGF gesteigert.	134
Abbildung 27:	Die HCV JC1-induzierte CXCR2-Liganden-Expression wird in Antwort auf EGF gesteigert.	136
Abbildung 28:	Die HCV-induzierte CXCL8 Expression wird in Antwort auf EGF weiter gesteigert.	137
Abbildung 29:	Die HCV-induzierte CXCR2-Liganden-Expression wird durch Ko-Stimulation mit EGF und/oder IL-1 β verstärkt.	139
Abbildung 30:	Das virale Nicht-Strukturprotein NS3/4A ist fñhrend an der verstärkten CXCL8-Expression beteiligt.	141
Abbildung 31:	Die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität fñhrt in der Anwesenheit des HCV-Replikons zu einer Herabregulation der CXCR2-Liganden-Expression auf Ebene der Transkription.	143
Abbildung 32:	Der Gen- <i>knockdown</i> von TC-PTP fñhrt sowohl auf Ebene der mRNA als auch auf Ebene des Proteins zu einer Zunahme der CXCL8-Expression.	145

Abbildung 33:	Nachweis des erfolgreichen Gen- <i>knockdowns</i> von TC-PTP auf Transkript-Ebene als auch auf Protein-Ebene mittels spezifischer siRNA.	146
Abbildung 34:	Die posttranskriptionelle Inhibition von MEK mittels siRNA führt zur deutlichen Herabregulation der CXCL8-Expression auf transkriptioneller Ebene.	148
Abbildung 35:	Nachweis des erfolgreichen Gen- <i>knockdowns</i> von MEK1 auf Protein-Ebene mittels siRNA.	149
Abbildung 36:	Der Inhibitor des MEK1/2-Signalweges hemmt spezifisch CXCL8 auf mRNA-Ebene, CXCL1 bis CXCL3 werden MEK1/2-unabhängig reguliert.	150
Abbildung 37:	Akt ist an der HCV-induzierten CXCL1- bis CXCL3-Expression involviert. CXCL8 wird Akt-unabhängig reguliert.	152
Abbildung 38:	Nachweis des erfolgreichen Gen- <i>knockdowns</i> von Akt auf Protein-Ebene mittels siRNA.	153
Abbildung 39:	Die Gegenwart des HCV-Replikons verstärkt die Translokation der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Nukleus.	155
Abbildung 40:	NF- κ B (p65) ist an der verstärkten CXCR2-Liganden-Expression beteiligt.	156
Abbildung 41:	Nachweis des erfolgreichen Gen- <i>knockdowns</i> von p65 auf Ebene der Transkription mittels siRNA.	157
Abbildung 42:	EGF verstärkt die virale Replikation sowohl in Anwesenheit des HCV-Replikons als auch in Anwesenheit des HCV-Stamms JC1.	158
Abbildung 43:	HCV induziert die basale Expression von EGF auf Ebene der Transkription.	159
Abbildung 44:	HCV induziert die basale EGF-Expression auf Protein-Ebene.	160
Abbildung 45:	Die durch EGF-verstärkte virale Replikation wird durch den Einsatz von 2-C'-Methylcytidin inhibiert.	161
Abbildung 46:	Die basale EGF-Expression ist im Modell der chronischen HCV-Infektion erhöht.	162

Abbildung 47:	Das HCV-Replikon induziert und reguliert die CXCR2-Liganden-Expression durch einen positiven autokrinen und parakrinen EGF <i>feedback loop</i>	164
Abbildung 48:	Die Inhibition des CXC-Rezeptors-2 übt keinen Einfluss auf die virale Replikation aus.	166
Abbildung 49:	Erfolgreiche Extraktion neutrophiler Granulozyten aus humanen Buffy Coats.	167
Abbildung 50:	Erfolgreiche Extraktion humaner Monozyten aus PBMCs humaner Buffy Coats.	168
Abbildung 51:	Steigerung des Migrationsverhaltens neutrophiler Granulozyten durch die HCV- und EGF-induzierte CXCR2-Liganden-Expression.	170
Abbildung 52:	Das Migrationsverhalten humaner Monozyten ist HCV-unabhängig.	171
Abbildung 53:	Die HCV-induzierte Migration neutrophiler Granulozyten ist abhängig von der CXCR2-Liganden-Expression.	172
Abbildung 54:	Schematischer Aufbau des Ko-Kultur-Modells sowie der Mono-Kultur.	174
Abbildung 55:	Zelldichte humaner CD14 ⁺ Makrophagen in Mono-Kultur.....	175
Abbildung 56:	Zelldichte humaner CD14 ⁺ Makrophagen und humaner Huh-7 Hepatomazellen in Ko-Kultur.....	176
Abbildung 57:	Zelldichte humaner CD14 ⁺ Makrophagen und humaner Huh-9.13 Hepatomazellen in Ko-Kultur.....	177
Abbildung 58:	Oberflächenexpression von CD11c, CD14 und CD163 auf CD14 ⁺ Makrophagen in Mono-Kultur.....	179
Abbildung 59:	Oberflächenexpression von CCR5 auf mono-kultivierten und ko-kultivierten Makrophagen.....	180
Abbildung 60:	Oberflächenexpression von CXCR4 auf mono- und ko-kultivierten Makrophagen.	181
Abbildung 61:	Das HCV-Replikon verhindert die verstärkte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf ko-kultivierten CD14 ⁺ Makrophagen.	182

Abbildung 62:	Zusammenfassendes Modell des HCV-bedingten Einflusses auf die Induktion der CXCR2-Liganden-Expression in seiner Wirtszelle sowie deren Verstärkung und funktionale Relevanz in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor.....	202
Abbildung 63:	Modell der durch das Hepatitis C Virus Replikon indirekt bedingten Herabregulation der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche ko-kultivierter CD14 ⁺ Makrophagen.	206

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Geräte und spezielle Materialien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	75
Tabelle 2:	Verwendete Zellkulturmaterialien.	76
Tabelle 3:	Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze.	77
Tabelle 4:	Verwendete Reagenzien und Feinchemikalien.	78
Tabelle 5:	Verwendete molekularbiologische Kits.	79
Tabelle 6:	Inhibitoren zur Hemmung gezielter Enzymreaktionen.....	80
Tabelle 7:	Spezifische siRNA zum gezielten <i>knockdown</i> von Genen.	81
Tabelle 8:	Komponenten für die Polymerase-Kettenreaktion und das Hepatitis C Virus Infektionssystem.....	81
Tabelle 9:	Spezifische Fluoreszenz-gekoppelte Anti-humane Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	82
Tabelle 10:	Spezifische Anti-humane Antikörper zur Immunofluoreszenzfärbung.	83
Tabelle 11:	Spezifische Anti-humane Antikörper zur Immundetektion.	83
Tabelle 12:	Verwendete MicroBeads zur positiven Selektion humaner CD14 ⁺ Monozyten.	84
Tabelle 13:	Verwendetes Plasmid für das Hepatitis C Virus Infektionssystem.	84
Tabelle 14:	Verwendete humane Oligonukleotide zur Quantifizierung von mRNA mittels RT-PCR.	84
Tabelle 15:	Zur Hitzeschock-Transformation verwendete Stämme von <i>E. coli</i>	91
Tabelle 16:	Hepatomazelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	91
Tabelle 17:	Charakteristika der HCV-monoinfizierten Patientenseren.	92
Tabelle 18:	Charakteristika der Kontrollseren.	93
Tabelle 19:	Verwendete Hepatomazelllinien, Kultivierungsmedien und Zusätze.....	94
Tabelle 20:	Volumen der einzelnen Komponenten in einem RT-PCR-Ansatz.	105

Tabelle 21:	RT-PCR-Programm zur DNA-Amplifikation.....	106
Tabelle 22:	Antikörperfärbung humaner CD14 ⁺ Makrophagen.	111
Tabelle 23:	Antikörperfärbung neutrophiler Granulozyten.	113
Tabelle 24:	Verwendete Fluorophore zur Immunofluoreszenzfärbung.	115
Tabelle 25:	Volumen der einzelnen Komponenten in einem Ansatz für die <i>in vitro</i> Transkription.	118
Tabelle 26:	Referenzkoordinaten der Chemokine.	125

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AIH	Autoimmunhepatitis
Akt	Proteinkinase B
AOM	<i>acousto-optic modulator</i>
AOTF	<i>acousto-optic tunable filter</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
Apo	Apolipoprotein
APC	Allophycocyanin
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cardif	<i>CARD adaptor inducing IFN-β</i>
CCL	CC-Motiv-Chemokin
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHC	chronischen Hepatitis C
CLDN	Claudin
CMV	Cytomegalovirus
COX	Cyclooxygenase
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin

CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DAA	<i>direct-acting antiviral agents</i>
DAG	1,2-Diacylglycerin
DC-SIGN	<i>C type lectins dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ds	<i>double strand</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMCV	Encephalomyokarditis Virus
EphA2	<i>ephrin receptor A2</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKBP	<i>FK506-binding protein</i>

G418	Geneticin
Gab	<i>growth factor receptor-bound protein (Grb)2-associated adaptor protein 1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Grb	<i>growth factor receptor bound protein</i>
GSK	Glykogensynthase-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HB	<i>heparin-binding</i>
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	<i>cell culture derived HCV</i>
HCVpp	HCV Pseudopartikel
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HLA	Histokompatibilitätsantigen
HPSF	<i>high purity salt free</i>
HRG	Heregulin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
HSPG	<i>heparan sulfate proteoglycans</i>
HTLV	<i>human T-cell leukemia virus</i>
Huh	Humane Hepatomazellen
HVR	hypervariable Region
IFN	Interferon

IFNAR	<i>interferon-α/β receptor</i>
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthetase</i>
IP ₃	Inosit-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
IRES	Interne Ribosomale Eintrittsstelle
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	<i>interferon stimulated genes</i>
JAK	Januskinase
JFH	<i>japanese fulminant hepatitis</i>
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
LRIG	<i>leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domain</i>
LSECs	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>
L-SIGN	<i>liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing integrin</i>
LSM	Laser Scanning Mikroskop
LTR	<i>long terminal repeats</i>
LVP	Lipoviropartikel
LZ	<i>leucin-zipper domain</i>
MACS	<i>magnetic activated cell separation</i>

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIG	<i>mitogen-inducible gene</i>
MLV	murines Leukämievirus
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSD	<i>membrane-spanning-domain</i>
MSK	<i>mitogen and stress activated kinase</i>
mTLP	modifizierter Triton-Lyse-Puffer
mTORC	<i>mechanistic target of rapamycin complex</i>
MW	Molekulargewicht
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NCR	nicht-kodierenden Regionen
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NES	nukleäre Export-Sequenz
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containig 3</i>
NLS	Kernlokalisierungssequenz
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-like cholesterol absorption receptor</i>

NRG	Neuregulin
NTP	Nukleosidtriphosphat
OAS	2', 5'-Oligoadenylatsynthetase
OCLN	Occludin
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p90RS6K	<i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>
PAA	Polyacrylamid
PAMPs	<i>pattern-associated molecular patterns</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-R	<i>platelet-derived growth factor-receptor</i>
PDK	<i>phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRRs	<i>pattern-recognition receptors</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Ras	<i>rat sarcoma</i>

Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
REM	<i>replication enhancing mutations</i>
RHD	<i>Rel-homology domain</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>respiratory burst</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RSV	Respiratorisches Synzytial Virus
RT-PCR	<i>Real-Time PCR</i>
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH	<i>Src homology</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain-containing</i>
SHP	<i>src-homology phosphatase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
SP	Signal-Peptidasen
SPP	Signal-Peptid-Peptidasen
SPRY	<i>sprouty</i>
SR-B1	<i>scavenger receptor B1</i>
Src	<i>rous sarcoma oncogene</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element binding proteins</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>

TA	Transaminasen
TAD	Transaktivierungs-Domäne
TBK	<i>TANK-binding kinase</i>
TCID50	<i>tissue culture infection dose</i>
TC-PTP	<i>T-Cell protein tyrosine phosphatase</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLP	Triton-Lyse-Puffer
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRIF	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β</i>
Tris	Trishydroxy-Aminomethan
TYK	<i>non-receptor tyrosine-protein kinase</i>
VE	Vollentionisiert
VAP	<i>vesicle-associated membrane protein-associated protein</i>
VLDL	<i>very-low-density lipoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
w/o	<i>without</i>

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

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis C Virus

Die Entdeckung des Hepatitis C Virus geht auf die siebziger Jahre zurück, in denen erstmalig eine chronische Non-A- und Non-B-Hepatitis deklariert wurde, welche mit kontaminierten Bluttransfusionen, Blutprodukten sowie entsprechenden Plasma-basierten Therapien in Verbindung gebracht wurde.¹⁻³ Die Beschreibung und Charakterisierung des Hepatitis C Virus als Erreger dieser Infektionskrankheit gelang schließlich Choo *et al.*, 1989 durch effektive molekulare Virusisolationsmethoden.⁴

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind aktuell 130-150 Millionen Menschen, was etwa 3 % der Weltbevölkerung entspricht, chronisch mit dem Hepatitis C Virus infiziert.⁵ Im internationalen Vergleich ist die Prävalenz der HCV-Infektionen in Deutschland mit 0,3 bis 0,7 % relativ gering.^{6,7} Dennoch sind etwa 400.000 bis 500.000 Menschen mit dem HCV chronisch infiziert.⁸ 75 % der HCV-Infektionen verlaufen lediglich mit grippeähnlichen Symptomen und bleiben meist unbemerkt, während 25 % der Fälle eine akute Hepatitis entwickeln.^{5,6,9} Fulminante Krankheitsverläufe sind eher die Ausnahme.⁶ 55 bis 85 % der Infektionen mit dem Hepatitis C Virus resultieren in einem chronischen, progressiven Krankheitsverlauf.^{5,10-12} Mehr als 90 % der Patienten mit einer HCV-Infektion können mittlerweile durch antivirale Therapien geheilt werden. Dennoch sterben jährlich weltweit, nach Schätzungen der WHO, etwa 500.000 Menschen an HCV-bedingten Leberschädigungen, zu denen unter anderem Leberzirrhose oder hepatozelluläre Karzinome gehören.^{5,13,14}

Die Epidemie des Hepatitis C Virus startete etwa 1960, besonders stark in westlichen Ländern, und wurde hauptsächlich durch kontaminierte Bluttransfusionen, Blutprodukte, medizinische Behandlungen mit unsterilen Nadeln bzw. Instrumenten sowie von Drogenabhängigen durch das gemeinsame Benutzen von kontaminierten Nadeln und Spritzen übertragen.^{15,16} Durch die Entwicklung effektiver diagnostischer Testverfahren konnte die Rate an Neuinfektionen durch Bluttransfusionen bzw. Blutprodukte reduziert werden, da seit dem Jahr 1991 die Präsenz von Anti-HCV Antikörpern und seit 1999 zusätzlich die Präsenz von HCV-RNA durch Nukleinsäureamplifikationstests analysiert wird.⁸

HCV wird primär parenteral durch kontaminiertes Blut übertragen.^{5,8} Neuinfektionen mit dem Hepatitis C Virus erfolgen heute vor allem durch intravenösen Drogenkonsum, seltener aber auch durch kontaminierte Lebertransplantate, durch die Mutter-Kind-Übertragung während der

Schwangerschaft oder der Geburt sowie auch sexuell.^{5,8} In etwa 30 % der Fälle kann der Übertragungsweg der HCV-Infektion nicht identifiziert werden.¹⁷

1.1.1 Genomklassifizierung und genetische Variabilität

Das Hepatitis C Virus wird in die Gattung *Hepacivirus* der Familie der *Flaviviridae* eingeordnet.^{18–20} Zu dieser Familie gehören zudem die Gattungen *Flavivirus*, *Pegivirus* sowie *Pestivirus*, zu deren bekanntesten Vertretern wiederum das Dengue-Virus, das West-Nil-Virus und das Schweinepest-Virus zählen. Namensgebend für die Familie der *Flaviviridae* ist das humanpathogene Gelbfieber-Virus (lat. *flavus* = gelb).^{19,21,22} Es handelt sich bei allen Mitgliedern dieser Familie um RNA-Viren mit einem einzelsträngigen Genom von positiver Polarität. Diese RNA kodiert in einem einzigen offenen Leserahmen (ORF) für ein Polyprotein.^{19,21} Bislang konnten elf Genotypen des HCV klassifiziert werden.^{23,24} Die Varianten des HCV weisen starke genetische Diversität auf, zum einen aufgrund der fehlenden 3′-5′-Exonukleaseaktivität (*proofreading ability*) der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B und paralleler hoher, viraler Replikationsrate,^{25,26} und zum anderen durch den Unterschied in der Nukleinsäuresequenz von etwa 31 bis 33 %.²⁰ Weiterhin gibt es starke geographische Varianzen in der Verteilung der Genotypen.^{16,27} Hierbei findet man in Deutschland vor allem die Genotypen 1a (besonders häufig bei Jugendlichen), 1b sowie 3a.^{28,29} In Nordeuropa wird besonders häufig der Genotyp 1a sowie 3a durch intravenösen Drogenkonsum übertragen. Der Genotyp 4a des HCV wird vor allem im mittleren Osten gefunden, während in Europa und Asien hingegen besonders häufig die Genotypen 1b, 2a sowie 2b vertreten sind. Besonders hohe virale Diversität wurde in Zentralafrika mit Genotyp 1, in Westafrika mit Genotyp 2 sowie in Südost-Asien mit Genotyp 6 beobachtet.^{24,30,31} Die stärkste Prävalenz der HCV-Infektionen durch iatrogene Übertragung ist in Subsahara- und Nordafrika sowie in Zentral- und Ostasien zu finden.^{31–33} Die verschiedenen Genotypen des HCV reagieren zudem mit unterschiedlichem Erfolg auf die Wirkung antiviraler Therapien.¹⁶

1.1.2 Molekulare Genomorganisation

Das Hepatitis C Virus ist durch ein Genom aus einzelsträngiger RNA von positiver Strangorientierung mit einer Größe von 9,6 kb charakterisiert. Dieses wird sowohl am 5′- als auch am 3′-Ende von nicht-kodierenden Regionen (NCR) flankiert und kodiert für einen einzigen offenen Leserahmen (ORF).³⁴ Die NCR enthalten hierbei die Signale für die Replikation und Translation der viralen RNA.^{35,36} Eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) ist zudem am 5′-Ende lokalisiert, die die Bindung der viralen mRNA an die Ribosomen sowie

eine 5'-Cap-unabhängige Translation des HCV ORF initiiert.^{37,38} Das translatierte Polyprotein wird ko- und posttranskriptionell durch virale und zelluläre Proteasen in funktional-aktive Struktur- und Nicht-Strukturproteine des Virus prozessiert.³⁹ Die schematische Darstellung der molekularen Genomorganisation sowie der Polyprotein-Prozessierung des HCV ist der Abbildung 1 zu entnehmen.

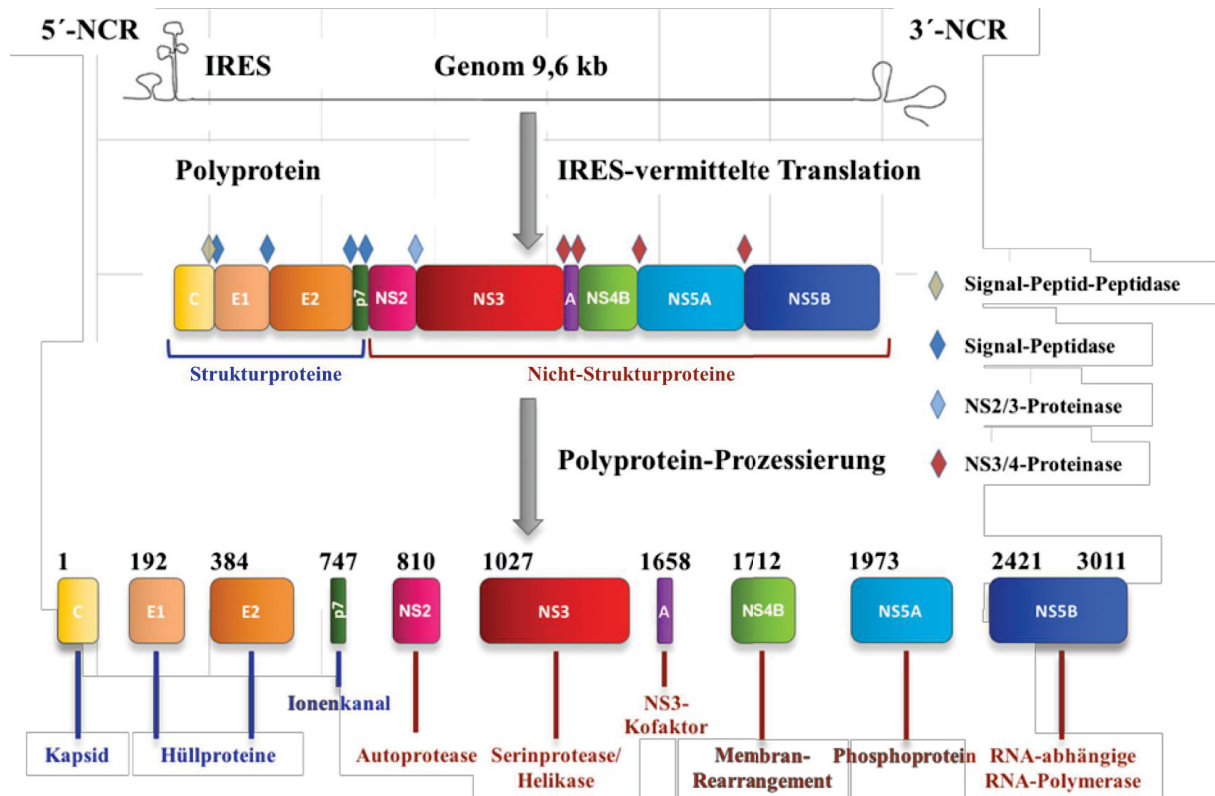


Abbildung 1: Schematische Darstellung der molekularen Genomorganisation und Polyprotein-Prozessierung des Hepatitis C Virus. Das 9,6 kb RNA-Genom von positiver Polarität wird am 5'- und am 3'-Ende von nicht-kodierenden Regionen flankiert. Es kodiert in einem einzigen offenen Leserahmen für ein Polyprotein aus etwa 3000 Aminosäuren, welches IRES-vermittelt translatiert wird. Die anschließende Prozessierung des Polyproteins erfolgt ko- und posttranskriptionell durch virale und zelluläre Proteasen in die funktionalen Strukturproteine Core, E1, E2 und p7 und in die Nicht-Strukturproteine NS2 bis NS5B. Die Strukturproteine bilden das virale Nukleokapsid und sind am Eintritt des HCV in die Wirtszelle beteiligt. Die Nicht-Strukturproteine sind besonders für die Replikation des HCV verantwortlich. Die Anzahl der Aminosäuren ist über jedem HCV-Protein lokalisiert. Abkürzungen: A: NS3-Kofaktor (NS4A), C: Kapsid, E1-E2: Glykoproteine, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, NCR: nicht-kodierende Region, NS2: Autoprotease, NS3: Serinprotease/Helikase, NS4B: Membran-Rearrangement, NS5A: Phosphoprotein, NS5B: RNA-abhängige RNA-Polymerase, p7: Ionenkanal. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology, Moradpour *et al.*, 2007,⁴⁰ Copyright (2007).

1.1.3 Polyprotein-Prozessierung und Funktion der Virusproteine

Zu den Strukturproteinen gehören das RNA-bindende Core-Protein, die glykosylierten Hüllproteine E1 und E2 sowie das p7 Viroporin. Die Prozessierung der Strukturproteine sowie des Polypeptids p7 erfolgt durch wirtsspezifische Signal-Peptidasen (SP) sowie durch Signal-Peptid-Peptidasen (SPP) des Endoplasmatischen Retikulums (ER) im aminoterminalen Bereich des Polyproteins.^{41,42} Das Core-Protein formt das virale Nukleokapsid,⁴³ während die Glykoproteine E1 und E2 in der Lipidmembran des HCV verankert sind und die Virushülle bilden. Sie sind wesentlich am Eintritt des Virus in die Wirtszelle beteiligt, durch die Interaktion mit Wirtszellrezeptoren sowie durch die Fusion mit der Wirtszellmembran.^{44,45} Die Funktion des membranintegrierten Viruspolypeptids p7 ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt.⁴⁶ Strukturanalysen legen durch seine hexameren bzw. heptameren Strukturen und seine Kationenkanal-Aktivität nahe, dass es zur Familie der Viroporine gehört und die Virusproduktion ermöglicht.⁴⁷⁻⁴⁹ Zudem wird vermutet, dass p7 nicht an der Virus-Replikation beteiligt, aber essentiell für die produktive Infektion *in vivo* sowie für die Zusammensetzung und Freisetzung von infektiösen HCV *in vitro* ist.⁵⁰

Die Nicht-Strukturproteine werden durch die viralen Proteasen NS2 und NS3/4A in einer präferenziellen Reihenfolge prozessiert.^{51,52} Sie umfassen die NS2 Protease, den NS3/4A-Komplex mit Protease- sowie NTPase/RNA-Helikase-Aktivität, die Proteine NS4B, NS5A sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B. Diese Proteine sind wesentlich für die virale Replikation verantwortlich.^{34,53} Das nichtglykosylierte membranintegrierte NS2-Protein entsteht durch seine Autoprotease-Aktivität. Es ist unwesentlich an der Replikation, sondern vielmehr an der proteolytischen Spaltung des HCV Polyproteins unter Verstärkung der Ko-Aktivität von NS3 beteiligt.⁵⁴ Die weitere Prozessierung des Polyproteins erfolgt zunächst ko-translational durch NS3/4A zwischen NS2/NS3 und NS3/NS4A. Auf diesem Weg wird die Serinprotease NS3 freigesetzt. Die weitere NS3/4A-vermittelte Prozessierung an der NS5A/NS5B-Seite resultiert in einem NS4A-NS5A Intermediat, gefolgt von einem Schnitt zwischen NS4A und NS4B, was in einem stabilen NS4B-5A Vorläufer resultiert. Abschließend erfolgt der Schnitt zwischen NS4B und NS5A.^{55,56}

NS3/4A ist ein multifunktionaler, nicht-kovalenter Proteinkomplex, bestehend aus NS3 sowie dem assoziierten Kofaktor NS4A (vgl. Abschnitt 1.1.4). NS4B ist bislang wenig charakterisiert. Es handelt sich um ein hydrophobes, membranintegriertes Protein.⁵⁷ N-terminal besitzt es zwei α -Helices, von denen die zweite Helix in der Lage ist den Membran-Bilayer durch Oligomerisierung zu differenzieren.^{58,59} Durch gerichtete Mutagenese konnte zudem belegt

werden, dass Membransegmente von NS4B eine wichtige Rolle in dem Zusammenbau des funktionalen Replikationskomplexes übernehmen.^{59,60} Bei dem Nicht-Strukturprotein NS5A handelt es sich um ein RNA-bindendes Phosphoprotein, welches als basal phosphorylierte (56 kDa) sowie als hyperphosphorylierte (58 kDa) Variante vorliegt.^{61–63} Die Effizienz der viralen Replikation wird durch den Status der Phosphorylierung von NS5A und vermutlich durch die Interaktion mit dem wirtsspezifischen Protein hVAP-A (*human vesicle-associated membrane protein-associated protein A*) bedingt.^{61,62,64} NS5A besitzt drei Domänen, mit denen es multiple Funktionen im Lebenszyklus des Virus übernimmt. Mit seiner ersten und zweiten Domäne ist es besonders in die RNA-Replikation^{65,66} und mit seiner ersten Domäne zudem in die Bindung des *lipid droplets* involviert.⁶⁷ Mit seiner dritten Domäne übernimmt es eine essentielle Rolle in dem Zusammenbau der Viruspartikel (*viral assembly*)⁶⁸ sowie in der Interaktion mit dem Core-Protein.⁶⁹ Mutagenese-Studien belegen, ähnlich wie auch für das nicht-strukturelle Protein NS3, dass die RNA-Replikation bei gleichzeitiger Verringerung des Virus-Zusammenbaus erhöht wird, was zu der Schlussfolgerung führt, dass NS5A neben NS3 an der Umschaltung, dem sogenannten *switch*, zwischen RNA-Replikation und Virus-Zusammenbau beteiligt ist.⁷⁰ Die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B ist das Schlüsselenzym für die Synthese der komplementären RNA mit negativer Strangorientierung unter Verwendung des Genoms als Template und die daraus resultierende Synthese des RNA-Genoms von positiver Polarität.^{71–73} Zudem wird vermutet, dass NS5B durch die Interaktion mit NS2 und p7 an dem Zusammenbau und der Reifung der Virionen (*virion assembly/maturation*) beteiligt ist.⁷⁴

1.1.4 Struktur und Funktion des NS3/4A-Komplexes

Der nicht-kovalente Proteinkomplex aus NS3 sowie dem assoziierten Kofaktor NS4A wurde als ein 70 kDa großes, bifunktionales Protein mit einer N-terminal lokalisierten Serinprotease (Aminosäuren 1-180) und einer C-terminal positionierten NTPase/RNA-Helikase (Aminosäuren 181-631) charakterisiert.^{75,76} Die katalytische Triade der Serinprotease des HCV wird durch drei konservierte Aminosäuren, ein Histidin an der Position 57, ein Aspartat an der Position 81 sowie ein Serin an der Position 139, gebildet.⁷⁷ Die 54 Aminosäuren des NS4A-Polypeptids fungieren als Kofaktor der Serinprotease. Diese Assoziation von NS3 mit NS4A als Kofaktor resultiert in der Stabilisierung der Serinprotease und ist essentiell für die Polyprotein-Prozessierung von NS4A/NS4B, NS4B/NS5A sowie NS5A/NS5B.^{78,79} Der hydrophobe, N-terminale Anteil des Polypeptids NS4A (Aminosäuren 1-21) ist verantwortlich für die Verankerung von NS3/4A in zellulären Membranen.⁶⁰ Die Aminosäuren 21-32

umfassen einen β -Strang, welcher in dem N-terminal gelegenen β -Fass von NS3 verankert ist.⁶⁰ Die C-terminal lokalisierten Aminosäuren (40-54) von NS4A sind in die RNA-Replikation sowie in die Viruspartikel-Zusammensetzung involviert und sind zudem erforderlich für die Interaktion mit den anderen Komponenten des Replikationskomplexes.^{80,81}

Die NS3 NTPase/RNA-Helikase gehört zur Superfamilie der Helikasen mit einer 2 DExH/D-Box.⁸² Sie ist in der Lage in 3' $\rightarrow$ 5'-Richtung, unter Hydrolyse von ATP, doppelsträngige RNA oder einzelsträngige RNA-Regionen mit komplexen Sekundärstrukturen zu entwinden.^{83,84} Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Regulation der Helikase-Aktivität durch Interaktion mit der Serinprotease NS3 erfolgt und essentiell für die Initiierung der viralen Replikation ist.⁸⁵ Auch die Beteiligung der Helikase an der Zusammensetzung der Viruspartikel wird vermutet.⁸⁶ NS3 interagiert direkt mit NS4B, NS5A sowie NS5B über den Kofaktor NS4A im Replikationskomplex.^{87,88} Des Weiteren konnten auch zahlreiche Interaktionen von NS3 mit wirtsspezifischen, zellulären Proteinen identifiziert werden.⁸⁹ Hierzu zählen unter anderem Interaktionen mit den Proteinkinasen A und C, deren regulatorische Untereinheiten durch NS3 modifiziert werden⁹⁰⁻⁹² sowie Interaktionen mit dem Tumorsuppressorprotein p53 durch Inhibierung der *trans*-aktivierenden Funktion^{93,94} und der p21-Promotoraktivität.⁹⁵ NS3 interagiert zudem aufgrund seiner vorwiegenden Lokalisation im Zytosol⁹⁶ mit dem Core-Histon H2B und H4, was aufgrund einer Konformationsänderung und Immobilisierung der Histone in einer Inhibierung der Translokation und damit zur Beeinträchtigung der Funktion der Histone in Kompartimenten des Zytosols führt.⁹⁷

NS3/4A ist in der Lage in die wirtsspezifische angeborene antivirale Immunantwort einzugreifen und diese zu inhibieren. Hierzu gehören doppelsträngige RNA-aktivierte Signalwege, welche zur Induktion einer IFN- α/β -vermittelten (IFN: Interferon) antiviralen Antwort führen.⁹⁸ Zum einen führt NS3/4A zur Inaktivierung des RIG-I-Signalweges (*retinoic acid inducible gene 1*) durch proteolytische Spaltung des mitochondrialen Wirtsadaptorproteins Cardif auch MAVS genannt (*CARD adaptor inducing IFN- β*).⁹⁹ Hierbei spielt die Lokalisation von NS3/4A nicht nur in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums sowie im Replikationskomplex, sondern zu einem geringen Anteil auch in der mitochondrialen Membran eine entscheidende Rolle.^{79,100} Zum anderen greift NS3/4A in den antiviralen Signalweg des endosomalen TLR3 (*Toll-like receptor 3*) ein. Auch hierbei erfolgt die Inhibierung durch proteolytische Spaltung des dazugehörigen Adaptorproteins TRIF (*Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β*).¹⁰¹ Des Weiteren führt die NS3/4A-vermittelte proteolytische Spaltung und die daraus resultierende Herabregulation des endogenen

Negativregulators des EGFR (*epithelial growth factor receptor*), TC-PTP (*T cell protein tyrosine phosphatase*), zur Aktivierung des EGFR/Akt-Signalweges (vgl. Abschnitt 1.2.6). Dies verdeutlicht, dass NS3/4A nicht nur für die virale Replikation erforderlich ist, sondern durch die Kontrollmechanismen der antiviralen Interferon-vermittelten Immunantwort des Wirts auch für die Persistenz sowie die Pathogenese des Hepatitis C Virus verantwortlich ist.¹⁰² Als Folge dessen ist das Nicht-Strukturprotein NS3/4A ein wichtiges Angriffsziel antiviraler-Therapien durch Inhibierung der Replikation, der Produktion von viralen Proteinen sowie der Regeneration der wirtsspezifischen, antiviralen Typ-I Immunantwort.¹⁰³

1.1.5 Der Infektions- und Replikationszyklus

Die umhüllten, infektiösen Partikel des Hepatitis C Virus weisen einen Durchmesser von etwa 30 bis 80 nm auf.^{104–106} Durch Elektronenmikroskopie konnte eine pleomorphe Oberfläche des Virus charakterisiert werden.^{107–109} Die Hülle der HCV-Virionen setzt sich aus einer Lipidmembran mit den integrierten Glykoproteinen E1 und E2 zusammen.¹¹⁰ Diese Hüllmembran umfasst wiederum das virale Core-Protein, welches mit dem viralen Genom das Nukleokapsid formt.^{43–45} HCV zirkuliert im Blut und liegt dort in Form von Komplexen mit den Lipoproteinen LDL (*low-density lipoproteins*) und VLDL (*very-low-density lipoproteins*) des Wirts und mit den assoziierten Apolipoproteinen B-100, CI sowie E (ApoB, ApoC und ApoE), als sogenanntes Lipoviropartikel (LVP) vor.^{111–115}

Das Hepatitis C Virus ist stark wirtsspezifisch und infiziert hauptsächlich humane Hepatozyten.¹¹⁶ Der Eintritt des HCV in die Wirtszelle ist ein komplexer Prozess aus multiplen Schritten, der Zeit- und Temperaturabhängig durch den niedrigen pH-Wert in den endosomalen Kompartimenten induziert wird.¹¹⁷ Hierzu gehören zunächst die Bindung an die Wirtszelle über zelluläre Rezeptoren und Oberflächenmoleküle, die anschließende Fusion mit der Lipidmembran, die Internalisierung der Viruspartikel und schließlich die Freisetzung des viralen Genoms in das Zytoplasma. Der initiale Schritt des HCV zum Eintritt in die Zielzelle ist die Interaktion der glykosylierten Hüllproteine E1 sowie E2 und/oder assoziiertem ApoE mit wirtsspezifischen Oberflächenrezeptoren der Hepatozyten, wobei hiervon einige als Rezeptoren und andere als Ko-Rezeptoren fungieren und direkt oder indirekt an der Bindung und/oder dem Viruseintritt in die Zelle involviert sind.^{44,118} Hierzu zählen das Tetraspaninprotein CD81 (CD: *cluster of differentiation*),¹¹⁹ der LDL-Rezeptor (*low-density lipoprotein receptor*)^{120–122} sowie die Lektine DC-SIGN (*C type lectins dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*)¹²³ und L-SIGN (*liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing integrin*).^{124,125} Zudem wurde der

scavenger-Rezeptor der Klasse B1 (SR-B1) als essentieller Bindungspartner des Glykoproteins E2 identifiziert.¹²⁶ Die hohe Affinität von E2 und dem HCV-Lipoprotein zu dem Heparansulfat Glykosaminoglykan auf den Hepatozyten (HSPG: *heparan sulfate proteoglycans*) erklärt dessen Notwendigkeit für die Virus-Wirt-Interaktion beim Zelleintritt.^{127,128} Auch das *tight junction* Protein Claudin-1 (CLDN1) ist als Ko-Rezeptor für den Viruseintritt beschrieben,¹²⁹ ebenso wie die *tight junction* Proteine Claudin-6 und -9.^{130,131} Des Weiteren übernehmen der EGFR sowie der EphA2 (*ephrin receptor A2*) aufgrund ihrer Tyrosinkinase-Aktivität eine wichtige Rolle als Kofaktoren für den Eintritt und die Infektion des HCV in die Wirtszelle.¹³²

Durch die Expression der Lektine DC-SIGN sowie L-SIGN auf der Oberfläche von dendritischen Zellen und lebersinusoidalen Endothelzellen erfolgt zunächst eine Transinfektion der Hepatozyten und damit eine verstärkte Interaktion mit der Zielzelle sowie die Aufrechterhaltung der viralen Replikation.^{133,134} Hierbei bindet das virale Glykoprotein E2, komplexiert mit den Lipoproteinen LDL und VLDL und/oder ApoE initial an hochsulfatiertes HSPG sowie an den LDL-Rezeptor auf der Oberfläche des Hepatozyten.^{114,120,135} Auch die Beteiligung des viralen Glykoproteins E1 und dem assoziierten Apolipoprotein E konnte bei der Anheftung der HCV-Partikel an HSPG belegt werden.^{118,136,137} Weiterhin geht man davon aus, dass der LDL-Rezeptor aufgrund seiner physiologischen Funktion im Cholesterolf-Stoffwechsel der Zelle eine Rolle bei der Replikation des HCV spielt.¹³⁸ Ein weiterer direkter Bindungspartner des viralen glykosolierten Proteins E2 ist der SR-B1.¹²⁶ Hierbei interagiert das HCV mit dem SR-B1 zum einen direkt über die hypervariable Region 1 (HVR1) des Glykoproteins E2¹³⁹ und zum anderen indirekt über ApoE-assoziierte Moleküle an den Viruspartikeln.^{140–145} Des Weiteren spielt SR-B1 als Teil des Rezeptorkomplexes zusammen mit CD81, dessen Bildung essentiell für den Viruseintritt in die Zelle ist, eine wesentliche Rolle.^{146,147} Die anschließende Wechselwirkung von CD81 mit E2 resultiert,¹¹⁹ unter der Beteiligung der aktivierten Signaltransduktionskaskade des EGFR und des EphA2,¹³² in der Bildung des Rezeptorkomplexes zwischen CD81 und dem *tight junction* Protein Claudin-1, was schließlich zur lateralen Relokalisation des Virus-Rezeptor-Komplexes sowie zur Fusion mit der Zellmembran führt.¹²⁹ Weiterhin ist auch der Cholesterolf-Transporter *Niemann-Pick C1-like cholesterol absorption receptor* (NPC1L1), der unter physiologischen Bedingungen als Regulator des Fettstoffwechsels der Zelle fungiert, am Viruseintritt beteiligt.¹⁴⁸ Durch eine pH-abhängige Clathrin-vermittelte Endozytose in frühen Endosomen kommt es zur Internalisierung der Viruspartikel, wobei die Glykoproteine E1 und E2 hierbei eine wesentliche Rolle spielen.^{149,150} Abschließend erfolgt die Freisetzung des Nukleokapsids und schließlich des

viralen Genoms in das Zytoplasma.¹⁵¹ Die schematische Darstellung des HCV-Eintritts in die Wirtszelle ist der Abbildung 2 zu entnehmen.

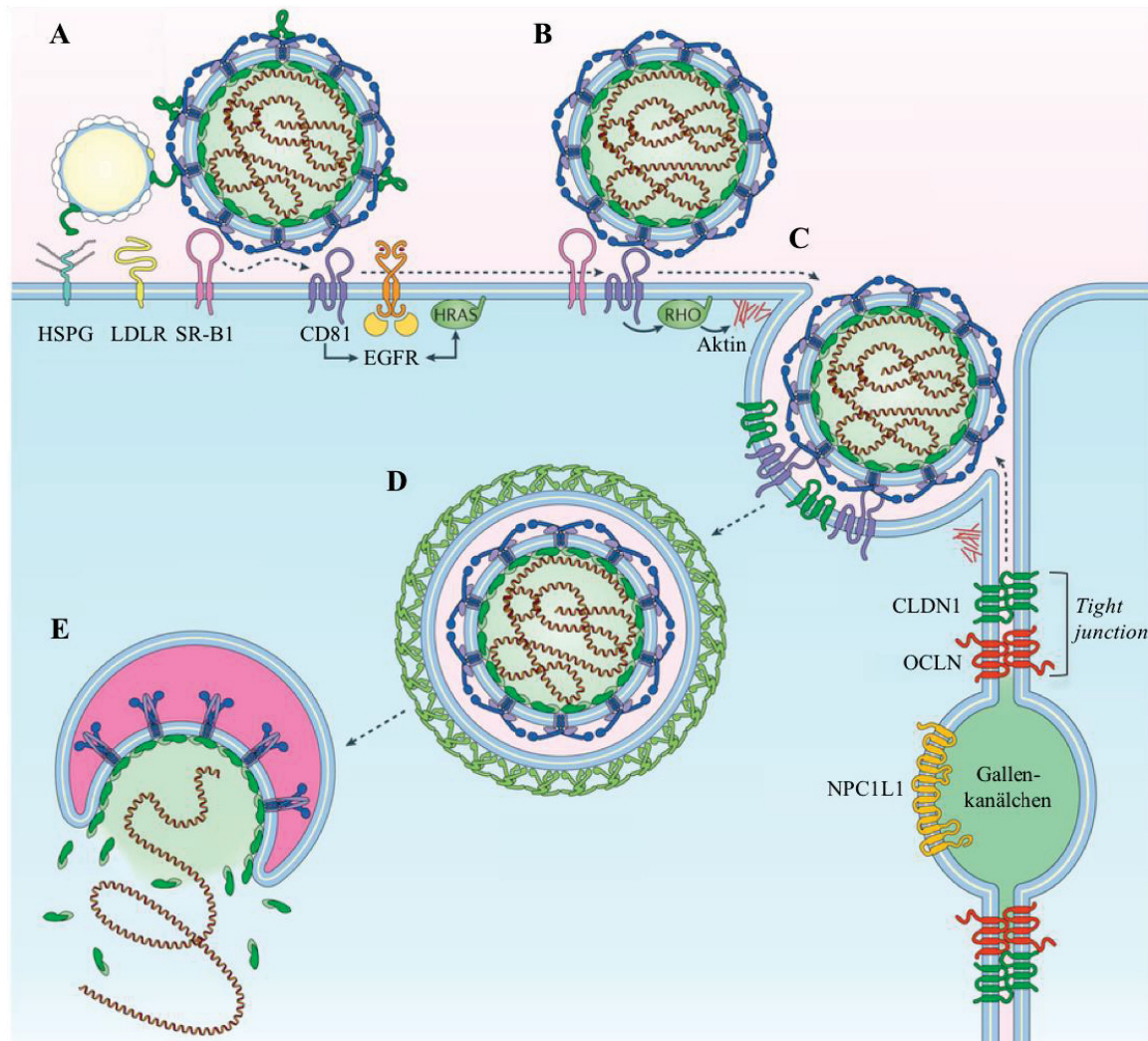


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Hepatitis C Virus Eintritts in den Hepatozyten. A Bindung des HCV als virales Lipopartikel an die Oberfläche der Wirtszelle durch die Interaktion der viralen Glykoproteine E1 und E2 und/oder ApoE mit HSPGs, LDLR und SR-B1. SR-B1 führt zu einer Konformationsänderung in E2. Die Interaktion von E2 und CD81 resultiert in der Aktivierung der Signaltransduktionskaskade durch EGFR, HRAS sowie durch RHO GTPasen. B Die Signaltransduktionskaskaden führen zu der Assoziation von CD81, SR-B1 sowie CLDN1 und schließlich zu einer lateralen Bewegung des HCV-CD81-SR-B1-Komplexes. C-D Interaktionen von E2 und CD81 mit den *tight junction* Proteinen CLDN1 und OCLN führen zur Clathrin-vermittelten Internalisierung des HCV unter weiterer Beteiligung des NPC1L1. E Durch einen pH-abhängigen Fusionsprozess wird das virale Nukleokapsid und schließlich das Genom des HCV in das Zytoplasma freigesetzt. Abkürzungen: CLDN1: Claudin-1, HSPG: *heparan sulfate proteoglykans*, LDLR: *low-density lipoprotein receptor*, NPC1L1: *Niemann-Pick C1-like 1*, OCLN: Occludin, SR-B1: *scavenger receptor B1*. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology, Lindenbach und Rice, 2013,¹⁵² Copyright (2013).

Nach der Infektion der Wirtszelle dient das virale RNA-Genom mit positiver Strangorientierung direkt als Template für die Translation im Zytoplasma. Durch die Verwendung der IRES in der 5'-nicht-kodierenden Region der viralen RNA wird die Bindung der mRNA an die Ribosomen und die 5'-Cap-unabhängige Translation sowie die Translokation des Translationskomplexes zu der Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums initiiert.^{37,38} Das entstandene Polyprotein wird ko- und posttranskriptionell durch virale und zelluläre Proteasen in zehn funktional-aktive Proteine geschnitten (vgl. Abschnitt 1.1.2). Das dabei prozessierte Nicht-Strukturprotein NS4B induziert die Ausbildung von netzartigen Membranstrukturen, den sogenannten *membranous web*, zur Induktion membran-assoziiierter Replikationskomplexe. Wirtsspezifische Faktoren, wie unter anderem hclF 4AII oder VAP-A und VAP-B (VAP: *vesicle-associated membrane protein-associated protein*), regulieren neben den viralen Proteinen die virale Replikation.¹⁵³ Hierbei repliziert die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B das virale Genom von positiver Polarität, über einen Zwischenschritt eines viralen RNA-Strangs mit negativer Orientierung, in den gebildeten Membrankompartimenten. Die synthetisierte RNA dient schließlich als Matrize für die erneute Replikation, als mRNA für die Translation oder für die Bildung infektiöser Viren durch den Einbau der RNA in Nukleokapside (*virus particle assembly*).^{40,154} Hierbei ist das Core-Protein aufgrund seiner Ladungseigenschaften in der Lage die virale RNA zu binden. Die Ausbildung des *budding* Komplexes erfolgt durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums, die sich einstülpt, abschnürt und die Virionen zum Golgi-Apparat weiterleitet. Hier erfolgt die Glykosylierung der viralen Hüllproteine E1 und E2. Abschließend erfolgt die Freisetzung der HCV-Partikel durch zelluläre Sekretion.^{40,154} Das zusammenfassende Modell des Infektions- und Replikationszyklus ist in der Abbildung 3 dargestellt.

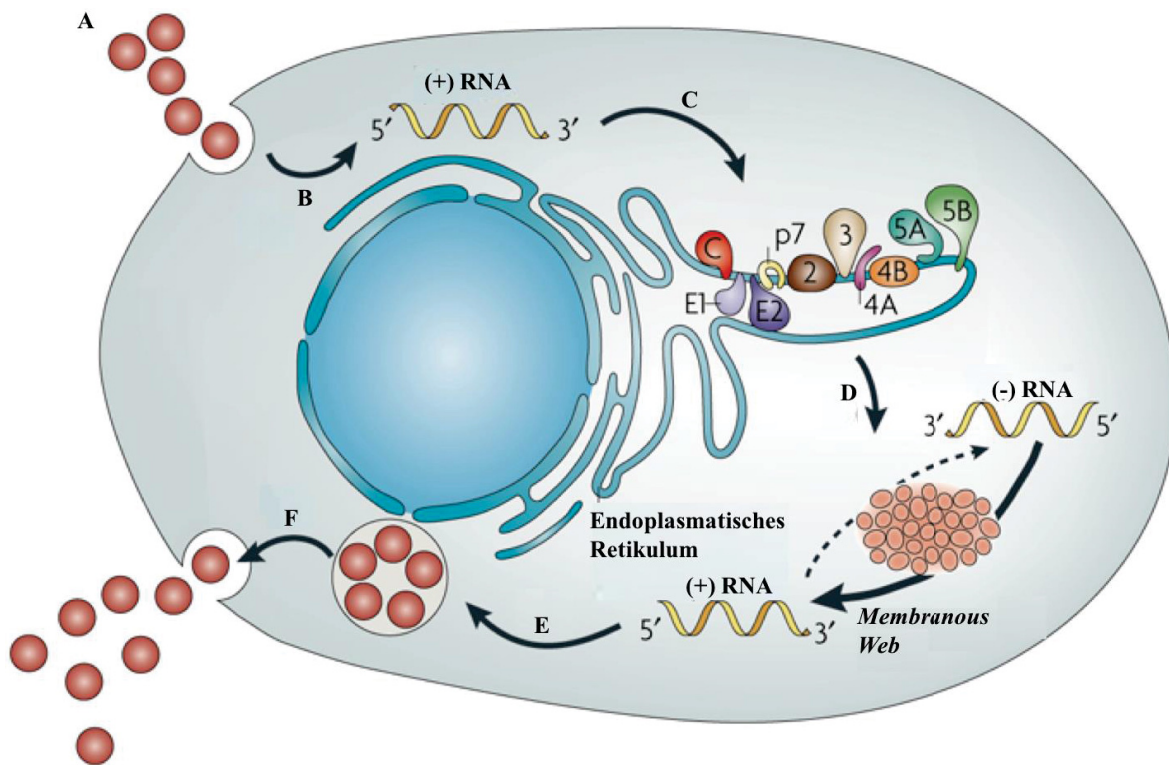


Abbildung 3: Zusammenfassendes Modell des Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis C Virus.

A Bindung und Clathrin-vermittelte Internalisierung des HCV. **B** Freisetzung und Entpackung des Nukleokapsids und viralen Genoms in das Zytoplasma. **C** IRES-vermittelte Translation, Translokation zur Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums und Polyprotein-Prozessierung. **D** Replikation der viralen RNA in netzartigen Membrankompartimenten (*membranous web*). **E** Zusammenbau und Verpackung des HCV. **F** Reifung und Freisetzung der Virionen (*budding*). Abkürzungen: C, E1 und E2: virale Strukturproteine, 2-5B: virale Nicht-Strukturproteine NS2-NS5B. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology, Moradpour *et al.*, 2007,⁴⁰ Copyright (2007).

1.1.6 Interaktionen mit der Wirtszelle

Zur Etablierung einer persistierenden Infektion, unter Aufrechterhaltung der viralen Replikation, hat das Hepatitis C Virus zahlreiche Strategien entwickelt, um die Infrastruktur des Wirts zu nutzen, die antivirale angeborene als auch die adaptive Immunantwort des Wirts zu umgehen und physiologische Funktionen, wie die zelluläre Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose zu manipulieren. Hierzu beeinflusst das Virus die wirtsspezifische Entzündungsantwort, greift in zelluläre Signaltransduktionskaskaden des angeborenen Immunsystems ein¹⁵⁵ und nutzt wirtsspezifische Mediatoren für seine effiziente Replikation, ohne die Vitalität seiner Wirtszelle schwerwiegend zu beeinträchtigen.^{153,156,157}

Unter physiologischen Bedingungen bildet die angeborene Immunität die erste Barriere für die Abwehr viraler doppelsträngiger Nukleinsäuren und/oder viraler Proteine.¹⁵⁸ Hierbei übernehmen hauptsächlich der Toll-like Rezeptor 3,^{101,158} die RIG-I-like Rezeptoren

(RLRs)^{99,158} sowie virale DNA-Sensoren die Detektion viraler RNA sowie die folglich induzierten antiviralen Abwehrmechanismen.¹⁵⁸ Diese werden im Wesentlichen durch die dazugehörigen Adaptorproteine ausgelöst, wie MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) und TRIF der Toll-like Rezeptoren (TLRs)¹⁵⁹ sowie Cardif der RLRs,^{99,160–162} als auch von viralen DNA-Sensoren, wie STING.^{163–165} Die meisten dieser Wege resultieren in der Aktivierung von Kinasen und der daraus folgenden Phosphorylierung *downstream* lokalisierter Signalmoleküle, wie beispielsweise der TBK-1 Kinase des RLRs und folglich phosphoryliertem IRF3 und IRF7 (*interferon regulatory factor*), was zur Translokation in den Nukleus führt.^{166,167} Diese Signalwege induzieren wiederum die antivirale Interferon-vermittelte Immunantwort vom Typ I (IFN- α und IFN- β) und III (IFN- γ).¹⁶⁸ Die folglich exprimierten Interferone (IFNs) werden von der Zelle sekretiert und wirken autokrin oder parakrin durch Bindung an spezifische Rezeptoren. Hierbei binden Typ I Interferone die heterodimeren Rezeptoren IFNAR-1 und -2¹⁶⁹ (*interferon- α/β receptor*) und Typ III Interferone die Interleukin-Rezeptoren IL-10R2 und IL-28RA.^{170,171} Diese Bindung resultiert in der Aktivierung der Kinasen JAK1 (JAK: Januskinase) und TYK1 (*non-receptor tyrosine-protein kinase 1*), der Heterodimerisierung von STAT1/STAT2 (STAT: *signal transducer and activator of transcription*) in Assoziation mit dem *interferon regulatory factor 9* und schließlich in der Transkription zahlreicher *interferon stimulated genes* (ISGs).¹⁷² Das Hepatitis C Virus ist in der Lage in diese antiviralen IFN-vermittelten Mechanismen auf zwei Wegen einzugreifen. Zum einen durch die Spaltung der Adaptorproteine MAVS^{98,99,173} und TRIF¹⁷³ durch das virale Nicht-Strukturprotein NS3/4A und zum anderen durch einen HCV-vermittelten Autophagie-Prozess zur Supprimierung der IFN-Immunantwort.¹⁷⁴ HCV ist zudem in der Lage die RNA-abhängige Proteinkinase R (PKR) zu phosphorylieren und damit zu aktivieren, was zur Supprimierung des Translationfaktors eIF2 α und damit zur Translation von ISG mRNA und so zu einer gesteigerten HCV Resistenz auf spätere antivirale IFN-vermittelte Immunantworten führt.¹⁷⁵ Der Überblick der angeborenen Immunantwort als Kontrolle der HCV-Infektion sowie die virale Regulation des HCV ist der Abbildung 4 zu entnehmen. Das Hepatitis C Virus umgeht des Weiteren durch drei mutative Mechanismen die wirtsspezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort des adaptiven Immunsystems.¹⁷⁶ Zum einen kommt es durch Mutationen in der HLA Klasse 1 (HLA: Histokompatibilitätsantigen) zur Verhinderung der Antigenpräsentation und zum anderen resultieren Mutationen des HCV im T-Zell-Rezeptor in der Beeinträchtigung spezifischer Epitopen-Erkennung durch die CD8⁺ T-Zellen.¹⁷⁷ Außerdem mutiert das Hepatitis C Virus flankierende Regionen eines Epitops, was zur Störung

der Antigenprozessierung durch das Proteasom und anderen Peptidasen führt und damit die Antigenpräsentation unterbindet.^{178–180}

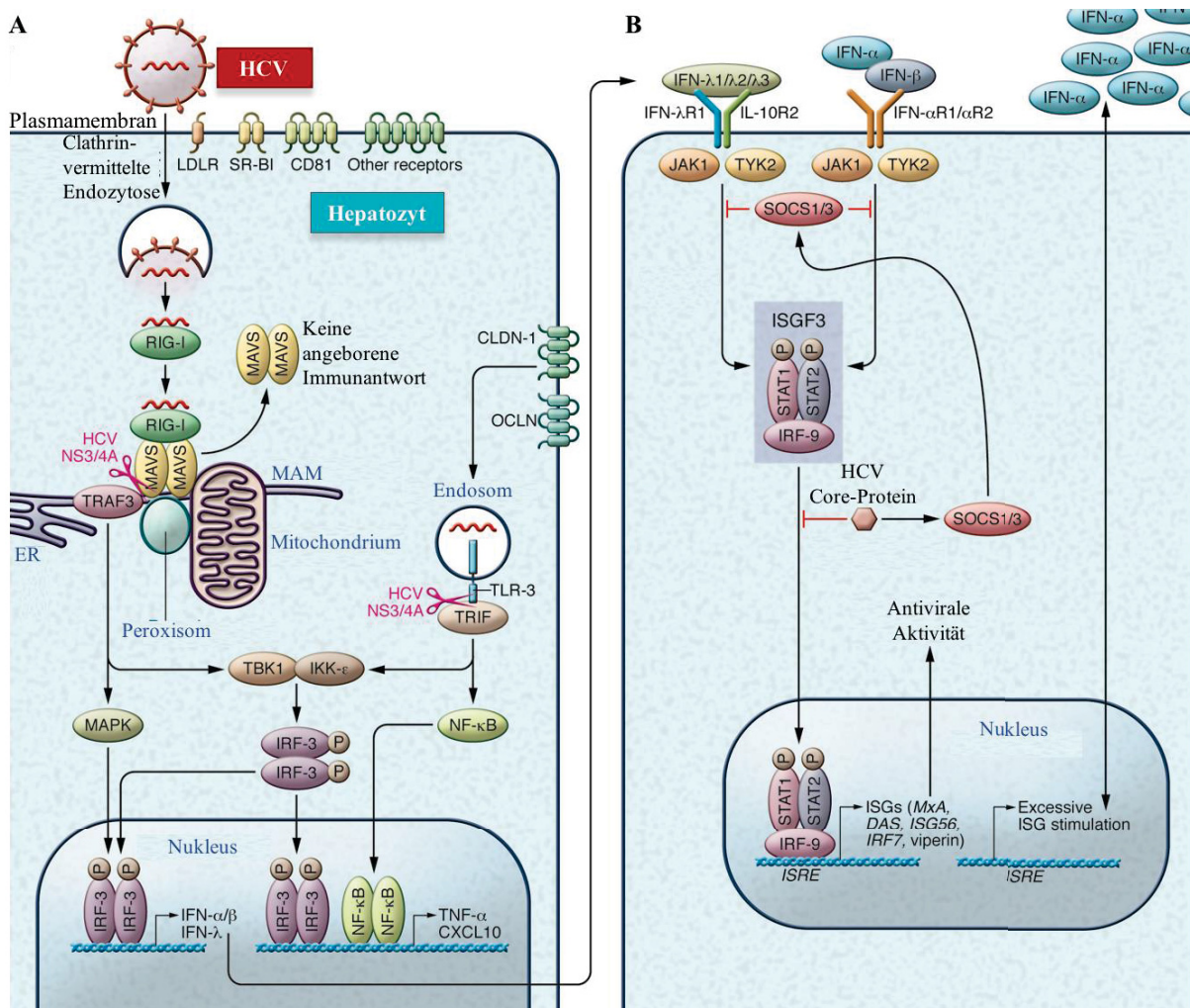


Abbildung 4: Zusammenfassendes Modell der angeborenen Immunantwort auf das Hepatitis C Virus sowie dessen Regulation. **A** Detektion intrazellulärer, doppelsträngiger viraler RNA durch die *pattern recognition receptors* RIG-I und TLR3. Aktivierung des Adaptorproteins MAVS und Interaktion mit dem Adaptorprotein TRAF3. Rekrutierung und Aktivierung der *downstream* Kinasen IKK-ε und TBK1 und daraus resultierende Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7 sowie Bindung von NF-κB. Induktion antiviraler und immunmodulierender Gene der Typ I und III Interferone, Chemokine und pro-inflammatorischen Zytokine. **B** Bindung der Typ I Interferone an die IFN-α/β-Rezeptoren (IFN-αR1 und -2) und vom Typ III an die heterodimeren IL-28Ra/IL-10Rβ Rezeptoren. Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs in Assoziation mit IRF-9. Der resultierende IFN-stimulierende Genfaktor 3 Transkriptionskomplex (ISGF3) gelangt in den Nukleus, bindet an den ISRE und induziert die Transkription von zahlreichen ISGs. Zwei Mechanismen der Regulation dieser antiviralen Abwehrmechanismen sind beschrieben. Zum einen die Spaltung der Adaptorproteine MAVS und TRIF durch HCV NS3/4A sowie die HCV-vermittelte Aktivierung der PKR, was in der Supprimierung der Translation der ISG mRNA resultiert und damit zu einer verringerten antiviralen IFN-vermittelten Immunantwort führt. Abkürzungen: IFN: Interferone, IKK: IκBα-Kinase-Komplex, IRF: *interferon regulatory factor*, ISG: *interferon stimulated genes*, ISRE: *interferon stimulated response element*, JAK: Januskinase, MAVS: *mitochondrial*

antiviral-signaling protein, STAT: *signal transducers and activators of transcription*, TBK1: *TANK-binding kinase 1*, TRAF-3: *TNF receptor associated factors*. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von American Society for Clinical Investigation: The Journal of Clinical Investigation, Rosen HR: Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection 2013; 123(10): 4121–4130,¹⁸¹ Copyright (2013).

Das Hepatitis C Virus wechselwirkt aber nicht nur mit Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems, sondern auch mit einer Vielzahl von wirtsspezifischen Signalwegen und Proteinen. Dies gewährleistet eine effiziente virale Replikation.^{153,156,157} Hierzu gehören unter anderem Cyclophilin B, das *FK506-binding protein 8* (FKBP8) sowie das Hitzeschockprotein HSP90.¹⁸² Die spezifische Interaktion von Cyclophilin B mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase resultiert in einer verstärkten Assoziation von NS5B mit der viralen RNA, was durch Inhibitor-Studien mit dem spezifischen Inhibitor Cyclosporin A belegt wurde.¹⁸³ Des Weiteren wird die Replikation durch die Wechselwirkung von NS5A mit dem Immunophilin FKBP8 und dem rekrutierten Chaperon HSP90, als Komponenten des Replikationskomplexes, reguliert.¹⁸⁴ Durch Studien mit dem Hefe Zwei Hybridsystem (*Yeast Two-Hybrid System*) wurde das humane VAMP-assoziierte Protein A (hVAP-A: Vesikel-assoziiertes Membranprotein) und seine Isoform hVAP-B als Interaktionspartner der Nicht-Strukturproteine NS5A und NS5B charakterisiert, die gleichermaßen, wie die bereits beschriebenen Proteine, für die virale Replikation essentiell sind.^{185,186} Weiterhin wird aufgrund der physiologischen Funktion der hVAPs im zellulären Vesikeltransport diskutiert, ob sie in dem viralen Membran-Rearrangement involviert sind.¹⁸² Insgesamt konnten bislang mehr als 26 zelluläre Proteine, die spezifisch an die interne ribosomale Eintrittsstelle des viralen Genoms binden,¹⁸⁷ als auch mehr als 70 verschiedene wirtszellspezifische Proteine die mit der nicht-kodierenden Region am 3'-Ende des HCV-Genoms interagieren, identifiziert werden.¹⁸⁸

HCV interferiert zudem mit zahlreichen zellulären Signaltransduktionskaskaden. Hierzu gehören unter anderem der EGFR,¹⁵⁶ die Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt)^{189,190} und die *cellular sarcoma*-Protein-Familie (c-Src).¹⁹¹ Hierbei interagiert NS5A mit p85, der regulatorischen Untereinheit der PI3K und bewirkt eine verstärkte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und entsprechender *downstream* lokalisierter Moleküle, wie der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK)3, was in dem Schutz der Zelle vor Apoptose resultiert.¹⁸⁹ Eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch NS4B konnte ebenfalls charakterisiert werden. Hierbei kommt es zur verstärkten PI3K/Akt-abhängigen Transkriptions-Aktivität des *sterol regulatory element binding proteins* SREBP-1 und zur verstärkten Protein-Expression von SREBP-1 und FAS (*fatty acid synthase*), was im Kontext mit der Effizienz der viralen Replikation und der HCV-Infektion steht.¹⁹⁰ Zudem aktiviert NS3/4A den EGFR/Akt-

Signalweg durch proteolytische Spaltung von TC-PTP an zwei Positionen *in vitro* und *in vivo*. Die resultierende Herabregulation von TC-PTP führt zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit Aktivierung des EGFR und entsprechender *downstream* lokalisierter Moleküle, wie unter anderem Akt sowie der Phosphoinositid-Phospholipase C (PLC). Auf diesem Weg wird die Zelle von HCV für EGF sensibilisiert und aktiviert Akt konstitutiv durch Ausschalten von TC-PTP. Dies hat einen starken Einfluss auf die Gewährleistung der viralen Replikation.¹⁵⁶

Zur Entstehung des Replikationskomplexes spielen zudem die Interaktionen zwischen NS5A und der SH2-Domäne sowie NS5B und der SH3-Domäne der Tyrosinkinase c-Src eine wesentliche Rolle.¹⁹¹

Weitere Interaktionen der viralen Proteine mit dem MAPK-Signalweg (*MAPK: mitogen activated protein kinases*) und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) sind essentiell für die verstärkte Zellproliferation und das Inhibieren der Apoptose, was zur Etablierung einer persistierenden Infektion und zur Aufrechterhaltung der viralen Replikation von entscheidender Bedeutung ist.^{192–195} Auch die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen steht hiermit in Verbindung (vgl. Abschnitt 1.2.10).

1.1.7 Neue Therapiemöglichkeiten einer chronischen Hepatitis C Virus Infektion

Bei 25 % der HCV-infizierten Patienten kommt es zu einer spontanen Ausheilung der Hepatitis C Virus Infektion, während 55 bis 85 % der Patienten eine chronische Hepatitis C Virus Infektion mit progressivem Krankheitsverlauf entwickeln.^{5,10–12} Im Zeitverlauf von etwa 20 Jahren entwickeln 15 bis 30 % der chronisch infizierten HCV-Patienten eine Leberzirrhose⁵ und 1-5 % hepatozelluläre Karzinome (HCC).⁸

Bis zum Jahr 2012 erfolgte die Standardbehandlung einer chronischen HCV-Infektion durch eine Kombinationstherapie von pegyliertem Interferon- α (PEG-IFN- α) und Ribavirin mit einem breiten Wirkungsspektrum (1- β -D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboamid).¹⁹⁶ Bei Ribavirin handelt es sich um ein Nukleosidanalogon (Guanosin), was zur Supprimierung von zahlreichen DNA- und RNA-Viren führt, darunter auch *Flaviviren*.¹⁹⁷ Die exakte Wirkung des Ribavirins wird noch kontrovers diskutiert. Man vermutet jedoch, dass durch Einbau in die RNA die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B und damit die virale Replikation inhibiert wird und dass die wirtszellspezifische Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) sowie die Synthese von Guanosin-Monophosphat gehemmt werden.¹⁹⁸ Zudem moduliert Ribavirin die antivirale, adaptive Immunantwort der T-Helferzellen Th1 und Th2. Hierbei

kommt es zu einer verstärkten Produktion der Zytokine IL-2, IFN- γ sowie TNF- α der Th1-Zellen und zur supprimierten Expression von IL-4, IL-5 sowie IL-10 der Th2-Zellen.^{199,200} PEG-IFN- α bindet an spezifische hochaffine Oberflächenrezeptoren der Virus-infizierten Zellen und wirkt immunmodulierend, antiviral sowie antiproliferativ.^{201,202} Hierbei kommt es zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges¹⁷² und folglich zur Induktion der Expression von zahlreichen Effektorproteinen, unter anderem der 2', 5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS), der PKR oder der Mx-Proteine. IFN- α induziert zudem die Antigenpräsentation durch den MHC-Klasse-I-Komplex (MHC: *major histocompatibility complex*) durch die Bindung an NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen.²⁰³ Die antiproliferativen Charakteristika des IFN- α sind vermutlich für die starken Nebenwirkungen der Interferontherapie, wie beispielsweise Leukopenie oder Thrombozytopenie, verantwortlich.²⁰³

Die Revolution der chronischen Hepatitis C (CHC) Therapie gelang durch die Entwicklung von neuen *direct-acting antiviral agents* (DAAs), um essentielle virale HCV-spezifische Enzyme und Proteine zu inhibieren.²⁰⁴ Hierzu gehörte initial die erste Generation der DAAs im Jahr 2012 mit den oralen NS3/4A-Protease-Inhibitoren, *Boceprevir*²⁰⁵ und *Telaprevir*,²⁰⁶ mit denen die Ausheilungsrate der HCV-Infektionen vom Genotyp 1 von 20 bis 30 % auf 70 bis 80 % erhöht werden konnte.²⁰⁷ Sie wurden in Kombination mit der PEG-IFN- α /Ribavirin-Standardtherapie verabreicht. Die resultierenden Nebenwirkungen dieser Therapie waren stark und mit einer langwierigen, komplexen Dosierung assoziiert sowie auf den Genotyp 1 des HCV limitiert.²⁰⁸ Die zweite Generation der DAAs nutzt verschiedene HCV-Proteine als bevorzugte Angriffspunkte, darunter NS3/4A, NS5A sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B.²⁰⁹

Der Durchbruch in der Ausheilung der chronischen HCV-Infektion vom Genotyp 1 gelang 2014 mit der Kombinationstherapie Harvoni® (Wirkstoffe *Sofusbrevir* plus *Ledipasvir*) der Firma Gilead Sciences. Bei *Sofusbrevir*/GS-7977 handelt es sich um ein Uridin Nukleotidanalogen (β -D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methyluridine monophosphate)²¹⁰ zur Inhibierung der viralen Replikation durch Einbau des aktiven Metaboliten GS-461203 in die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B.²⁰⁹ *Ledipasvir* hemmt den NS5A Replikationskomplex und wird zusammen mit *Sofusbrevir* verabreicht.²⁰⁹ Hiermit wurde eine Basis mit einer hohen Toleranz und minimalen Nebenwirkungen durch die IFN-freie Therapie sowie mit einem größeren Wirkungsspektrum gegen verschiedene HCV-Genotypen geschaffen.²⁰⁹ Bislang ist Harvoni® nur für die Behandlung von CHC vom Genotyp 1 zugelassen und darf nicht bei Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz verabreicht werden.²⁰⁹

2015 erfolgte die Zulassung einer weiteren Kombinationstherapie, zur Behandlung von CHC vom Genotyp 1, Viekirax® und Exviera® der Firma Abbvie. Die enthaltenen Wirkstoffe sind *Ombitasvir*, *Paritaprevir* und der Wirkstoffverstärker *Ritonavir*, die zusammen mit dem Wirkstoff *Dasabuvir* verabreicht werden. Diese Wirkstoffe greifen an multiplen Stellen des HCV-Lebenszyklus an.²⁰⁹ *Ombitasvir* inhibiert NS5A, *Paritaprevir* die NS3/4A-Protease, sodass sowohl die virale Replikation als auch die Polyprotein-Prozessierung inhibiert wird. *Ritonavir* ist ein pharmakokinetischer Verstärker, der die Spitzen- und Tal-Plasmakonzentrationen von *Paritaprevir* steigert. *Dasabuvir* hemmt als nukleosidischer Inhibitor die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B und damit die virale Replikation.²⁰⁹

Trotz der großen Erfolge der neuen antiviralen HCV-Therapien besteht weiterhin die Notwendigkeit in der Entwicklung alternativer oder erweiterter Therapieansätze zur Erweiterung des Wirkungsspektrums für die chronischen HCV-Infektionen aller Genotypen mit möglichst geringen Kontraindikationen und einem geringen Risiko zur Entwicklung von Arzneimittelresistenzen.

1.1.8 Verwendete *in vitro* HCV Zellkulturmodelle

1.1.8.1 Das HCV Replikonsystem

Im Jahr 1999 wurde das erste *in vitro* Zellkulturmodell für komplexe Analysen des viralen Replikationskomplexes und resultierende Wechselwirkungen des Hepatitis C Virus mit der Wirtszelle entwickelt.⁶² Hierzu erfolgte die Isolierung viraler RNA aus Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion des Genotyps 1b mit anschließender Konstruktion und Transfektion selbstreplizierender Replikons in die humane Hepatomazelllinie Huh-7. Der Prototyp dieser Replikons war eine bizistronische RNA des Genotyps 1b (Con1 Isolat), die für ein Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle der internen ribosomalen Eintrittsstelle des HCV, gefolgt von einer zweiten IRES des Encephalomyokarditis Virus (EMCV) zur Kontrolle der Expression der viralen Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B, kodierte.^{62,211} Hierbei wurden die viralen Strukturproteine Core bis p7 durch ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen ersetzt, was in einer Geneticin-Resistenz (G418) resultierte. Damit war die positive Selektion von HCV-Klonen in den humanen Hepatomazellen Huh-7 möglich.^{62,211} Die Integration adaptiver Mutationen, sogenannter *replication enhancing mutations* (REMs), führte zu einer wesentlich effizienteren viralen Replikation.^{212,213} REMs sind hauptsächlich im N-Terminus der viralen Serinprotease/Helikase NS3 lokalisiert, zwei weitere in NS4B und zentral in NS5A. Die am stärksten potenten REMs sind in der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B positioniert,

was zu Differenzierungen der Phosphorylierung im Protein führte, damit parallel einen Hinweis auf die Regulation der Virus-Replikation durch Phosphorylierung lieferte und die positiven Kolonienanzahl um das 500-fache steigerte.^{64,213,214}

1.1.8.2 Das Hepatitis C Virus Infektionssystem (HCVcc)

Pietschmann und Bartenschlager *et al.*, synthetisierten 2002 die ersten Vollängen-Replikon-Konstrukte.²¹⁵ Mit diesen können, aufgrund des gesamten enthaltenen viralen Genoms vom Genotyp 1b (Con1 Isolat), Interaktionen der viralen Strukturproteine Core bis p7 mit der Wirtszelle analysiert werden.²¹⁵ Die Limitierung dieses Systems besteht jedoch in dem Zusammenbau und der Freisetzung infektiöser Viruspartikel sowie der Infektion neuer Zielzellen aufgrund der für die hohe Replikationsrate notwendig integrierten REMs.^{70,215}

Durch die weitere Entwicklung von sogenannten retroviralen HCV Pseudopartikeln (HCVpp) gelang ein erster Durchbruch in der Entwicklung der HCV-Zellkulturmodelle. Erstmals konnten Analysen zum Eintritt des Virus in seine Wirtszelle durchgeführt und die Beteiligung der HCV-Proteine E1 und E2 am Eintritt des Virus identifiziert werden.⁴⁴ Das System basiert auf einer Ko-Transfektion von 293 T-Zellen mit Expressionsvektoren, welche für die glykosylierten HCV-Proteine E1 und E2 kodieren, sowie der gag-pol Proteine des murinen Leukämievirus (MLV) oder dem Humanen Immunodefizienz Virus (HIV) sowie einem Reporter-Gen.^{44,216}

Kato *et al.*, gelang im Jahr 2001 erstmals die Isolation und Sequenzanalyse des HCV-Klons JFH-1 aus einem japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis C (JFH-1: *japanese fulminant hepatitis clone 1*).²¹⁷ Basierend auf dem Klon JFH-1 vom Genotyp 2a wurden schließlich subgenomische Replikons konstruiert, die mit einer starken Effizienz unabhängig von integrierten, adaptiven REMs replizieren.²¹⁸ Die Transfektion des viralen RNA-Genoms in humane Hepatomazellen führte zur Produktion und Freisetzung infektiöser Viruspartikel sowie zur Infektion neuer, naiver Zielzellen und Schimpansen.¹⁰⁹ Auf dieser Grundlage gelang 2005 die Entwicklung des *in vitro* HCV Infektionssystem, das sogenannte *cell culture derived* HCV (HCVcc).^{109,219,220} Mit diesem System, was mittlerweile routinemäßig unter Biologischer Sicherheitsstufe 3 verwendet wird, ist es möglich *in vitro* den vollständigen Lebenszyklus des Hepatitis C Virus, vom Eintritt des Virus in seine Wirtszelle bis zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel sowie die Infektion humaner Hepatomazellen, zu untersuchen.¹⁰⁹

Die Transfektion der Vollängen-Replikons anderer HCV-Klone vom Genotyp 2a blieb zunächst erfolglos. Erst die Generierung von viralen Chimären vom Klon JFH-1 (Genotyp 2a)

und J6 (Genotyp 2a), dessen Nicht-Strukturproteine sich vom Klon JFH-1 ableiteten und dessen Strukturproteine durch korrespondierende Sequenzen des Klons J6 ersetzt wurden, ermöglichte eine effiziente virale Replikation unabhängig von REMs sowie die Synthese infektiöser Viruspartikel. Die dazugehörige Schnittstelle wurde hinter die erste transmembrane Domäne des HCV-Proteins NS2 positioniert, zur optimalen Effizienz der Virusproduktion der entstandenen viralen Chimäre.²¹⁹ Weitere chimäre Viren konnten folglich aus Nicht-Strukturproteinen des HCV-Klons JFH-1 und den Strukturproteinen der HCV-Klone H77 (Genotyp 1a), Con1 (Genotyp 1b) und 452 (Genotyp 3a) generiert werden.²²¹

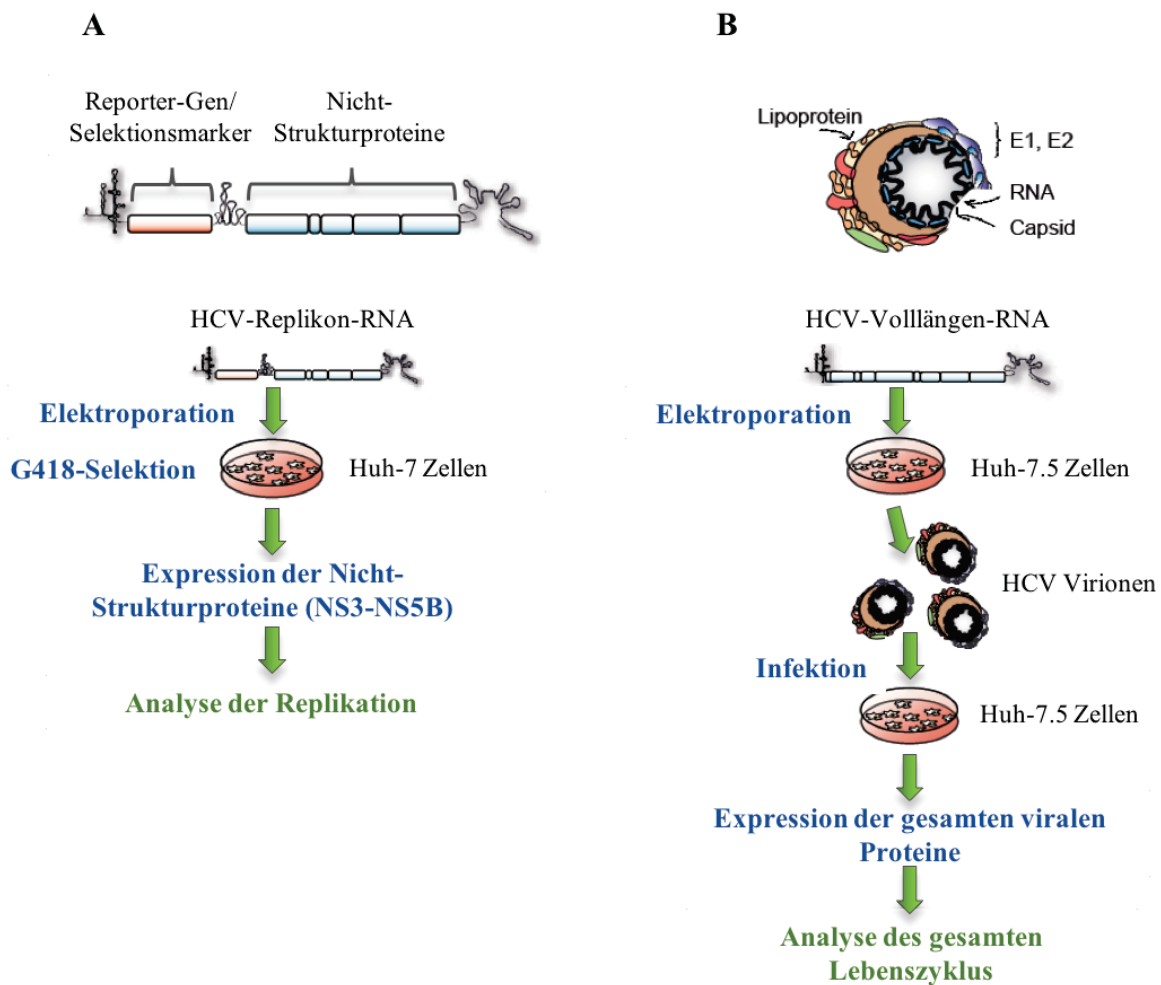


Abbildung 5: Verwendete *in vitro* Hepatitis C Virus Zellkultursysteme. **A** Die selbstreplizierenden HCV-Replikon-RNAs basieren auf einem Selektionsmarker, dem Neomycin-Phosphotransferase-Gen, welches die viralen Strukturproteine Core bis p7 ersetzt und von der HCV-IRES kontrolliert wird. Zur Kontrolle der Expression der viralen Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B kodieren die HCV RNAs eine weitere IRES des Encephalomyokarditis Virus (EMCV). Nach der Transfektion der HCV-Replikon-RNA in die Huh-7 Hepatomazellen und einer G418 Selektion ist die Analyse der Expression der viralen Nicht-Strukturproteine (NS3-NS5B) sowie der viralen Replikation möglich. **B** Die Produktion infektiöser *cell culture derived* HCV-Partikel basiert auf dem Genotyp 2a des HCV-Klons JFH-1 und entsprechender chimärer Varianten. Die HCV-Volllängen-

RNA wird mittels Elektroporation in die humane Hepatomazelllinie Huh-7.5 transfiziert, was zur viralen Replikation, zur Produktion und Freisetzung infektiöser Viren führt, die zur Infektion neuer Zielzellen genutzt werden können. Durch das HCVcc kann somit der gesamte HCV-Lebenszyklus untersucht werden. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von S. Karger AG: Digestive Diseases, Gerold und Pietschmann, 2014,²²² Copyright (2014).

Die im Replikonsystem als auch im HCV Infektionssystem entsprechend verwendete humane Zelllinie bedarf spezifischer Auswahlkriterien. Für das Replikonsystem ist die humane Hepatomazelllinie Huh-7 am effizientesten geeignet.²²³ Hierbei spielen die Zellpassage sowie die Zelldichte eine wesentliche Rolle.²²⁴ Durch antivirale Interferon-vermittelte Therapie vom HCV-Replikon geheilte Huh-7 Zellen (*cured cells*) weisen eine signifikante Steigerung der viralen Replikation aufgrund der erhöhten Aufnahmefähigkeit der *cured* Zellen für das HCV auf, wie beispielsweise Huh-7.5 Zellen.²²³ Der genaue Wirkmechanismus wird noch diskutiert. Man vermutet jedoch eine Beteiligung der angeborenen antiviralen Immunität durch einen beeinträchtigten RIG-I-Signalweg²²⁵ sowie eine gesteigerte Expression spezifischer Oberflächenrezeptoren, die für den Viruseintritt essentiell sind, wie LDLR, CD81 sowie SR-B1.²²⁶

Die revolutionäre Entwicklung des HCVcc mit dem Vorteil zur Analyse des gesamten Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis C Virus mit allen beteiligten Komponenten weist auch einige Nachteile auf. Hierzu zählen die hohe Proliferations- und geringe Differenzierungsrate der Huh-7 basierten Zelllinien im Vergleich zu differenzierten, nicht-proliferierenden Hepatozyten und die daraus resultierenden Einflüsse auf die Genregulationen und Signaltransduktionen der Zelle.²²⁷ Zudem sind sie Non-Responder für doppelsträngige RNA.²²⁸ Eine weitere Limitierung ist die Verwendung der viralen Nicht-Strukturproteine lediglich vom Genotyp 2a, was die Analyse der unterschiedlichen Genotypen unmöglich macht.²²⁹

1.2 Der EGF-Rezeptor/EGF-Signalweg

1.2.1 Der epidermale Wachstumsfaktor

Der *epidermal growth factor* (EGF) ist ein 6,45 kDa großes Protein, bestehend aus 53 Aminosäuren mit drei intramolekularen Disulfidbrücken.^{230,231} Es gehört mit zehn anderen Mitgliedern zur EGF-Protein-Familie. Alle Mitglieder dieser Familie weisen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten auf. Hierzu gehören sechs hoch konservierte Cysteine mit dem Motiv CX₇CX₄₋₅CX₁₀₋₁₃CXCX₈GXRC in einer EGF-ähnlichen Domäne.²³² Des Weiteren induzieren sie ihre Wirkung durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren und die

daraus resultierende Induktion spezifischer Signaltransduktionskaskaden. EGF induziert dabei hauptsächlich Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie *cell survival*-Signale.²³³

1.2.2 Die EGF-Rezeptor-Familie

Der *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor, welcher auch ErbB1 (*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*) oder HER1 (*human epidermal growth factor receptor 1*) genannt wird, ist eines der vier Mitglieder der EGF-Rezeptor Familie in der Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen.²³⁴ Die weiteren drei Mitglieder umfassen ErbB2 (Neu/HER2), ErbB3 (HER3) sowie ErbB4 (HER4).²³⁴ Der Begriff ErbB leitet sich hierbei von der strukturellen Homologie zu dem viralen v-ErbB-Onkogen ab.²³⁵ Elf bislang charakterisierte EGF-ähnliche glykosylierte, transmembrane Liganden sind in der Lage die ErbB-Rezeptoren durch extrazelluläre Bindung und daraus resultierender Homo- oder Heterodimerisierung zu aktivieren.²³⁶ Hierbei besteht die EGF-ähnliche Domäne aus sechs hoch konservierten Cysteinen.²³² Die Rekrutierung der entsprechenden Bindungspartner wird durch eine Interaktionsdomäne von geringer Affinität und Spezifität ermöglicht.²³⁷ Die Synthese der Liganden erfolgt über einen Zwischenschritt eines glykosylierten, transmembranen Vorläuferproteins bis hin zur Abspaltung und Freisetzung der reifen Wachstumsfaktoren von der Membran über einen Prozess, der auch als *ectodomain shedding* bezeichnet wird. Dieser Mechanismus wird von extrazellulären Proteasen, wie beispielsweise der Metalloprotease ADAM17 (*a disintegrin and metalloproteinase*), vermittelt.^{238,239} Die Liganden binden spezifisch an die ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen und werden von zahlreichen Geweben, unter anderem in der Leber, synthetisiert. Hierbei aktivieren Amphiregulin (AR), der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), Epigen und der *transforming growth factor* α (TGF- α) spezifisch den EGFR. β -Cullin (Betacellulin), Epiregulin sowie das Heparin-bindende EGF (HB-EGF) binden hingegen sowohl den EGFR als auch den ErbB4-Rezeptor und führen über Heterodimerisierung zur Aktivierung der beiden Rezeptoren. Die Neureguline 1 und 2 (NRG), auch als Hereguline (HER) bekannt, vermitteln ihre Signale über ErbB3 und ErbB4, während NRG3 und NRG4 ausschließlich den ErbB4-Rezeptor binden. Ein direkter Ligand von ErbB2 ist bislang nicht beschrieben, er verstärkt jedoch durch Heterodimerisierung mit den anderen drei Rezeptor-Tyrosinkinasen die Aktivierung und die damit resultierende Signaltransduktion der entsprechenden Signalwege.²³¹

1.2.3 Struktureller Aufbau der EGF-Rezeptor-Familie

Der EGFR wurde 1978 von Carpenter *et al.*, als ein transmembranes, 170 kDa großes Protein charakterisiert.²⁴⁰ Es handelt sich um einen zellspezifischen Oberflächenrezeptor bestehend aus vier funktional-aktiven Domänen. Hierzu gehören eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne (Ektodomäne) aus den vier Protein-Subdomänen I-IV, eine Transmembrandomäne mit sich daran anschließender intrazellulärer juxtamembraner Domäne, einer im Zytoplasma lokalisierten Kinasedomäne sowie einem C-Terminus mit Phosphotyrosin-Bindungsmotiven für zahlreiche Effektorproteine.^{233,234} Die vier Subdomänen der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne bestehen aus den zwei homologen Leucin-reichen Domänen L1 und L2 sowie den zwei Cystein-reichen Proteindomänen CR1 und CR2, welche in der präferenziellen Reihenfolge L1-CR1-L2-CR2 angeordnet sind.²⁴¹ Hierbei spielen die Cystein-reichen Subdomänen eine Rolle bei der Regulation der Rezeptor-Dimerisierung und die L-Domänen bei der Bindung der spezifischen Liganden.²⁴² Mit Ausnahme der beiden Rezeptor-Tyrosinkinasen ErbB2 und ErbB3 weisen alle Mitglieder der EGFR-Familie einen ähnlichen strukturellen, monomeren Aufbau auf, der schematisch in der Abbildung 6 dargestellt ist. Der ErbB2-Rezeptor besitzt hierbei, als Ausnahme der Rezeptor-Tyrosinkinasen, keine Bindungsstelle für extrazelluläre Effektorliganden und ErbB3 keine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität.²⁴³

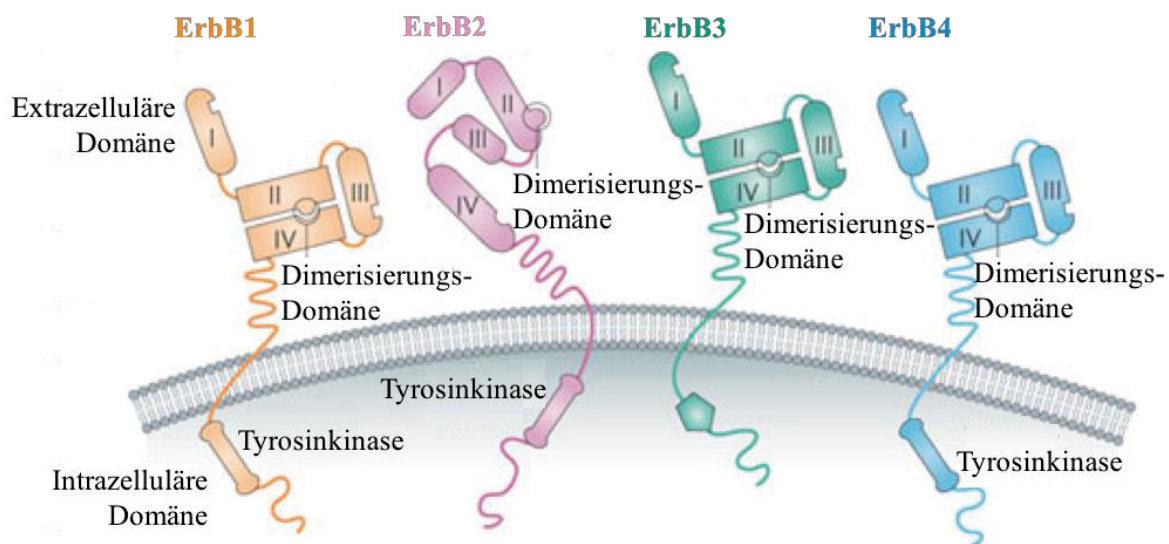


Abbildung 6: Schematische Darstellung des monomeren Aufbaus der Rezeptor-Tyrosinkinasen ErbB1 bis ErbB4. Die vier Mitglieder ErbB1 bis ErbB4 der EGF-Rezeptor-Familie in der Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen besitzen einen homologen strukturellen, monomeren Aufbau. Dieser besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne (Ektodomäne) mit vier Subdomänen I bis IV, einer Transmembrandomäne, einer intrazellulären Juxtamembrandomäne, einer Tyrosinkinase-Domäne sowie einem C-Terminus mit Phosphotyrosinresten als Bindungsstellen für zahlreiche Effektorproteine. Der ErbB2-Rezeptor

besitzt als Ausnahme keine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle und der ErbB3-Rezeptor keine Tyrosinkinase. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer, Baselga und Swain, 2009,²⁴⁴ Copyright (2009).

Die ErbB-Rezeptoren werden auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, wobei Hepatozyten vergleichsweise die stärkste Expressionsdichte aufweisen. Dies spricht für eine bedeutende Rolle in der physiologischen Leberfunktion. Die Signaltransduktions-vermittelten Funktionen der Rezeptoren umfassen unter anderem Zellproliferation und Zelldifferenzierung.²⁴⁵ Mutationen in den Rezeptor-Tyrosinkinasen führen häufig zur Überexpression und hyperaktiven Funktion aufgrund differenzierter Signaltransduktionskaskaden, was wiederum in engem Zusammenhang mit Neoplasie und der Entstehung von malignen Tumoren steht. Folglich sind die Mitglieder der EGFR-Familie bedeutende Angriffsziele in der anti-kanzerogenen Therapie.^{236,245}

1.2.4 Liganden-induzierte Dimerisierung des EGF-Rezeptors

Im inaktiven, ungebundenen Zustand liegt der EGFR, ebenso wie die drei anderen Mitglieder der Rezeptor-Tyrosinkinasen, in einem prä-dimerisierten Zustand vor.²⁴⁶ Die Aktivierung des EGFR erfolgt durch die extrazelluläre Bindung von zwei Liganden an die Subdomänen L1 und L2 und daraus resultierender CR-vermittelter Dimerisierung des EGFR.^{242,247} In der aktivierten Form bilden sie Dimere und weisen zwei EGFR-Bindungsstellen auf, eine hochaffine sowie eine weniger affine.²⁴⁸ 95 % der ungebundenen EGF-Rezeptoren liegen in einer autoinhibierten, Dimerisierungs-unzugänglichen Form, der sogenannten geschlossenen, *tethered conformation* vor. Hierbei erfolgt die Interaktion der Cystein-reichen Subdomänen der ErbB1-Rezeptoren intramolekular untereinander.^{242,244} Die anderen 5 % weisen eine sogenannte offene, *untethered conformation* auf, in der die LR-Subdomänen in räumlicher Nähe vorliegen, die Interaktion der CR-Proteindomänen unterbinden und für die Bindung spezifischer Liganden zugänglich sind.^{242,244} Das Modell der Homodimerisierung von ErbB1 ist der Abbildung 7 zu entnehmen.

Die Dimerisierung resultiert in der Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase und induziert die Autophosphorylierung von spezifischen Tyrosinresten, welche in dem C-Terminus des Rezeptors lokalisiert sind. Hierzu gehören Tyrosin 974, 992, 1045, 1068, 1086, 1148 sowie 1173.²⁴⁹ Auf diesem Weg entstehen spezifische Bindungsstellen im C-Terminus für zahlreiche Signaltransduktoren. Der EGFR steht hierbei im Zusammenhang mit der Aktivierung des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweges und des STAT3-abhängigen Signalweges, welche Zellproliferation, Zellmigration, Zelldifferenzierung sowie Angiogenese

induzieren und der Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweges, der antiapoptische und damit überlebenssignalisierende Wirkungen vermittelt.^{244,250,251} Im folgenden wird lediglich näher auf den EGFR-induzierten MAPK- sowie den PI3K/Akt-Signalweg eingegangen.

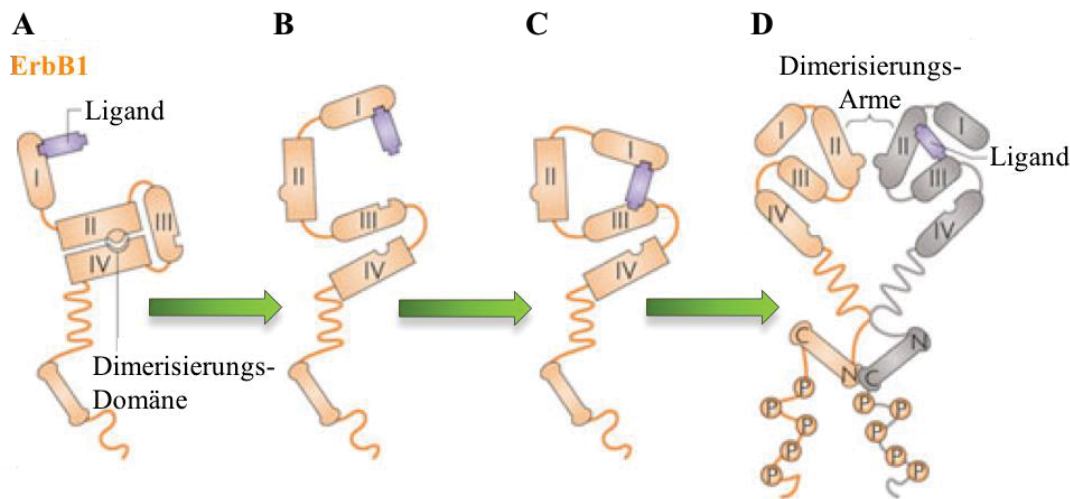


Abbildung 7: Modell der Bildung der Rezeptor-Dimerisierung von ErbB1. A ErbB1 in geschlossener, *tethered conformation* und somit zugänglich für die Ligandenbindung. B ErbB1 in offener, Ligandenbindungs-zugänglicher *untethered conformation*. C Die Bindung des Liganden in der *untethered conformation* resultiert in einer Konformationsänderung von ErbB1. D Schließlich resultierende Homodimerisierung der ErbB1-Rezeptoren. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer, Baselga und Swain, 2009,²⁴⁴ Copyright (2009).

1.2.5 EGFR-induzierte Aktivierung des MAPK-Signalweges

Die durch die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors bedingte Autophosphorylierung der Tyrosinreste 1068, 1086, 1148 sowie 1173 führt zur Interaktion mit den Signaltransduktoren *growth factor receptor bound protein 2* (Grb2) und *Src homology 2 domain-containing* (Shc).²⁵² Diese Wechselwirkung resultiert in der Aktivierung des MAPK-Signalweges.²⁵³ Hierbei kommt es zunächst zur Rekrutierung der Signalproteine Sos (*son of sevenless*) und der GTPase Ras (*rat sarcoma*).²⁵⁴ Ras katalysiert nun durch Sos dissoziiertes GDP zu GTP und wird aktiviert. Die aktive Form des Enzyms aktiviert nachfolgend die MAP-Kinasen durch Phosphorylierung. Der initiale Schritt hierbei ist die Aktivierung der Serin/Threoninkinase Raf (*rapidly growing fibrosarcoma*), die ihrerseits wiederum die MAP-Kinase Kinase 1 (MEK1) und 2 (MEK2) durch Phosphorylierung von zwei Serinresten aktiviert. Diese resultierende Aktivierung von MEK1/2 phosphoryliert und aktiviert nun die *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2),^{255–258} die ihrerseits wiederum in den Nukleus transloziert und dort als Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher Gene

induziert, darunter das Gen der MSK-1 (*mitogen and stress activated kinase-1*) oder der Serin/Threoninkinase p90RS6K (*90 kDa ribosomal S6 kinase*).^{251,259}

Die durch den EGFR autophosphorylierten Tyrosinreste 992 und 1173 resultieren ebenfalls in der Aktivierung von ERK1/2, jedoch in diesem Fall Ras-unabhängig.²⁶⁰ Sie bilden direkte Bindungsstellen für die Phospholipase C gamma 1 (PLC γ 1), die ihrerseits die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu IP₃ (Inosit-1,4,5-triphosphat) katalysiert und die Freisetzung von DAG (1,2-Diacylglycerin) induziert. Der *second messenger* IP₃ vermittelt folglich durch Bindung an spezifische IP₃-Kanäle die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol. Durch die entstandene Calcium-reiche Umgebung werden cPKCs, beispielsweise die Proteinkinase C (*classical protein kinase C*) und isomere Formen, wie nPKCs, darunter PKC δ (*novel protein kinase C*) durch in der Plasmamembran lokalisiertes DAG aktiviert, welches schließlich zur Aktivierung von ERK1/2, NF- κ B, p38^{MAPK} und c-Jun N-terminaler Proteinkinasen (JNK) führt.²⁶¹

1.2.6 EGFR-induzierte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges

Durch die EGF-Rezeptor-abhängige Autophosphorylierung der Tyrosinreste 1068 und 1086 kommt es zur Wechselwirkung mit dem Adaptorprotein Gab1 (*growth factor receptor-bound protein (Grb)2-associated adaptor protein 1*). Diese Interaktion führt zur Rekrutierung der heterodimeren PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), bestehend aus der katalytischen Untereinheit p85 und der regulatorischen Untereinheit p110.^{262,263} Hierbei entsteht durch die regulatorische Untereinheit p110 durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) der sekundäre Botenstoff Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃).²⁶⁴ Dies führt zur Translokation von PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) und der Serin/Threoninkinase Akt an die Plasmamembran. PDK1 aktiviert zusammen mit der Serin/Threoninkinase mTORC2 (*mechanistic target of rapamycin complex 2*) schließlich Akt durch Phosphorylierung des Threoninrests 308 sowie des Serinrests 473.²⁶⁵

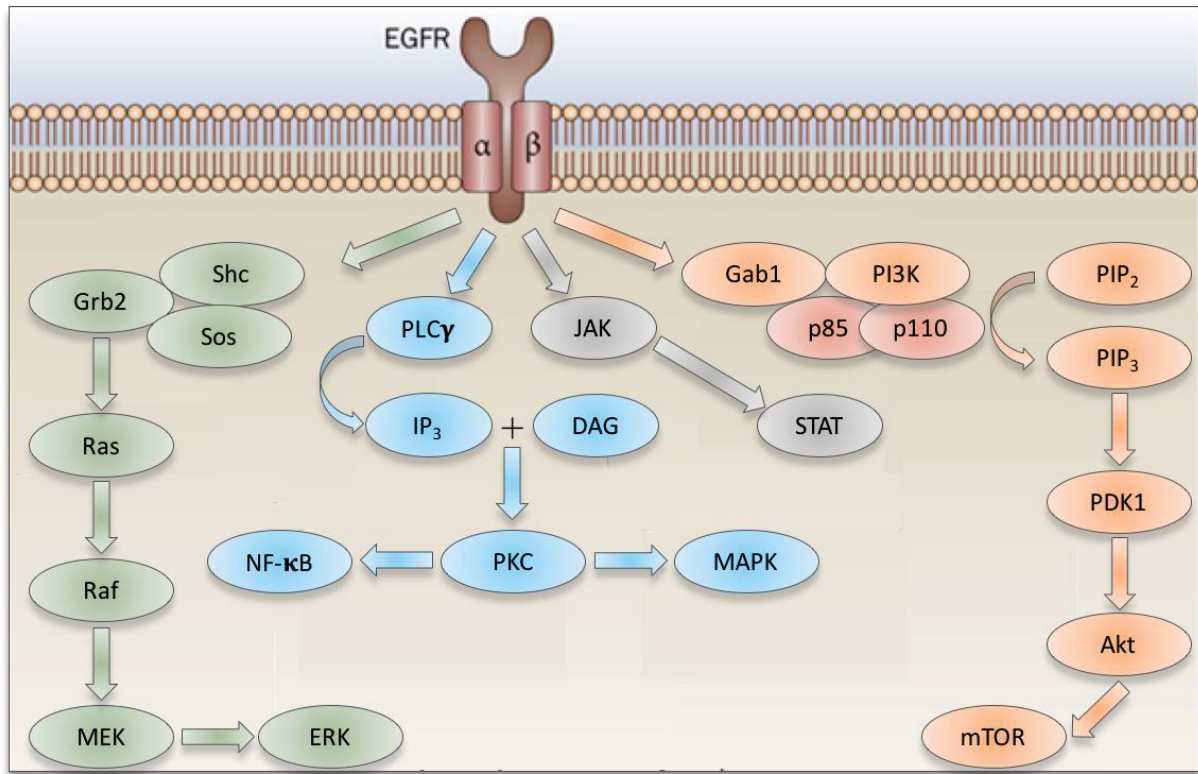


Abbildung 8: Zusammenfassendes Modell der EGFR-induzierten Signalwege. Durch die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors an den EGFR kommt es zur Dimerisierung und damit zur Aktivierung des Rezeptors. Die daraus resultierende Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in dem C-Terminus führt zur Rekrutierung der entsprechenden Adapterproteine. Aufgrund dessen kommt es zur Aktivierung des MAPK-Signalweges (grün dargestellt), des PI3K/Akt-Signalweges (orange dargestellt), der Aktivierung des JAK/STAT3-Signalweges (grau dargestellt) sowie zur Ras-unabhängigen Aktivierung der MAPK, wie ERK1/2, JNK und NF-κB (blau dargestellt). Abkürzungen: Akt: Serin/Threoninkinase (Proteinkinase B), DAG: 1,2-Diacylglycerin, ERK: *extracellular signal-regulated kinase*, Gab1: *growth factor receptor-bound protein (Grb)2-associated adaptor protein 1*, Grb2: *growth factor receptor bound protein 2*, IP₃: Inosit-1,4,5-trisphosphat, MAPK: Mitogen-aktivierte Protein Kinasen, MEK: Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), p85: katalytische Untereinheit der PI3K, p110 regulatorische Untereinheit der PI3K, PDK1: *phosphoinositide-dependent protein kinase 1*, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PIP₃: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, PKC: Proteinkinase C, PLC-γ: Phospholipase C gamma, Raf: *rapidly growing fibrosarcoma*, Ras: *rat sarcoma*, Shc: *Src homology 2 domain-containing*, Sos: *son of sevenless*. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Clinical Oncology, Harris und McCormick, 2010,²⁶⁶ Copyright (2010).

1.2.7 Negativregulation des EGF-Rezeptors

Die Expression sowie die Aktivität des EGF-Rezeptors wird durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Dies erfolgt zum einen durch Endozytose der gebildeten Komplexe EGF-gebundener EGFR-Homodimere sowie anschließender Degradierung der Komplexe

durch lysosomalen Abbau. EGFR/ErbB2-Heterodimere hingegen werden zwar endozytiert, aber nicht degradiert, sondern zur schnelleren Liganden-induzierten Reaktivierung wieder in die Zellmembran integriert.²³⁷

Die Inhibition des EGF-Rezeptors durch die Induktion der Expression von Negativregulatoren über *negative feedback loops* ist eine weitere Regulationsmöglichkeit. Hierzu gehören unter anderem MIG-6 (*mitogen-inducible gene 6*), LRIG-1 (*leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1*), SPRY (*sprouty*) sowie SOCS5 (*suppressor of cytokine signaling 5*).²³⁴

Die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors wird durch intrazellulär lokalisierte Serin- und Threoninreste reguliert. *In vitro* Studien von Theroux *et al.*, 1992 identifizierten hierbei die Herabregulation der Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors durch Phosphorylierung von zwei Serinen an den Positionen 1046 und 1047.²⁶⁷

Eine weitere Regulationsmöglichkeit sind Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs). Hierzu zählen unter anderem die *src-homology phosphatase 2* (SHP2)²⁶⁸, die *protein tyrosine phosphatase 1 B* (PTP1B)²⁶⁹ sowie die *T cell protein tyrosine phosphatase* (TC-PTP).^{270,271}

1.2.8 Die T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase

Die *T cell protein tyrosine phosphatase* (TC-PTP), oder auch *protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2* (PTPN2) genannt, wurde erstmals 1989 von Cool *et al.*, als eine ubiquitär exprimierte Phosphatase in T-Zellen als Mitglied der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Familie beschrieben.²⁷² Durch alternatives Spleißen der katalytischen Domäne der Phosphatase werden zwei Varianten generiert, die p45^{TC} mit einer Größe von 45 kDa und die p48^{TC} mit einer Größe von 48 kDa.^{273,274} Hierbei ist die Spleißvariante p45^{TC} im Nukleus lokalisiert, während das endogen exprimierte p48^{TC} mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums assoziiert ist.²⁷⁵ Diese unterschiedliche Lokalisation in subzellulären Kompartimenten beruht auf sequenzspezifischen Motiven in der jeweiligen nicht-katalytischen Domäne der Enzyme, dem COOH-Terminus. Der Carboxy-Terminus von p45^{TC} besitzt hierbei eine Hexapeptidsequenz, während der C-Terminus der Variante p48^{TC} hingegen hydrophobe Charakteristika aufweist.²⁷⁵ Die TC-PTP Spleißvariante p45^{TC} weist eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) auf, die dessen Translokation in den Zellkern vermittelt. Durch Affinitätschromatographie-Studien wurden drei zytoplasmatische Proteine mit 97, 116 und 120 kDa charakterisiert, die mit TC-PTP interagieren.²⁷⁶ Durch Sequenzanalysen wurde Importin-β-p97 als essentielle Komponente der Nukleus-Import-Maschinerie von p45^{TC} identifiziert, weshalb p45^{TC} im Grundzustand im

Nukleus lokalisiert ist.²⁷⁶ Durch spezifischen zellulären Stress, darunter hyperosmotischer Stress oder mitogene Stimulation, wird es ins Zytoplasma akkumuliert.²⁷⁷ Im Zytoplasma bewirkt p45^{TC} die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung des EGF-Rezeptors und schließlich die Herabregulation der durch den hyperosmotischen Stress induzierten c-Jun N-terminalen Kinasen.²⁷⁷

Tiganis *et al.*, 1998 belegten durch Generierung von Mutationen in Substraten der TC-PTP, dass die Spleißvariante p45^{TC} die EGF-induzierte Assoziation des Adaptorproteins p52Shc mit Grb2 Dephosphorylierungs-vermittelt inhibiert und damit stark in die Regulation der Zelldifferenzierung sowie Zellproliferation durch Differenzierung entsprechend inhibierter Signaltransduktionskaskaden eingreift.²⁷⁰

TC-PTP ist des Weiteren auch in der negativen Regulation der Januskinasen JAK1 und JAK3 durch Dephosphorylierung involviert.²⁷⁸ Die überexprimierte nukleär lokalisierte Spleißvariante p45^{TC} von TC-PTP supprimiert zudem die IL-6-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung und damit die Aktivierung des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)²⁷⁹ und ist in der negativen Regulation des Prolaktin (PRL)-induzierten Signalweges durch Dephosphorylierung von STAT5a sowie STAT5b involviert.²⁸⁰ Diese Tatsache als auch der Umstand, dass TC-PTP-defiziente Mäuse nach 3-5 Wochen versterben, verdeutlicht die bedeutende Rolle von TC-PTP in der Regulation des Immunsystems, der Akut-Phase-Reaktion, der Hämatopoese, der entsprechenden Freisetzung von IL-6 sowie der TC-PTP-vermittelten Kontrolle der Homöostase.^{278,279}

TC-PTP übernimmt auch in der Regulation der Glukosehomöostase sowie der PDGF-R-vermittelten zellulären Proliferation eine wesentliche Rolle, durch Supprimierung des *platelet-derived growth factor-receptors* (PDGF-R)²⁸¹ sowie des Insulin-Rezeptors²⁸² als auch des Insulin-Rezeptor-induzierten Signalweges und zwar durch Dephosphorylierungs-vermittelte Inaktivierung.²⁸³

1.2.9 Einfluss des Hepatitis C Virus auf den EGF-Rezeptor

Wie unter Abschnitt 1.1.5 beschrieben, spielt der EGFR als Kofaktor aufgrund seiner Tyrosinkinase-Aktivität eine bedeutende Rolle beim Eintritt des Hepatitis C Virus in seine Wirtszelle sowie für die Infektion.¹³² Durch das Nicht-Strukturprotein NS5A ist HCV zudem in der Lage EGFR-induzierte Signaltransduktionskaskaden zu modifizieren. Hierzu bindet NS5A spezifisch aufgrund hoch konservierter Prolin-reicher Sequenzen an die SH3-Domäne des Adaptorproteins Grb2 und damit an den aktivierten EGFR.²⁸⁴ Diese Wechselwirkung

resultiert in der Inhibierung der EGFR-induzierten Aktivierung von ERK1/2.²⁸⁴ Zusätzlich interagiert die N-terminale Domäne von NS5A mit dem Gab1 (*GRB2-associated binder 1*) Protein. Diese NS5A/Gab1-Assoziation führt indirekt durch die Wechselwirkung mit der p85-Untereinheit der PI3K zu einer verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung von p85 in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor.²⁸⁵ Dies aktiviert die *downstream* lokalisierte Kinase Akt durch verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung sowie den pro-apoptotischen Faktor BAD durch Serin-Phosphorylierung.²⁸⁵ NS5A induziert durch die Hemmung des MAPK-Signalweges und der gleichzeitig verstärkten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges die Zellproliferation und inhibiert die Apoptose, was zu einer verstärkten Persistenz sowie Pathogenese des HCV führt.²⁸⁵ Des Weiteren inhibiert NS5A die EGF-induzierte Aktivierung des Ras-ERK-Signalweges.²⁸⁶

Durch Reporter-Assay-Analysen wurde eine verstärkte Promotor-Aktivität des EGFR-Liganden Amphiregulin während einer HCV-Infektion in Hepatozyten beschrieben. Diese verstärkte Expression von Amphiregulin wird sowohl durch autokrine Stimulation sowie doppelsträngige RNA als auch durch das virale Nicht-Strukturprotein NS3 induziert. Amphiregulin seinerseits spielt in HCV-infizierten Patienten eine essentielle Rolle bei der Entstehung von Leberzirrhose sowie hepatozellulären Karzinomen und schützt die Hepatozyten vor HCV-induziertem Zelltod durch Aktivierung der Proliferations-aktivierenden Signalwege von ERK, Akt und p38^{MAPK}. Durch spezifische Gen-*knockdown*- sowie Inhibitor-Studien konnte zudem die Beteiligung von Amphiregulin am Eintritt des HCV in seine Wirtszelle sowie am Zusammenbau und der Freisetzung der Virionen belegt werden.²⁸⁷

1.2.10 Einfluss des Hepatitis C Virus auf den MAPK-Signalweg

Das Hepatitis C Virus interferiert mit dem zellulären MAPK-Signalweg zur Penetration einer Infektion. Hierbei agiert beispielsweise das virale Hüllprotein E2 als Induktor der intrazellulären MAPK-Signaltransduktionskaskade. Folglich werden die *upstream* lokalisierten Kinasen Raf-1 sowie MEK1/2 verstärkt phosphoryliert und damit aktiviert, ebenso wie die *downstream* lokalisierten Kinasen ERK1/2 und p38^{MAPK}. Auf diesem Weg resultiert eine gesteigerte Zellproliferation, zu Gunsten des Virus.¹⁹² Zudem ist das virale Nicht-Strukturprotein NS3 mit seinem onkogenen Potential an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. In NS3-transfizierten Hepatozyten, welche spezifisch NS3 exprimieren, konnte ein verstärktes Zellwachstum basierend auf einer verstärkten Aktivierung von ERK und daraus resultierender Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 sowie NF-κB beobachtet werden.¹⁹³ Zudem wird die HCV-abhängige ERK-Aktivierung mit der Aktivierung einer

zytosolischen, Calcium-abhängigen *IVA phospholipase A2* (PLA2G4A) assoziiert. Durch Hemmung der PLA2G4A-Aktivität wurde eine reduzierte Abundanz des Core-Proteins an Lipide, der Core-Bildung sowie der Sekretion von infektiösen Viruspartikeln charakterisiert.²⁸⁸

Die Fehlregulation der Kinasen ERK1/2, JNK und p38^{MAPK} als Signalkomponenten des MAPK-Signalweges geht aufgrund ihrer physiologischen Funktion als Induktoren der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration sowie überlebenssignalisierender Wirkungen oft mit der Krebsentstehung einher, darunter die Entwicklung hepatozellulärer Karzinome. Hierbei resultiert die verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 in einer gesteigerten Zellproliferation, während die verstärkte Aktivierung von JNK, durch seine anti-apoptotischen Effekte, das Tumorstadium fördert.²⁸⁹

1.3 Zytokine

Zytokine sind eine Gruppe von pleiotropen regulatorischen Peptiden, die von allen kernhaltigen Zellen, darunter auch Leberzellen, synthetisiert werden. Sie induzieren ihre Wirkung durch Bindung an spezifische Zytokin-Rezeptoren. Hierzu gehören Zellproliferation und Zelldifferenzierung, aber auch die Regulation von Entzündungs- und Immunprozessen. Die Familie der Zytokine besitzt zahlreiche Unterfamilien, darunter Interleukine, Interferone, kolonie-stimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und auch Chemokine.²⁹⁰

1.3.1 Das Interleukin-1 β

Interleukin-1 (IL-1) wurde 1977 als kleines, endogenes, Fieber-induzierendes *human leukocytic pyrogen* Protein beschrieben.²⁹¹ Es gehört zur IL-1-Protein-Familie, von der bislang elf Mitglieder bekannt sind.²⁹² Die Mitglieder der IL-1-Protein-Familie werden durch ein konserviertes Aminosäure-Motiv mit der Abfolge A-X-D charakterisiert, wobei A Methionin, Leucin, Isoleucin, X eine beliebige Aminosäure und D Asparaginsäure repräsentiert. Dieses Motiv ist essentiell für die räumliche Faltung der Zytokine.²⁹³ IL-1 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches die Zellproliferation sowie die Zelldifferenzierung induziert und verstärkt sowie maßgeblich als Schlüsselfaktor bei der angeborenen Immun- und Entzündungsantwort involviert ist.²⁹³ IL-1 umfasst zwei Proteine, die sich durch geringe Sequenzhomologien, jedoch durch ähnliche biologische Eigenschaften charakterisieren. Hierzu gehören IL-1 α und IL-1 β . Sie unterscheiden sich zudem aufgrund ihrer Lokalisation, Reifung sowie Sekretion.²⁹² Während IL-1 α direkt in eine biologisch aktive Form translatiert wird, erfolgt die Synthese von IL-1 β zunächst über das 31 kDa große, biologisch inaktive Vorläuferprotein pro-IL-1 β . Die Produktion von IL-1 β wird hierbei durch die Erkennung von

PAMPs (*pattern-associated molecular patterns*), welche auf eingedrungenen Pathogenen lokalisiert sind, durch *pattern-recognition receptors* (PRRs) initiiert. Durch Caspase-1-vermittelte Prozessierung entsteht schließlich biologisch aktives IL-1 β , dessen Sekretion hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, als Folge der ausgelösten Immunantwort, induziert wird.^{292,294} Es entfaltet seine Wirkung schließlich durch die Bindung an den spezifischen *IL-1 type I receptor* (IL-1RI). IL-1 β kann ebenso an den IL-1 Typ II Rezeptor binden (IL-1RII), der jedoch nicht in die Signaltransduktion involviert ist und damit für die Regulation des IL-1RI, über eine Balance der beiden Rezeptoren, verantwortlich ist.^{292,295}

1.3.2 Das Interleukin-10

Das Interleukin 10 (IL-10) wurde erstmalig von Fiorentino *et al.*, 1989 als Zytokin-Synthese inhibierender Faktor beschrieben.²⁹⁶ IL-10 reguliert als anti-inflammatorischer Faktor zahlreiche Immunantworten.²⁹² Es umfasst eine molekulare Masse von etwa 18 kDa. IL-10 besitzt vier konservierte Cysteine und bildet sechs α -Helices in seiner reifen 3-dimensionalen Tertiär-Struktur.²⁹⁷ Es wird als Homodimer mit zwei Subdomänen von jeweils 178 Aminosäuren hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen (Th1, Th2 und Treg), dendritischen Zellen und NK-Zellen, sekretiert.^{292,297} Auch Mastzellen produzieren IL-10, was in einer limitierten Leukozyten-Infiltration sowie Inflammation resultiert.²⁹² IL-10 induziert seine Funktionen durch Bindung an seinen spezifischen Rezeptor IL-10R, ein Komplex aus den zwei Domänen IL-10R1 und IL-10R2.²⁹⁸ Es fungiert als immunsuppressiver Faktor und inhibiert zahlreiche Immunantworten.²⁹² Hierzu gehören unter anderem die Regulation von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) durch direkte Herabregulation der Expression des MHC-Klasse-II-Komplexes sowie der ko-stimulierenden Moleküle CD80/CD86 auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen,²⁹⁹ aber auch die Inhibierung der T-Zell-Aktivierung durch Supprimierung von CD28, CD2 sowie der Hemmung von T-Zell-Ko-Stimulatoren durch SHP-1-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung.²⁹² Außerdem inhibiert IL-10 zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1 β oder IL-6, Chemokine, darunter CXCL8 und RANTES sowie Chemokinrezeptoren.^{299,300} Neben inhibitorischen Funktionen induziert IL-10 aber auch die Zelldifferenzierung und Zellproliferation von B-Zellen und reduziert die Expression von IgG4.²⁹²

1.3.3 Einfluss des Hepatitis C Virus auf IL-1 β und IL-10

IL-1 β ist als pro-inflammatorisches Zytokin stark an der Pathogenese des Hepatitis C Virus beteiligt. Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion weisen im Vergleich zu gesunden

Patienten im Serum erhöhte IL-1 β Level auf. Durch Immunohistochemische Analysen konnte belegt werden, dass intrahepatische Makrophagen (Kupffer-Zellen) für die Produktion von IL-1 β während einer HCV-Infektion verantwortlich sind.³⁰¹ Diese IL-1 β -Sekretion wird durch eine HCV-vermittelte Aktivierung der Caspase-1 induziert. Hierzu wird das Hepatitis C Virus durch Phagozytose, CD81-unabhängig, in die Makrophagen internalisiert. Die virale RNA des Virus leitet die MyD88-vermittelte Signaltransduktionskaskade des *Toll-like receptor 7* (TLR7) zur mRNA-Expression von IL-1 β ein. Parallel induziert HCV einen Kalium-Efflux, der wiederum das NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containig 3*) Inflammasom zur IL-1 β Prozessierung und Sekretion aktiviert.³⁰¹ Detaillierte Studien zur Induktion der HCV-abhängigen IL-1 β Sekretion in HCV-infizierten Hepatozyten beschreiben die Involvierung der pro-proteolytischen Prozessierung von pro-Caspase-1 in die reife Caspase-1 in einem Multiprotein-Inflammasom-Komplex. Der HCV-vermittelte Zusammenbau des Inflammasom-Komplexes benötigt hierbei zum einen die Rekrutierung des Adaptorproteins ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) sowie reaktive Sauerstoffspezies und die daraus resultierende, verstärkte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B.³⁰²

Des Weiteren konnte eine Herabregulation der mRNA-Expression von IL-10 in Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion belegt werden.³⁰³ Diese steht in engem Zusammenhang mit der HCV-vermittelten Pathogenese, Fibrogenese sowie der Resistenz des Virus gegen Interferon-basierte Therapien.³⁰⁴

1.3.4 Chemokine

Chemokine sind kleine Signalproteine mit einer Molmasse zwischen 8 und 14 kDa, die von unterschiedlichen Zellen sekretiert werden. Sie besitzen vier Cysteine an konservierten, definierten Positionen, die essentiell für die Ausbildung ihrer hoch konservierten 3-dimensionalen Tertiär-Struktur sind.³⁰⁵ Die Anzahl und Lokalisation der Cysteine bedingt die systemische Nomenklatur der Chemokine, weshalb sie in vier Unterfamilien gegliedert werden.³⁰⁶ Die C-Chemokine besitzen ein konserviertes Cystein am Aminotermius und bilden dementsprechend nur eine Disulfidbrücke aus. Die CC-Chemokine werden durch zwei direkt aufeinanderfolgende Cysteine am Aminotermius charakterisiert. Bei den CXC-Chemokinen werden die beiden Cysteine am Aminotermius durch eine Aminosäure und bei den CX3C-Chemokinen durch drei Aminosäuren voneinander separiert. Die letzten drei Chemokin-Unterfamilien bilden jeweils zwei Disulfidbrücken aus.^{306,307} Die schematische Darstellung der Struktur der Chemokin-Unterfamilien ist der Abbildung 9 zu entnehmen.

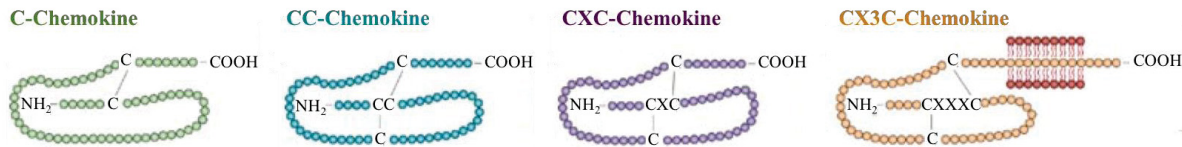


Abbildung 9: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der Chemokin-Unterfamilien. Die Herleitung der systemischen Nomenklatur der Chemokine in die vier Unterfamilien ist abhängig von der Anzahl und Lokalisation der konservierten Cysteine. Die C-Chemokine (grün dargestellt) besitzen ein Chemokin am Aminoterminus und bilden eine Disulfidbrücke aus. Die CC-Chemokine (türkis dargestellt) weisen zwei Cysteine am Aminoterminus auf, welche direkt aufeinander folgen, während sie bei den CXC-Chemokinen (lila dargestellt) durch eine Aminosäure und bei den CX3C-Chemokinen (orange dargestellt) durch drei Aminosäuren voneinander getrennt werden. Die letzten drei Unterfamilien bilden jeweils zwei Disulfidbrücken aus. Abkürzungen: C: konserviertes Cystein, X: beliebige Aminosäure, Strich: Disulfidbrücke. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Neuroscience, Rostène *et al.*, 2007,³⁰⁷ Copyright (2007).

Man unterscheidet inflammatorische Chemokine, deren Expression beispielsweise in Antwort auf eine Entzündung, auf virale oder bakterielle Infektionen oder auf Verletzungen induziert wird, und homöostatische Chemokine, die konstitutiv exprimiert werden.³⁰⁵ Inflammatorische Chemokine sind wesentlich an der Rekrutierung von Immunzellen ins Gewebe durch Chemotaxis involviert, während homöostatische Chemokine beispielsweise an der Angiogenese oder der Ausbildung von lymphoidem Gewebe beteiligt sind.³⁰⁵ Hierbei induzieren sie ihre Wirkung durch die Bindung an spezifische G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren, bestehend aus sieben transmembranen Helices, einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne und einem zytoplasmatischen Carboxy-Terminus mit zahlreichen Serin- und Threoninresten.^{305,308} Die Aktivierung der Chemokinrezeptoren induziert zahlreiche Signaltransduktionskaskaden, unter anderem den MAPK- oder PI3K/Akt-Signalweg. Hierdurch werden Mechanismen wie Chemotaxis und Zellmigration sowie die Kommunikation des Immunsystems während einer Entzündung und einer Immunantwort reguliert.^{309,310}

1.3.4.1 CXC-Chemokine

Bislang sind 17 Mitglieder der CXC-Chemokine des Menschen bekannt. Sie sind charakterisiert durch die Präsenz oder Absenz eines sogenannten ELR-Motivs. Dieses ELR-Motiv besteht aus der präferenziellen Abfolge der drei Aminosäuren Glutamin, Leucin und Arginin.^{311,312} Chemokine mit einem präsenten ELR-Motiv, darunter CXCL1, CXCL2, CXCL3 sowie CXCL8, induzieren unter anderem die Zellproliferation und wirken pro-angiogenetisch durch die Bindung an ihre spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2.^{312,313} CXC-Chemokine, denen das ELR-Motiv fehlt, unter anderem CXCL9, CXCL10

sowie CXCL11, entfalten ihre Wirkungen durch Bindung an die spezifischen Chemokinrezeptoren CXCR3 bis CXCR7 und inhibieren die Zellproliferation und Angiogenese.^{312,313} Rezeptoren der CXC-Chemokine sind vorwiegend auf neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten lokalisiert.³¹⁴ Die Produktion der CXC-Motiv-Chemokine erfolgt insbesondere durch neutrophile Granulozyten, Makrophagen sowie Epithel- und Endothelzellen.^{315,316} Sie induzieren im Wesentlichen die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten zum Ort der Infektion sowie die Angiogenese.^{315,317}

1.3.5 Einfluss des Hepatitis C Virus auf die CXCR2-Liganden CXCL1 bis CXCL3

Das Hepatitis C Virus moduliert die Expression der Chemokine zur Etablierung einer persistierenden Infektion sowie zur Inhibierung der antiviralen Immunantwort des Wirts auf unterschiedliche Weise.³¹⁰ Besonders entzündliche CXC- sowie CC-Chemokine werden während einer chronischen HCV-Infektion im peripheren Blut als auch in der Leber verstärkt exprimiert.³¹⁸ Der genaue molekulare Mechanismus der Regulation der Chemokinexpressionen durch das Hepatitis C Virus ist bislang weitgehend unbekannt und wird im Rahmen umfangreicher Analysen in dieser Arbeit untersucht.

Während einer HCV-Infektion konnten bereits erhöhte Plasmakonzentrationen von den CXCR2-Liganden CXCL1 bis CXCL3 sowie CXCL8 in HCV-infizierten Patienten vom Genotyp 1 nachgewiesen werden.³¹⁹ Diese stehen in engem Zusammenhang mit der Fibrogenese in HCV-infizierten Patienten.^{318,319} Weitere Studien belegen zudem, dass CXCL1 mit dem Allel rs4074 ein starker genetischer Risikofaktor für die Entstehung von Leberzirrhose in HCV-infizierten Patienten darstellt.³²⁰

HCV führt des Weiteren zu einer Translokation von NF- κ B in den Nukleus und induziert hier direkt die Expression der Chemokine MCP-1 und CXCL2 in primären Hepatozyten.³²¹

Der CXC-Rezeptor 2 (CXCR2) ist in der Tumorangiogenese, Tumorgenese und der Metastasierung von zahlreichen humanen Krebsarten, darunter Lungenkrebs oder pankreatischer Karzinome involviert.^{322,323}

Des Weiteren konnte eine verstärkte Expression von CXCL1 in hepatozellulären Karzinomen sowie eine CXCL1-vermittelte Regulation der Infiltration von CXCR2-positiven neutrophilen Granulozyten in hepatozelluläre Karzinome nachgewiesen werden. Die Korrelation zwischen CXCR2 und CXCL1 sowie der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten stellt ein wichtiges Angriffsziel für die Therapie hepatozellulärer Karzinome dar.³²⁴

1.3.6 Einfluss des Hepatitis C Virus auf den CXCR2-Liganden CXCL8

CXCL8 wird von zahlreichen Zellen, darunter hauptsächlich Monozyten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen sowie Fibroblasten unter physiologischen Bedingungen in geringen Mengen sekretiert.³²⁵ In der Leber wird die Sekretion von CXCL8 führend von Kupffer-Zellen, Hepatozyten und LSECs (*liver sinusoidal endothelial cells*) durch spezifische Stimuli induziert.¹⁵⁵ Hierzu zählen pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- α oder IL-1,³²⁶ sowie oxidativer Stress,³²⁷ aber auch bakterielle³²⁸ und virale Infektionen³²⁹ führen zu einem Anstieg der CXCL8-Expression, während es in gesundem Gewebe lediglich in geringen Mengen nachweisbar ist.³²⁵ Hierbei induziert TNF- α CXCL8 um das 100-fache, während EGF beispielsweise zu einer 5 bis 10-fach verstärkten CXCL8-Expression führt.³²⁵ CXCL8 spielt ebenso wie die anderen CXCR2-Liganden eine essentielle Rolle bei der Angiogenese, Metastasierung und Tumorgenese sowie bei der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Es vermittelt seine Funktionen durch die Bindung an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2.³³⁰ Die Regulation der Expression von CXCL8 ist ERK-, JNK-, und p38^{MAPK}-abhängig. Durch spezifische Bindungsstellen im CXCL8-Promotor sind die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B sowie C/EBP in die Aktivierung der Transkription involviert.³²⁵ Die Stabilisierung der mRNA ist ebenfalls an der Regulation der CXCL8-Expression beteiligt und erfolgt posttranslational sowie p38^{MAPK}-vermittelt.³²⁵

Auch im Rahmen einer HCV-Infektion konnte eine verstärkte CXCL8-Expression sowie eine Stabilisierung der mRNA von CXCL8, induziert durch das virale Nicht-Strukturprotein NS5A, sowie eine HCV-vermittelte Überexpression von CXCL8 in Antwort auf TNF- α nachgewiesen werden. Diese wird mit der Pathogenese des Virus sowie der partiellen Inhibition der IFN- α -induzierten antiviralen Immunantwort assoziiert.^{331,332} Des Weiteren wurde auch eine verstärkte IL-1 α -abhängige Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, darunter IL-6 und CXCL8, durch Ko-Kultivierung von hepatischen Sternzellen mit HCV-infizierten Hepatozyten, *in vitro* nachgewiesen.³³³

1.4 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B, auch als *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, bekannt, wurde erstmals 1986 von Sen und Baltimore als ein nukleäres Protein charakterisiert, welches mit der Sequenz des *kappa B-enhancers* der leichten Kette der Immunglobuline von B-Zellen interagiert.³³⁴ NF- κ B wird ubiquitär von nahezu allen Zelltypen

exprimiert und von mehr als 150 Stimuli induziert sowie aktiviert. Hierzu gehören freie Radikale, zellulärer Stress, aber auch bakterielle und virale Antigene.³³⁵ Als Transkriptionsfaktor reguliert es ein komplexes Repertoire an Zielgenen, darunter Chemokine, inflammatorische Zytokine sowie Rezeptoren des Immunsystems und übernimmt eine bedeutende Rolle in der Regulation von zahlreichen physiologischen, zellulären Prozessen, wie angeborenen und adaptiven Immunantworten, der Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie die Inhibierung von Apoptose.³³⁵

1.4.1 Die NF- κ B/Rel-Protein-Familie

NF- κ B umfasst eine Familie der sogenannten Rel-Proteine. Hierbei handelt es sich um eine in Vertebraten strukturell verwandte, heterogene Gruppe von fünf Mitgliedern, zu denen RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) und NF- κ B2 (p52/p100) gehören.^{336,337} Zur Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren, zur Interaktion mit der DNA sowie zur nukleären Translokation und Wechselwirkung mit den I κ B-Inhibitor-Proteinen, weisen die Rel-Proteine eine hoch konservierte, N-terminal lokalisierte *Rel-homology domain* (RHD) auf. Diese Rel-Domäne umfasst jeweils 300 Aminosäuren.^{338,339} NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52), mit dem charakteristischen Ankyrin-reichen Motiv, entstehen durch proteolytische Prozessierung über die Vorläuferproteine p105 und p100.^{338,339} Sie bilden sowohl Homo- als auch Heterodimere aus, wobei sie als Homodimere die Transkription inhibieren und als Heterodimere mit den Proteinen RelA, RelB und c-Rel und ihrer C-terminal lokalisierten Transaktivierungs-Domäne die Transkription der entsprechenden Zielgene aktivieren.³⁴⁰ RelB bildet jedoch nur Heterodimere mit p50 und p52.³⁴¹ RelA, RelB und c-Rel werden direkt als reife Proteine synthetisiert und wirken als Aktivatoren der Transkription durch ihre Transaktivierungs-Domäne.^{338,339} Die schematische Darstellung der NF- κ B/Rel-Protein-Familie ist der Abbildung 10 zu entnehmen.

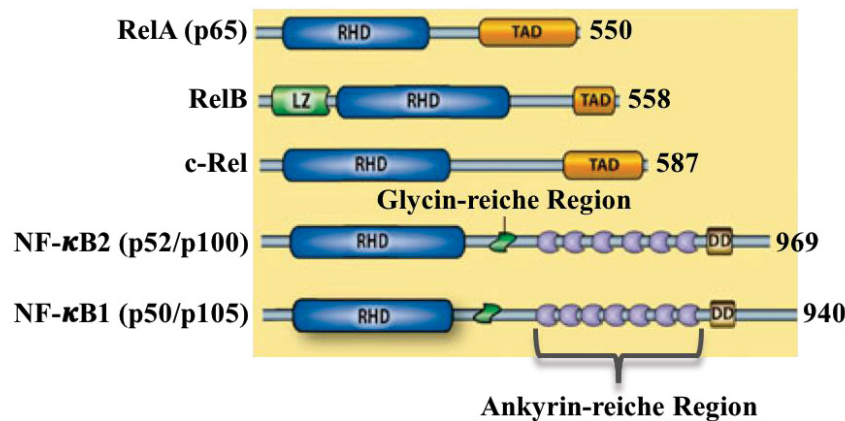


Abbildung 10: Schematische Darstellung der NF-κB/Rel-Protein-Familie. Die Familie der NF-κB/Rel-Proteine umfasst fünf Mitglieder. Zu diesen Mitgliedern gehören RelA(p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p50/p105) und NF-κB2 (p52/p100). Alle Mitglieder werden durch eine am N-Terminus lokalisierte RHD, bestehend aus 300 Aminosäuren, charakterisiert. Die RHD ist verantwortlich für die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren, zur DNA-Bindung, Kerntranslokation und Interaktion mit den inhibitorischen IκB-Proteinen. Die proteolytische Spaltung von p50 und p52 aus den Precursor-Proteinen p105 und p100 erfolgt hinter der Glycin-reichen Region. p50 und p52 werden durch eine Ankyrin-reiche Region sowie eine DD charakterisiert. Die Proteine RelA, RelB und c-Rel besitzen eine TAD, RelB weist zudem eine LZ auf. Abkürzungen: DD: *death domain*; LZ: *leucin-zipper domain*; RHD: *Rel-homology domain*; TAD: Transaktivierungs-Domäne. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Cell Research, Hayden und Gosh, 2011,³³⁸ Copyright (2011).

Die gebildeten NF-κB-Dimere interagieren nur mit spezifischen Sequenz-Motiven der DNA, den sogenannten B-Elementen. Diese umfassen die Aminosäuren-Abfolge 5'-GGGRNWYYCC-3', wobei R Adenin/Guanin, N eine beliebige Aminosäure, W Adenin/Thymin und Y Cytosin/Thymin repräsentiert. Aufgrund der starken Variabilität entstehen mehrere Varianten des Motivs, wovon jeweils eine Variante von einem gebildeten NF-κB-Dimer spezifisch gebunden wird. Auf diese Weise wird die transkriptionelle Regulation der entsprechenden Zielgene sichergestellt, da je nach Kondition unterschiedliche NF-κB-Dimere gebildet werden.³⁴²

1.4.2 Die IκB-Proteine

Durch Interaktion mit den inhibitorischen IκB-Proteinen wird die Aktivität der NF-κB-Dimere im Zytoplasma reguliert. Die bislang acht beschriebenen Mitglieder dieser Protein-Familie werden durch ein strukturelles Motiv aus fünf bis sieben *ankyrin repeats*, die C-terminal lokalisiert vorliegen, charakterisiert. Diese Ankyrin-reichen Wiederholungen sind erforderlich für die Wechselwirkung mit der Rel-Domäne der NF-κB-Dimere. Die Gliederung der acht IκB-Proteine erfolgt in zwei Klassen. Die erste Klasse umfasst die zytosolischen Proteine IκBα,

I κ B β und I κ B ϵ sowie die aus Precursor-Proteinen prozessierten Proteine I κ B γ (p105) und I κ B δ (p100). Zur zweiten Klasse gehören hingegen die untypischen Proteine I κ B ζ , I κ B_{NS} sowie BCL-3. Die erste Gruppe mit den klassischen I κ B-Proteinen ist hauptsächlich für die negative Regulation der im Zytoplasma lokalisierten NF- κ B-Dimere verantwortlich, die in dem inhibitorischen Komplex nicht nukleär transloziert werden können. Abhängig vom zellulären Stimulus werden sie degradiert, die NF κ B-Dimere aktiviert und entsprechend in den Zellkern transloziert. Sie besitzen strukturelle Ähnlichkeiten. Am N-Terminus weisen sie drei spezifische Phosphorylierungs-Motive auf, die für die Degradierung der I κ B-Proteine erforderlich sind, sowie eine am C-Terminus lokalisierte Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiche Region, die sogenannte PEST-Domäne, zur Stabilisierung der Proteine. Die Induktion der Expression der zweiten Klasse, mit den untypischen I κ B-Proteinen, erfolgt Stimulus-abhängig. Sie sind insbesondere im Nukleus lokalisiert und übernehmen hier NF- κ B-inhibitorische Funktionen und wirken zudem auch als Aktivatoren der Transkription NF- κ B-abhängiger Zielgene.^{338,343} Das Modell der I κ B-Proteine ist in der Abbildung 10 dargestellt.

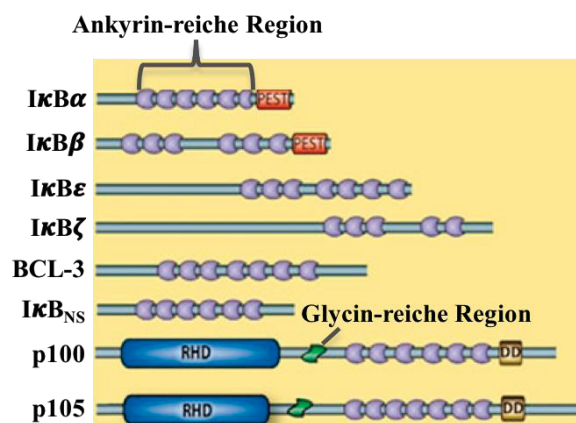


Abbildung 11: Modell der I κ B-Protein-Familie. Acht Mitglieder gehören zur I κ B-Protein-Familie. Die Mitglieder werden durch fünf bis sieben Ankyrin-reiche-Sequenzwiederholungen charakterisiert. Diese *ankyrin repeats* sind erforderlich für die Wechselwirkung mit der RHD der NF- κ B-Dimere. Die erste Klasse der Protein-Familie umfasst die typischen I κ B-Proteine I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ sowie die aus den Vorläuferproteinen synthetisierten Proteine I κ B γ (p105) und I κ B δ (p100). Zu den untypischen, nukleär lokalisierten I κ B-Proteinen gehören I κ B ζ , I κ B_{NS} sowie BCL-3. Abkürzungen: PEST: Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiche Region; RHD: *Rel-homology domain*. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Cell Research, Hayden und Gosh, 2011,³³⁸ Copyright (2011).

Aufgrund der unvollständigen Abdeckung der Kernlokalisierungssequenz der NF- κ B-Dimere durch das I κ B α -Protein und dessen eigener nukleärer Export-Sequenz (NES), wandern diese Komplexe Stimulus-unabhängig zwischen Zytoplasma und Nukleus hin und her. Die Freisetzung der NF- κ B-Dimere erfolgt nach Stimulierung der Zelle durch Phosphorylierung

und proteasomalen Abbau von I κ B α . Die NF- κ B-Dimere werden in den Zellkern transloziert und induzieren die Transkription der entsprechenden Zielgene. Die Exportierung der NF- κ B-Dimere aus dem Zellkern zurück ins Zytoplasma erfolgt ebenfalls durch Interaktion mit I κ B α -Proteinen, da die I κ B α -Neusynthese direkt nach der Aktivierung der NF- κ B-Dimere induziert wird. Hierzu besitzt I κ B α im kodierenden Gen ein I κ B-Motiv. Auf diese Weise entsteht ein negativer *feedback* Mechanismus zwischen der NF- κ B-Aktivierung und der I κ B α -Neusynthese.^{342,343} I κ B α bindet hochaffin NF- κ B-Heterodimere, bestehend aus p50 und p65. Hierbei maskiert es lediglich die Kernlokalisierungssequenz von p65. Ebenso bindet I κ B β bevorzugt die Heterodimere p50/p65 von NF- κ B, jedoch maskiert es, im Gegensatz zu I κ B α , beide Kernlokalisierungssequenzen.³⁴⁴

1.4.3 Aktivierung der NF- κ B-Signalwege

NF- κ B-Dimere liegen in den meisten ruhenden Zellen im Zytoplasma in einem inaktiven Komplex mit den inhibitorischen, klassischen I κ B-Proteinen I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ vor. Auf diese Weise wird die Kernlokalisierungssequenz der NF- κ B-Dimere maskiert und die nukleäre Translokation unterbunden. Die Aktivierung der NF- κ B-Dimere erfolgt durch mehr als 150 verschiedene Stimuli, darunter die inflammatorischen Zytokine IL-1 β oder TNF- α oder virale und bakterielle Antigene.³³⁵ Die Aktivierung der NF- κ B-Dimere kann über zwei Wege erfolgen, den klassischen, kanonischen Signalweg sowie den alternativen, nicht-kanonischen Signalweg. Die Degradierung der I κ B-Proteine durch Stimulus-abhängige Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK) ist jeweils bei beiden Signalkaskaden der initiale Schritt der Freisetzung der NF- κ B-Dimere. Diese führen zunächst zur Phosphorylierung der I κ B-Proteine und schließlich zum proteasomalen Abbau derselben durch Ubiquitinylierung.³⁴² Auf diese Weise werden die NF- κ B-Dimere aktiviert und in den Zellkern transloziert, in dem sie schließlich die Expression der entsprechenden Zielgene induzieren. Der IKK setzt sich aus katalytischen Untereinheiten der Kinasen IKK α und/oder IKK β sowie einem *NF- κ B essential modulator* (NEMO) zusammen.³⁴²

Der klassische, kanonische NF- κ B-Signalweg wird durch Bindung der entsprechenden Stimuli, darunter TNF- α oder IL-1 β , an die spezifischen Rezeptoren induziert. Hierbei wird IKK- β durch Phosphorylierung der spezifischen Serinreste an den Positionen 177 und 181 aktiviert, was schließlich zur Phosphorylierung der klassischen I κ B-Proteine I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ führt.³⁴⁵ Hierbei werden die Serine an den Positionen 32 und 36 des I κ B α -Proteins phosphoryliert. Durch die E3-Ubiquitin-Ligase SCF/ β TRCP kommt es schließlich zur Ubiquitinylierung von I κ B α und zur Markierung für die resultierende Degradierung durch das

26S-Proteasom.³⁴⁶ Durch den klassischen Signalweg werden insbesondere NF- κ B-Dimere bestehend aus p50 und RelA aktiviert.^{342,347} Das Modell des klassischen NF- κ B-Signalweges ist der Abbildung 12A zu entnehmen.

Über den nicht-kanonischen, alternativen Signalweg werden hauptsächlich p100/RelB-Komplexe aktiviert. Die entsprechenden Stimuli, Lymphotoxin- oder der *B-cell activating factor* (BAFF) führen durch Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren zur Phosphorylierung der Serine an den Positionen 809, 812 und 815 der *NF- κ B-inducing kinase* (NIK). Diese Aktivierung resultiert wiederum in der Phosphorylierung des IKK, der IKK- α und IKK- β , aber kein NEMO besitzt. Durch den aktivierten IKK werden zwei Serinreste, welche direkt auf die *ankyrin repeats* des C-Terminus der IB-Domäne von p100 folgen, phosphoryliert. Dies resultiert in der partiellen Proteolyse zu p52 und der Freisetzung des p52/RelB-Komplexes.^{342,347} Das Modell des alternativen NF- κ B-Signalweges ist in der Abbildung 12B abgebildet.

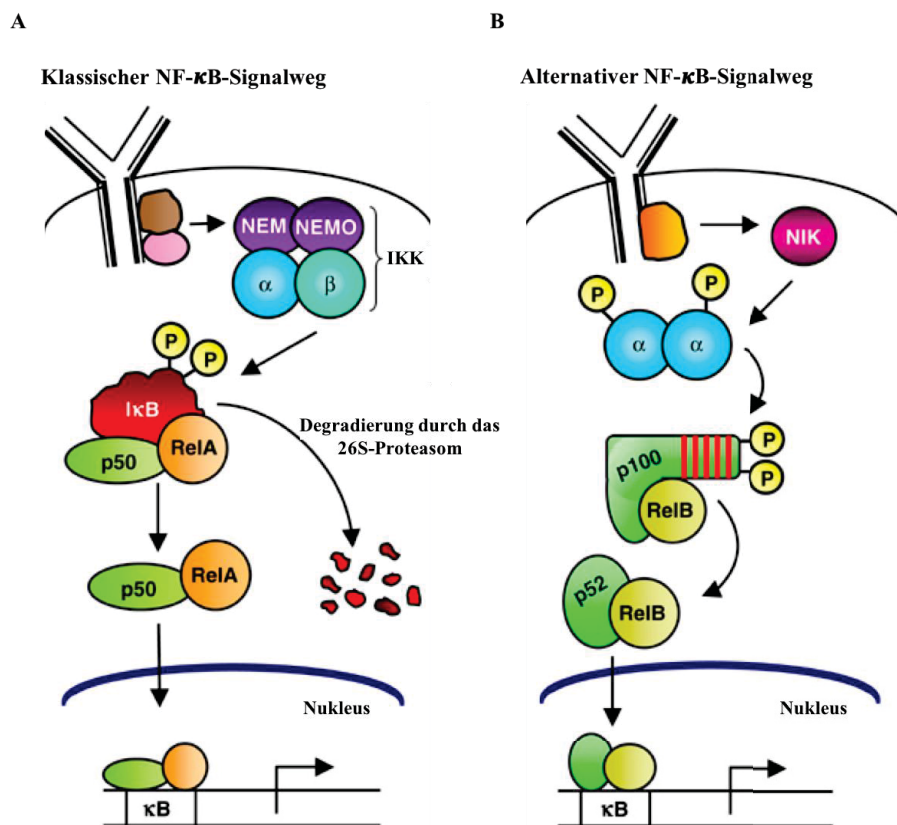


Abbildung 12: Modell der NF- κ B-Signalwege. A Aktivierung der NF- κ B-Dimere p50/RelA durch den klassischen, kanonischen Signalweg. Die Induktion wird durch inflammatorische Zytokine, darunter TNF- α , IL-1 β oder auch LPS, ausgelöst. Die Rezeptor-Liganden-Bindung resultiert in der Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes, aufgebaut aus IKK- α und/oder IKK- β sowie NEMO. Der aktivierte IKK resultiert in der Phosphorylierung von I κ B α an zwei spezifischen Serinresten. I κ B β und I κ B ϵ können Zelltyp-abhängig ebenfalls

phosphoryliert werden. Die resultierende Ubiquitylierung führt zur proteasomalen Degradierung von I κ B α und schließlich zur Freisetzung und nukleären Translokation der NF- κ B-Dimere, die wiederum die Transkription der entsprechenden Zielgene induzieren. **B** Aktivierung der NF- κ B-Dimere, hauptsächlich p100/RelB, durch den alternativen, nicht-kanonischen Signalweg, der durch Stimuli wie Lymphotoxin-B und BAFF induziert wird. IKK wird durch NIK phosphoryliert. Der aktivierte IKK phosphoryliert wiederum p100 und induziert die partielle Proteolyse zu p52. Die auf diesem Weg freigesetzten NF- κ B-Dimere aus p52/RelB translozieren in den Nukleus und aktivieren die Expression der entsprechenden Zielgene. Abkürzungen: BAFF: *B-cell activating factor*, IKK: I κ B α -Kinase-Komplex, NEMO: *NF- κ B essential modulator*, NIK: *NF- κ B-inducing kinase*. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Oncogene, Gilmore 2006,³⁴² Copyright (2006).

1.4.4 Interaktionen des Hepatitis C Virus mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B

Während einer Hepatitis C Virus Infektion kommt es zu zahlreichen Interaktionen der viralen Nicht-Strukturproteine mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B. NF- κ B kann beispielsweise indirekt NS5A-vermittelt durch oxidativen Stress aktiviert werden. Hierbei modifiziert NS5A den intrazellulären Calcium-Spiegel, welcher eine Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies in die Mitochondrien bewirkt und letztlich in der Freisetzung, der nukleären Translokation sowie der konstitutiven Aktivierung von NF- κ B resultiert.¹⁹⁴ NS5A moduliert hierzu den klassischen NF- κ B-Signalweg in Antwort auf oxidativen Stress. NS5A und das subgenomische Replikon aktivieren im Zytoplasma lokalisierte NF- κ B-Dimere nicht durch Phosphorylierung der beiden Serinreste 32 und 36 in dem inhibitorischen I κ B α -Protein, sondern durch Tyrosin-Phosphorylierung an den Positionen 42 und 305, welches die Degradierung von I κ B α , vermutlich durch die Calpain-Protease, induziert.¹⁹⁵ Diese NS5A-abhängige konstitutive Aktivierung von NF- κ B steht hierbei in enger Assoziation mit der Pathogenese der Leber, darunter die Entstehung hepatozellulärer Karzinome.^{194,195}

Das Hepatitis C Virus ist zudem in der Lage eine direkte NF- κ B-Aktivierung durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B zu vermitteln. Eine verstärkte Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalweges durch eine zunehmende NS5B-induzierte Expression von Lymphotoxin-B ist nachgewiesen. Zudem beschreiben Simonin *et al.*, 2013 die Reduktion der Karzinogenese durch die Inaktivierung von IKK- β in FL-N/35 HCV-transgenen Mäusen.³⁴⁸ Die transiente Expression von NS5B führt des Weiteren in humanen Hepatozyten und in der Maus-Leber zur Synthese kleiner RNA-Spezies. Diese induzieren die Aktivierung von NF- κ B, welches wiederum die Expression von Typ I Interferonen und Interleukin-6 induziert.³⁴⁹ Brenndörfer *et al.*, 2010 konnten in NS3/4A transgenen Mäusen eine verstärkte Expression von TNF- α und CCL2 nachweisen. Auf diese Weise kommt es ebenfalls NS3/4A-abhängig zu einer

gesteigerten Aktivierung von NF- κ B, was wiederum Apoptose inhibiert sowie die Regeneration von Hepatozyten stimuliert.¹⁵⁶ Des Weiteren reguliert NS3 NF- κ B-vermittelt die Gen-Promotor-Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2).³⁵⁰ Zudem führt das HCV Viroporin p7 zur einer verstärkten Induktion und Sekretion von IL-1 β in Kupffer-Zellen, welche ebenfalls durch den NF- κ B-Signalweg vermittelt wird.³⁵¹ Der NF- κ B-Signalweg wird durch zahlreiche Viren modifiziert, darunter auch das Hepatitis B Virus (HBV) sowie das Humane Immundefizienz Virus (HIV). Das Core-Protein des HBV verstärkt die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B und auf diese Weise vermutlich, als positiver, transkriptioneller Aktivator, die virale Replikation in Hepatozyten.³⁵² Außerdem reguliert NF- κ B die HIV Genexpression in Monozyten und stimuliert den HIV Enhancer in T-Zellen.³⁵³

1.5 Das Humane Immundefizienz Virus

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) wurde erstmals von Barré-Sinoussi *et al.*, sowie Gallo *et al.*, 1983 isoliert und als Retrovirus des *human T cell leukemia virus* (HTLV), welches die erworbene Immunschwäche AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) induziert, charakterisiert.^{354,355} Bereits im Jahr 1981 wurden Symptome einer immunologischen Dysfunktion bei fünf homosexuellen Männern beobachtet, die später als die erworbene Immunschwäche AIDS beschrieben wurde, ohne den Erreger dabei zu identifizieren.^{356,357} Im Jahr 1986 wurde der Erreger von AIDS als HI-Virus deklariert.³⁵⁸

Nach Schätzungen der WHO und UNAIDS sind weltweit etwa 36,9 Millionen Menschen mit dem Humanen Immundefizienz Virus infiziert. Jährlich sterben etwa 1,2 Millionen Menschen an HIV-bedingten Folgeerkrankungen.^{359,360} 70 % der weltweit HIV-infizierten Patienten leben in Subsahara-Afrika.³⁶⁰ Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts sind in Deutschland etwa 83.400 Menschen mit dem HI-Virus infiziert.³⁶¹

1.5.1 Der Infektionszyklus

Das Humane Immundefizienz Virus wird in die Gattung *Lentivirus* der Familie der *Retroviridae* eingeordnet.³⁶² Bislang sind innerhalb der Lentiviren nur die beiden Genotypen HIV-1 und HIV-2 als humanpathogene Viren bekannt.³⁶³ Hierbei ist HIV-1 weltweit am stärksten vertreten.³⁶⁴ Innerhalb der *Retroviridae* nehmen die Viruspartikel mit ihren konischen Kapsiden eine Sonderstellung ein. Die komplexen retroviralen HIV-1 Virionen haben einen Durchmesser von etwa 120 nm und enthalten das virale Genom, bestehend aus zwei identischen, einzelsträngigen RNA-Molekülen mit einer Größe von etwa 9,75 kb. Das Nukleokapsid, welches das virale Genom enthält, wird von einer Lipidmembran umgeben, die sich aus

wirtsspezifischen und etwa 72 viralen Glykoproteinen zusammensetzt.³⁶⁵ Die Glykoproteine bestehen jeweils aus einer transmembranen gp41 und einer externen gp120 Untereinheit, welche die Spikes des HI-Virus formen.^{366,367}

Das Humane Immundefizienz Virus ist in der Lage CD4⁺ T-Zellen, Monozyten, Makrophagen³⁶⁸ und auch dendritische Zellen zu infizieren.³⁶⁹ Der initiale Schritt der HIV-Infektion ist die virale Bindung an die Zielzelle. Hierzu interagieren zunächst das virale Glykoprotein gp120 mit dem wirtsspezifischen Oberflächenrezeptor, dem 58 kDa großen monomeren Glykoprotein CD4.^{370,371} Diese Wechselwirkung hat zudem pro-apoptotische Wirkungen auf die CD4⁺ T-Zellen.³⁷² Des Weiteren benötigt das HI-Virus für den Eintritt in die Zelle den *chemokine cc-motif receptor 5* (CCR5)³⁷³ oder den *chemokine CXC-motif receptor 4* (CXCR4).^{368,374} Die Interaktion von gp120 und dem primären Rezeptor CD4 bedingt eine Konformationsänderung in gp120 und ermöglicht die Bindung an den Ko-Rezeptor CCR5 oder CXCR4 sowie die Komplexbildung mit dem transmembranen Glykoprotein gp41. Die Erkennung der Ko-Rezeptoren ist durch zahlreiche strukturelle Elemente in gp120 charakterisiert, darunter dessen hypervariable Regionen V1 bis V2 sowie ein anti-paralleles, 5-strängiges β -Faltblatt, welches die innere und äußere Domäne von gp120 verbindet, der sogenannte V3-Loop. Hierbei ist der V3-Loop durch seine starke Variabilität die wichtigste Komponente für die Ko-Rezeptor-Spezifität.³⁷⁵ Eine weitere Konformationsänderung in dem gebildeten Komplex aus gp120 und gp41 resultiert in der Exposition der Fusions-Proteine von gp41. Folglich kommt es zur Verankerung der *membrane-spanning-domain* (MSD) mit dem spezifischen Aminosäuresequenz-Motiv GGXXG, G repräsentiert hierbei Glycin und X eine beliebige Aminosäure, in der Wirtsmembran³⁷⁶ und zur Fusion der viralen mit der zellulären Lipidmembran, was schließlich zur Internalisierung des Virus in die Wirtszelle führt.^{375,377} Das Modell des HIV-Eintritts in seine Wirtszelle durch die Interaktion mit zellulären Oberflächenrezeptoren ist der Abbildung 13 zu entnehmen.

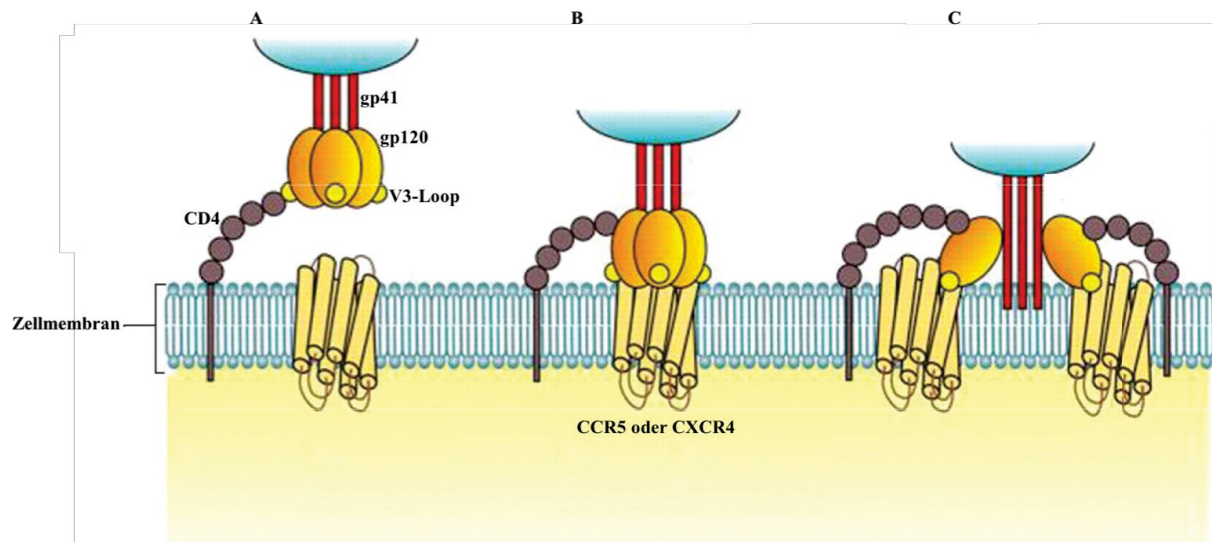


Abbildung 13: Modell des HIV-Eintritts in die Wirtszelle durch Interaktion mit zellulären Oberflächenrezeptoren. Zum Eintritt des Humanen Immundefizienz Virus in die Wirtszelle erfolgt die Interaktion von viralen Glykoproteinen mit zellulären Oberflächenrezeptoren. **A** Der initiale Schritt der HIV-Bindung an die Wirtszelle basiert auf der Wechselwirkung zwischen dem viralen Protein gp120 und dem zellulären CD4-Rezeptor. **B** Durch die gp120-CD4-Interaktion-bedingte Konformationsänderung in gp120 erfolgt die spezifische Bindung an den zellulären Chemokinrezeptor CCR5 oder CXCR4 durch strukturelle Elemente in gp120, darunter der V3-Loop, sowie die Komplexbildung mit dem viralen, transmembranen Glykoprotein gp41. **C** Fusion der viralen und zellulären Membran durch eine weitere Konformationsänderung in dem gp120/gp41-Komplex, woraufhin die erforderlichen Fusions-Proteine in gp41 freigelegt werden. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Vandekerckhove L, Verhofstede C, Vogelaers D. Maraviroc: perspectives for use in antiretroviral-naïve HIV-1-infected patients. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2009; 63(6): 1087–1096,³⁷⁵ Oxford University Press, Copyright (2009).

1.6 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten dient zur Abwehr von Pathogenen, darunter Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten. Hierzu muss es prinzipiell vier Hauptaufgaben erfüllen: die immunologische Erkennung der eingedrungenen Pathogene, die Regulation der Immunantwort, die Eindämmung der Infektion durch spezifische Effektorfunktionen, wie durch das Komplementsystem, sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses zum lebenslangen Schutz einer Reinfektion durch das gleiche Pathogen. Hierzu erfolgt die immunologische Reaktion gegenüber einer Infektion durch potenzielle Pathogene durch zwei Immunantworten: durch eine unspezifische, angeborene Immunantwort und durch eine spezifische, adaptive Immunantwort.³⁷⁸ Alle Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems entstehen aus einer gemeinsamen pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle (HSC) des blutbildenden Knochenmarks.³⁷⁹

Das angeborene, unspezifische Immunsystem umfasst hierbei die Granulozyten, die Makrophagen, die dendritischen Zellen, die Mastzellen und die NK-Zellen. Diese unspezifische Abwehr gegen ein breites Spektrum von Erregern reagiert schnell und steht dauerhaft zur Verfügung, ist jedoch limitiert effektiv gegen ein einzelnes Pathogen und ist nicht in der Lage eine lebenslange Immunität auszubilden.³⁷⁸ Es erkennt eingedrungene Pathogene durch evolutionär konservierte regelmäßige Muster von molekularen Strukturen, darunter Mannose-reiche Oligosaccharide, Lipopolysaccharide, doppelsträngige RNA, nichtmethylierte CpG-DNA oder Proteoglykane, die man zusammenfassend als *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) bezeichnet.³⁸⁰ Diese Muster werden durch keimbahnkodierte Rezeptoren, die einer klonalen Verteilung unterliegen und auf der Oberfläche spezifischer Zellen der angeborenen Immunität exprimiert werden, sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*), darunter Toll-like Rezeptoren,³⁸¹ erkannt.^{378,380}

B- und T-Lymphozyten sind hingegen Teil der adaptiven, spezifischen Immunität, welche durch aktivierte Zellen des angeborenen Immunsystem zeitverzögert induziert wird. Es zeichnet sich durch seine hohe Erkennungsspezifität von 10^8 Strukturen aus. Hierbei tragen ungeprägte Lymphozyten Antigenrezeptoren für jeweils eine einzige spezifische chemische Struktur. Durch somatische DNA-Rekombination entsteht jedoch ein großes, vielfältiges Repertoire an B-Zell- sowie T-Zell-Rezeptoren durch Millionen von Genvarianten, die für die Rezeptormoleküle kodieren. Durch klonale Selektion werden hierbei nur die Lymphozyten zur Proliferation und Entwicklung zu Effektorzellen aktiviert, deren Rezeptor mit dem spezifischen Antigen interagiert. Im Laufe der Reifung der Lymphozyten, entwickeln diese sich so zu hoch spezialisierten Zellen, die spezifisch gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind und eine Reinfektion mit demselben Pathogen durch ein immunologisches Gedächtnis vorbeugen. Durch die Sekretion von Antikörpern übernehmen B-Lymphozyten humorale und T-Zellen durch ihre membrangebundenen Rezeptoren zelluläre Immunantworten. Durch Störungen des adaptiven Immunsystems kann es zu Autoimmunkrankheiten oder Allergien kommen.³⁷⁸

1.6.1 Makrophagen als Teil der angeborenen Immunität

Makrophagen sind eine heterogene Gruppe mononukleärer Zellen und gehören zur angeborenen Immunität.³⁸² Sie entstehen, ebenso wie die Granulozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen, aus einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle.³⁷⁹ Makrophagen sind in fast allen Geweben lokalisiert und entwickeln sich aus einer Vorstufe, den Monozyten. Monozyten zirkulieren im Blut und reifen erst zu Makrophagen aus, sobald sie ins Gewebe einwandern.³⁸³ Der Phänotyp sowie die Funktion der unterschiedlichen Populationen der

Makrophagen ist dabei abhängig von dem lokalen Mikromilieu. Makrophagen sind langlebig und während der gesamten angeborenen und adaptiven Immunantwort aktiv und werden in Antwort auf Gewebeschädigung oder eine Infektion aktiviert.³⁸² Hierbei sind sie in zahlreiche immunologische, homöostatische und inflammatorische Prozesse involviert. Hierzu zählen die Phagozytose, Sekretion von Signalproteinen, wie Zytokine, Chemokine oder inflammatorische Moleküle, die Aktivierung von Zellen des Immunsystems durch Antigenpräsentation sowie die Mobilisierung der Zellen zu einer Immunantwort, aber auch die Zytotoxizität.^{382,383}

Die Differenzierung der Makrophagen in die unterschiedlichen Subpopulationen M1 und M2 (M2a, M2b und M2c) wird durch unterschiedliche Stimuli induziert. Die Subpopulationen unterscheiden sich dabei hinsichtlich der Expression von Rezeptoren, eines unterschiedlichen Sekretions- und Produktionsprofils von Zytokinen und Effektormolekülen sowie hinsichtlich der Funktion.³⁸² Die Namensgebung M1 und M2 basiert auf der induzierten Th1- und Th2-Antwort.³⁸⁴ Unabhängig von dieser Differenzierung können sie durch den Oberflächenmarker CD68 identifiziert werden.³⁸⁵

Die Differenzierung von Makrophagen in die Subpopulation M1 wird hauptsächlich durch IFN- γ alleine oder in Kombination mit LPS, TNF und GM-CSF induziert. Sie exprimieren klassischerweise hohe Mengen an IL-12 und IL-23, geringe Mengen an IL-10 sowie metabolische Arginine. Zudem produzieren sie große Mengen an *inducible nitric oxide synthetase* (iNOS) und sekretieren toxische, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale sowie inflammatorische Zytokine, darunter IL-1 β , IL-6 und TNF. Zudem induzieren sie Th1-typische, inflammatorische Antworten³⁸² und sind an der Erkennung sowie Zerstörung von Tumoren beteiligt.³⁸⁶ Des Weiteren inhibieren sie die Zellproliferation und führen zur Gewebeschädigung.³⁸⁴

Die M2-Makrophagen-Differenzierung wird hingegen insbesondere durch IL-4, IL-10 und IL-13, durch die Bindung von Immunkomplexen, sowie durch Glukokortikoid- und Secosteroid- (Vitamin D₃) Hormone induziert. Charakteristisch sekretieren sie große Mengen an IL-10 und geringe Mengen an IL-12 und IL-23. Des Weiteren exprimieren sie verstärkt Scavenger-, Mannose- und Galaktose-Rezeptoren. Sie fungieren als effektive Phagozyten und sind in die Th2-Antwort involviert.³⁸² M2-Makrophagen induzieren zudem die Zellproliferation und sind an der Regeneration und Reparatur von geschädigtem Gewebe beteiligt.^{382,384}

Die Regulation der Proliferation und Differenzierung der monozytären Zellen erfolgt hauptsächlich durch den ständig von Monozyten sezernierten *monocyte-colony stimulating*

factor M-CSF.^{383,387} Durch M-CSF induzierte Makrophagen weisen charakteristische Eigenschaften der Subpopulation M2 auf.³⁸³

1.6.2 Neutrophile Granulozyten als Teil der angeborenen Immunität

Beim Menschen machen neutrophile Granulozyten den größten Anteil der Leukozyten aus. Sie werden durch einen polymorphkernigen, segmentierten Nukleus charakterisiert und gehören, ebenso wie die Makrophagen, zur angeborenen Immunität. Hierbei richtet sich die immunologische Reaktion der Neutrophilen in erster Linie gegen intrazelluläre Bakterien, Viren und Pilze. Des Weiteren übernehmen sie als Aktivatoren der adaptiven Immunität eine wichtige Rolle. Neutrophile Granulozyten sind kurzlebig und sterben während ihrer antimikrobiellen Funktion.³⁸⁸ Sie sekretieren ein charakteristisches Zytokinprofil und tragen damit zur Orchestrierung der Entzündung bei.³⁸⁹ Neutrophile werden im Knochenmark aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle gebildet.³⁹⁰

Neutrophile Granulozyten phagozytieren intrazellulär erkannte infektiöse Pathogene.³⁹¹ In dem Phagosom werden zahlreiche schädliche Substanzen, darunter reaktive Sauerstoffspezies (ROS: *respiratory burst*)³⁹² durch die Aktivität der NADPH-Oxidase (NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) generiert³⁹³ und parallel wird der Inhalt der im Zytoplasma lokalisierten, charakteristischen Granula (primäre, sekundäre und tertiäre) und Vesikel mit spezifischen antimikrobiellen und pro-inflammatorischen Proteinen ins Phagosom entlassen.³⁹⁴ Dies dient dem Verdau und der antimikrobiellen Zerstörung der Pathogene.³⁸⁸ Ein weiterer antimikrobieller Mechanismus der Neutrophilen ist ein Vorgang, der als NETose bezeichnet wird. Hierzu werden Pathogene gebunden und durch *neutrophil extracellular traps* (NETs), extrazelluläre Chromatin-Strukturen, unschädlich gemacht.³⁹⁵

Neutrophile Granulozyten zirkulieren, ebenso wie Monozyten, im Blut und wandern im Falle einer Infektion durch einen mehrstufigen komplexen Prozess entlang eines Chemokingradienten, ins Gewebe aus.^{388,396} Hierbei spielt für die Rekrutierung der Neutrophilen das Chemokin CXCL8 in seiner monomeren als auch gleichermaßen in seiner dimeren Form eine wesentliche Rolle.^{397,398}

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus resultiert in 55 bis 85 % der Fälle in einem chronischen Krankheitsverlauf.^{5,10-12} Meist verlaufen die Infektionen bis zur Entstehung HCV-bedingter Lebererkrankungen, wie Leberzirrhose oder hepatozelluläre Karzinome,^{5,13,14} vollkommen unbemerkt oder lediglich mit grippeähnlichen Symptomen.^{5,9} Zur Etablierung einer persistierenden Infektion hat das Hepatitis C Virus Strategien entwickelt, um die antivirale und angeborene Immunantwort des Wirts zu unterbinden sowie zelluläre Signaltransduktionskaskaden und wirtsspezifische Mediatoren für seine eigene Replikation zu nutzen, ohne die Vitalität der Wirtszelle zu gefährden.^{153,156} Zu den wirtsspezifischen Mediatoren, mit denen HCV interferiert, gehören unter anderem die Chemokine.^{310,318}

In NS3/4A-transgenen Mäusen, die intrahepatisch den viralen NS3/4A-Protease/Helikase-Komplex exprimieren, wird die TNF- α /LPS-induzierte Aktivierung des STAT1-Signalweges inhibiert. Die Induktion dieses Signalweges wird erst durch IFN- γ möglich,³⁹⁹⁻⁴⁰¹ wobei Hepatozyten selbst kein IFN- γ exprimieren.⁴⁰² Die virale Protease/Helikase NS3/4A führt durch die Interferenz mit der TNF- α /LPS-induzierten Sekretion von Chemokinen zur Freisetzung von IFN- γ in Hepatozyten und damit zur Aktivierung von STAT1 sowie zur Modifikation der Zusammensetzung der Immunzellpopulationen in der Leber.³⁹⁹⁻⁴⁰¹ Diese Befunde der Arbeitsgruppe sowie Daten der Literatur deuten auf die Relevanz der Interferenz des HCV mit Chemokinen hin. Inwieweit HCV direkt in die Regulation der Chemokinexpression eingreift und welche biologische Relevanz die Chemokine für das Virus aufweisen ist bisweilen wenig untersucht.

Vor diesem Hintergrund lag das initiale Ziel der hier vorgelegten Arbeit zunächst auf der Charakterisierung der Interferenz des Hepatitis C Virus mit Chemokinen in seiner Wirtszelle. Im Vordergrund dieser Untersuchungen standen die CXCR2-Liganden CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8, da unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe (Triller und Bode) einen ersten Hinweis auf die verstärkte HCV-induzierte Expression von CXCL1, CXCL2 sowie von CXCL8 lieferten. Weitere Daten aus dem Labor belegen zudem eine deutliche Steigerung der viralen Replikation in Antwort auf EGF sowie eine HCV-bedingte Sensibilisierung der Wirtszelle für die EGF-induzierte Signalantwort durch die Aktivierung des PLC- γ - und des PI3K/Akt-Signalweges.^{156,401} Aufgrund dessen war von besonderem Interesse, ob die basal durch HCV-induzierte Überexpression der CXCR2-Liganden in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor weiter verstärkt wird. Im Verlauf der Untersuchungen ergaben sich im Wesentlichen zwei Fragestellungen. Zum einen galt es den molekularen Mechanismus

aufzuklären durch den HCV die Expression dieser Mediatoren induziert, reguliert und in Antwort auf EGF verstärkt. Zum anderen sollte die biologische Relevanz dieser Deregulationen näher charakterisiert werden. Für Letzteres wurde einerseits der Einfluss der HCV-induzierten Chemokinsynthese auf das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten und Monozyten untersucht, da vorrangig CXCR2-Liganden an der Rekrutierung dieser Immunzellen zum Ort der Infektion beteiligt sind.^{315,317} Aufgrund aus der Literatur hervorgehender Interferenzen von HCV mit der Expression von Chemokinrezeptoren^{310,318} wurde andererseits ein leberähnliches Ko-Kultur-Modell humaner CD14⁺ Makrophagen und Hepatomazellen etabliert. Mit Hilfe dieses Modells wurde der Einfluss der HCV-induzierten Sekretion der Mediatoren auf die Expression der Chemokinrezeptoren, CCR5 und CXCR4, die wesentlich am Eintritt von HIV in seine Wirtszelle involviert sind,^{375,373,381} auf der Oberfläche der ko-kultivierten Makrophagen untersucht. Das Schema der Zielsetzung dieser Arbeit ist der Abbildung 14 zu entnehmen.

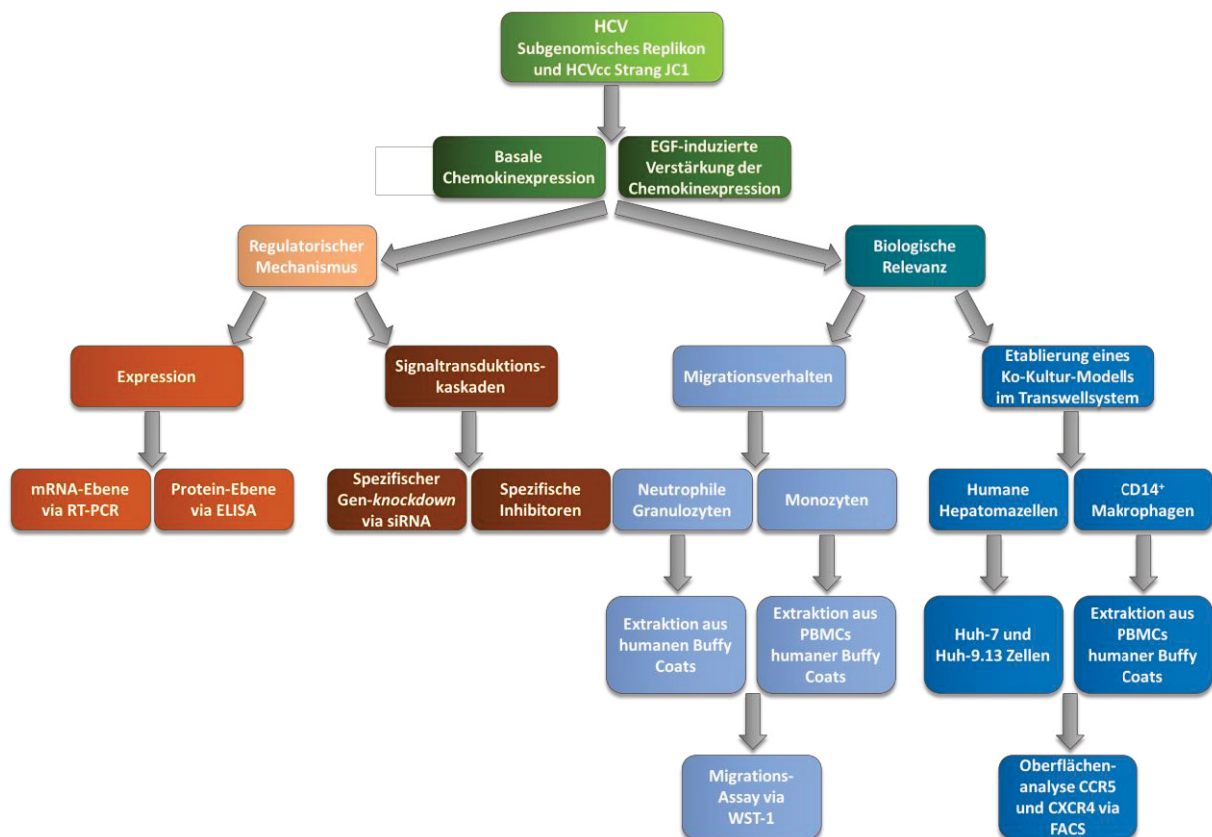


Abbildung 14: Schema der Zielsetzung dieser Arbeit. In dieser Arbeit sollte der Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Induktion der basalen und durch EGF gesteigerten Chemokinexpression analysiert werden. Hierzu sollte zum einen der molekulare Mechanismus aufgeklärt werden, durch den HCV die Expression der CXCR2-Liganden reguliert (orange dargestellt) und zum anderen die biologische Relevanz dieser HCV-bedingten Deregulationen näher charakterisiert werden (blau dargestellt). Eigene Abbildung.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und spezielle Materialien

Tabelle 1: Geräte und spezielle Materialien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Gerätebezeichnung	Hersteller	Herkunftsort
Blottingkammer	Biometra	München
Brutschrank	Thermo Scientific	Schwerte
Cell Observer SD	Zeiss	Jena
Curix 60 (Filmentwickler)	AGFA	Köln
Elektrophoresekammer	Biometra, Bio-Rad	Göttingen, München
FACSCanto™ II	BD Biosciences	Heidelberg
Hyperfilm ECL™	Amersham, GE Healthcare	München
Image Station	Kodak	Rochester, USA
Kodak X-ray Film BioMax™ Light-1	Sigma-Aldrich Chemie	München
Large Cell Separationssäulen	Miltenyi, Biotec	Bergisch Gladbach
Laser Scanning Mikroskop LSM 510 META	Zeiss	Jena
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies	Darmstadt
Mikroskop	Zeiss	Jena
Multiskan plate reader	Thermo Scientific	Schwerte
NanoDrop 1000	NanoDrop Technologies	Wilmington, USA
OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
pH-Meter	WTW	Weilheim
Power Supply	Biometra	Göttingen, München

Pre-Separationsfilter	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
PVDF-Membran	Amersham, GE Healthcare	München
QuadroMACS Separationsunit	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Schüttler	Stuart	Staffordshire, UK
Sorvall® WX Ultra Centrifuge	Thermo Scientific	Schwerte
Sterilfilter	Millipore	Eschborn
T3 Thermocycler	Biometra	Göttingen
Thermoblock	Eppendorf	Hamburg
Ultrospec 2100 pro	Amersham, GE Healthcare	München
ViiA™7 <i>Real-Time</i> PCR System	Applied Biosystems	Darmstadt
Whatman Filterpapier	Whatman	Maidstone, UK
Zellschaber	BD Falcon™	Heidelberg
Zellsieb 70/100 µm	Greiner	Frickenhausen
Zentrifugen	Eppendorf	Hamburg

2.1.1 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Tabelle 2: Verwendete Zellkulturmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller	Herkunftsort
75 cm ² Gewebekulturflasche	Greiner	Frickenhausen
6 cm Gewebekulturschalen	BD Falcon™	Heidelberg
6 cm Primaria™ Gewebekulturschalen	BD Falcon™	Heidelberg
10 cm Gewebekulturschalen	BD Falcon™	Heidelberg
15 cm Gewebekulturschalen	BD Falcon™	Heidelberg
6-Well Gewebekulturplatten	Nunc	Wiesbaden
12-Well Gewebekulturplatten	Nunc	Wiesbaden
96-Well Gewebekulturplatten	Nunc	Wiesbaden

6,5 mm Zellkultureinsätze (Porendurchmesser 3 µm)	BD Falcon™	Heidelberg
24 mm Zellkultureinsätze (Porendurchmesser 0,4 µm)	BD Falcon™	Heidelberg
Companion-Platten für Zellkultureinsätze	BD Falcon™	Heidelberg
Minisart Plus Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius	Göttingen
Minisart Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm)	Sartorius	Göttingen

2.1.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze.

Medium/Zusatz	Hersteller	Herkunftsort
DMEM (4,5 g/l Glukose)	Invitrogen	Karlsruhe
DMEM/Nutrient Mix-F12	Invitrogen	Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie	München
FCS	Perbio	Bonn
G418 (Geneticin)	Invitrogen	Karlsruhe
Hank's Balanced Salt Solution	Merck Millipore	Billerica, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen	Karlsruhe
OptiMEM	Invitrogen	Karlsruhe
PBS	Invitrogen	Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen	Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen	Karlsruhe
RPMI 1640 plus GlutaMAX™	Invitrogen	Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Cytogen	Sinn-Fleisbach

2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien und Feinchemikalien.

Reagenz	Hersteller	Herkunftsort
3-Amino-9-ethylcarbazol	Sigma-Aldrich Chemie	München
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie	München
Ampuwa®	Fresenius Kabi	Bad Homburg
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie	München
APS	Serva	Heidelberg
ATP	Sigma-Aldrich Chemie	München
Benzamidin	Sigma-Aldrich Chemie	München
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich Chemie	München
Bradford Protein-Assay	Bio-Rad	Hercules, USA
8-Bromoadenosine 3', 5'-cyclic monophosphate	Sigma-Aldrich Chemie	München
BSA	PAA-Laboratories	Linz, Österreich
Dharmafect 4	Dharmacon	Colorado, USA
NNN-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie	München
DNase	Qiagen	Hilden
DTT	Sigma-Aldrich Chemie	München
ECL Western Lightning	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
EDTA	Carl Roth	Karlsruhe
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare Life Sciences	Freiburg
Forskolin	Sigma-Aldrich Chemie	München
L-Glutathion, reduced	Sigma-Aldrich Chemie	München
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie	München
Mounting Medium	Dako	Hercules, USA

Mounting Medium mit DAPI	Vector	Burlingame, USA
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie	München
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie	München
Na-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie	München
Pefablock	Fluka	St. Gallen, Schweiz
Polyacrylamid	Applichem	Darmstadt
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad	München
ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution	Merck Millipore	Billerica, USA
Rekombinantes humanes CXCL8	R&D Systems	Minneapolis, USA
Rekombinantes humanes EGF	Sigma-Aldrich Chemie	München
Rekombinantes humanes IL-1 β	Roche	Mannheim
Rekombinantes humanes IL-10	R&D Systems	Minneapolis, USA
Rekombinantes humanes M-CSF	PeptoTech	Hamburg
Spermidin	Sigma-Aldrich Chemie	München
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie	München
Triton X-100	Merck	Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie	München

2.1.4 Kits für die Molekularbiologie

Tabelle 5: Verwendete molekularbiologische Kits.

Kit	Hersteller	Herkunftsort
Human IL-8 ELISA Ready-SET GO! (2nd Generation)	eBioscience	San Diego, USA
EGF Human ELISA Kit	Abcam	Cambridge, UK
miRNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden

miScript II RT Kit	Qiagen	Hilden
Proteome Profiler™ Human Chemokine Array Kit	R&D Systems	Minneapolis, USA
QIAGEN Plasmid Giga Kit	Qiagen	Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	Hilden
QIAshredder Kit	Qiagen	Hilden
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen	Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden
Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs	Berlin

2.1.5 Inhibitoren und siRNA für die Zellkultur

Tabelle 6: Inhibitoren zur Hemmung gezielter Enzymreaktionen.

Inhibitor	Hersteller	Herkunftsort
AG1478	Calbiochem	Bad Soden
Akt Inhibitor V (Triciribine)	Merck	Darmstadt
FR180204	Sigma-Aldrich Chemie	München
Filgotinib (GLPG0634)	Selleckchem	München
JNK Inhibitor II	Merck	Darmstadt
SB203580, Hydrochloride	Merck	Darmstadt
SB225002	Tocris Bioscience	Bristol, UK
U0126	Promega	Mannheim

Tabelle 7: Spezifische siRNA zum gezielten *knockdown* von Genen.

siRNA	Hersteller	Herkunftsort
siGenome Non-Targeting siRNA Mix	Dharmacon	Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human Akt siRNA	Dharmacon	Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human EGF siRNA	Dharmacon	Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human MAPK9 siRNA	Dharmacon	Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human MAP2K1 siRNA	Dharmacon	Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human p65 siRNA	Dharmacon	Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human PTPN2 siRNA	Dharmacon	Colorado, USA

2.1.6 PCR und *in vitro* Transkription

Tabelle 8: Komponenten für die Polymerase-Kettenreaktion und das Hepatitis C Virus Infektionssystem

Komponente	Hersteller	Herkunftsort
dNTP Mix	Roche	Mannheim
rNTP Mix	Roche	Mannheim
IPTG	Promega	Madison, USA
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen	Hilden
Oligonukleotide	MWG	Ebersberg
Restriktionsenzym <i>Mlu</i> I	New England Biolabs	Ipswich, USA
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega	Madison, USA
Sequenzierungen	MWG	Ebersberg

Smart Ladder	Eurogentec	Köln
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	Foster City, USA
T7-RNA-Polymerase	Promega	Madison, USA
<i>Taq</i> -Polymerase	Roche	Mannheim

2.1.7 Antikörper

Tabelle 9: Spezifische Fluoreszenz-gekoppelte Anti-humane Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Primärantikörper	Hersteller	Herkunftsort
Maus IgG1 α kappa CD11c Phycoerythrin	eBioscience	San Diego, USA
Maus IgG1 α kappa CD14 Phycoerythrin	eBioscience	San Diego, USA
Maus IgM CD15 Allophycocyanin	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Maus IgG1 α kappa CD163 Phycoerythrin	eBioscience	San Diego, USA
Maus IgG2 α kappa CD184 Phycoerythrin	BD Pharmingen™	Heidelberg
Maus IgG2 α kappa CD195 Fluorescein Isothiocyanat	BD Pharmingen™	Heidelberg
Sekundärantikörper	Hersteller	Herkunftsort
Maus IgM Isotyp Kontrolle Allophycocyanin	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Maus IgG1 α kappa Isotyp Kontrolle Phycoerythrin	eBioscience	San Diego, USA
Maus IgG2 α kappa Isotyp Kontrolle Fluorescein Isothiocyanat	BD Pharmingen™	Heidelberg

Maus IgG2 α kappa Isotyp	BD Pharmingen™	Heidelberg
Kontrolle Phycoerythrin		

Tabelle 10: Spezifische Anti-humane Antikörper zur Immunofluoreszenzfärbung.

Primärantikörper	Herkunft	Erkanntes Epitop	Hersteller	Herkunftsort
Anti-HCV NS5A (Genotyp 2a)	Maus, monoklonal	NS5A (Genotyp 2a)	Austral Biologicals	San Ramon, USA
Sekundärantikörper	Herkunft	Erkanntes Epitop	Hersteller	Herkunftsort
Anti-Maus Alexa Fluor® 488 dye	Ziege	konstanter Bereich von Maus IgG1	Invitrogen	Karlsruhe

Tabelle 11: Spezifische Anti-humane Antikörper zur Immundetektion.

Primärantikörper	Herkunft	Erkanntes Epitop	Hersteller	Herkunftsort
Akt	Kaninchen, polyklonal	Akt1, Akt2 und Akt3	Cell Signaling	Danvers, USA
GAPDH	Maus, monoklonal	Glycerinaldehyd-3- PDH	Biodesign	Saco, USA
HCV NS3	Maus, monoklonal	NS3-Protein (AS 1252-1477)	Abcam	Cambridge, UK
HCV NS3 (JFH-1)	Maus, monoklonal Klon 2E3	Helikase Domäne JFH-1 NS3 (Genotyp 2a)	BioFront Technologies	Tallahassee, USA
MEK1/2	Kaninchen, polyklonal	endogenes MEK1/2	Cell Signaling	Danvers, USA
NF- κ B p65 (C-20)	Kaninchen, polyklonal	C-Terminus	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
TC-PTP	Maus, monoklonal	TC-PTP (AS 2-314)	R&D Systems	Minneapolis, USA
Sekundärantikörper	Herkunft	Erkanntes Epitop	Hersteller	Herkunftsort

HRP-anti-Kaninchen	Ziege, polyklonal	konstanter Bereich von Kaninchen-IgG	DAKO	Hercules, USA
HRP-anti-Maus	Kaninchen, polyklonal	konstanter Bereich von Maus-IgG	DAKO	Hercules, USA
HRP-anti-Maus	Kaninchen, polyklonal	konstanter Bereich von Maus-IgG	Sigma- Aldrich Chemie	München

2.1.8 Beads zur Immunomagentischen Zellseparation

Tabelle 12: Verwendete MicroBeads zur positiven Selektion humaner CD14⁺ Monozyten.

Beads	Hersteller	Herkunftsort
Humane CD14	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach

Weitere in dieser Arbeit nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (München) und Fluka (St. Gallen, Schweiz) in dem Qualitäts-Reinheitsgrad *pro Analysis (p.A.)* bezogen.

2.1.9 Plasmide und Primer

Tabelle 13: Verwendetes Plasmid für das Hepatitis C Virus Infektionssystem.

Stamm	Genotyp	Herkunftsort
JC1	pFK_JH1/J6/C-846_dg	R. Bartenschlager, Heidelberg

Tabelle 14: Verwendete humane Oligonukleotide zur Quantifizierung von mRNA mittels RT-PCR.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')		TM [°C]
CXCL1	sense	CTG GCG GAT CCA AGC AAA T	57,5
	antisense	CAT TCC CCT GCC TTC ACA AT	58,4
CXCL2	sense	GCA GGG AAT TCA CCT CAA GA	58,4
	antisense	GAC AAG CTT TCT GCC CAT TC	58,4
CXCL3	sense	TGC TTG TAG GGC ATA ATG CCT	59,5
	antisense	AGA GAA ACG CTG CAG AAT GGA	59,5

CXCL8	sense	AGA AGT TTT TGA AGA GGG CTG AGA	62,0
	antisense	CAG ACC CAC ACA ATA CAT GAA GTG	63,6
EGF	sense	CCA GCT CTG CGT TCC TCT TA	59,4
	antisense	GCA AAC AGC AAA AAT GGT TGT GG	58,9
HCV NS3 JFH-1	sense	CTA CGG TGT GCG CCA GAG	60,8
	antisense	CCC AAA CGG TAC AGG AGA GG	62,5
HCV NS5A	sense	AAT TAT TCT AGG GCG CTG TGG	59,5
	antisense	GAG CTG TGA CCC AAC CAG GT	62,5
HCV NS5A JFH-1	sense	CCG TTG CTG GTT GTG CTC T	59,5
	antisense	GTT GCT GGA GGG CTT CTG AT	60,5
NF- κ B	sense	TGG ACT ACC TGG TGC CTC TA	60,5
	antisense	ACA ATA ACC TTT GCT GGT CCC	59,5
SDHA	sense	AGA TGT GGT GTC TCG GTC GAT	61,2
	antisense	CGT GAT CTT TCT CAG GGC CA	60,5
TC-PTP	sense	CAC AGG GTC CAC TTC CTA ACA	61,2
	antisense	TTC AGC ATG ACA ACT GCT TTG	57,5

2.1.10 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden in H₂O_{VE} gelöst und sofern notwendig vor Gebrauch autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 Minuten) bzw. steril-filtriert.

Durchflusszytometrie

FACS-Puffer

2 % BSA

2 mM EDTA

in 500 ml PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺

Einfriermedium für die Zellkultur

20 % FCS

10 % DMSO

DMEM/Nutrient Mix F-12

Hepatitis C Virus Infektionssystem

5 x RRL-Puffer

400 mM HEPES (pH 7,5)

60 mM MgCl₂

10 mM Spermidin

200 mM DTT

Cytomix

120 mM KCl

0,15 mM CaCl₂

10 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,6)

25 mM HEPES (pH 7,6)

2 mM EGTA

5 mM MgCl₂

Carbazol-Substrat-Lösung

5 ml NaOAc

1,5 ml 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol

20 µl 30 % H₂O₂

vor Gebrauch filtriert (0,45 µM)

Herstellung hitzekompetenter *E. coli*

TFB1-Puffer (pH 5,8)

30 mM Kaliumacetat

10 mM CaCl₂

50 mM MnCl₂

100 mM RbCl

15 % Glycerin

TFB2-Puffer (pH 6,5)

100 mM MOPS

75 mM CaCl_2

10 mM RbCl

15 % Glycerin

Immunomagnetische Zellseparation

MACS-Puffer (pH 7,2)

0,5 % BSA

2 mM EDTA

in 500 ml PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Kernextraktion

Puffer A (100 ml)

2 ml 10 mM HEPES-KOH (pH 7,9) (500 mM)

150 μl 1,5 mM MgCl_2 (1 M)

1 ml 10 mM KCl (1 M)

Puffer C (100 ml)

4 ml 20 mM HEPES-KOH (pH 7,9) (500 mM)

8,4 ml 420 mM NaCl (5 M)

150 μl 1,5 mM MgCl_2 (1 M)

40 μl 0,2 mM EDTA pH 8 (500 mM)

25 ml 25 % Glycin (100 %)

Puffer A⁺ und C⁺ (je 2 ml) Zusätze kurz vor Gebrauch

1 μl 0,5 mM DTT (1 M)

2 μl 0,2 mM PMSF (200 mM)

20 μl 1 mM Natrium-Orthovanadat (Na_3VO_4) (100 mM)

Kultivierungsmedien für Bakterien

LB-Medium (Bertani, 1951, Sambrook und Russell, 1989)^{403,404}

10 g/l Pepton aus Casein

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

LB-Agar

LB-Medium mit 15 g/l Agar-Agar

SOC-Medium (Hanahan, 1983)⁴⁰⁵

20 g/l Bacto® Trypton

5 g/l Hefeextrakt

0,584 g/l NaCl

0,19 g/l KCl

2,03 g/l MgCl₂ x 6 H₂O

2,46 g/l MgSO₄ x 7 H₂O

3,96 g/l Glucose x H₂O

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Triton-Lysepuffer (mTLP; pH 7,4)

136 mM NaCl

20 mM Tris/HCl (pH 7,4)

10 % Glycerol

2 mM EDTA

50 mM β-Glycerophosphat

20 mM Natrium-Pyrophosphat

0,2 mM Pefablock

5 µg/ml Aprotinin

5 µg/ml Leupeptin

4 mM Benzamidin

1 mM Na₃VO₄

1 % Triton X-100

vor Gebrauch wurden 0,2 % SDS hinzugesetzt

5 x Elektrophoresepuffer (5 l)

75,5 g Tris

25 g SDS

470 g Glycin

4 x Protein-Auftragspuffer/4 x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970)⁴⁰⁶

250 mM 1 M Tris/HCl (pH 6,8)

40 % Glycerol

5 % 10 % SDS

0,002 % Bromphenolblau

vor Gebrauch wurde 8 % β-Mercaptoethanol hinzugesetzt

5 % Sammelgel (5 ml)

3,4 ml H₂O

0,83 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1

0,63 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8)

0,05 ml 10 % SDS

0,05 ml 10 % APS

0,005 ml TEMED

12 % Trenngel (15 ml)

4,9 ml H₂O

6,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid 29:1

3,8 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)

0,15 ml 10 % SDS

0,15 ml 10 % APS

0,006 ml TEMED

Semi-dry Western Blot

Anoden-Puffer I

0,3 M Tris

20 % Methanol

Anoden-Puffer II

0,025 M Tris

20 % Methanol

Kathoden-Puffer

0,04 M 6-Aminocapronsäure

20 % Methanol

10 x TBS (5 l) (pH 7,6)

120 g Tris

435 g NaCl

TBS-T (Waschpuffer)

20 mM Tris/HCl (pH 7,4)

137 mM NaCl

0,1 % Tween20

Blockingpuffer

TBS-T (Waschpuffer)

5 % BSA

2.1.11 Verwendete Bakterienstämme von *Escherichia coli*

Tabelle 15: Zur Hitzeschock-Transformation verwendete Stämme von *E. coli*.

Stamm	Genotyp	Referenz	Hersteller
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1</i> <i>hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> $\Delta(lac-proAB)$ [F' <i>traD36</i> <i>proAB</i> ⁺ <i>lacIq lacZ</i> Δ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985 ⁴⁰⁷	Promega, Madison, USA
One Shot™ TOP10	F' <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-$ <i>mcrBC) Φ80<i>lacZ</i>ΔM15 $\Delta lacX74 recA1 araD139$ $\Delta(ara-leu)$7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i>$\lambda-$</i>	Invitrogen ⁴⁰⁸	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.12 Verwendete Zelllinien

Tabelle 16: Hepatomazelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz	Hersteller
HepG2	Humane Hepatoblastomzelllinie	Aden <i>et al.</i> , 1979 ⁶	ATCC®, HB- 8065™ Rockville, USA
HepG2 NS3/4A/Mock	Humane Hepatoblastomzelllinie; konstitutive Expression von HCV NS3/4A	Aden <i>et al.</i> , 1979 ⁴⁰⁹	ATCC®, HB- 8065™ Rockville, USA; Generiert von Patricia Cebula, 2011
Huh-7	Humane Hepatomazelllinie	Nakabayashi <i>et al.</i> , 1982 ⁴¹⁰	JCRB 0403 Cell Bank, Osaka, Japan
Huh-9.13	Humane Hepatomazelllinie; subgenomisches HCV Replikon (NS3-NS5B)	Lohmann <i>et al.</i> , 1999 ²¹¹	Ralf Bartenschlager, Heidelberg

Huh-5.15	Humane Hepatomazelllinie; subgenomisches HCV Replikon (NS3-NS5B)	Lohmann <i>et al.</i> , 1999 ²¹¹	Ralf Bartenschlager, Heidelberg
Huh-7.5	Humane Hepatomazelllinie	Pietschmann <i>et al.</i> , 2006 ⁴¹¹	Apath, New York, USA

2.1.13 Humanes Zellmaterial

Patientenseren

Die in dieser Arbeit verwendeten Patientenseren stammten aus der Infektionsambulanz der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Seren wurden vollkommen anonym nach Alter, Geschlecht, spezifischen Lebererkrankungen sowie HCV-positiven und HCV-negativen Antikörpern katalogisiert und unterteilt. Insgesamt wurden 9 HCV-monoinfizierte Patientenseren, therapiert und nicht therapiert für ELISA-Studien eingeschlossen. Als Kontrollen wurden 5 Seren von gesunden Patienten hinzugezogen. Nähere Charakteristika der Patientenseren sind der Tabelle 17 und Tabelle 18 zu entnehmen.

Von allen Patienten liegt eine Einverständniserklärung zur Verwendung der Seren für wissenschaftliche Untersuchungen vor. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien sind zudem von der Ethik-Kommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bewilligt worden.

Tabelle 17: Charakteristika der HCV-monoinfizierten Patientenseren.

Patientenanzahl	HCV Genotyp	Therapie
9 HCV-monoinfizierte Seren	1: 22,22 % (2)	naiv: 44,44 % (4)
weiblich: 44,44 % (4)	1a: 22,22 % (2)	Sofusbuvir + Ribavirin: 22,22 % (2)
männlich: 55,55 % (5)	1b: 11,11 % (1)	n.a.: 22,22 % (2)
Alter: 43-86 Jahre	3: 22,22 % (2)	zzt. ^{B)} keine Therapie: 11,11 % (1)
	n.a. ^{A)} : 22,22 % (2)	

A) n.a. nicht analysiert; B) zzt. zurzeit

Tabelle 18: Charakteristika der Kontrollseren.

Patientenanzahl	Alter (Jahren)	Sonstige Lebererkrankung
9 Kontrollseren	26-83	AIH: 33,33 % (3)
weiblich: 55,55 % (5)		Erhöhte TA: 11,11 % (1)
männlich: 44,44 % (4)		HBV: 33,33 % (3)
		Leberzirrhose: 22,22 % (2)

Buffy Coats

Die in dieser Arbeit verwendeten Buffy Coats wurden von gesunden anonymen Blutspendern mit der Genehmigung des Instituts für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, unter der Leitung von Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Rüdiger E. Scharf bezogen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien sind von der Ethik-Kommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bewilligt worden

CD14⁺ Monozyten wurden aus tagesfrischem Blut männlicher Spender isoliert, während zur Extraktion von neutrophilen Granulozyten tagesfrisches männliches als auch weibliches Spenderblut verwendet wurde.

Buffy Coats werden aus der peripheren Vollblutspende durch Zentrifugation und unter Zusatz eines Antikoagulans aus der Interphase zwischen dem Blutplasma und der Erythrozytenschicht gewonnen und enthalten hauptsächlich Leukozyten und Thrombozyten.⁴¹²

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierungsbedingungen humaner Hepatomazelllinien

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Kultivierung der verwendeten Hepatomazellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Nutrient Mix F-12 oder DMEM (4,5 g/l Glukose), supplementiert mit Hitze-inaktiviertem FCS sowie den entsprechenden Zusätzen (Tabelle 19), in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C. Alle verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Tabelle 19: Verwendete Hepatomazelllinien, Kultivierungsmedien und Zusätze.

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze
HepG2	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS
HepG2 NS3/4A/Mock	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS 350 µg/ml Zeocin
Huh-7	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS
Huh-9.13	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS 1 mg/ml Geneticin
Huh-5.15	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % FCS 1 mg/ml Geneticin
Huh-7.5	DMEM (4,5 g/l Glukose)	9 % FCS 2 mM Glutamin 100 U/ml Pen/Strep 1 x Nicht-essentielle Aminosäuren

Die verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf die Präsenz von Mykoplasmen analysiert, basierend auf einer PCR-vermittelten Screeningmethode mittels Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit.

Kryokonservierung und Auftauen der Hepatomazelllinien

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 60 % trypsiniert, pelletiert und in einem geeigneten Volumen von frischem Einfriermedium aufgenommen. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei -80 °C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff asserviert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig bei 37 °C und unmittelbarer Überführung in frisches Kulturmedium. Um restliches DMSO des Einfriermediums zu entfernen erfolgte eine Inkubation von 4 Stunden bei 37 °C mit anschließendem Mediumwechsel.

Bei der humanen Hepatomazelllinie Huh-7.5 erfolgte die Separation des DMSO unmittelbar nach dem Auftauen durch Abzentrifugieren (4 Minuten, 1.400 RPM, 4 °C) und Aufnahme der Zellen in frisches Kulturmedium.

2.2.1.2 Kultivierungsbedingungen humaner CD14⁺ Monozyten/Makrophagen

Die Kultivierung primärer CD14⁺ Monozyten/Makrophagen erfolgte in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 plus GlutaMAX™, supplementiert mit 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin sowie 0,1 mg/ml Streptomycin, in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C für maximal zehn Tage.

2.2.1.3 Extraktion von PBMCs aus humanen Buffy Coats zur Isolation von CD14⁺ Monozyten

Zur Isolation der CD14⁺ Monozyten erfolgte zunächst die Extraktion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs: *peripheral blood mononuclear cells*) durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum, 1968.^{413,414} Als Ausgangsmaterial dienten Buffy Coats, die aus peripherem Vollblut gesunder männlicher Blutspender gewonnen wurden (vgl. Abschnitt 2.1.13). Mittels einer Ficoll-Lösung als Separationsmedium erfolgte die Fraktionierung der zellulären Blutbestandteile entsprechend ihrer Zellgrößen und Zelldichten.⁴¹⁵

Ficoll ist ein synthetisches Copolymer aus einer stark verzweigten Kreuzvernetzung aus Saccharosemonomeren und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,078 g/ml.⁴¹⁶⁻⁴¹⁸ Das in der Ficoll-Lösung enthaltene Natriumdiatrizoat bewirkt eine Erhöhung der Dichte des Ficolls und führt zur Agglutination und Beschleunigung der Sedimentation der Erythrozyten.^{417,418}

Die Ficoll-Lösung wurde zunächst vorsichtig mit 1:1 HBSS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ verdünntem Vollblut überschichtet (Abbildung 15A). Von entscheidender Bedeutung hierbei war die Aufrechterhaltung der Separation beider Phasen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 35 Minuten bei 600 x g und Raumtemperatur ohne Bremse. Da die Dichte des Ficolls, die der Erythrozyten und Granulozyten unterschreitet, pelletieren diese während der Zentrifugation durch das Ficoll hindurch und bilden das Sediment. Die Monozyten und Lymphozyten reichern sich in der milchigen Interphase zwischen Blutplasma und Ficoll an und verharren dort aufgrund gleicher Dichte in einem Schwebezustand, sobald sie die Ficoll-Lösung erreichen. Die meisten Thrombozyten sammeln sich aufgrund ihrer geringeren Dichte und Größe in der Plasmafraktion an (Abbildung 15B). Die Interphase wurde schließlich abgenommen und dreimal mit HBSS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Die Zellen wurden in MACS-Puffer aufgenommen und bis zur immunomagnetischen Zellseparation (vgl. Abschnitt 2.2.1.4) bei 4 °C gelagert.

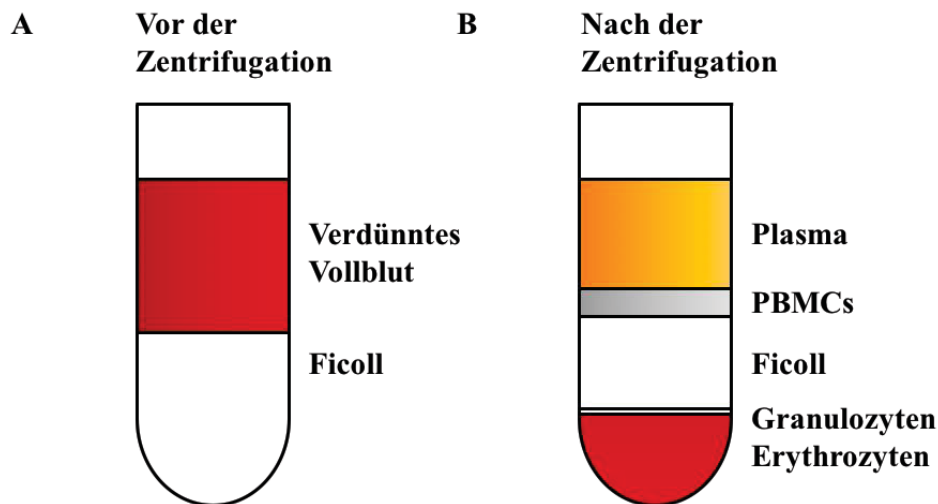


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Separation von PBMCs durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation. **A** Ficoll wird mit verdünntem Vollblut (1:1 mit HBSS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) überschichtet. **B** Durch Zentrifugation (35 Minuten, $600 \times g$, Raumtemperatur) werden die zellulären Blutbestandteile entsprechend der Zellgröße und Zelldichte fraktioniert. Thrombozyten verbleiben im Blutplasma. Monozyten und Lymphozyten (PBMCs) reichern sich in der Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll-Lösung an. Granulozyten und Erythrozyten passieren das Ficoll und bilden das Sediment. Eigene Abbildung.

2.2.1.4 Immunomagnetische Zellseparation der CD14^+ Monozyten aus PBMCs

Die vollständige Extraktion der CD14^+ Monozyten aus den zuvor isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (vgl. Abschnitt 2.2.1.3) erfolgte durch positive magnetisch aktivierte Zellseparation basierend auf der MACS-Technologie (MACS: *magnetic activated cell separation*) der Firma Miltenyi Biotec.^{419,420}

Hierbei werden hoch spezifische Antikörper an in colloidalen Suspension befindliche superparamagnetische Partikel (MicroBeads) konjugiert. Diese sind in der Lage spezielle Antigene direkt oder indirekt auf der Oberfläche einzelner Zellpopulationen zu erkennen und diese magnetisch zu markieren (Abbildung 16A). Aufgrund der geringen Größe der MicroBeads (50 nm) sowie atoxischer und degradierbarer Charakteristika werden die markierten Zellen nicht aktiviert. Die weitere Separation der Zielzellen erfolgt in einem starken Magnetfeld in dem MACS-Separator. Die dabei in den Magneten eingespannten MACS-Säulen enthalten eine ferromagnetische Matrix, die das magnetische Feld um das 10.000-fache verstärkt. Aufgrund des entstandenen starken magnetischen Gradienten werden die markierten Zellen in der Säule gebunden. Nicht markierte Zellen passieren durch mehrfache Zugabe von MACS-Puffer die Säule und werden eluiert (Abbildung 16B). Das Entfernen der Säule aus dem Magneten sowie die Zugabe von MACS-Puffer und das Verwenden eines sterilen

Säulenstempels resultiert schließlich ebenfalls in der Elution der Zielzellen aus der Säule (Abbildung 16C).^{419,420}

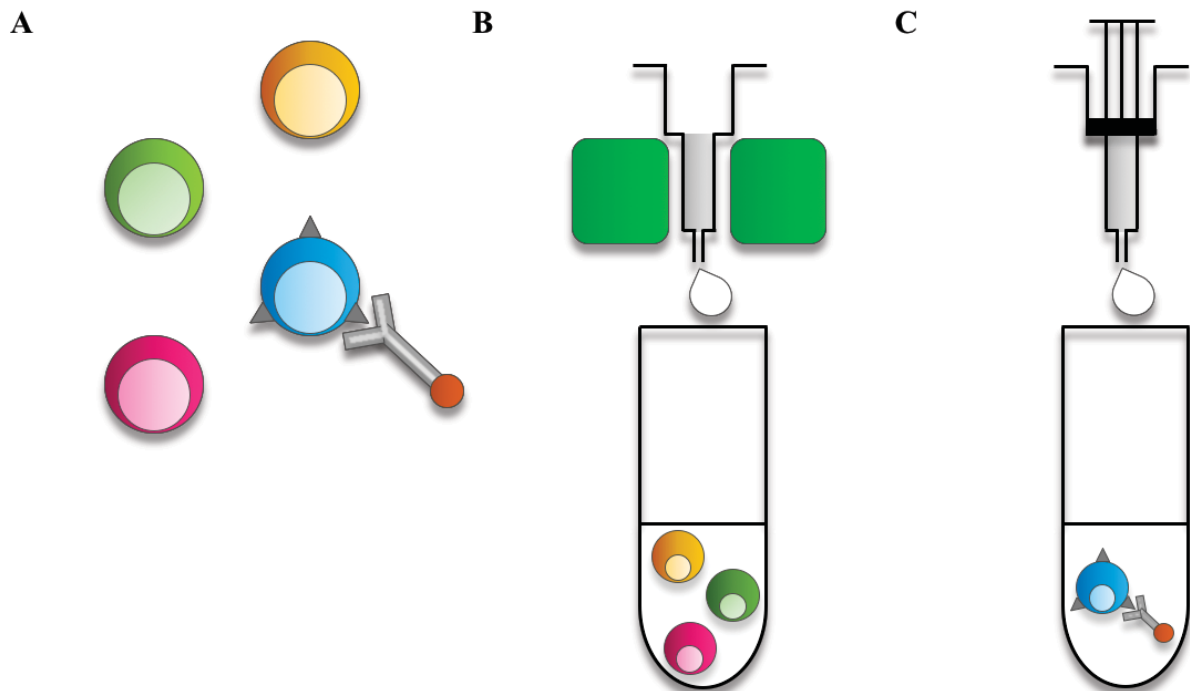


Abbildung 16: Schematische Funktionsweise der positiven immunomagnetischen Zellseparation (MACS).

A Die zu isolierenden Zellen werden mit Hilfe von MicroBeads magnetisch markiert. **B** In dem Magnetfeld des MACS-Separators werden die Zielzellen in der ferromagnetischen Matrix der Separationssäulen gebunden. Nicht-markierte Zellen passieren die Säule. **C** Durch Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld werden nun auch die markierten Zielzellen eluiert. Abbildung modifiziert nach dem Original mit freundlicher Genehmigung von MACS Miltenyi Biotec: MACS Technology. The gold standard. Now and forever 2013, Miltenyi Biotec GmbH,⁴²⁰ Copyright (2013).

Um die CD14⁺ Monozyten zu isolieren, wurde die Zellsuspension zunächst auf einen Pre-Separationsfilter (30 µm) aufgetragen und anschließend für 10 Minuten bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 80 µl MACS-Puffer pro 1 x 10⁷ Zellen resuspendiert. Anschließend erfolgte die lichtgeschützte Inkubation der Zellsuspension mit CD14 MicroBeads (200 µl pro 1 x 10⁸ Zellen) für 15 Minuten bei 4 °C. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit MACS-Puffer (10 Minuten, 300 x g, 4 °C) wurden die Zellen in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die weitere positive Separation erfolgte in dem Magnetfeld des MACS-Separators in vorbereiteten LS-Separationssäulen. Durch dreimaliges Waschen der Zellen mit jeweils 3 ml MACS-Puffer wurden nicht-markierte Zellen von CD14⁺ markierten Monozyten separiert. Die Separationssäulen wurden schließlich aus dem Magneten entfernt und mit 5 ml MACS-Puffer mittels eines sterilen Säulenstempels eluiert. Nach einem weiteren

Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 300 x g, 4 °C) wurden die CD14⁺ Monozyten in 3 ml Medium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C asserviert.

2.2.1.5 Ausdifferenzierung isolierter CD14⁺ Monozyten durch Inkubation mit M-CSF

Nachdem die CD14⁺ Monozyten, wie unter Abschnitt 2.2.1.3 und 2.2.1.4 beschrieben, extrahiert wurden, erfolgte als nächstes die Ausdifferenzierung der Zellen zu reifen Makrophagen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst auf eine Konzentration von $1,4 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und mit jeweils 2 ml pro 6 cm Primaria™ Gewebekulturschalen verteilt. Dem Medium wurde 40 ng/ml humanes M-CSF hinzugesetzt. Die Zellen wurden für sieben Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Am dritten Tag erfolgte eine Volumenerhöhung um 30 % und am fünften Tag eine Volumenerhöhung um 50 % mit frischem Kulturmedium, supplementiert mit 40 ng/ml humanem M-CSF.

Die morphologischen Differenzierungen sowie die Vitalität der Zellen wurden täglich lichtmikroskopisch durch schonendes konfokales Oberservieren im Cell Observer verfolgt.

2.2.1.6 Kultivierungsbedingungen humaner neutrophiler Granulozyten

Primäre neutrophile Granulozyten wurden in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640, supplementiert mit 100 U/ml Penicillin sowie 0,1 mg/ml Streptomycin in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C für maximal 24 Stunden kultiviert.

2.2.1.7 Isolation neutrophiler Granulozyten aus humanen Buffy Coats

Neutrophile Granulozyten wurden basierend auf der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum, 1968 entsprechend ihrer Zellgrößen und Zelldichten von den anderen peripheren zellulären Blutbestandteilen separiert (vgl. Abschnitt 2.2.1.3).^{413,414} Als Ausgangsmaterial dienten Buffy Coats, die aus peripherem Vollblut gesunder weiblicher als auch männlicher Blutspender gewonnen wurden (vgl. Abschnitt 2.1.13). Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Ficoll-Lösung mit unverdünntem Vollblut überschichtet, sodass zwei voneinander separierte Phasen entstanden. Durch nachfolgende Zentrifugation (20 Minuten, 1.700 rpm) erfolgte die Separation der Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte von denen in der Interphase lokalisierten Monozyten und Lymphozyten sowie von denen in der Plasmafraktion lokalisierten Thrombozyten. Die Fraktion des Blutplasmas, die Interphase sowie die Ficoll-Schicht wurden verworfen. Das verbliebene Sediment aus Erythrozyten und Granulozyten wurde vorsichtig mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und erneut zentrifugiert

(8 Minuten, 1.400 rpm). Hierbei war es von entscheidender Bedeutung das Pellet nicht zu zerstören. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das PBS entfernt und das Sediment in hypotonem, sterilen H₂O_{VE} (4,26 ml pro ml Pellet) für exakt 45 Sekunden resuspendiert. Die Isotonie wurde durch die Zugabe von 5 M NaCl-Lösung wiederhergestellt, deren Menge wie folgt berechnet wurde:

$$\text{Volumen NaCl (ml)} = \frac{\text{Wasser (ml)} + \text{Pellet (ml)}}{500} \times 15$$

Durch erneute Zentrifugation (8 Minuten, 900 rpm) und mehrfaches Waschen der Zellen mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ wurden die lysierten Erythrozyten entfernt und die Zellen schließlich in 1 ml PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

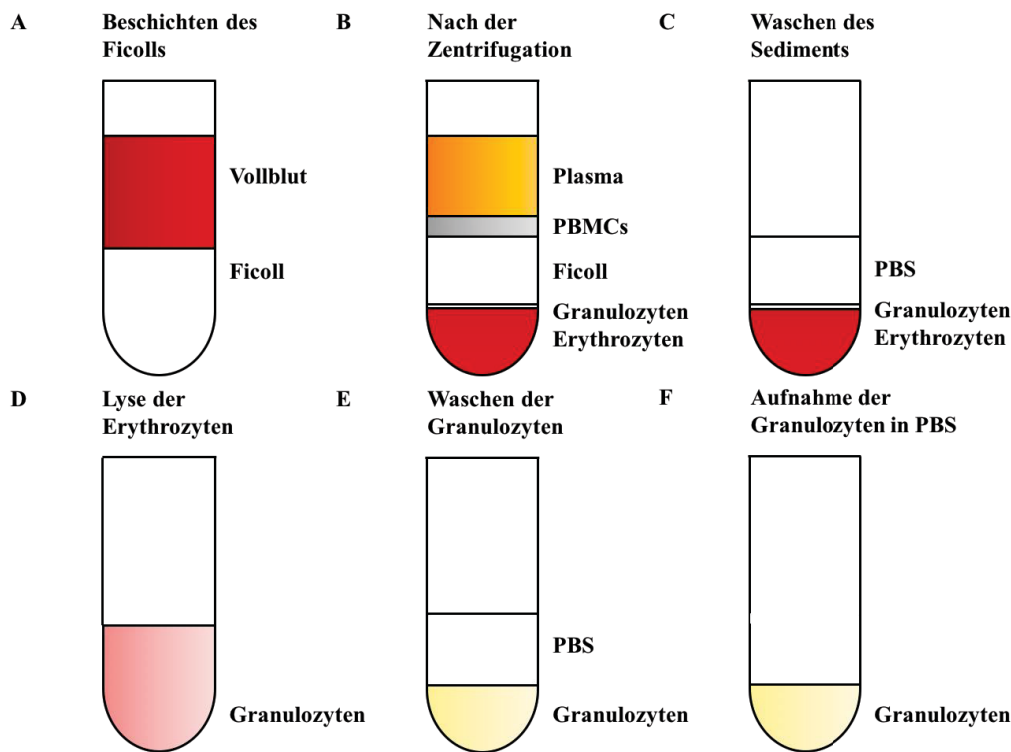


Abbildung 17: Prinzip der Separation neutrophiler Granulozyten aus peripherem Vollblut. **A** Überschichten der Ficoll-Lösung mit unverdünntem Vollblut. **B** Durch Zentrifugation (20 Minuten, 1.700 rpm, 4 °C) kommt es zur Fraktionierung der zellulären Blutbestandteile entsprechend der Zelldichte und Zellgröße. Granulozyten und Erythrozyten durchdringen das Ficoll und bilden das Sediment. In der Interphase reichern sich Monozyten und Lymphozyten an. Thrombozyten verharren in der Plasmafraktion. **C** Blutplasma, Interphase und Ficoll-Schicht werden verworfen. Das Sediment aus Granulozyten und Erythrozyten wird mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. **D** Lyse der Erythrozyten durch Resuspendieren der Zellen in sterilem, hypotonem Wasser und Wiederherstellen der Isotonie durch Zugabe einer berechneten Menge an 5 M NaCl-Lösung. **E** Entfernen der lysierten Erythrozyten durch Zentrifugation (8 Minuten, 900 rpm) und mehrfaches Waschen der Granulozyten mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺. **F** Aufnahme der Granulozyten in 1 ml PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ und Lagerung der Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C. Eigene Abbildung.

2.2.1.8 Generierung von konditionierten Zellkulturüberständen

Das Herstellen von konditionierten Zellkulturüberständen des Replikonsystems erfolgte für Migrations-Assays, ELISA-Studien sowie für den *Proteome Profiler Human Chemokine Array*. Hierzu wurden die Hepatomazellen in 6-Well Gewebekulturplatten mit jeweils 2 ml ausgesät und bei 5 % CO₂ und 37 °C bis zu einer Konfluenz von etwa 60 bis 80 % kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimalig mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und ein dem Versuch entsprechender Mediumwechsel mit 1 ml pro Well durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für einen definierten Zeitraum mit den entsprechenden Stimulanzien. Die Zellkulturüberstände wurden schließlich abgenommen, zentrifugiert (20 Minuten, 14.000 rpm, 4 °C) und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C asserviert.

2.2.1.9 Ko-Kultivierung humaner CD14⁺ Makrophagen mit humanen Hepatomazellen

Bei dem in dieser Arbeit etablierten Ko-Kultur-Modell handelt es sich um ein indirektes *in vitro* Transwellsystem zur Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation zwischen humanen Hepatomazellen und humanen CD14⁺ Makrophagen (Abbildung 54) über sezernierte im Medium lösliche Mediatoren (vgl. Abschnitt 3.18).

PBMCs wurden aus peripherem Vollblut gesunder männlicher Blutspender mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert (vgl. Abschnitt 2.2.1.3). Die weitere Extraktion der CD14⁺ Monozyten aus den PBMCs erfolgte durch positive magnetisch aktivierte Zellseparation (vgl. Abschnitt 2.2.1.4). Die Ausdifferenzierung zu reifen Makrophagen wurde durch Inkubation mit humanem M-CSF induziert (vgl. Abschnitt 2.2.1.5). Am siebten Tag wurden die ausdifferenzierten CD14⁺ Makrophagen in Zellkultureinsätze mit einer permeablen Membran mit einer Porengröße von 0,4 µm überführt (Abbildung 54). Hierzu wurden die reifen adhärenierten CD14⁺ Makrophagen vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst und gepoolt. Nach anschließender Zentrifugation (5 Minuten, 1.500 rpm, 4 °C) der auf diesem Weg gewonnenen Zellsuspension wurde das Zellpellet in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 Minuten, 1.500 rpm, 4 °C). Abschließend wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen von frischem Ko-Kultur-Medium (RPMI 1640 plus GlutaMAX™ supplementiert mit 100 U/ml Penicillin sowie 0,1 mg/ml Streptomycin ohne FCS) supplementiert mit 40 ng/ml humanem M-CSF aufgenommen, auf eine Konzentration von 0,1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und mit jeweils 2 ml pro Insert ausgesät.

Die humanen Hepatomazellen (Huh-7 und Huh-9.13) wurden auf speziellen 6-Well Gewebekulturschalen mit Vorkehrungen zum Positionieren der Inserts (Companionplatten)

ausgesät. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, trypsiniert, pelletiert und in einem geeigneten Volumen von Ko-Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf $0,3\text{-}0,5 \times 10^6$ Huh-7 Zellen/ml bzw. $1,3\text{-}1,5 \times 10^6$ Huh-9.13 Zellen/ml eingestellt und mit jeweils 2 ml pro Kavität der Companionplatte verteilt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 5 % CO_2 und 37 °C wurden die Inserts mit den ausgesäten CD14^+ Makrophagen in den Companionplatten positioniert, sodass sich die CD14^+ Makrophagen im oberen und die Hepatomazellen im unteren Kompartiment des Transwellsystems befanden (Abbildung 54). Die anschließende Ko-Kultivierung der Zellen erfolgte für drei Tage in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 5 % CO_2 und 37 °C ohne Mediumwechsel.

Am zweiten Tag der Ko-Kultivierung wurden die Hepatomazellen im unteren Kompartiment des Transwellsystems mit denen den Versuchen entsprechenden Faktoren für 24 Stunden stimuliert. Dabei erfolgte eine Dreifachbestimmung jeder Konditionsbedingung.

Morphologische Differenzierungen sowie die Vitalität der Zellen wurden täglich lichtmikroskopisch durch schonendes konfokales Oberservieren im Cell Observer überprüft.

Nach drei Tagen Ko-Kultivierung und Inkubation mit den entsprechenden Stimulanzen, wurden die Makrophagen geerntet und die Oberflächenexpression von CD11c, CD14 und CD163 zur Reinheitsanalyse der Makrophagen sowie die Oberflächenexpression von CXCR4 und CCR5 mittels Durchflusszytometrie untersucht (vgl. Abschnitt 2.2.6.1).

2.2.1.10 Migrations-Assay mit WST-1

Die Messung der relativen Anzahl migrierter Zellen erfolgte unter Zusatz eines farblosen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorids (WST-1). WST-1 wird hierbei von Dehydrogenasen der Atmungskette von intakten, migrierten Zellen, unter der Aufnahme von zwei Elektronen und einem Proton, zu einem rötlich-bräunlichen Farbstoff 1,3,5-Triphenylformazan reduziert. Die Reduktion ist besonders von der glykolytischen Produktion von NADPH der vitalen Zellen abhängig. Der gebildete Farbstoff kann photometrisch gemessen werden und steht für die Anzahl der migrierten Zellen.^{421,422}

Die Untersuchung des Migrationsverhaltens humaner CD14^+ Monozyten und neutrophiler Granulozyten erfolgte mittels Chemotaxis-Assays unter Einsatz eines WST-1 Reagenz in 24-Well Gewebekulturplatten mit speziellen Zellkultur-Inserts der Firma Merck Millipore. Diese Einsätze besitzen eine permeable Membran mit einer Porengröße von 3 μm .

Hierzu wurden die Zellen in entsprechendem Serum-freiem Medium auf eine Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und mit 250 μl pro Insert verteilt. Im unteren Kompartiment

wurden 400 µl der konditionierten Zellkulturüberstände verteilt. Die Zellen wurden anschließend für 16 Stunden bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Durch die von den Hepatomazellen sezernierten, chemotaktischen Mediatoren, nach zuvor erfolgter Stimulation mit den entsprechenden Faktoren für einen definierten Zeitraum, wanderten die Zellen durch die Membran des Inserts in das untere Kompartiment entlang des gebildeten Chemokingradienten. Zur Bestimmung der relativen Anzahl der migrierten Zellen wurden zunächst die Inserts entfernt und 40 µl WST-1 Reagenz pro Well für weitere 3 Stunden bei 5 % CO₂ und 37 °C hinzugesetzt. Der gebildete rötlich-bräunliche Farbstoff Formazan wurde schließlich bei 450 nm und 630 nm photometrisch gemessen. Als Kontrolle für jedes Migrations-Assay diente Zell-freies Kulturmedium.

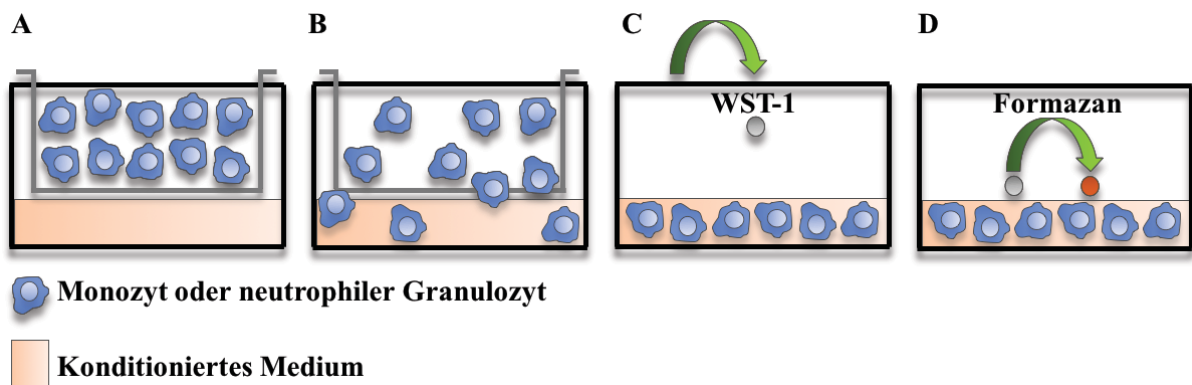


Abbildung 18: Schema des Migrations-Assays mit WST-1. **A** Monozyten oder neutrophile Granulozyten im oberen Insert durch eine permeable Membran vom unteren Kompartiment mit konditionierten Zellkulturüberständen getrennt. **B** Migration der Zellen in das untere Kompartiment entlang des von Hepatomazellen sezernierten Chemokingradienten für 16 Stunden. **C** Entfernung der Inserts, Zugabe von WST-1 und Inkubation für weitere 3 Stunden. **D** Von Enzymen der Atmungskette von intakten migrierten Zellen umgesetztes WST-1 zu dem rötlichen Farbstoff Formazan und photometrische Messung von dessen Intensität bei 450 nm. Eigene Abbildung.

2.2.2 Zucht von *Escherichia coli*

Die Zucht von *E. coli* erfolgte für alle genetischen Arbeiten unter sterilen Bedingungen und in LB-Medium, aerob über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 180-220 rpm. Vor der Inkubation erfolgte die Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin als Endkonzentration. Als Erholungsmedium nach der Hitzeschocktransformation (vgl. Abschnitt 2.2.3.2) wurde SOC-Medium ohne Zusatz von Antibiotikum verwendet.

Zur Vermehrung der entsprechenden Plasmide in *E. coli* für das Hepatitis C Virus Infektionssystem, wurden diese durch Hitzeschocktransformation in die *E. coli* Stämme JM109

oder One Shot® TOP10 transformiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum des HCV Plasmids JC1 ausplattiert und selektiert.

Zur Kryokonservierung wurden Glycerolstocks der entsprechenden Bakterienkulturen in LB-Medium, supplementiert mit 20 % Glycerol, angelegt und bei -80 °C asserviert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Standardmethoden erfolgten, falls nicht anders angegeben, nach Sambrook und Russel, 1989.⁴⁰⁴ PCR-Produkte sowie DNA-Linearisierungsansätze des Hepatitis C Virus Infektionssystems wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Isolation von Plasmiden des Hepatitis C Virus Infektionssystems wurde, abhängig vom Maßstab, mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit bzw. des QIAGEN Plasmid Giga Kit durchgeführt. Isolierte Plasmide dienten direkt für die *in vitro* Transkription des Hepatitis C Virus Infektionssystems (vgl. Abschnitt 2.2.7). Die Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen erfolgte spektralphotometrisch bei einer Extinktion von einer $\Delta OD_{260\text{ nm}}$ mit Hilfe des NanoDrops 1000.

2.2.3.1 Herstellung hitzekompetenter *E. coli* für das Hepatitis C Virus Infektionssystem

Zur Synthese hitzekompetenter *E. coli* JM109 erfolgte zunächst ein Verdünnungsausstrich der entsprechenden Glycerolstammkultur auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum über Nacht bei 37 °C. Basierend darauf wurde die Vorkultur in Reagenzgläsern in 5 ml LB-Medium, aerob über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 180-220 rpm kultiviert. Die Zucht der Hauptkultur erfolgte in 250 ml LB-Medium ohne Antibiotikum, supplementiert mit 20 nM MgSO₄, in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen, 2 %ig angeimpft, bei 37 °C und 150 rpm, bis zu einer ΔOD_{600} von 0,4 bis 0,5. Um die beste Kompetenz der Bakterien zu erzielen, wurden die Zellen in der logarithmischen frühen Phase des Wachstums geerntet. Hierzu wurden die Bakterien für 5 Minuten bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das Pellet in TFB-1 Puffer aufgenommen und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut durch Zentrifugation pelletiert (5 Minuten, 4.000 rpm, 4 °C), in TFB-2 Puffer resuspendiert und für 15 bis 60 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend wurde die so gewonnene Bakteriensuspension aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C asserviert.

2.2.3.2 Hitzeschocktransformation des HCV JC1 Plasmids

Zur Transformation durch Hitzeschock wurden zunächst hitzekompetente *E. coli* JM109 auf Eis aufgetaut, 100 µl der Bakteriensuspension mit 1-3 µl Plasmid-DNA versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Dem anschließenden Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C

folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 2 Minuten auf Eis. Anschließend wurde der Transformationsansatz in 900 µl vorgewärmten SOC-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Abschließend wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Transformation des Plasmids durch Hitzeschock in *E. coli* One Shot™ TOP10 erfolgte nach Angaben des Herstellers der Firma Invitrogen.⁴⁰⁸

2.2.3.3 RNA-Extraktion aus humanen Hepatomazellen

Zunächst wurden humane Hepatomazellen auf 6-Well Gewebekulturplatten oder 6 cm Gewebekulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 60 bis 80 % kultiviert. Zur Extraktion der mRNA wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in 350 µl RLT-Puffer, versetzt mit β-Mercaptoethanol (1:100), pro Well bzw. pro Schale lysiert. Zur Homogenisierung wurde das gesamte Zelllysate auf die QIAshredder Säulen aufgetragen und anschließend nach Angaben des Herstellers mittels miRNeasy Mini Kit extrahiert und aufgereinigt. Die mRNA wurde in 30-60 µl H₂O_{VE} von der Säule eluiert und die Konzentration mittels Spektralphotometrie bei einer Extinktion von ΔOD_{260 nm} bestimmt.

2.2.3.4 Reverse Transkription der extrahierten mRNA

Die Reverse Transkription der isolierten mRNA in *complementary* DNA (cDNA) erfolgte mittels des Quantitect Reverse Transcription Kits. Die Reverse Transkription in cDNA erfolgte aus 1 µg zuvor isolierter mRNA nach Herstellerangaben. Hierzu wurden Kontaminationen mit genomischer DNA durch den Einsatz eines *wipeout* Puffers zunächst entfernt. Anschließend wurden Oligo-dT-Primer, Puffer mit RNase-Inhibitoren und Reverser Transkriptase hinzugesetzt und für 30 Minuten bei 42 °C inkubiert. Um die Reinheit der Synthese zu kontrollieren diente jeweils ein entsprechender Ansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte bei 95 °C für 3 Minuten. Abschließend wurde die cDNA in 100 µl H₂O_{VE} aufgenommen und mittels RT-PCR quantifiziert.

2.2.3.5 Real-Time PCR (RT-PCR)

Basierend auf dem Prinzip der konventionellen PCR ist die RT-PCR eine Methode zur parallelen *in vitro* Amplifikation in Echtzeit sowie zur Quantifizierung bestimmter Nukleinsäureabschnitte, vermittelt durch DNA-Polymerasen sowie durch Fluoreszenzsignale.^{423,424}

Für RT-PCR Analysen wurde der DNA-interkalierende Reporterfarbstoff SYBR-Green I verwendet. Dieser bildet sequenzunabhängige Fluorochrom-Komplexe durch spezifische Bindung an die kleine Furche doppelsträngiger DNA und hat ein charakteristisches Anregungsspektrum bei einer Wellenlänge von 494 nm sowie ein Emissionsspektrum bei 521 nm. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs steigt proportional zu der Konzentration des zu amplifizierenden Nukleinsäurefragments. Von entscheidender Bedeutung bei der RT-PCR ist das Design sequenzspezifischer Primer, die das gewünschte zu amplifizierende Gen generieren. Dies erfolgte mittels des Primer-Blast der Datenbank Pubmed. Hiermit wurde zum einen die Neigung zur Ausbildung von unspezifischen Sekundärstrukturen, wie Primer-Dimeren, minimiert und zum anderen ein GC-Gehalt von etwa 50 %, eine Schmelztemperatur von etwa 59 °C sowie eine Länge des Amplifikats von 90 bis 120 bp sichergestellt. Die Synthese und Bereitstellung der spezifischen Oligonukleotide (Tabelle 14) erfolgte durch die Firma Eurofins MWG, HPSF gereinigt. Die Spezifität der Oligonukleotide erfolgte mittels einer Schmelzkurven-Analyse.

Die Messungen erfolgten mittels ViiA™7 Real Time PCR System in Mikrotiterplatten. Jeder RT-PCR-Ansatz hatte ein Endvolumen von 25 µl. Das Volumen der einzelnen Komponenten ist der Tabelle 20 und das Standard-Programm der RT-PCR der Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 20: Volumen der einzelnen Komponenten in einem RT-PCR-Ansatz.

Komponente	Volumen
cDNA (1:6 verdünnt in H ₂ O _{VE})	1,2 µl
Oligonukleotid-Primer sense (10 pmol)	1 µl
Oligonukleotid-Primer antisense (10 pmol)	1 µl
SYBR Green PCR Mastermix	12,5 µl
H ₂ O _{VE}	ad 20 µl

Tabelle 21: RT-PCR-Programm zur DNA-Amplifikation.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen [Anzahl]
[1] Initiale Denaturierung	95	10	1
[2] Denaturierung	95	15 sec	1
[3] Annealing	60	1	} 40
[4] Elongation	60	1	
[5] Schmelzkurvenanalyse	70	15 sec	1

Die Quantifizierung der Daten erfolgte mit Hilfe der ViiA™7 RUO Software 2010 der Firma Applied Biosystems sowie der ΔC_T -Methode nach Lang und Heeg, 1998.⁴²⁵ Als Referenz wurde humanes SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A) hinzugezogen. Der C_T -Wert (cycle threshold) basiert auf der Anzahl der Zyklen, bei dem das analysierte Fluoreszenzsignal das exponentielle Wachstum der Standardkurve einen signifikanten Schwellenwert übersteigt. Dieser wurde ermittelt durch die Subtraktion der Referenz, des Housekeeping-Gens, von dem C_T -Wert des amplifizierten DNA-Fragments.

2.2.4 RNA Interferenz

2.2.4.1 Transfektion von spezifischer siRNA zum gezielten *knockdown* von Genen in Hepatomazellen

Um die Funktion von spezifischen Genen sowie dessen codierter Proteine zu analysieren wurden in dieser Arbeit gezielte *knockdown*-Studien von Genen mittels spezifischer *small interfering* RNA (siRNA) der Firma Dharmacon durchgeführt (Tabelle 7).

In eukaryotischen Zellen führt die RNA Interferenz (RNAi) zu einem gezielten sequenzspezifischen posttranskriptionellen Ausschalten von Genen (*Gene Silencing*) durch eine von *interfering* RNA Fragmenten (siRNA) vermittelte sequenzspezifische Degradierung der komplementären mRNA des entsprechenden Gens.^{426,427} RNA Interferenz ist ein evolutionär konservierter Mechanismus zur Abwehr viraler Infektionen,⁴²⁸ sowie zum Schutz des Genoms vor Instabilität durch repetitive Sequenzen oder Transposons.^{429,430}

Initiatoren der Herabregulation der entsprechenden Gene sind kurze siRNAs, bestehend aus 21-22 Nukleotiden mit einem 3' positioniertem Überhang von zwei Nukleotiden.⁴³¹ Sie werden aus längeren doppelsträngigen RNAs (dsRNA) durch einen Multienzym-Komplex, aus einer ATP-abhängige Ribonuklease III sowie einer Helikase (genannt *Dicer*) generiert.⁴³² siRNAs

werden schließlich durch einen weiteren Multienzym-Komplex, *RISC* (*RNA-induced silencing complex*) erkannt,⁴³³ entwunden und in Einzelstränge zerlegt, die dann wiederum komplementäre mRNA-Stränge erkennen⁴³⁴ und von entscheidender Bedeutung für die Degradierung der Ziel-mRNA sind. Die Expression des entsprechenden Gens wird somit inhibiert.^{435,436}

In dieser Arbeit wurde synthetisch hergestellte siRNA mittels Transfektion in die Hepatomazellen eingebracht. Diese siRNA wurde chemisch so modifiziert, dass sie von Nukleasen der Hepatomazellen nicht abgebaut wird.⁴³⁷ Hierzu wurden die Hepatomazellen zunächst in 6-Well Gewebekulturplatten ausgesät und für 24 Stunden bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Daran anschließend erfolgte die Transfektion der spezifischen siRNA unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Dharmafect 4. Hierzu wurde zunächst die entsprechende siRNA sowie ein Kontroll-Mix aus drei Non-Targeting siRNAs 1, 3 und 5 mit 1 x siRNA Puffer auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt. Anschließend wurde Antibiotika-freies OptiMEM mit verdünnter siRNA, verdünntem Kontroll-siRNA-Mix und Transfektionsreagenz, entsprechend der Herstellerangaben, versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das mit Dharmafect versetzte OptiMEM jeweils in einem vom Hersteller-entsprechenden Volumen zu den siRNA Ansätzen und einer siRNA-freien Kontrolle gegeben und zur Komplexbildung für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Antibiotika-freiem Kulturmedium zu jedem Ansatz, die Verteilung auf die zu transfizierenden Zellen mit jeweils 2 ml pro Well und eine Inkubation für 6 Stunden. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium durch Antibiotika-freies Kulturmedium ersetzt und die Zellen für 72 Stunden mit täglichem Mediumwechsel kultiviert.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Zellaufschluss humaner Hepatomazellen zur Extraktion von Proteinen

Die Hepatomazellen wurden auf 6-Well Gewebekulturplatten oder 6 cm Gewebekulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 70 bis 80 % kultiviert. Die adhärenenten Hepatomazellen wurden einmalig mit 4 °C kaltem 1 x PBS, supplementiert mit 0,1 mM Na₃VO₄, gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in einem Volumen von 120 µl pro Well bzw. pro Schale des Triton-Lyse-Puffers (mTLP) vom Boden abgelöst, geerntet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach kräftigem Vortexen erfolgte zur vollständigen Lyse eine Inkubation für 10 Minuten auf Eis. Abschließend wurden

die Zelllysate für 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die auf diesem Weg isolierten Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C asserviert.

2.2.5.2 Isolation von Kernextrakten humaner Hepatomazellen

Humane Hepatomazellen wurden zunächst auf 10 cm Gewebekulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 70 bis 80 % kultiviert. Die sich daran anschließende Präparation der Kernextrakte erfolgte nach Andrews und Faller, 1991.⁴³⁸ Hierzu wurde zunächst altes Zellkulturmedium entfernt und die Zellen einmalig mit 4 °C kaltem 1 x PBS, supplementiert mit 0,1 mM Na_3VO_4 , gewaschen. Anschließend wurden die Hepatomazellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst, geerntet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden sedimentiert (2 Minuten, 14.000 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl hypoosmolarem Puffer A⁺ aufgenommen und für 10 Minuten zur vollständigen Lyse der Zellen auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate erneut zentrifugiert (2 Minuten, 14.000 rpm, 4 °C), in 50-100 µl Puffer C⁺ resuspendiert (abhängig von der Größe des Pellets) und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt für 2 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C, der Überstand wurde von dem Pellet separiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Kernextrakte bei -20 °C gelagert.

2.2.5.3 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentration der zuvor isolierten Proteine bzw. Kernextrakte erfolgte nach Bradford, 1976.⁴³⁹ Bei diesem Bradford-Protein-Assay handelt es sich um eine quantitative, spektralphotometrische Methode zur Bestimmung des Proteingehalts, basierend auf dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue. Dieser Triphenylmethanfarbstoff bildet in saurer Lösung Komplexe mit den kationischen, hydrophoben sowie nichtpolaren Seitenketten der Proteine und besitzt in dieser Form ein Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 465 nm. Durch die gebildeten Komplexe mit den Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum, aufgrund der stabilisierten anionischen, unprotonierten Sulfonatform des Farbstoffs, auf 595 nm.⁴³⁹ Die Zunahme der Extinktion wird spektralphotometrisch bei 595 nm, im Ultrospec 2100 pro der Firma Amersham, GE Healthcare, gemessen. Das Verhältnis von gebundenem Protein-Farbstoffkomplex zu ungebundenem Farbstoff repräsentiert hierbei das Maß der Proteinkonzentration in der Lösung. Das hierzu benötigte Bradford-Protein-Assay wurde von der Firma Bio-Rad bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.⁴⁴⁰

2.2.5.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende Auftrennung der zuvor extrahierten Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld nach Laemmli, 1970.⁴⁰⁶ Hierbei werden die negativ geladenen Proteine im Sammelgel zunächst konzentriert und im Trenngel schließlich der Größe nach aufgetrennt. Dabei spielt der unterschiedliche pH-Wert sowie die unterschiedliche Porengröße und Ionenstärke eine entscheidende Rolle.⁴⁰⁶

Zunächst wurden jeweils 30-60 µg Protein (abhängig vom Experiment) mit mTLP auf ein gleiches Volumen eingestellt und im Verhältnis 3:1 mit 4 x Laemmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proteine für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, abgekühlt und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Entsprechend der Größe der zu detektierenden Proteine betrug der prozentuale Anteil der Polyacrylamid-Trenngele 12 %, während die Sammelgele 5 % Polyacrylamid aufwiesen. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde stets der Größenmarker Precision Plus Protein™ Dual Color Standard mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte abhängig von der Gelgröße bei konstanter Spannung von zunächst 80-100 V bis zum Erreichen des Trenngels und dann zwischen 160 und 240 V für 4 bzw. 6 Stunden in der Elektrophoresekammer der Firma Biometra/Bio-Rad.

2.2.5.5 *Semi-dry* Western Blot

Mittels des *Semi-dry* Western Blots wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran der Firma Amersham, GE Healthcare, transferiert. Whatman-Paper wurde in drei Puffersystemen mit unterschiedlicher Ionenstärke (Anoden-Puffer I und II, Kathodenpuffer) getränkt, um den Stromfluss zwischen den Elektroden während dem Proteintransfer sicherzustellen. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke I, die nach der folgenden Formel berechnet wurde:

$$I \text{ [mA]} = \text{Fläche der Membran [cm}^2\text{]} \times 0,8$$

Die Dauer des Transfers war abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine und variierte zwischen 1,5 und 2 Stunden.

2.2.5.6 Immundetektion und Chemilumineszenz

Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran im Anschluss an den Proteintransfer für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln in Blockingpuffer inkubiert. Die Bindung des primären Antikörpers (1:1000 verdünnt in TBS-T) erfolgte über

Nacht bei 4 °C unter Schütteln. Die Reaktion mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, der an eine *horseradish peroxidase* (HRP) konjugiert ist, erfolgte in einer Verdünnung von 1:3000 in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dabei wurden nicht-gebundene, überschüssige Antikörper jeweils durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für 20 Minuten entfernt.

Die anschließende Immundetektion erfolgte durch enzymatische Erzeugung von Chemilumineszenz unter Verwendung von Western Lightning Plus ECL Substrat.^{441,442} Die Entwicklung des Filmes erfolgte schließlich in der Image Station der Firma Kodak.

Zur mehrfachen Immundetektion unterschiedlicher Proteine auf einer Membran, erfolgte das Entfernen der gebildeten Antikörper-Protein-Komplexe von der Membran mittels *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution*, für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln.

2.2.6 Immunologische Methoden

2.2.6.1 FACS (*fluorescence activated cell sorting*)⁴⁴³

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgt die Analyse einzelner Zellen entsprechend ihrer relativen Größe, Granularität, Fluoreszenzintensität und interner Komplexität, aufgrund zelltypisch spezifischer Fluoreszenz- und Streuungscharakteristika. Durch den in der Messküvette aufgebauten Überdruck werden die Zellen einer Suspension beschleunigt und aufgrund der hydrodynamischen Fokussierung des Hüllstroms einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und durch einen Detektor ausgewertet.^{444–446}

In dieser Arbeit durchgeführte durchflusszytometrische Analysen erfolgten am FACSCanto™ II der Firma BD.⁴⁴⁶ Die optischen Komponenten dieses Geräts bestehen aus drei Lasern. Aus einem blauen und violetten Festkörperlaser mit einer Leistung von 20 mW bzw. 30 mW und einem roten Helium-Neon-Laser mit einer Leistung von 17 mW, die in der Lage sind Licht bei 488 nm, 405 nm bzw. 633 nm zu emittieren.⁴⁴⁶ Die Streuung des Laserlichts erfolgt durch das Vorbeifließen einzelner Zellen. Die dabei entstandene Energie wird in Form von Photonen von Fluorochromen absorbiert und mit geringerer Energie und größerer Wellenlänge an den Detektor weitergeleitet und von diesem analysiert, intensiviert und digitalisiert. Das Vorwärtstreulicht (FSC: *forward scatter*) dient dabei als Maß für die Größe, und das Seitwärtstreulicht (SSC: *side scatter*) für die Granularität der Zelle.^{445,446}

Um die quantitative Expressionsstärke spezifischer Oberflächenantigene auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in dieser Arbeit nachzuweisen, wurden diese mit spezifischen Anti-humanen Antikörpern, die an die Fluoreszenzfarbstoffe Allophycocyanin (APC), Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) gekoppelt sind, markiert. Diese Fluoreszenzen

werden durch 10 Kanäle mit unterschiedlichen Emissionsmaxima des FACSCanto™ II erfasst.^{445,446}

2.2.6.2 Vorbereitung humaner CD14⁺ Makrophagen für durchflusszytometrische Messungen

Alle FACS-Vorbereitungen wurden, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt, um ein Internalisieren der Oberflächenrezeptoren CXCR4 und CCR5 zu unterbinden. Jeweils drei Inserts mit gleichen Kultivierungsbedingungen und Stimulationskonditionen wurden gepoolt, um eine ausreichende Zellmenge für die FACS-Messungen zu gewährleisten. Zunächst wurde altes Zellkulturmedium abgenommen, die Inserts mit adhärenierten Makrophagen in eine neue 6-Well Gewebekulturplatte überführt und zweimalig mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers in erwärmtem FACS-Puffer von der Membran abgelöst, abgespült und gepoolt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend in die mit FACS-Puffer vorbereiteten FACS-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 200 µl Fixierlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit FACS-Puffer gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in einem Volumen von 100 µl in FACS-Puffer verdünnter Antikörperlösung, entsprechend dem Schema in Tabelle 22, lichtgeschützt inkubiert.

Tabelle 22: Antikörperfärbung humaner CD14⁺ Makrophagen.

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
Maus IgG1α kappa CD11c PE	1:10	30 Minuten	4 °C
Maus IgG1α kappa CD14 PE	1:100	30 Minuten	4 °C
Maus IgG1α kappa CD163 PE	1:5	30 Minuten	4 °C
Maus IgG2α kappa CD184 PE	1:20	60 Minuten	Raumtemperatur
Maus IgG2α kappa CD195 FITC	1:20	60 Minuten	Raumtemperatur

Maus IgG1 α kappa PE	1:100	30 Minuten	4 °C
Maus IgG2 α kappa FITC	1:100	30 Minuten	4 °C
Maus IgG2 α kappa PE	1:100	30 Minuten	4 °C

Nach erfolgter Antikörperfärbung wurden die Zellen dreimalig mit FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation (5 Minuten, 1.500 rpm) gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Für die FACS-Messungen wurde das Zellpellet schließlich in 250 μ l FACS-Puffer aufgenommen und die Fluoreszenzintensitäten im FACSCanto™ II gemessen.

Die Analyse und Darstellung der digitalisierten Daten erfolgte mittels der FlowJo Software (Version 7.6.1) als Histogramm. Hierzu wurde die Zellzahl auf der Y-Achse gegenüber dem Fluorochrom-Signal auf der X-Achse aufgetragen oder ein Dot Plot Diagramm (zweidimensionale Punktwolke) erstellt, bei dem sowohl auf der X-Achse als auch auf der Y-Achse jeweils ein Fluoreszenzkanal gegeneinander aufgetragen wurde. Jeder Punkt repräsentiert in diesem Diagramm eine einzelne Zelle. Die Expressionsstärke des Oberflächenantigens wurde durch den geometrischen Mean der mittleren Fluoreszenzintensität angegeben.

2.2.6.3 Vorbereitung neutrophiler Granulozyten für durchflusszytometrische Messungen

Alle FACS-Vorbereitungen wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Jeweils zwei 6 cm Gewebekulturschalen wurden, um eine ausreichende Zelldichte für die FACS-Analysen zu gewährleisten, gepoolt. Hierzu wurde zunächst altes Zellkulturmedium abgenommen und die adhären Zellen zweimalig mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst, in FACS-Puffer resuspendiert und in die mit FACS-Puffer vorbereiteten FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (10 Minuten, 1.500 rpm). Im Anschluss wurden die Zellen in 200 μ l Fixierlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit FACS-Puffer gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde entsprechend dem Schema in Tabelle 23 in einem Volumen von 100 μ l in FACS-Puffer verdünnter Antikörperlösung lichtgeschützt inkubiert.

Tabelle 23: Antikörperfärbung neutrophiler Granulozyten.

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
Maus IgM CD15 APC	1:11	10 Minuten	4 °C
Maus IgM APC	1:11	10 Minuten	4 °C

Die weitere Behandlung der Zellen, die anschließende Messung am FACSCanto™ II sowie die Analyse und Darstellung der digitalisierten Daten mittels der FlowJo Software (Version 7.6.1) entsprach dem Vorgehen in Abschnitt 2.2.6.2.

2.2.6.4 Indirekte Immunofluoreszenz und konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie kommt es, nicht wie bei der konventionellen Lichtmikroskopie zu einer vollständigen Messung aller Objektpunkte gleichzeitig, sondern zu einer seriellen, punktuellen Bestrahlung der Probe. Das durch das Laserlicht erzeugte reflektierte Licht oder die Fluoreszenz wird hierbei punkt- und zeilenweise abgetastet und erzeugt einen optischen Schnitt, der schließlich zur Konstruktion eines hochaufgelösten kontrastreichen Abbildes der Probe führt. Dazu wird die Fokusebene schrittweise verschoben und die Bilder zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammengesetzt und digitalisiert. Emittiertes und reflektiertes Licht der Probe wird hierbei aufgrund der zur Fokusebene konjugiert angeordneten konfokalen Blende aus einer einzigen Ebene gesammelt, Licht aus anderen Ebenen wird hingegen inhibiert und nicht vom Detektor erkannt.^{447,448}

In dieser Arbeit wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop (META 510) der Firma Zeiss verwendet. Um Fluoreszenzfarbstoffe sowie fluoreszierende Proteine anzuregen besitzt das Mikroskop einen Argon-Laser, der Licht bei 405 nm, 458 nm, 488 nm und 514 nm emittiert sowie zwei Helium-Neon-Laser, die Licht bei 543 nm und 633 nm aussenden. Durch einen *acousto-optic modulator* (AOM) bzw. AOTF (*acousto-optic tunable filter*) wird die Intensität der jeweiligen Wellenlänge moduliert.^{447,448}

Die humanen Hepatomazellen der Linie Huh-7.5 wurden für Immunofluoreszenzfärbungen auf eine Zelldichte von $0,052 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und mit jeweils 1 ml auf sterilen Deckgläschen in einer 24-Well Gewebekulturplatte ausgesät. Die anschließende Kultivierung erfolgte zunächst für 24 Stunden und nach erfolgter Infektion der Zellen mit 2 MOI des Hepatitis C Virus vom Genotyp 2a (Stamm JC1) für weitere 72 Stunden bis zu einer Konfluenz von etwa 60-80 % in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C.

Für die Färbung wurde zunächst altes Zellkulturmedium entfernt und die Zellen zweimalig mit 37 °C erwärmtem PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 30 Sekunden fixiert und aufgrund charakteristischer Eigenschaften des Methanols parallel permeabilisiert. Dies ermöglicht schließlich die Färbung endogener Proteine von Interesse. Nach zweimaligem Waschen der Deckgläschen mit 4 °C kaltem PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ wurde unspezifisches Binden des Antikörpers durch den Einsatz von Blockierungspuffer (PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ supplementiert mit 5 % FCS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unterbunden. Anschließend wurden die Deckgläschen in eine Feuchtkammer überführt und die Zellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Hierzu wurde der monoklonale Anti-HCV NS5A Antikörper 1:200 in Blockierungspuffer verdünnt und 50 µl pro Deckgläschen aufgetragen. Anschließend wurden die Zellen einmal kurz und dreimalig für jeweils 10 Minuten mit kaltem PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Dies entfernt überschüssige, ungebundene Antikörper. Danach erfolgte die lichtgeschützte Inkubation der Zellen mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper, versetzt mit dem Kernfarbstoff DAPI (1:20.000), der ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt wurde, für 1 Stunde auf Eis. Nachfolgend wurden die Zellen erneut einmal kurz und dreimalig für jeweils 10 Minuten mit kaltem PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Um die Kristalle des PBS zu entfernen erfolgte schließlich ein Waschschriff mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{VE}}$ für 2 Minuten. Die Deckgläschen wurden nach kurzfristigem Abtauchen in Ethanol an der Luft getrocknet, in Mounting Medium eingedeckelt und konserviert. Um die Spezifität der Färbungen zu kontrollieren wurden jeweils entsprechende Färbungen ohne den Primärantikörper als Negativkontrolle mitgeführt. Die Ränder der Deckgläschen wurden schließlich mit Nagellack fixiert und abgedichtet. Die Lagerung der Deckgläschen erfolgte bis zur Mikroskopie lichtgeschützt bei 4 °C.

Die Analyse der Färbung erfolgte mittels LSM. Die Exzitationsmaxima und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorophore sind in der Tabelle 24 zusammengefasst. Die Steuerung der Komponenten sowie die Bildaufnahmen (63-fach vergrößert) erfolgten mit Hilfe der AxioVision Software (Version 4.8) der Firma Zeiss. Zur Vermeidung von Interferenzen der verschiedenen Farbstoffe wurden die Kanäle mittels eines Multitrack-Modus voneinander getrennt.

Tabelle 24: Verwendete Fluorophore zur Immunofluoreszenzfärbung.

Fluorophor	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Dye	490	525
DAPI	358	461

2.2.6.5 Quantitative Messung der Proteine CXCL8 und EGF mittels ELISA-Analysen

Eine quantitative Methode zum Nachweis von Proteinen ist der *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).^{449,450} Dazu werden zunächst 96-Well Gewebekulturplatten mit einem spezifischen Primärantikörper (*Capture Antibody*) gegen das nachzuweisende Protein beschichtet (Abbildung 19A). Anschließend werden die zu untersuchenden Proben sowie ein vom Hersteller stammender Standard in die Wells aufgetragen und das Zielprotein bzw. Zielantigen durch den immobilisierten Antikörper gebunden (Abbildung 19B). Nach Waschen der Wells, zum Entfernen ungebundener Bestandteile der Proben, erfolgt die Zugabe eines entsprechenden biotinylierten Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers zur Detektion (*Detection Antibody*; Abbildung 19C). Dieser bindet hierbei an ein anderes Epitop des Antigens und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen der Wells werden überschüssige, ungebundene Antikörper entfernt. Durch die Zugabe von Streptavidin- bzw. Avidin-HRP-Konjugat kommt es zur Bindung mehrerer Moleküle des biotinylierten Detektionsantikörpers und damit zu einer Signalverstärkung (Abbildung 19D). Zum Schluss werden die Wells noch mit einer Substrat-Lösung inkubiert. Das Substrat wird hierbei durch das Reporterenzym zu einem Farbstoff umgesetzt, welcher proportional zur Menge an gebundenem Protein ist. Durch Abstoppen der Reaktion erfolgt ein Farbumschlag von blau zu gelb, dessen Intensität photometrisch bei 450 nm gemessen wird (Abbildung 19E). Durch den vom Hersteller mitgeführten Standard wird zunächst dessen Regression und schließlich die Menge an Antigen berechnet.^{449–451}

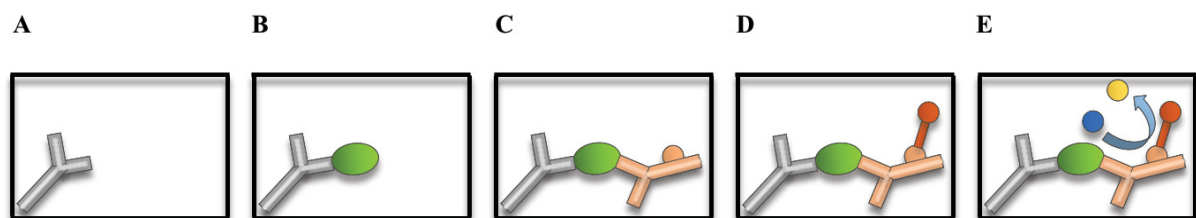


Abbildung 19: Schema des *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). **A** Beschichtung der 96-Well Gewebekulturplatte mit dem Primärantikörper. **B** Bindung des Zielantigens an den immobilisierten Primärantikörper. **C** Zugabe des Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers und Entstehung des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes. **D** Zugabe von Streptavidin- bzw. Avidin-HRP-Konjugat zur Signalverstärkung.

E Inkubation mit Substrat-Lösung und Umsetzung in einen blauen Farbstoff. Abstoppen der Reaktion sowie anschließende photometrische Messung des Farbumschlags. Abbildung modifiziert nach dem Original mit freundlicher Genehmigung von Abcam: ab100504-EGF Human ELISA Kit, Instructions for Use, Version 4, Last Updated 05 August 2014, abcam,⁴⁵² Copyright (2014).

Der quantitative Nachweis von CXCL8 und EGF erfolgte zum einen in konditionierten Zellkulturüberständen (vgl. Abschnitt 2.2.1.8), 1:100 verdünnt in entsprechendem Diluent des Herstellers, zum anderen in unverdünnten Serumproben HCV-infizierter bzw. nicht-infizierter Patienten, nach Herstellerangaben der Firma abcam (EGF)⁴⁵² bzw. eBioscience (CXCL8).⁴⁵³

2.2.6.6 *Proteome Profiler Human Chemokine Array*

Bei dem *Proteome Profiler Human Chemokine Array* handelt es sich um ein Sandwich Immunassay basierend auf einer Nitrozellulosemembran, die in einer Spot-Doppelbestimmung mit den entsprechenden *Capture*-Antikörpern zur Analyse der Zielproteine konjugiert ist. Hiermit ist es möglich parallel Differenzen in der relativen Expression 31 unterschiedlicher humaner Chemokine in einer einzelnen Probe zu analysieren.⁴⁵⁴

Hierzu wurden zunächst die Zellkulturüberstände (vgl. Abschnitt 2.2.1.8) mit einem Cocktail aus biotinylierten Detektionsantikörpern gemixt und anschließend mit der Array-Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Überschüssige, ungebundene Antikörper wurden schließlich von der Membran gewaschen und die *Capture*-Antikörper durch Streptavidin-HRP sowie Chemilumineszenz Detektionsreagenzien in der Image Station der Firma Kodak nach vom Hersteller definierter Exposition (1-10 Minuten) visualisiert. Hierbei erzeugt jeder *Capture*-Spot auf der Membran ein Signal, welches proportional zur Menge an gebundenem Protein ist. Die genaue Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.⁴⁵⁴

Die Analyse der Daten erfolgte durch exaktes Positionieren einer vom Hersteller stammenden, transparenten Schablone, auf den positiven Referenzpunkten mit den Koordinaten A1-2, A19-20, G1-2 und den negativen Referenzpunkten mit den Koordinaten F9-10. Das Identifizieren des entsprechenden Chemkokins erfolgte über die vom Hersteller angegebenen Koordinaten (Tabelle 26).⁴⁵⁴ Das Schema der Schablone ist der Abbildung 20 zu entnehmen.

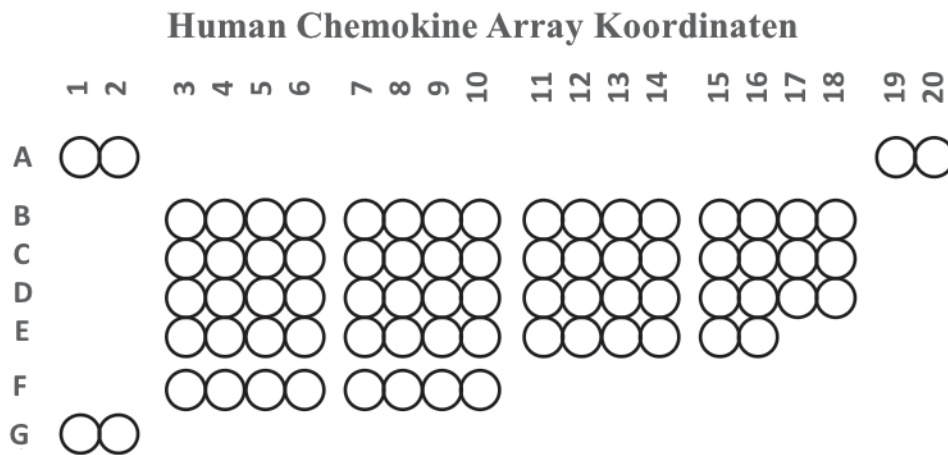


Abbildung 20: Schema der Schablone zur Analyse der Daten des *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays*. Die Kreise repräsentieren die 31 verschiedenen *Capture*-Antikörper auf der Nitrozellulosemembran, die wiederum für die einzelnen Chemokine stehen. Als Referenzspots dienen die Punkte mit den Koordinaten A1-2, A19-20 sowie G1-2, die zum einen zum exakten Positionieren der Schablone und zum Identifizieren der einzelnen Chemokine über die entsprechenden Koordinaten dienen und zum anderen nachweisen, dass der Array funktionstüchtig war. Als Negativkontrollpunkte dienten die *Capture*-Antikörper mit den Koordinaten F9-10. Abbildung übernommen und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von R&D Systems: Proteome Profiler Array, Human Chemokine Array Kit, Catalog Number ARY017 2014, R&D Systems,⁴⁵⁴ Copyright (2014).

Die densitometrische Analyse der Chemokinexpressionen erfolgte mit Hilfe der Molecular Imaging Software (Version 4.0.3) der Firma Kodak. Hierzu wurde zunächst die relative Pixeldichte der einzelnen Chemokinpunkte, der positiven und negativen Referenzpunkte sowie des Hintergrunds bestimmt. Abschließend wurde der Mittelwert der negativen Referenzpunkte von der Summe der Pixeldichte der einzelnen Chemokinpunkte subtrahiert und durch den Mittelwert der positiven Referenzpunkte dividiert.

2.2.7 Virus Hepatitis Systeme

2.2.7.1 Hepatitis C Virus Infektionssystem

Zur Analyse des gesamten viralen Lebenszyklus wurde in dieser Arbeit das Hepatitis C Virus Infektionssystem verwendet. Zur Produktion von *cell culture derived* HCV Partikeln basierend auf dem Genotyp 2a des JFH-1-Klons und Derivaten^{109,219} wurde das virale Vollängen-Genom des JFH-1-Klons zunächst *in vitro* transkribiert und anschließend durch Elektroporation in die humane Hepatomazelllinie Huh-7.5 transfiziert. Nachfolgend wurden die synthetisierten Virionen aus den Zellkulturüberständen extrahiert und die MOI zur Infektion von naiven Huh-7.5 Hepatomazellen mittels eines TCID50-Assays bestimmt.

***In vitro* Transkription von Volllängen HCV RNA**

Zunächst wurde das HCV JC1 Plasmid (Tabelle 13) in *E. coli* JM109 oder *E. coli* One Shot® TOP10 durch Hitzeschock transformiert (vgl. Abschnitt 2.2.3.2) und vermehrt. Die Plasmid-Isolation erfolgte, wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben, je nach Maßstab der angesetzten Kultur. Für die sich daran anschließende *in vitro* Transkription wurden zunächst 10 µg virale DNA linearisiert. Dies wurde durch enzymatischen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Mlu*I der Firma New England Biolabs für eine Stunde bei 37 °C erzielt. Mittels des QIAquick PCR Purification Kits wurde die DNA schließlich aufgereinigt und in 60 µl H₂O_{VE} eluiert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Transkription durch die T7-RNA-Polymerase für 3 Stunden bei 37 °C. Das Volumen der einzelnen Komponenten in einem Ansatz für die *in vitro* Transkription ist der Tabelle 25 zu entnehmen. Anschließend wurden weitere 2 µl T7-RNA-Polymerase hinzugesetzt und die Inkubation über Nacht bei 37 °C fortgeführt. Der Verdau der restlichen DNA erfolgte durch die Zugabe von 2,5 µl DNase [3 U/ml] für 30 Minuten bei 37 °C. Die Aufreinigung der auf diesem Weg transkribierten RNA erfolgte mittels RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen. Abschließend wurde die Konzentration der RNA spektralphotometrisch im NanoDrop 1000 bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

Tabelle 25: Volumen der einzelnen Komponenten in einem Ansatz für die *in vitro* Transkription.

Komponente	Volumen
5 x RRL-Puffer	20 µl
rNTPs [jeweils 25 mM]	12,5 µl
RNasin [40 U/ml]	2,5 µl
T7-RNA-Polymerase [20 U/ml]	4 µl

Transfektion durch Elektroporation

Zunächst wurden humane Hepatomazellen der Linie Huh-7.5 in Zellkulturflaschen (75 cm²) bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90 % kultiviert, einmalig mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und für 3 Minuten bei 37 °C trypsinisiert. Durch die Zugabe von frischem Kulturmedium wurde die Proteinasewirkung des Trypsins inaktiviert. Die Zellen wurden anschließend auf eine Konzentration von 1,5 x 10⁷ Zellen/ml eingestellt und jeweils auf ein 15 ml Falcon verteilt. Nachfolgend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 700 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Beckmann CS-15 R Centrifuge; Rotor S4180) und das Pellet einmalig mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺

gewaschen und in 1 ml Cytomix, supplementiert mit ATP (1:50) und GSH (1:50), aufgenommen. Zur Transfektion durch Elektroporation wurden 10 µg transkribierte HCV JC1 RNA und 400 µl Zellsuspension in eine Elektroporationskuvette überführt. Nach einem Puls von 270 V sowie 975 µF wurden jeweils 1,5 Ansätze in mit 18 ml Huh-7.5 Medium vorbereitete 15 cm Gewebekulturschale aufgenommen. Die Zeitkonstante lag bei jedem Puls bei etwa 20 ms. Die Kultivierung erfolgte bis zur Virusernte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C für insgesamt 96 Stunden. Nach etwa vier Stunden Kultivierung beginnt die Produktion der Viren.

Virusernte nach 48, 72 und 96 Stunden

Die Ernte der produzierten Viren erfolgte jeweils nach 48, 72 und 96 Stunden. Hierzu wurde das virushaltige Zellkulturmedium abgenommen, in ein 50 ml Falcon überführt und für 5 Minuten bei 1.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon überführt und bis zur Virusfällung bei 4 °C asserviert. Zur weiteren Virussynthese erfolgte die Zugabe von 20 ml frischem Kulturmedium zu den adhärennten Hepatomazellen und eine weitere Kultivierung bei 5 % CO₂ und 37 °C bis zur Abnahme des virushaltigen Mediums nach 96 Stunden.

PEG-Fällung des Virus

Um die Viren schließlich zu fällen erfolgte zunächst die Zugabe von 4,8 ml 40 % PEG-8000 in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ zu jeweils 20 ml zuvor geerntetem, virushaltigem Kulturmedium und eine Inkubation für 3 bis 4 Tage bei 4 °C zur maximalen Virusausschüttung. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation für 90 Minuten bei 8000 x g und 4 °C. Abschließend wurde das Virus-Pellet in DMEM aufgenommen, aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C asserviert.

Bestimmung der MOI mittels TCID₅₀-Assay

Um die Titer in einer virushaltigen Suspension zu bestimmen wurde in dieser Arbeit die kulturinfektiöse Dosis, die *Tissue Culture Infectious Dose 50* (TCID₅₀) verwendet. Sie repräsentiert ein Maß für die Verdünnung einer Viruslösung zur Infektion von 50 % der vorliegenden Zellen. Hierzu wurden zunächst humane Hepatomazellen der Linie Huh-7.5 auf eine Konzentration von 0,01 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und mit jeweils 200 µl pro Well auf eine 96-Well Gewebekulturplatte verteilt. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit Verdünnungen des Virus von 1:10 bis 1:50 in einer 6-fachen Bestimmung. Aus jeder Verdünnung wurden wiederum sieben 1:6 Verdünnungen durchgeführt. Hierzu wurden 40 µl

von einem Well in das darunter lokalisierte Well überführt. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert, zweimalig mit 4 °C kaltem PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und die Zellen für 15 Minuten bei -20 °C mit Methanol fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 4 °C kaltem PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ erfolgte die Permeabilisierung mit 0,5 % TritonX-100/PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur und erneutes Waschen der Zellen, dreimalig mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺. Anschließend erfolgte die Färbung des viralen Nicht-Strukturproteins NS3 durch Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper (1:1000) für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 180-200 rpm. Die Zugabe des Sekundärantikörpers (Anti-Maus-HRP, 1:200) erfolgte für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Zur Detektion des HCV-Proteins NS3 erfolgte die Zugabe einer Carbazol-Substrat-Lösung und eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt unter Schütteln. Hierbei wird das Substrat durch die *horseradish peroxidase* umgesetzt. Abschließend wurden die gefärbten Viruskolonien lichtmikroskopisch ausgezählt und die TCID₅₀ nach Spearman und Kärber bestimmt.⁴⁵⁵

2.2.7.2 Chronisches Hepatitis C Virus Infektionssystem

Das chronische Hepatitis C Virus Infektionssystem basiert auf dem konventionellen Hepatitis C Virus Infektionssystem, welches in Abschnitt 2.2.7 beschrieben wurde.^{109,219} Zur Chronifizierung und stetigen Virussyntese wurden humane Hepatomazellen der Linie Huh-7.5 mit einer Zelldichte von 0,1 x 10⁶ Zellen/ml mit jeweils 1 ml pro Well auf eine 12-Well Gewebekulturplatte verteilt. Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden in konventionellem Kulturmedium bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium gegen Huh-7.5 Medium, supplementiert mit 2 % DMSO, ersetzt und die Zellen für weitere 14 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Hierbei erfolgte alle 48 Stunden ein Mediumwechsel mit 1 ml pro Well. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen für 48 Stunden mit 2 MOI des Hepatitis C Virus vom Genotyp 2a (Stamm JC1) infiziert und schließlich für bis zu weitere vier Wochen bei 5 % CO₂ und 37 °C in DMSO-haltigem Huh-7.5 Medium kultiviert.

2.2.8 Analyse von Genen und Proteine durch Bioinformatische Methoden

Biomedizinische Literaturrecherche

NCBI, PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Datenbanken

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

RCSB PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Uniprot: <http://www.uniprot.org>

Design spezifischer Oligonukleotide

Primerdesign: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Kalkulationen von Schmelztemperaturen und weiteren Oligonukleotid-Charakteristika

OligoCalc, Primerdesign: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Sequenzvergleich von Nukleotiden und Proteinen

BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2.2.9 Statistische Analysen

Verwendete Daten in Diagrammen oder Tabellen bei den Auswertungen wurden als Mittelwert mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 5.01 (La Jolla, USA) unter Verwendung einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test. Die analysierten Resultate wurden als signifikant deklariert bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant).

3 Ergebnisse

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus ist eine der führenden Ursachen für die Entstehung chronischer Lebererkrankungen.⁵ Zur Etablierung einer persistierenden Infektion, unter Aufrechterhaltung der Replikation des viralen Genoms, manipuliert das Hepatitis C Virus die Infrastruktur des Wirts ohne die Vitalität seiner Wirtszelle schwerwiegend zu beeinträchtigen. Hierzu greift das Virus in zelluläre Signaltransduktionskaskaden ein, unterbindet die antivirale und angeborene Immunantwort des Wirts und passt die virale Replikation, unter Verwendung wirtsspezifischer Mediatoren, an die gegebenen zellulären Bedingungen an.^{153,156} Daten der Arbeitsgruppe legen nahe, dass zu diesen wirtsspezifischen Mediatoren, mit denen HCV interferiert, unter anderem die Chemokine gehören. So konnte in NS3/4A-transgenen Mäusen, die leberspezifisch den viralen NS3/4A-Protease/Helikase-Komplex exprimieren, die Aktivierung des in Hepatozyten inhibierten STAT1-Signalweges beobachtet werden. Die Befunde lassen davon ausgehen, dass NS3/4A durch die Wechselwirkung mit der TNF- α /LPS-induzierten Sekretion von Chemokinen die Freisetzung von IFN- γ in Hepatozyten bewirkt, die normalerweise selbst kein IFN- γ exprimieren⁴⁰² und damit zur Aktivierung von STAT1 führt. Da es hierbei zur Modifikation der Zusammensetzung der Immunzellpopulationen in der Leber kommt, ist eine direkte Interaktion von NS3/4A mit der intrazellulären STAT1-Signalkaskade auszuschließen.^{399–401} Auch Patientenstudien weisen auf die Interferenz des Hepatitis C Virus mit den Chemokinen und den Chemokinrezeptoren hin.^{310,318} Inwieweit HCV direkt in die Regulation der Chemokinexpression eingreift und welche biologische Relevanz die Chemokine für das Virus aufweisen ist bisweilen wenig erforscht.

Vor diesem Hintergrund wurde initial ein Screening der basalen Expression unterschiedlicher Chemokine, in An- und Abwesenheit des subgenomischen HCV-Replikons, mittels eines *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays* der Firma R&D Systems durchgeführt, um Interferenzen des Hepatitis C Virus mit spezifischen Chemokinen in seiner Wirtszelle zu charakterisieren. Von diesen Chemokinen galt es in der Folge den HCV-bedingten molekularen Mechanismus sowie die funktionelle Relevanz dieser Deregregationen aufzuklären.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden initial in der Anwesenheit des subgenomischen Replikons des Hepatitis C Virus (Genotyp 1b) in den humanen Hepatomazellen der Linie Huh-9.13 und Huh-5.15 absolviert. Die wichtigsten Befunde des Replikonsystems wurden im HCV Infektionssystem in mit dem HCV-Stamm JC1 vom Genotyp 2a infizierten Huh-7.5 Hepatomazellen verifiziert.

3.1 HCV modifiziert die basale Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle

Wie bereits aus der Literatur hervorgeht, korrelieren virale Infektionen mit der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren,^{329,456} so auch die Infektion mit dem Hepatitis C Virus.^{310,318} Während einer akuten und chronischen HCV-Infektion kommt es insbesondere zu einer verstärkten Expression von inflammatorischen Chemokinen, vorrangig mit einem CXC- sowie CC-Motiv, im peripheren Blut als auch in der Leber.³¹⁸ Im Plasma HCV-infizierter Patienten konnte bereits ein Anstieg der Konzentration der CXCR2-Liganden CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8 beobachtet werden.³¹⁹ Einen ersten Hinweis, dass HCV direkt in die Regulation der Expression dieser Chemokine eingreift, lieferten Daten der eigenen Arbeitsgruppe. So konnte in der Anwesenheit des subgenomischen Replikons des Hepatitis C Virus eine verstärkte Expression von CXCL1 sowie CXCL2 auf mRNA-Ebene und von CXCL8 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene belegt werden (unveröffentlichte Daten Triller und Bode).

Basierend auf diesen Befunden wurde initial die basale Expression von 31 unterschiedlichen Chemokinen, darunter CXCL1 und CXCL8, in An- und Abwesenheit des subgenomischen HCV-Replikons mittels *Proteome Profiler Human Chemokine Array* und anschließender Chemilumineszenz-Detektion analysiert. Auf diese Weise sollten, unter besonderer Berücksichtigung der CXCR2-Liganden, Chemokine oder Chemokinfamilien mit strukturellen und funktionellen Homologien identifiziert werden, mit deren Expression das Hepatitis C Virus führend in seiner Wirtszelle interferiert.

In der Folge konnte zum einen der Vorbefund der deutlich verstärkten Induktion der Expression von CXCL8 in der Gegenwart des HCV-Replikons validiert und erstmalig die HCV-vermittelte Induktion von CXCL1 auf Ebene des Proteins belegt werden (Abbildung 21). Zum anderen wurde tendenziell die Expression acht weiterer Chemokine durch die Präsenz des HCV-Replikationskomplexes modifiziert. So kam es zu einer tendenziell verstärkten Expression der Chemokine CCL2, CCL22, CCL26, CXCL5, CXCL10, des Midkins sowie des Neurotaktins und zugleich zu einer tendenziellen Herabregulation der basalen Expression von CCL20 und CXCL16. Währenddessen übte das HCV-Replikon keinen Einfluss auf die Expression der CC-Motiv-Chemokine 1 bis 5, 7, 14, 15, 17 bis 19, 21 und 28, auf die Expression von Chemerin, die Expression der CXC-Motiv-Chemokine 4, 7, 9, 11, 12 und 17 sowie auf die Expression von LCF und Lymphotaktin aus (Abbildung 21). Die Referenzkoordinaten der entsprechenden Chemokine sind in der Tabelle 26 zusammengefasst.

Die Ergebnisse legen nahe, dass das Hepatitis C Virus führend die basale Expression von CXCL1 und CXCL8 in seiner Wirtszelle verstärkt induziert.

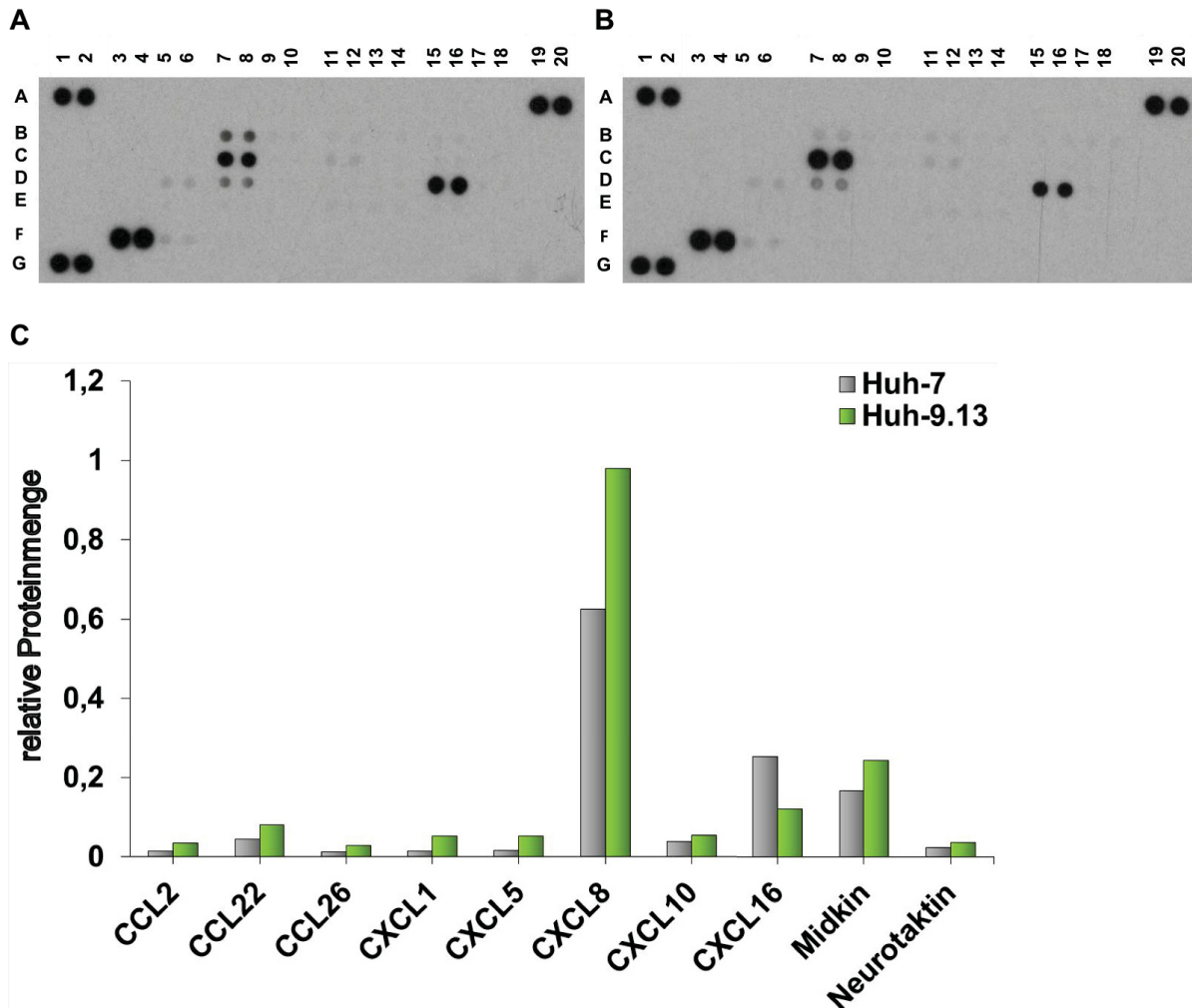


Abbildung 21: HCV modifiziert die basale Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. **A** und **B** Kultivierung humaner Huh-7 und Huh-9.13 Hepatomazellen bis zu einer Konfluenz von etwa 60 bis 80 % mit anschließendem Mediumwechsel. Generierung unstimulierter Zellkulturüberstände nach weiteren 8 Stunden Inkubation, entsprechend Abschnitt 2.2.1.8. **A** und **B** Analyse der unstimulierten Zellkulturüberstände von **A** Huh-7 und **B** Huh-9.13 Zellen mittels *Proteome Profiler Human Chemokine Array* und anschließender Chemilumineszenz-Detektion auf die basale Expression von 31 unabhängigen Chemokinen. Die entsprechenden Referenzkoordinaten der einzelnen Chemokine sind der Tabelle 26 zu entnehmen. **C** Densitometrische Auswertung des *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays* der Korrelation von **A** zu **B** auf die basale Expression der HCV-modifizierten Chemokine, bezogen auf die negativen und positiven Referenzpunkte der Array Membran. Hierzu wurde der Mittelwert der negativen Referenzpunkte von der Summe der Pixeldichte der einzelnen Chemokinpunkte subtrahiert und durch den Mittelwert der positiven Referenzpunkte dividiert, wobei die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Referenzpunkten der Array Membran berücksichtigt wurden.

Tabelle 26: Referenzkoordinaten der Chemokine.

Koordinate	Chemokin
A1-2, A19-20	Referenzpunkte
B3-4	CCL21, Exodus-2
B5-6	CCL28, MEC
B7-8	CXCL16, SRPSOX
B9-10	Chemerin, TIG-2, RARRES2
B11-12	CXCL5
B13-14	CCL26
B15-16	CX3CL1, Neurotaktin
B17-18	CXCL1
C3-4	CCL14, HCC-3
C5-6	CCL1, TCA3
C7-8	CXCL8
C9-10	LCF
C11-12	CXCL10
C13-14	CXCL11
C15-16	Lymphotaktin
C17-18	CCL2, MCAF
D3-4	CCL7
D5-6	CCL22, STCP-1, ABCD-1
D7-8	Midkin
D9-10	CXCL9
D11-12	CCL3, CCL4
D13-14	CCL15, MIP-5
D15-16	CCL20, LARC, Exodus-1

D17-18	CCL19, ECL, Exodus-3
E3-4	CXCL7, CTAP III
E5-6	CCL18, MIP-4
E7-8	CXCL4
E9-10	CCL5, SISd
E11-12	CXCL12, PBSF
E13-14	CCL17
E15-16	CXCL17, DMC
F3-4	Fibrinogen
F5-6	IL6ST, CD130
F7-8	TfR, CD71
F9-10	Negativkontrolle
G1-2	Referenzpunkte

3.2 HCV verstärkt die basale Expression von CXCL8 auf Protein-Ebene

Im Anschluss sollte nun die HCV-induzierte Steigerung der basalen Expression von CXCL8 im Replikonsystem als auch im HCV Infektionssystem verifiziert werden. Hierzu wurde die Proteinkonzentration von CXCL8 mittels ELISA in unstimulierten Zellkulturüberständen humaner HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 sowie Huh-5.15 Hepatomazellen und humaner mit dem HCV-Stamm JC1 infizierten Huh-7.5 Hepatomazellen quantifiziert. Zugleich wurde die Protein-Menge von CXCL8 in Seren von HCV-infizierten Patienten bestimmt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen des *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays*, Vordaten der Arbeitsgruppe sowie mit Daten der Literatur,^{331,332,457} konnte auch im ELISA die verstärkte Sekretion von CXCL8 in der Anwesenheit des subgenomischen HCV-Replikons nachgewiesen werden. Um klonale Effekte auszuschließen wurde die Konzentration von CXCL8 mittels ELISA in zwei Replikonsystemen (Huh-9.13 und Huh-5.15) untersucht. Hierbei wurde eine im Vergleich zu Huh-7 Kontrollzellen um den Faktor 2,5 verstärkte Expression des Chemokins in Huh-9.13 Zellen (Abbildung 22A) und eine um den Faktor drei gesteigerte Sekretion von CXCL8 in Huh-5.15 Zellen (Abbildung 22B) quantifiziert.

Eine tendenzielle HCV-bedingte Zunahme der Expression von CXCL8 konnte auch im HCV Infektionssystem festgestellt werden (Abbildung 22C). Hierzu wurden initial Huh-7.5 Zellen für 72 Stunden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 vom Genotyp 2a infiziert.

In Übereinstimmung mit den *in vitro* Zellkulturdaten konnte auch ein deutlicher Anstieg von CXCL8 *in vivo* beobachtet werden (Abbildung 22D). So wurde in Seren HCV-infizierter Patienten eine 6-fache Steigerung der Proteinkonzentration, verglichen mit Seren von gesunden Patienten, quantifiziert.

Die Befunde belegen in ihrer Gesamtheit, dass das Hepatitis C Virus in seiner Wirtszelle vorrangig die Expression von CXCL8 verstärkt induziert.

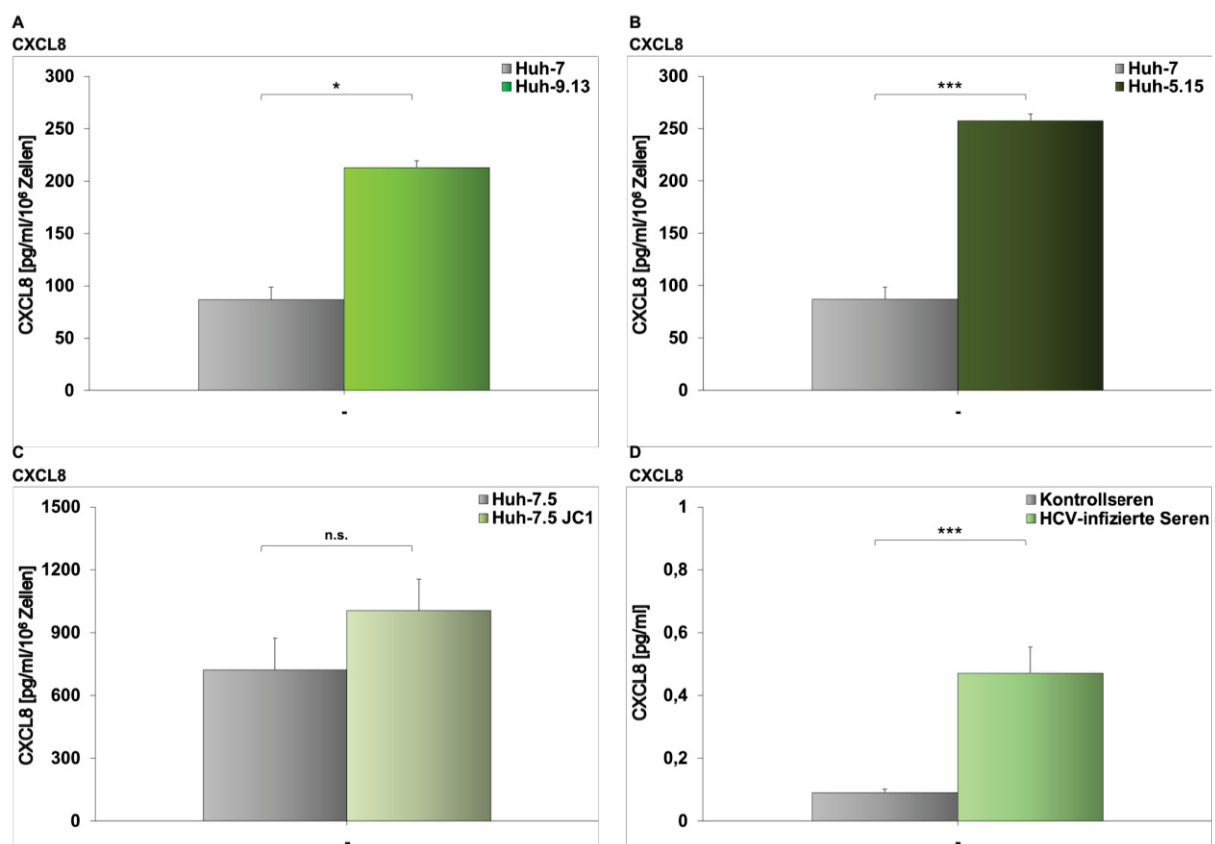


Abbildung 22: HCV verstärkt die basale Expression von CXCL8 in seiner Wirtszelle. A und B Huh-9.13 und Huh-5.15 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. Kultivierung humaner Huh-7, Huh-9.13 und Huh-5.15 Hepatomazellen bis zu einer Konfluenz von etwa 60 bis 80 % mit anschließendem Mediumwechsel. Generierung unstimulierter Zellkulturüberstände nach weiteren 8 Stunden Inkubation, entsprechend Abschnitt 2.2.1.8. C Huh-7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 infiziert. Huh-7.5 Zellen dienen der Kontrolle. Nach 72 Stunden Inkubation wurden unstimulierte Zellkulturüberstände generiert, entsprechend Abschnitt 2.2.1.8. A bis C Quantitative Analyse der Proteinkonzentration von CXCL8 in unstimulierten Zellkulturüberständen von A Huh-7 und Huh-9.13 Zellen B Huh-7 und Huh-5.15 Zellen und C Huh-7.5 und Huh-7.5 JC1 Zellen mittels spezifischem CXCL8-ELISA. D Quantitative Analyse der CXCL8-Proteinkonzentration in Seren von gesunden und Seren von HCV-infizierten

Patienten mittels spezifischem CXCL8-ELISA. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus **A** und **B** sieben, **C** vier und **D** neun unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

3.3 HCV verstärkt die basale Expression der CXCR2-Liganden auf Ebene der Transkription

Basierend auf den vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe und den Resultaten des *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays* sollte in den weiterführenden Untersuchungen die Interferenz des Hepatitis C Virus mit der Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL8 genauer charakterisiert werden. Aufgrund dessen wurde in RT-PCR-Analysen mittels spezifischer Primer gegen CXCL1, CXCL2 und CXCL8 untersucht, ob die HCV-induzierte Chemokinexpression bereits auf der Ebene der Transkription oder erst auf Protein-Ebene reguliert wird. Hierzu wurde initial die Transkriptmenge der genannten Chemokine in Huh-7 und den HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 und Huh-5.15 Hepatomazellen quantifiziert.

Wie der Abbildung 23A zu entnehmen ist, wird die basale mRNA-Expression von CXCL1 um den Faktor 32, von CXCL2 um den Faktor 8 und von CXCL8 um den Faktor 25 durch die Präsenz des HCV-Replikationskomplexes in Huh-9.13 Zellen verstärkt. Zugleich wurde eine 3-fache Transkriptmenge von CXCL1 und CXCL2 sowie eine 10-fach verstärkte mRNA-Expression von CXCL8 in Huh-5.15 Zellen im Vergleich zu Huh-7 Kontrollzellen quantifiziert (Abbildung 23B). Ebenso konnte in Huh-7.5 Zellen, welche mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 für 72 Stunden infiziert wurden, eine deutlich verstärkte Induktion der Expression der genannten Signalproteine auf mRNA-Ebene beobachtet werden. Wie in der Abbildung 23C dargestellt ist, wurde jeweils eine 5-fache Steigerung der CXCL1- und CXCL2-Expression und eine um den Faktor 8,9 verstärkte CXCL8-Expression auf transkriptioneller Ebene gemessen.

Neben dem Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Induktion der CXCL1-, CXCL2- und CXCL8-Expression, wurde in dieser Arbeit zugleich die Möglichkeit einer HCV-vermittelten Modifikation von CXCL3 untersucht. Diese Überlegung basiert auf strukturellen und funktionellen Homologien der Chemokine. So werden sie zum einen aufgrund ihrer definierten Anzahl und Lokalisation ihrer Cysteine sowie einem homologen ELR-Motiv aus der präferenziellen Aminosäureabfolge Glutamin, Leucin und Arginin,^{311,312} in dieselbe Unterfamilie der CXC-Motiv-Chemokine eingeordnet³⁰⁶ und vermitteln zum anderen analog ihre Funktionen über denselben spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, CXCR2.³¹²

Aufgrund dessen werden CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL8 auch als CXCR2-Liganden zusammengefasst.

Um den Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Induktion der CXCL3-Expression zu evaluieren, erfolgte zunächst eine quantitative Analyse der Transkriptmenge des Chemokins mittels RT-PCR sowie mit Hilfe eines spezifischen gegen CXCL3-gerichteten Primers, in An- als auch in Abwesenheit des subgenomischen HCV-Replikons. Der Abbildung 23A ist zu entnehmen, dass die Präsenz des HCV-Replikationskomplexes in Huh-9.13 Zellen eine um den Faktor 3 verstärkte CXCL3-mRNA-Expression zur Folge hatte. Parallel konnte in Huh-5.15 Zellen eine deutliche Steigerung der basalen Expression von CXCL3 auf Transkript-Ebene um den Faktor 6 festgestellt werden (Abbildung 23B). Ebenso resultierte die Infektion humaner Huh-7.5 Zellen mit dem HCV-Stamm JC1 für 72 Stunden in einer um den Faktor 4 gesteigerten, transkriptionellen CXCL3-Expression und verifizierte die Befunde des Replikonsystems, was der Abbildung 23C zu entnehmen ist.

Die bisher erbrachten Befunde des Replikon- und des HCV Infektionssystems konnten zusammenfassend nachweisen, dass das Hepatitis C Virus führend die Expression der CXCR2-Liganden in seiner Wirtszelle induziert, verstärkt und bereits auf transkriptioneller Ebene reguliert. Aufgrund dessen wurden die nachfolgenden Untersuchungen dieser Arbeit auf die HCV-vermittelte Induktion der CXCR2-Liganden-Expression fokussiert, von welchen in der Folge zum einen der molekulare Mechanismus, über den HCV die Überexpression dieser zellulären Mediatoren reguliert und zum anderen die biologische und funktionelle Relevanz der HCV-überexprimierten Chemokinsynthese genauer charakterisiert werden sollte.

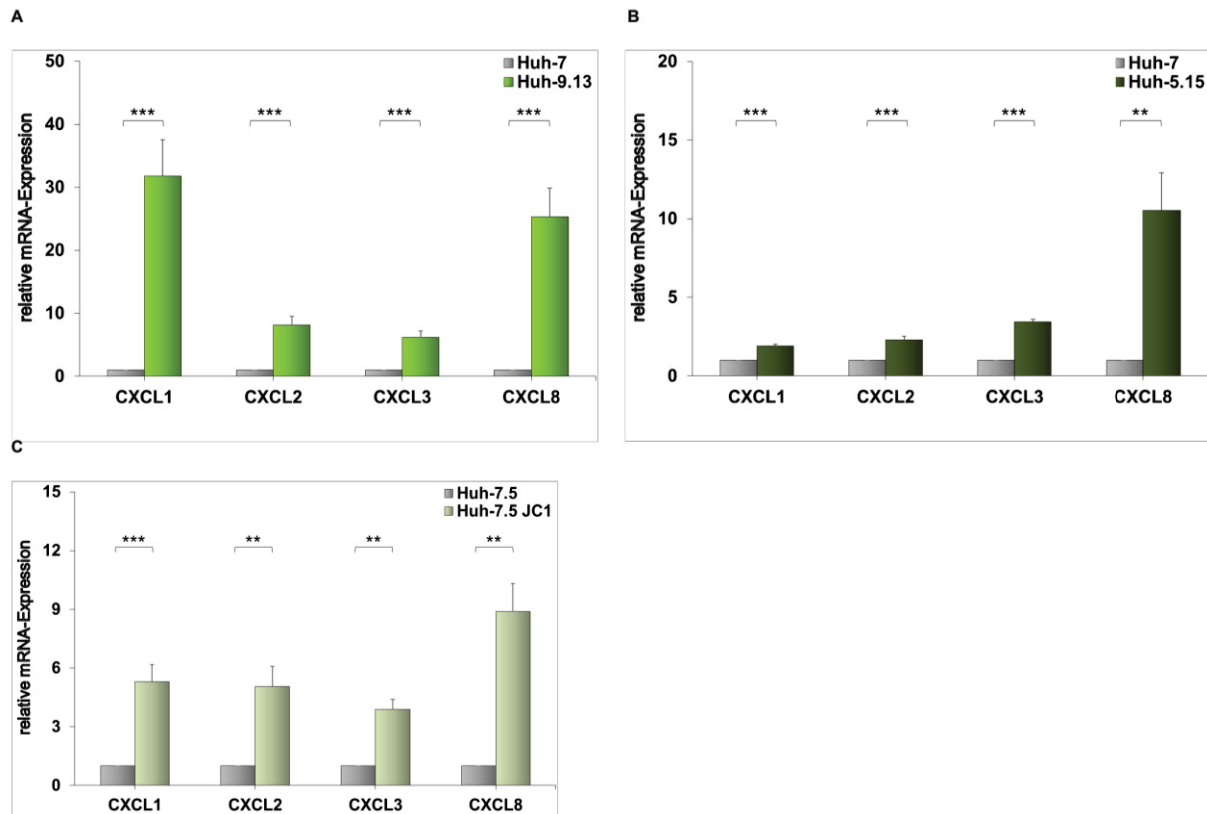


Abbildung 23: HCV verstärkt fñhrend die basale Expression der CXCR2-Liganden in seiner Wirtszelle auf Ebene der Transkription. A und B Huh-9.13 und Huh-5.15 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. C Huh-7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 für 72 Stunden infiziert. Huh-7.5 Zellen dienen der Kontrolle. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL8 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur A und B Huh-7 Kontrolle bzw. C Huh-7.5 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus A 35, B und C drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

3.4 HCV modifiziert EGF-vermittelt die Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle

Vorausgehende Resultate der Arbeitsgruppe belegen bereits die Interferenz des Hepatitis C Virus mit dem EGF-induzierten Signalweg.¹⁵⁶ Diesbezüglich wurde eine Steigerung der subgenomischen Replikation in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor sowie eine HCV-vermittelte Sensibilisierung der Wirtszelle für die EGF-induzierte Signalantwort durch die Aktivierung des PLC- γ - und des PI3K/Akt-Signalweges beobachtet.^{156,401}

EGF als extrazellulärer Ligand des EGFR ist ein essentieller Regulator und Induktor von Zellmigration, Zelldifferenzierung, Zellproliferation sowie überlebenssignalisierender Wirkungen, vermittelt durch EGFR-induzierte zelluläre Signaltransduktionskaskaden.^{233,234} Wie bereits aus der Literatur hervorgeht, wird die Sekretion von CXCL8 in der Leber führend von Kupffer-Zellen, Hepatozyten und LSECs (*Liver sinusoidal endothelial cells*) durch spezifische Stimuli induziert.¹⁵⁵ Hierzu zählen pro-inflammatorische Zytokine, darunter TNF- α ^{155,326} und der epidermale Wachstumsfaktor,³²⁵ aber auch oxidativer Stress³²⁷ sowie bakterielle Infektionen.³²⁸ Des Weiteren korrelieren virale Infektionen, darunter Infektionen mit dem Respiratorischen Synzytial Virus (RS-Virus) mit einer gesteigerten Expression der CXCR2-Liganden.^{329,456,458} Zugleich lieferten unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe erste Hinweise darauf, dass die basal durch HCV induzierte Überexpression von CXCL1, CXCL2 und CXCL8 in der Anwesenheit des HCV-Replikons durch die externe Zugabe von EGF verstärkt wird.

Vor diesem Hintergrund sollte folglich validiert werden, ob das Hepatitis C Virus die EGF-induzierte Signalantwort für die verstärkte Induktion und molekulare Regulation der CXCR2-Liganden-Expression bzw. zur Synthese weiterer Chemokine in seiner Wirtszelle moduliert.

Hierzu wurden Huh-7 und Huh-9.13 Zellen mit 40 ng/ml EGF für 8 Stunden stimuliert und die nachfolgend gewonnenen Zellkulturüberstände mittels *Proteome Profiler Human Chemokine Array* und anschließender Chemilumineszenz-Detektion auf die Expression von 31 unterschiedlichen Chemokinen analysiert. Wie der Abbildung 24A (Huh-7 Kontrollzellen) und der Abbildung 24B (Huh-9.13 Zellen) zu entnehmen ist, resultierte die Stimulation der Zellen sowie die Präsenz des HCV-Replikons in einer deutlichen Verstärkung der Expression von CXCL1 und CXCL8 und verifizierte den Vorbefund der Arbeitsgruppe. Des Weiteren wurde im Vergleich zu Huh-7 Kontrollzellen EGF-vermittelt in den HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Zellen eine tendenzielle Steigerung der CCL7-Expression, der Expression des CC-Motiv-Chemokins 20, des CXC-Motiv-Chemokins 5 und der Midkin-Expression sowie zugleich eine tendenzielle Herabregulation der CC-Chemokine 17 und 22, der CXC-Chemokine 10, 12 und 16 sowie des Neurotaktins beobachtet (Abbildung 24). Währenddessen blieben die Chemokinexpressionen der CC-Chemokine 1, 2, 3, 5, 14, 15, 18, 19, 21, 26 und 28, des Chemerins, der CXC-Motiv-Chemokine 4, 7, 9, 11 und 17, sowie von LCF und Lymphotaktin HCV- und EGF-abhängig unbeeinflusst. Die Referenzkoordinaten der einzelnen Chemokine sind der Tabelle 26 zu entnehmen.

Die Ergebnisse lassen annehmen, dass das Hepatitis C Virus die EGF-induzierte Signalantwort insbesondere für die verstärkte Induktion und molekulare Regulation von CXCL1 und CXCL8 in seiner Wirtszelle moduliert.

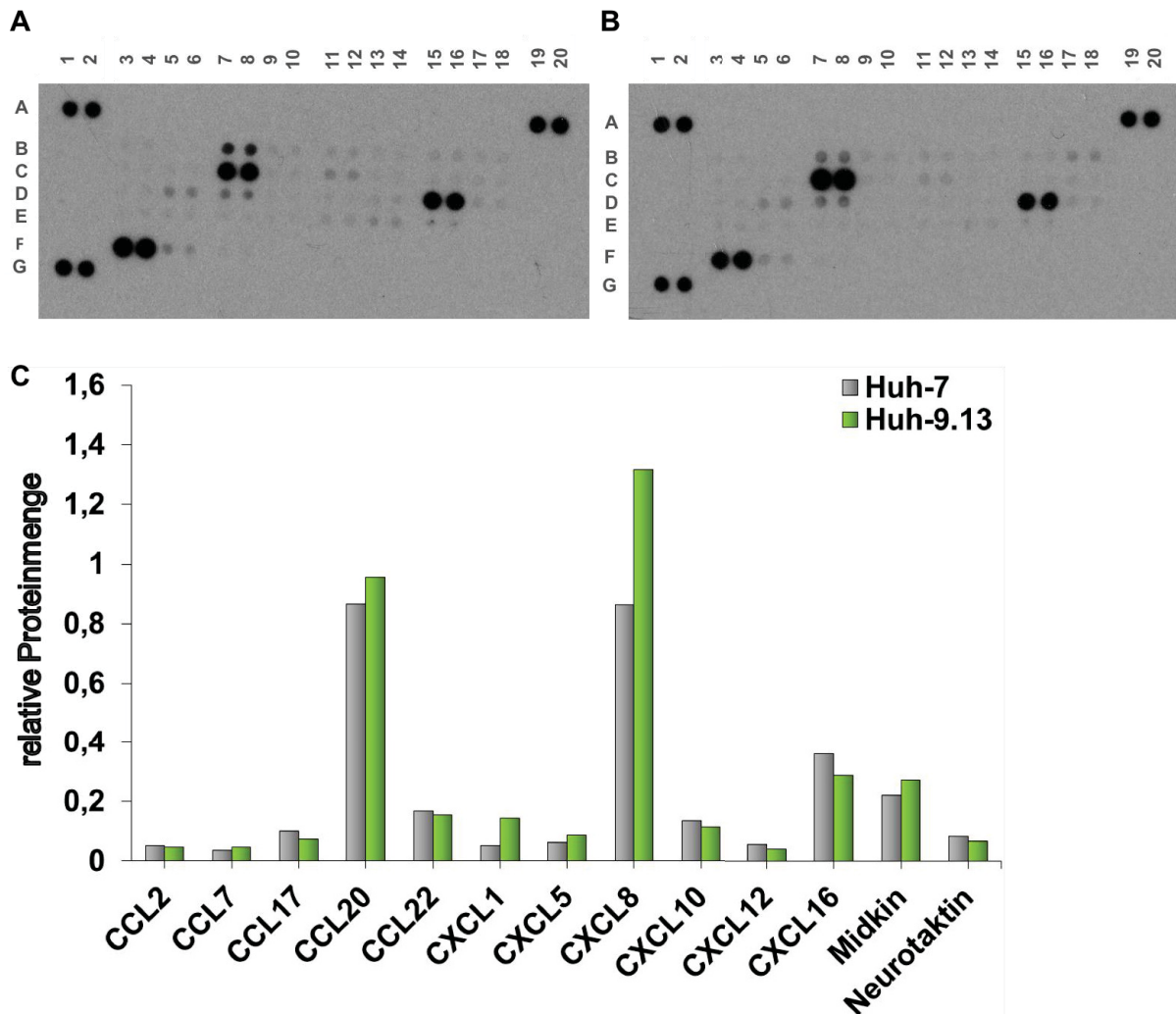


Abbildung 24: HCV modifiziert EGF-vermittelt die Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. **A** und **B** Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden für 8 Stunden mit 40 ng/ml EGF stimuliert und anschließend wurden die konditionierten Zellkulturüberstände humaner Huh-7 und Huh-9.13 Hepatomazellen entsprechend Abschnitt 2.2.1.8 generiert. Analyse der Zellkulturüberstände von **A** Huh-7 und **B** Huh-9.13 Zellen mittels *Proteome Profiler Human Chemokine Array* und anschließender Chemilumineszenz-Detektion auf die Expression von 31 unabhängigen Chemokinen. Die entsprechenden Referenzkoordinaten der einzelnen Chemokine sind der Tabelle 26 zu entnehmen. **C** Densitometrische Auswertung des *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays* der Korrelation von **A** zu **B** auf die Expression der HCV-modifizierten Chemokine in Antwort auf EGF, bezogen auf die negativen und positiven Referenzpunkte der Array Membran. Hierzu wurde der Mittelwert der negativen Referenzpunkte von der Summe der Pixeldichte der einzelnen Chemokinpunkte subtrahiert und durch den Mittelwert der positiven Referenzpunkte dividiert, wobei die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Referenzpunkten der Array Membran berücksichtigt wurden.

3.5 HCV konvertiert EGF in einen potenten Induktor und Regulator der CXCR2-Liganden-Expression

Die vorangehend ausgeführten Untersuchungen legen nahe, dass das Hepatitis C Virus den epidermalen Wachstumsfaktor zur Induktion und Regulation der CXCR2-Liganden-Expression modifiziert. Es sollte daher initial untersucht werden, ob die basal durch HCV-induzierte Überexpression von CXCL1 und CXCL8 in Antwort auf EGF verstärkt wird. Aufgrund dessen wurden die densitometrischen Daten des basalen mit den densitometrischen Daten des EGF-stimulierten *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays* verglichen. Wie der Abbildung 25 zu entnehmen ist, führte die EGF-Stimulation der HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Zellen zu einer Steigerung der bereits basal durch das Hepatitis C Virus bedingten Überexpression von CXCL1 und CXCL8.

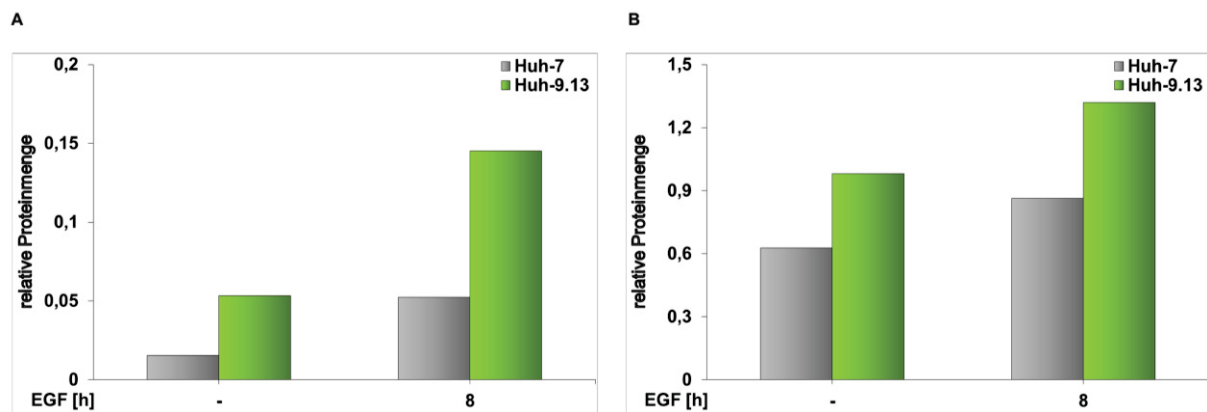


Abbildung 25: Die basal durch HCV-induzierte Überexpression von CXCL1 und CXCL8 wird in Antwort auf EGF verstärkt. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden für 8 Stunden mit 40 ng/ml EGF stimuliert und anschließend die konditionierten Zellkulturüberstände humaner Huh-7 und Huh-9.13 Hepatomazellen entsprechend Abschnitt 2.2.1.8 generiert. Analyse der Zellkulturüberstände auf die Expression von **A** CXCL1 und **B** CXCL8 mittels *Proteome Profiler Human Chemokine Array* und anschließende Chemilumineszenz-Detektion. Densitometrische Auswertung der relativen Protein-Expression von **A** CXCL1 und **B** CXCL8; basaler Array im Vergleich mit dem EGF-stimulierten Array (vgl. Abbildung 21 basaler Array und vgl. Abbildung 24 EGF-stimulierter Array). Huh-7 Kontrollzellen in der Korrelation mit Huh-9.13 Zellen, bezogen auf die negativen und positiven Referenzpunkte der Array Membran. Hierzu wurde der Mittelwert der negativen Referenzpunkte von der Summe der Pixeldichte der einzelnen Chemokinpunkte subtrahiert und durch den Mittelwert der positiven Referenzpunkte dividiert, wobei die Ergebnisse aus jeweils zwei unabhängigen Referenzpunkten der Array Membran berücksichtigt wurden.

Im Anschluss galt es nun zu prüfen, ob das Hepatitis C Virus EGF-vermittelt die Expression aller CXCR2-Liganden CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8 induziert, verstärkt und bereits auf der Ebene der Transkription reguliert.

Hierzu wurden Huh-7 Kontrollzellen, Huh-9.13 und Huh-5.15 Zellen, welche den subgenomischen, viralen Replikationskomplex enthalten, mit 40 ng/ml EGF stimuliert und anschließend die mRNA-Expression der Chemokine mittels RT-PCR und mit Hilfe von spezifischen Primern gegen CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL8 analysiert.

Die Behandlung der Zellen mit EGF führte zu einer deutlichen Steigerung der mRNA-Expression der CXCL-Chemokine 1 (Abbildung 26A), 2 (Abbildung 26B), 3 (Abbildung 26C) und 8 (Abbildung 26D) sowohl im Vergleich zu Huh-7 Kontrollzellen als auch zu unstimulierten Huh-9.13 bzw. Huh-5.15 Zellen. So wurde die basale HCV-induzierte Expression von CXCL1 in Antwort auf EGF nach 160 Minuten nochmals um den Faktor 2,73, von CXCL2 um den Faktor 1,6, von CXCL3 um den Faktor 1,7 und von CXCL8 um den Faktor 21,6 in Huh-9.13 Zellen gesteigert. Zugleich wurde in Huh-5.15 Zellen als Folge der EGF-Stimulation nach 160 Minuten eine 2,5-fache Verstärkung der basalen HCV-induzierten CXCL1-, eine 2,3 fache CXCL2- als auch CXCL3- und eine 7,5-fache CXCL8-Expression festgestellt (Abbildung 26). Nach mehr als 240 Minuten EGF-Stimulation war tendenziell eine Abnahme der Chemokinexpression in Huh-9.13 und Huh-5.15 Zellen zu beobachten (Abbildung 26).

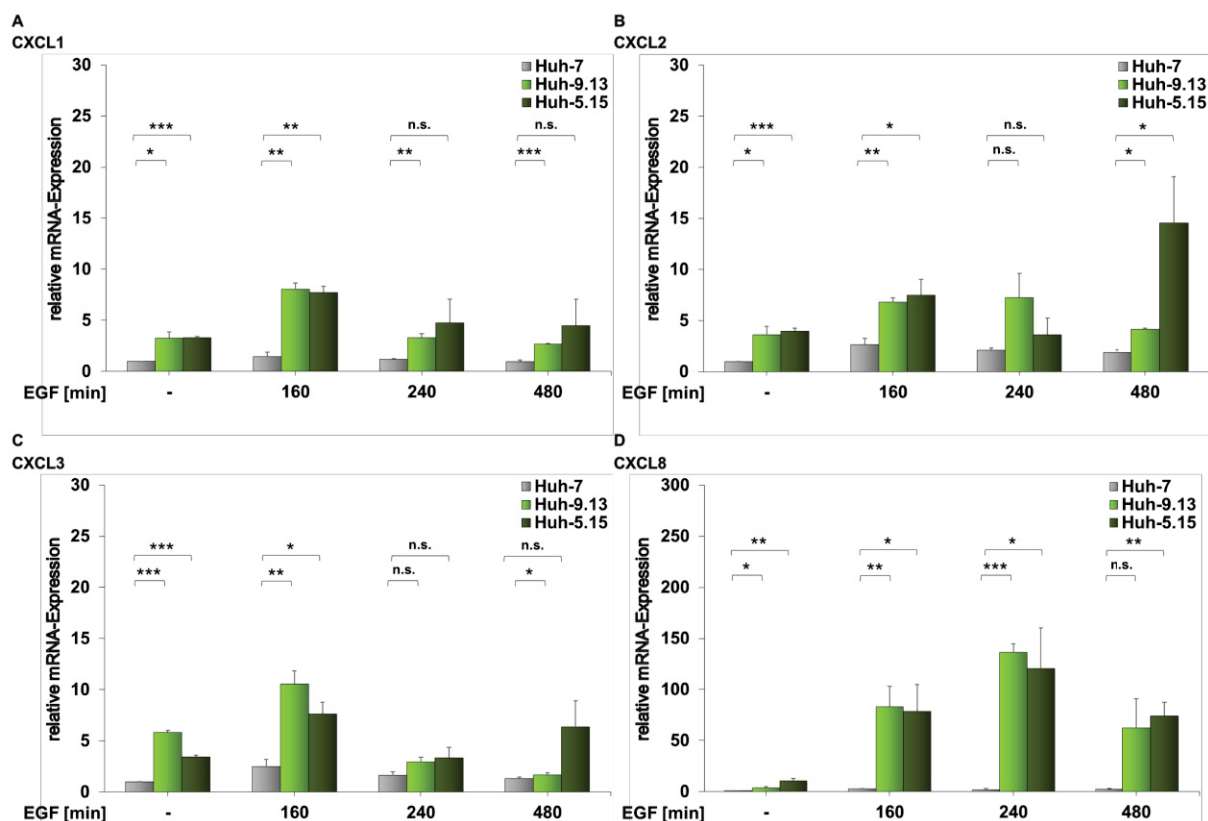


Abbildung 26: Die HCV-induzierte CXCR2-Liganden-Expression wird in Antwort auf EGF gesteigert. Huh-9.13 Zellen und Huh-5.15 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der

Kontrolle. Huh-7, Huh-9.13 und Huh-5.15 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A** CXCL1, **B** CXCL2, **C** CXCL3 und **D** CXCL8 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Weiterführend sollten die Befunde des Replikonsystems im HCV Infektionssystem verifiziert werden. Hierzu wurden Huh-7.5 Zellen mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 infiziert und nach 72 Stunden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Die Transkriptmenge der Chemokine wurde in der RT-PCR mit spezifischen gegen CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL8 gerichteten Primern quantifiziert. In Übereinstimmung mit den Resultaten des Replikonsystems (Abbildung 26) konnte in mit dem HCV-Stamm JC1 infizierten Huh-7.5 Zellen als Reaktion auf den epidermalen Wachstumsfaktor bereits nach 160 Minuten die basale mRNA-Expression der CXCR2-Liganden nochmals deutlich gesteigert werden (Abbildung 27). Hierbei wurde eine Steigerung der CXCR2-Liganden-Expression auf transkriptioneller Ebene als Konsequenz der EGF-Stimulation um den Faktor 4 bei CXCL1 (Abbildung 27A), um den Faktor 1,9 bei CXCL2 (Abbildung 27C), um den Faktor 11,9 bei CXCL3 (Abbildung 27C) und um den Faktor 5 bei CXCL8 (Abbildung 27D) festgestellt. Nach mehr als 240 Minuten EGF-Stimulation war tendenziell eine Herabregulation der Chemokinexpression zu beobachten (Abbildung 27).

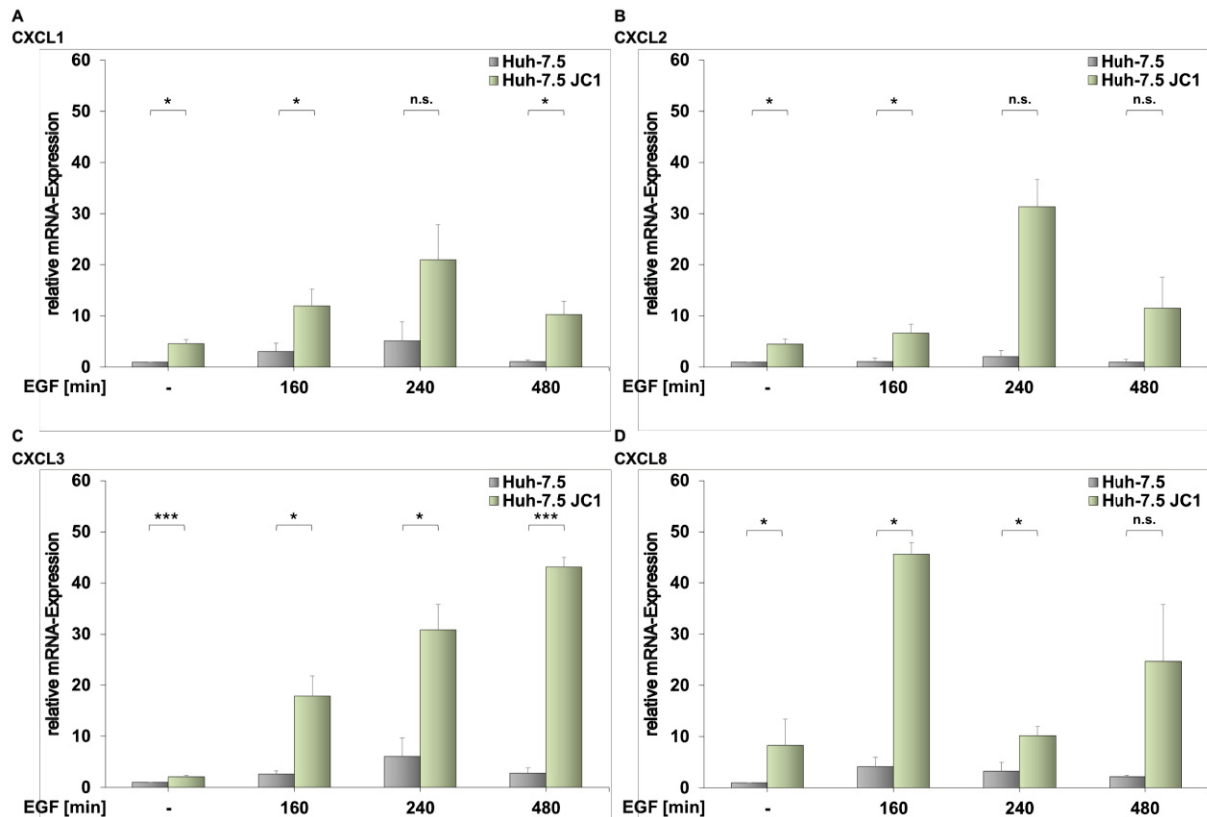


Abbildung 27: Die HCV JC1-induzierte CXCR2-Liganden-Expression wird in Antwort auf EGF gesteigert. Huh-7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 für 72 Stunden infiziert und mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Huh-7.5 Zellen dienten der Kontrolle. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A CXCL1**, **B CXCL2**, **C CXCL3** und **D CXCL8** mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7.5 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Übereinstimmend mit diesen Befunden konnte auch auf Protein-Ebene eine durch HCV entsprechende Verstärkung des EGF-Effektes auf die Expression des CXCR2-Chemokins 8 beobachtet werden. So war die Freisetzung von CXCL8 in den Überständen der HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Zellen um den Faktor 3,2 (Abbildung 28A) und in Huh-5.15 Zellen um den Faktor 3,2 verstärkt.

Ebenso kam es nach der Infektion der Huh-7.5 Hepatomazellen mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 für 72 Stunden und der anschließenden Stimulation mit 40 ng/ml EGF zu einer 2,5-fach gesteigerten Sekretion von CXCL8 (Abbildung 28B).

In der Gesamtheit lassen die bisher erbrachten Befunde annehmen, dass das Hepatitis C Virus den epidermalen Wachstumsfaktor in einen potenten Induktor und Regulator der CXCR2-Liganden-Expression konvertiert.

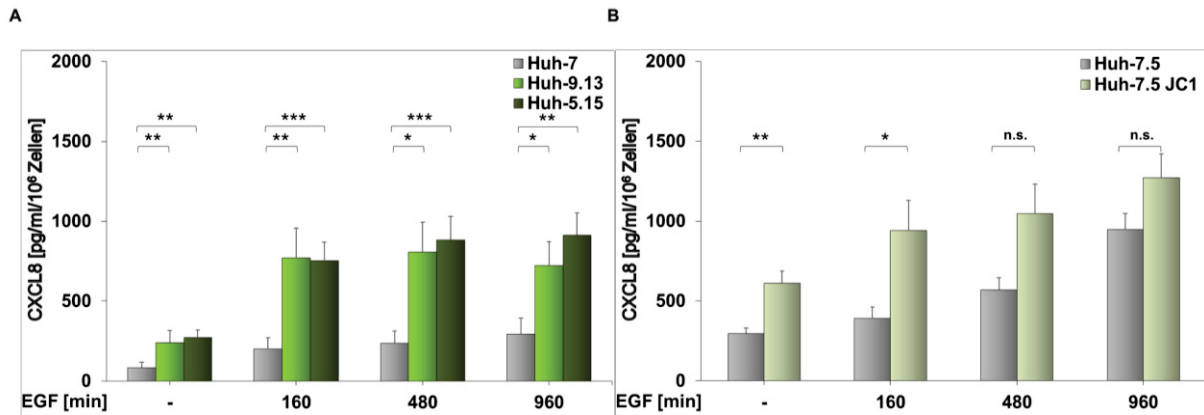


Abbildung 28: Die HCV-induzierte CXCL8 Expression wird in Antwort auf EGF weiter gesteigert. **A** Huh-9.13 Zellen und Huh-5.15 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. Huh-9.13 und Huh-5.15 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. **B** Huh-7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 infiziert und nach 72 Stunden Inkubation mit 40 ng/ml EGF stimuliert. **A** und **B** Konditionierte Zellkulturüberstände wurden entsprechend Abschnitt 2.2.1.8 generiert und für ELISA-Analysen verwendet. **A** Quantitative Analyse der Proteinkonzentration von CXCL8 in konditionierten Zellkulturüberständen von Huh-7, Huh-9.13 und Huh-5.15 Zellen mittels spezifischem CXCL8-ELISA. **B** Quantitative Analyse der CXCL8-Expression in konditionierten Zellkulturüberständen humaner Huh-7.5 und mit dem HCV-Stamm JC1 infizierten Huh-7.5 Hepatomazellen auf Protein-Ebene mittels spezifischem CXCL8-ELISA. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus **A** vier und **B** drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

3.6 HCV ko-konvertiert EGF und IL-1 β in potente Induktoren und Regulatoren der CXCR2-Liganden-Expression

Wie einleitend in Abschnitt 1.3.1 und 1.3.3 bereits ausführlich beschrieben, geht eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus mit einer Erhöhung der Serumkonzentration von IL-1 β einher.³⁰¹ So konnte belegt werden, dass Kupffer-Zellen für die Produktion von IL-1 β während einer HCV-Infektion verantwortlich sind.³⁰¹ Makrophagen, welche mit dem HCV-Stamm JFH-1 infiziert wurden, sekretieren IL-1 β -Konzentrationen von bis zu 3000 pg/ml.³⁰¹ Als pro-inflammatorisches Zytokin induziert und verstärkt IL-1 β die Zellproliferation sowie die Zelldifferenzierung.²⁹³ Zudem ist IL-1 β ein essentieller Induktor und Regulator zahlreicher Signaltransduktionskaskaden.²⁹³ Es aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor NF- κ B durch die gesteigerte Degradierung seines inhibitorischen Proteins I κ B α .¹⁹⁵ Unveröffentlichte

Daten der Arbeitsgruppe (Spitzley und Bode) legen ferner nahe, dass das Hepatitis C Virus die IkB ζ - sowie die daraus resultierende Lipocalin-2-Expression IL-1 β -abhängig supprimiert und auf diese Weise inhibierende Effekte auf die Zellproliferation reduziert.⁴⁵⁹

Des Weiteren geht aus der Literatur hervor, dass sowohl EGF³²⁵ als auch IL-1 β ³²⁶ zu einem Anstieg der CXCL8-Expression unter physiologischen Bedingungen führen.

Basierend auf denen in der Literatur beschriebenen Interferenzen des Hepatitis C Virus mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 β und den vorangegangenen Befunden dieser Arbeit, der EGF-vermittelten Verstärkung der basalen HCV-induzierten CXCR2-Liganden-Expression, resultierte weiterführend die Fragestellung, ob HCV neben EGF auch IL-1 β zur verstärkten Induktion und Regulation der CXCR2-Liganden-Expression modifiziert und ob die Ko-Stimulation mit beiden Faktoren zu einer weiteren Steigerung der Chemokinexpressionen führt.

Aufgrund dessen wurden Huh-7 und Huh-9.13 Zellen einerseits mit 40 ng/ml EGF oder 50 U/ml IL-1 β stimuliert und andererseits mit beiden Zytokinen in den angegebenen Konzentrationen ko-stimuliert. Die Transkriptmenge von CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8 wurde mittels RT-PCR und mit Hilfe von spezifischen Primern gegen die genannten Chemokine quantifiziert.

Wie der Abbildung 29 zu entnehmen ist, wurde die basal verstärkte HCV-induzierte Expression des Chemokins CXCL1 um den Faktor 113, CXCL2 um den Faktor 31, CXCL3 um den Faktor 72 und CXCL8 um den Faktor 7 als Reaktion auf das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β verstärkt. Die Konsequenz der Ko-Stimulation mit EGF und IL-1 β sowie die Präsenz des HCV-Replikons in Huh-9.13 Zellen führte sogar zu einer weiteren Steigerung der Chemokinexpression.

Die Befunde deuten daraufhin, dass das Hepatitis C Virus nicht nur den epidermalen Wachstumsfaktor, sondern auch das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β in einen potenten Induktor und Regulator der CXCR2-Liganden-Expression konvertiert.

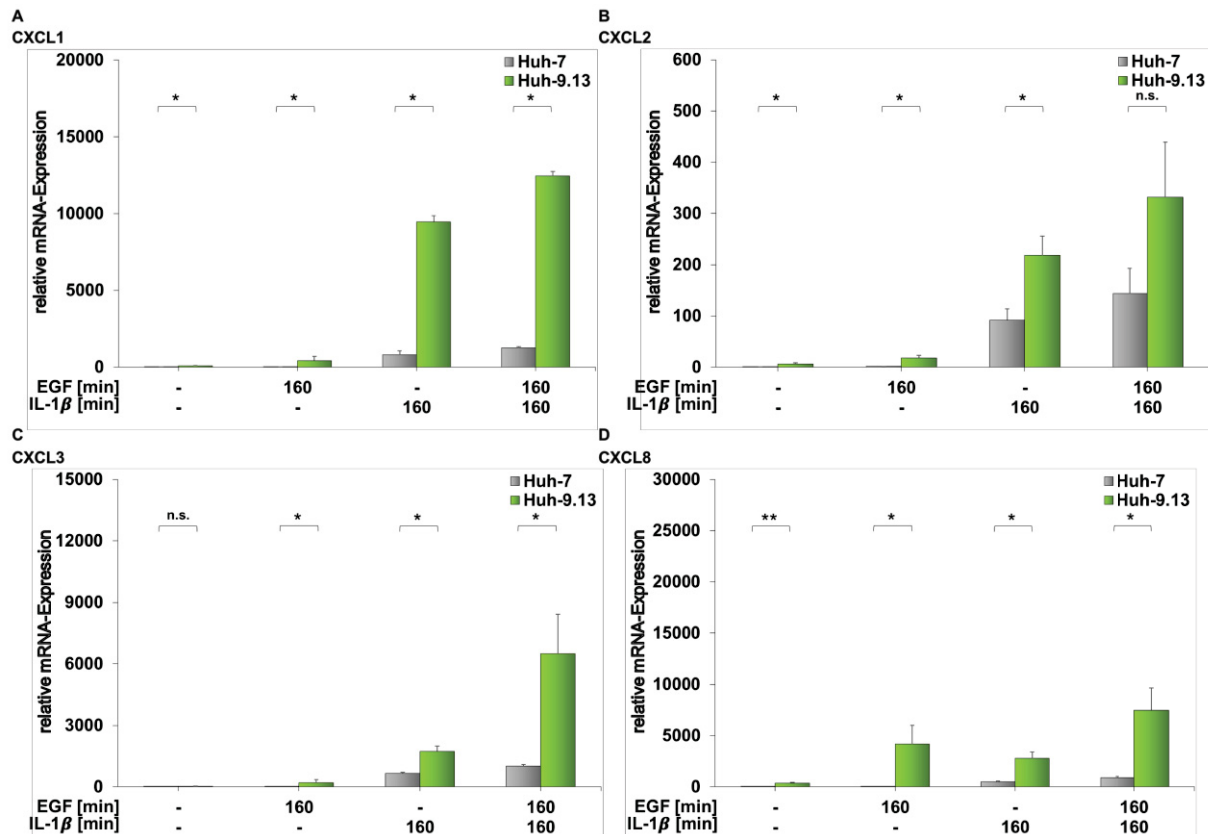


Abbildung 29: Die HCV-induzierte CXCR2-Liganden-Expression wird durch Ko-Stimulation mit EGF und/oder IL-1β verstärkt. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF oder 50 U/ml IL-1β stimuliert bzw. mit 40 ng/ml EGF und 50 U/ml IL-1β ko-stimuliert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A CXCL1**, **B CXCL2**, **C CXCL3** und **D CXCL8** mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

3.7 Das virale Nicht-Strukturprotein NS3/4A ist in die HCV-vermittelte CXCL8-Expression involviert

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die verstärkte CXCR2-Liganden-Expression durch ein spezifisches virales Nicht-Strukturprotein des HCV-Replikationskomplexes induziert wird.

Um diesen Kontext im Detail zu evaluieren, wurde die humane Hepatoblastomzelllinie HepG2 NS3/4A, die konstitutiv das nicht-strukturelle HCV-Protein NS3/4A exprimiert sowie die HepG2 und Mock-transfizierten HepG2 Kontrollzellen mit 40 ng/ml EGF stimuliert und

nachfolgend die Transkriptmenge der CXCR2-Liganden in der RT-PCR mittels spezifischer Primer gegen CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8 quantifiziert.

Die quantitative Analyse der Chemokin-Transkripte weist auf eine Beteiligung von NS3/4A spezifisch an der Induktion der CXCL8-Expression hin, die in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor, analog zu den bisher erbrachten Ergebnissen, deutlich gesteigert wurde (Abbildung 30D). Die basale mRNA-Expression von CXCL8 wurde hierbei NS3/4A-abhängig im Vergleich zu den entsprechenden HepG2 Kontrollzellen bereits um den Faktor 8,6 verstärkt induziert und in der Folge der EGF-Stimulation um den Faktor 4,9 gesteigert. Auch verglichen mit den HepG2 Mock-transfizierten Zellen konnte NS3/4A-vermittelt eine 4,6-fache basale und in Antwort auf EGF eine 2,9-fache Steigerung des CXCL8-Transkriptes belegt werden. Währenddessen wurde lediglich eine geringe Heraufregulation der mRNA-Expression der CXC-Motiv-Chemokine 1 (Abbildung 30A), 2 (Abbildung 30B) und 3 (Abbildung 30C) durch die alleinige Präsenz von NS3/4A detektiert (unveröffentlichte Daten Triller und Bode).

Die Resultate lassen vermuten, dass die HCV-induzierte Expression von CXCL8 insbesondere die Präsenz des viralen Nicht-Strukturproteins NS3/4A erfordert. Dennoch kann an dieser Stelle die Involvierung der anderen viralen Nicht-Strukturproteine nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die HCV-induzierte Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 kann hingegen nicht durch die alleinige Gegenwart von NS3/4A induziert werden, weshalb davon auszugehen ist, dass auch hierfür die Präsenz der anderen Proteine des HCV-Replikons benötigt wird.

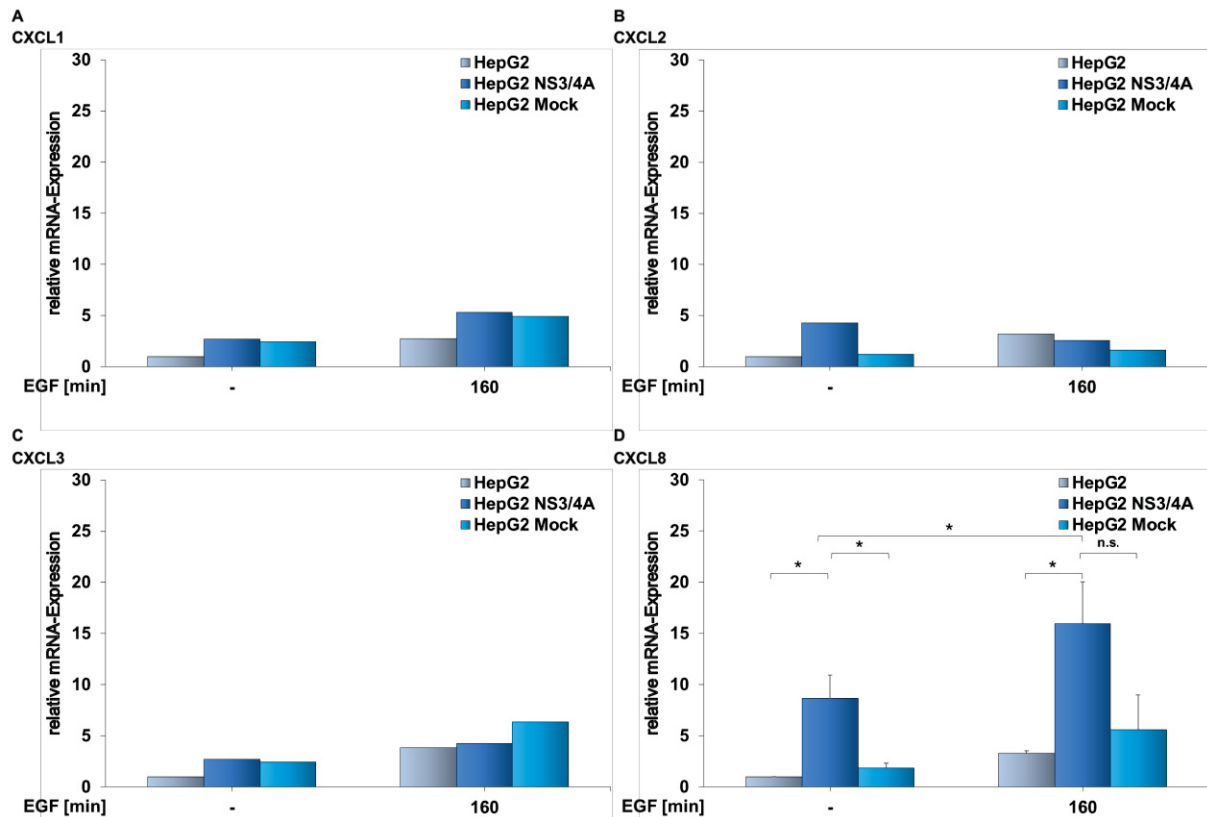


Abbildung 30: Das virale Nicht-Strukturprotein NS3/4A ist führend an der verstärkten CXCL8-Expression beteiligt. HepG2 NS3/4A Zellen exprimieren konstitutiv das virale Nicht-Strukturprotein NS3/4A. HepG2 und HepG2 Mock-transfizierte Zellen dienten der Kontrolle. HepG2, HepG2 NS3/4A und HepG2 Mock Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression **A** CXCL1, **B** CXCL2, **C** CXCL3 und **D** CXCL8 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur HepG2 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. **A**, **B** und **C** Jeweils ein Experiment wurde berücksichtigt. **D** Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden (unveröffentlichte Daten Triller und Bode).

3.8 HCV sensibilisiert den EGF-Rezeptor zur Induktion und Regulation der CXCR2-Liganden-Expression

In der Folge galt es nun den molekularen Mechanismus aufzuklären, über den das Hepatitis C Virus die basale und EGF-induzierte Überexpression der CXCR2-Liganden auf der Transkript-Ebene reguliert, weshalb in den fortführenden Analysen initial die Rolle des EGF-Rezeptors als möglicher Schlüsselfaktor der Induktion der Chemokinexpression näher charakterisiert werden sollte.

Wie einleitend in Abschnitt 1.1.5 bereits beschrieben, spielt der EGFR als Kofaktor aufgrund seiner Tyrosinkinase-Aktivität eine bedeutende Rolle beim Eintritt des Hepatitis C Virus in seine Wirtszelle sowie für die Infektion.¹³² In der Literatur sind bereits Interaktionen des Hepatitis C Virus mit dem EGFR beschrieben, darunter die Modifikation der EGFR-induzierten Signaltransduktionskaskade durch das virale Nicht-Strukturprotein NS5A.²⁸⁴ Publierte Daten der Arbeitsgruppe legen zudem eine HCV-vermittelte Sensibilisierung der Wirtszelle für die EGF-induzierte Signalantwort nahe.^{156,401} Die Befunde belegen, dass EGF durch eine NS3/4A-vermittelte proteolytische Suppression des endogenen Negativregulators des EGFR, der TCTP (vgl. Abschnitt 3.9) einerseits die Aktivierung der MAP-Kinasen und andererseits durch die Phosphorylierung der Tyrosinreste 1068 und 1086 des EGFR den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert und durch Phosphorylierung der Tyrosinreste 992 und 1173 im zytoplasmatischen Bereich des Rezeptors zu einer verstärkten Aktivierung des PLC- γ -Signalweges führt.^{156,401} Des Weiteren deuten Daten der Arbeitsgruppe auf die verstärkte HCV-vermittelte Expression des EGF-Rezeptors auf der Oberfläche der infizierten Wirtszelle hin.^{460,461}

In Anbetracht dessen, sollte nun verifiziert und sichergestellt werden, dass HCV die Produktion der CXCR2-Liganden durch eine Sensibilisierung des EGF-Rezeptors in seiner Wirtszelle induziert und diesbezüglich den EGFR/EGF-induzierten Signalweg modifiziert.

Hierzu wurden Huh-7 und Huh-9.13 Zellen mit 10 μ M AG1478, dem spezifischen Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität für eine Stunde prä-inkubiert und anschließend mit 40 ng/ml EGF stimuliert. In der RT-PCR wurde schließlich durch den Einsatz spezifischer Primer gegen CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8 die entsprechende mRNA-Expression der genannten Chemokine analysiert.

Die Inhibition des EGFR führte, wie aus der Abbildung 31 hervorgeht, zu einer Reduktion der basalen und zu einer deutlichen Suppression der EGF-induzierten mRNA-Expression der zu analysierenden Zielgene im Vergleich zu den entsprechenden Huh-9.13 Kontrollzellen.

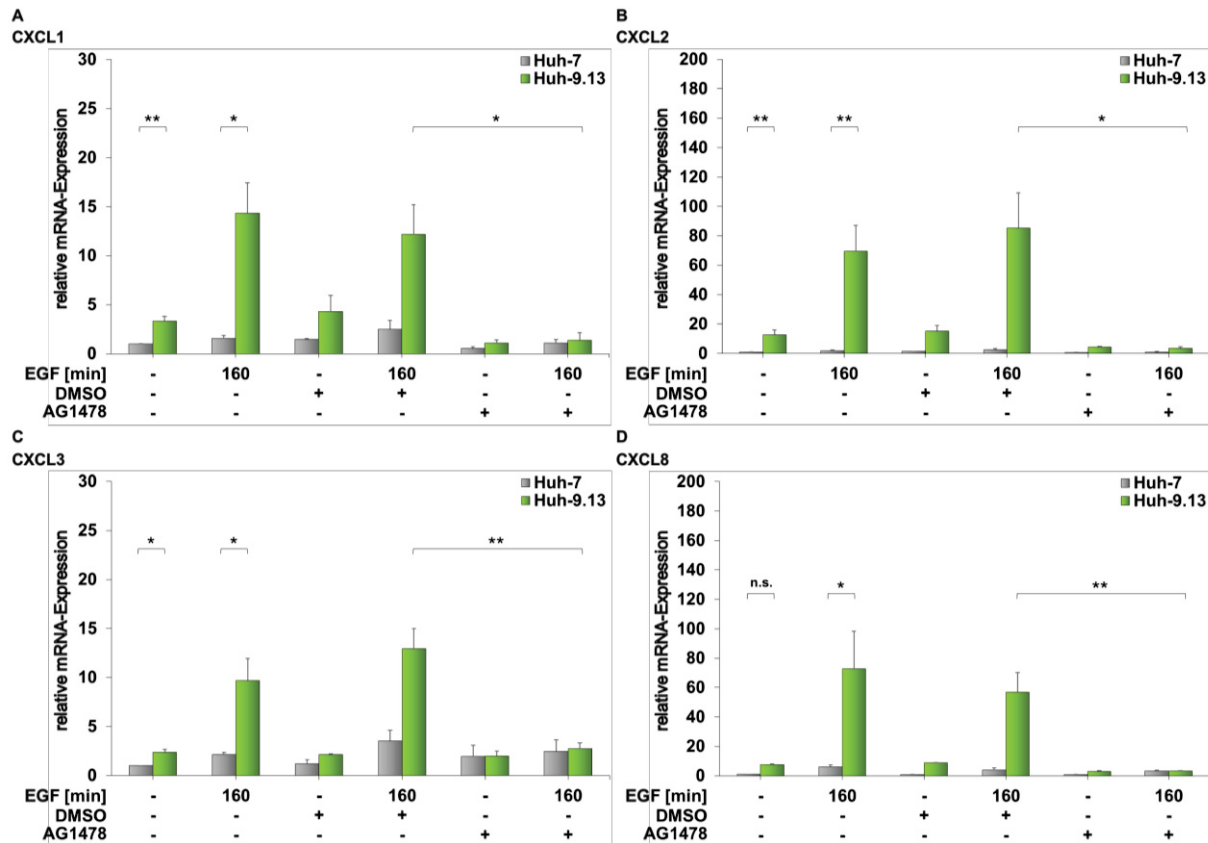


Abbildung 31: Die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität führt in der Anwesenheit des HCV-Replikons zu einer Herabregulation der CXCR2-Liganden-Expression auf Ebene der Transkription. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden mit 10 μ M AG1478, dem spezifischen Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität, für eine Stunde prä-inkubiert und anschließend mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A** CXCL1, **B** CXCL2, **C** CXCL3 und **D** CXCL8 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

In der Gesamtheit deuten die Befunde darauf hin, dass der EGFR/EGF-induzierte Signalweg eine maßgebliche Rolle für die Regulation und Induktion der HCV-induzierten und durch EGF-Stimulation gesteigerten Expression der CXCR2-Liganden durch die HCV-vermittelte Sensibilisierung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität spielt. Diese Resultate werden von vorangegangenen Inhibitor-Studien im Replikonsystem der Arbeitsgruppe gestützt (unveröffentlichte Daten Triller und Bode).

3.9 Die HCV-vermittelte Suppression von TC-PTP ist an der Induktion der CXCL8-Expression beteiligt

Wie aus der Literatur hervorgeht, wird die Expression sowie die Aktivität des EGF-Rezeptors unter physiologischen Bedingungen durch zahlreiche Mechanismen reguliert, darunter die Internalisierung der gebildeten Komplexe EGF-gebundener EGFR-Homodimere sowie anschließender Degradierung der Komplexe durch lysosomalen Abbau,²³⁷ die Induktion der Expression von Negativregulatoren über *negative feedback loops*, wie beispielsweise SOCS5²³⁴ oder Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), wie beispielsweise SHP2²⁶⁸, *die protein tyrosine phosphatase 1 B* (PTP1B)²⁶⁹ sowie die *T cell protein tyrosine phosphatase* (TC-PTP).^{270,271}

Publizierte Daten der Arbeitsgruppe belegen, dass der endogene Negativregulator des EGFR durch die virale NS3/4A-Protease/Helikase an zwei spezifischen Stellen proteolytisch gespalten wird und auf diese Weise zu der EGF-vermittelten Aktivierung des PLC- γ - sowie des PI3K/Akt-Signalweges führt.^{156,401} *In vivo* konnte die HCV-vermittelte Herabregulation der Proteinlevel von TC-PTP in HCV-infizierten Patienten als auch in NS3/4A-transgenen Mäusen, die intraheptisch den NS3/4A-Protease/Helikase-Komplex exprimieren, nachgewiesen werden.^{95,41}

Basierend auf den bisher ausgeführten Untersuchungen sowie den publizierten Daten der Arbeitsgruppe entstand die Überlegung, ob die HCV-vermittelte Sensibilisierung der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität durch die NS3/4A-abhängige Reduktion von TC-PTP eine Voraussetzung für die verstärkte basale und EGF-induzierte CXCL8-Expression in HCV-infizierten Zellen ist, nicht zuletzt aufgrund der Involvierung von NS3/4A in die HCV-vermittelte CXCL8-Expression (vgl. Abschnitt 3.7).

Daher wurde ein spezifischer Gen-*knockdown* von TC-PTP mittels spezifischer gegen TC-PTP gerichteter siRNA in Huh-7 Zellen induziert und darauffolgend mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Die Transkriptmenge wurde in der RT-PCR auf die Expression von CXCL8 hin untersucht. Hierzu wurde ein spezifischer Primer gegen das genannte Chemokin eingesetzt. Das Maß der Proteinkonzentration wurde sowohl in unstimulierten als auch in EGF-stimulierten Zellkulturüberständen mittels spezifischem CXCL8-ELISA quantifiziert.

Die simulierte NS3/4A-vermittelte Suppression von TC-PTP in den Huh-7 Zellen, durch den spezifischen Gen-*knockdown* von TC-PTP, ergab übereinstimmend mit den bisherigen Befunden (vgl. Abschnitt 3.5) eine tendenzielle Zunahme des basalen und EGF-induzierten

CXCL8-Transkriptes (Abbildung 32A) sowie des CXCL8-Proteins (Abbildung 32B) im Vergleich zu den entsprechend behandelten Huh-7 Kontrollzellen.

Um den Erfolg des Gen-*knockdowns* von TC-PTP mittels siRNA sowohl auf der Ebene des Transkripts als auch auf Protein-Ebene zu verifizieren, wurde die mRNA-Expression von TC-PTP mittels RT-PCR (Abbildung 33A) und die Expression von TC-PTP im Western Blot (Abbildung 33B) analysiert.

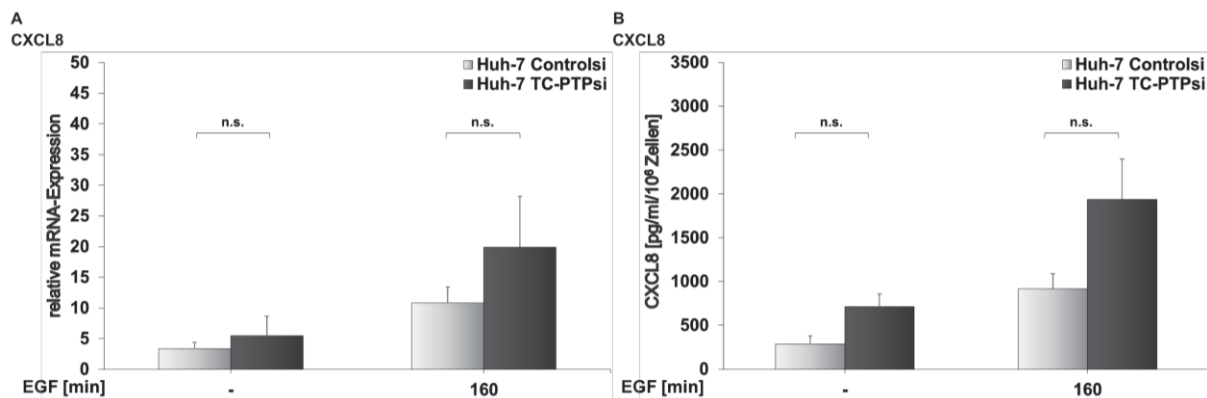


Abbildung 32: Der Gen-*knockdown* von TC-PTP führt sowohl auf Ebene der mRNA als auch auf Ebene des Proteins zu einer Zunahme der CXCL8-Expression. Huh-7 Zellen wurden mit 50 nM TC-PTP-siRNA bzw. Control-siRNA transfiziert und anschließend mit 40 ng/ml EGF stimuliert. **A** Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung eines spezifischen Primers die Expression CXCL8 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. **B** Quantitative Analyse der Proteinkonzentration von CXCL8 in unstimulierten und mit EGF-konditionierten Zellkulturüberständen von Huh-Zellen mittels spezifischem CXCL8-ELISA. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus **A** fünf und **B** drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Zusammenfassend ist basierend auf den bisherigen Resultaten zu vermuten, dass die Sensibilisierung der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität durch die HCV-vermittelte Reduktion der TC-PTP-Proteinlevel spezifisch in die HCV-induzierte und als Reaktion auf externes EGF gesteigerte CXCL8-Expression in HCV-infizierten Zellen involviert ist. Zur Verifizierung dieser Annahme gilt es weitere Untersuchungen durchzuführen.

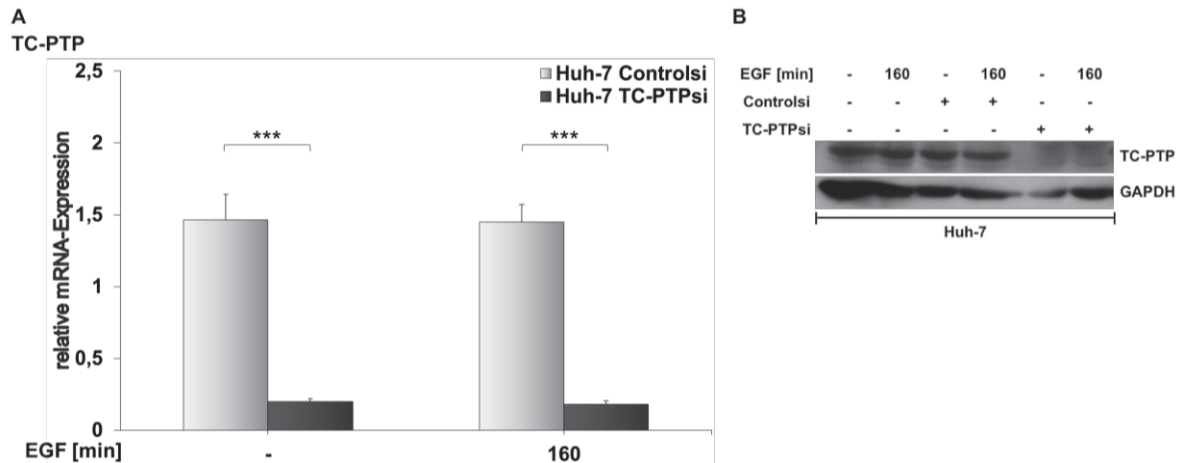


Abbildung 33: Nachweis des erfolgreichen Gen-knockdowns von TC-PTP auf Transkript-Ebene als auch auf Protein-Ebene mittels spezifischer siRNA. A und B Huh-7 Zellen wurden mit 50 nM TC-PTP-siRNA bzw. 50 nM Control-siRNA transfiziert und nach 72 Stunden Inkubation mit 40 ng/ml EGF stimuliert. **A** Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung eines spezifischen Primers die Expression von TC-PTP mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden. **B** Gesamtproteinextrakte wurden aus den Zellen isoliert und 30 μ g Protein in einem 12 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von TC-PTP analysiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestriipt.

3.10 Die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1 (MEK1) ist an der HCV-induzierten CXCL8-Expression beteiligt, die Expression von CXCL1 bis CXCL3 wird unabhängig von MEK1 reguliert

Aufgrund der maßgeblichen Involvierung des EGFR in die HCV-induzierte und durch EGF verstärkte CXCR2-Liganden-Expression sollte in der Folge zur weiteren Aufklärung des molekularen Mechanismus die EGFR-induzierten Signaltransduktionskaskaden näher analysiert werden. Diesbezüglich kamen insbesondere die Signalmoleküle Akt, ERK1/2, JNK, MEK1/2 bzw. $p38^{MAPK}$ als Induktoren und Regulatoren für die Überexpression der Chemokine in Frage. Wie bereits aus der Literatur und aus vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe hervorgeht, moduliert HCV eine Vielzahl zellulärer Signaltransduktionskaskaden und aktiviert verstärkt die genannten Signalmoleküle.^{156,192,193,288,401} Des Weiteren ist eine ERK-, JNK-, und $p38^{MAPK}$ -abhängige Regulation der CXCL8-Expression unter physiologischen Konditionen beschrieben.³²⁵

Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren bzw. durch spezifischen Gen-*knockdown* mittels siRNA wurde evaluiert, ob das Virus die Signalmoleküle zur Induktion und Regulation der CXCR2-Liganden manipuliert. Die verstärkte Aktivierung von ERK1/2, JNK und p38^{MAPK} durch die Präsenz des subgenomischen HCV-Replikons und nachfolgender EGF-Stimulation wurde bestätigt, jedoch konnte kein Einfluss des ERK1/2-Inhibitors FR180204, des JNK-Gen-*knockdowns*, noch des p38^{MAPK}-Inhibitors SB203580 auf die Expression der CXCR2-Liganden beobachtet werden (Daten nicht abgebildet).

Im Anschluss wurde der Einfluss der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase 1 auf die Expression der CXCR2-Liganden untersucht.

Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe legen diesbezüglich nahe, dass spezifisch die Expression des CXC-Motiv-Chemokins 8 die Aktivierung von MEK1 erfordert (unveröffentlichte Daten Triller und Bode). Daher sollte im nächsten Schritt zunächst die Beteiligung von MEK1 an der Regulation der CXCL1-, CXCL2-, und CXCL8-Expression verifiziert bzw. sichergestellt und des Weiteren aufgeklärt werden, ob die HCV-induzierte CXCL3-Expression MEK1-abhängig reguliert wird.

Hierzu wurde in den HCV-Replikationskomplex enthaltenden Huh-9.13 Zellen die posttranskriptionelle Inhibierung von MEK1 mittels siRNA induziert und anschließend sowohl die transfizierten als auch die Huh-7 Kontrollzellen mit EGF stimuliert.

So führte der spezifische MEK1-*knockdown* zu keiner deutlichen Differenz der mRNA-Expression von CXCL1 (Abbildung 34A) und CXCL3 (Abbildung 34C), im Vergleich mit der mRNA-Expression der Zielgene der entsprechenden Huh-9.13 Kontrollzellen. Währenddessen konnte eine Abnahme des CXCL2-Transkriptes in der Folge des Gen-*knockdowns* von MEK1 beobachtet werden (Abbildung 34B). Zugleich hatte der Einfluss des spezifischen MEK1 Gen-*knockdowns* auf Ebene des Transkriptes eine basale Reduktion und eine deutlich EGF-induzierte Herabregulation der CXCL8-Expression (Abbildung 34D) als Konsequenz und verifizierte die vorausgegangenen Befunde der Arbeitsgruppe.

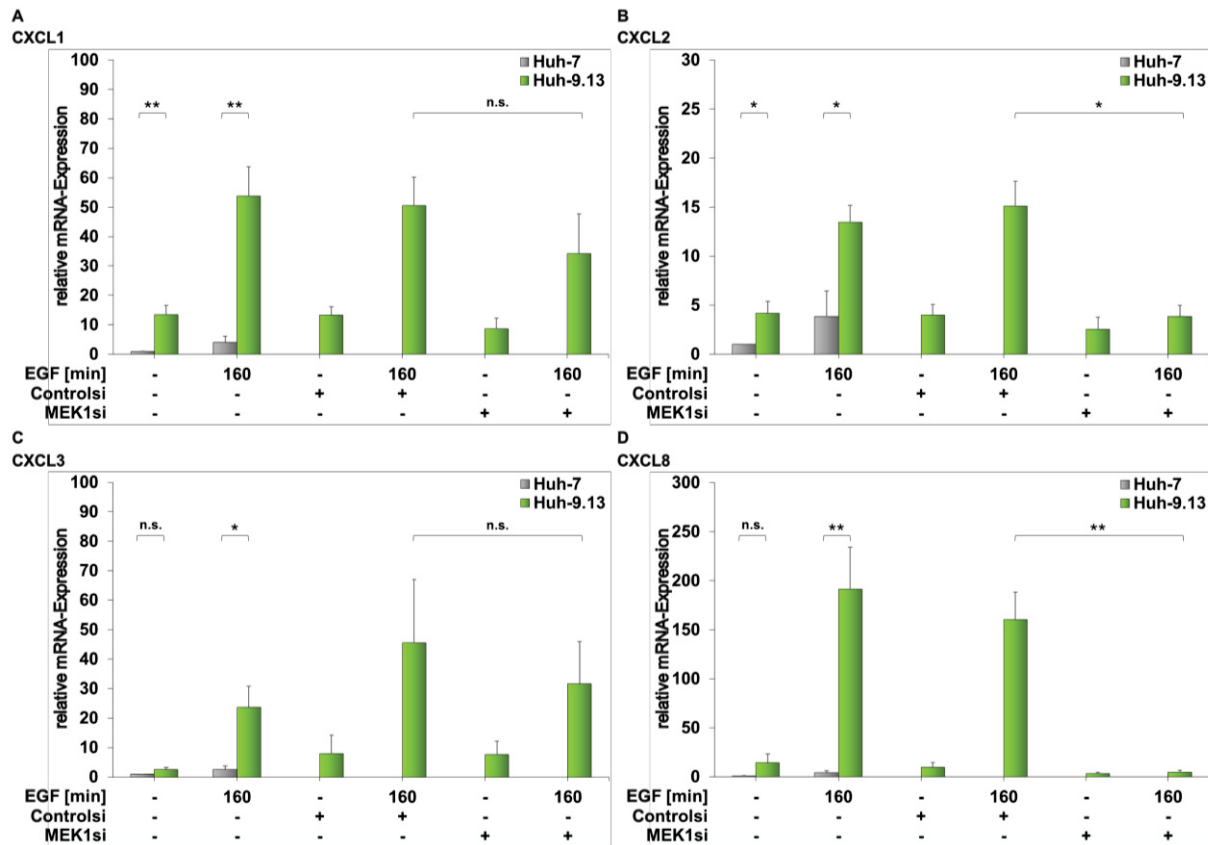


Abbildung 34: Die posttranskriptionelle Inhibition von MEK mittels siRNA führt zur deutlichen Herabregulation der CXCL8-Expression auf transkriptioneller Ebene. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Huh-9.13 Zellen wurden für 72 Stunden mit 50 nM MEK1-siRNA bzw. 50 nM Control-siRNA transfiziert. Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A CXCL1**, **B CXCL2**, **C CXCL3** und **D CXCL8** mittels qRT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta C_T$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Der erfolgreiche Gen-*knockdown* von MEK1, der in der Abbildung 35 dargestellt ist, wurde mittels eines spezifischen Antikörpers auf Protein-Ebene im Western Blot belegt.

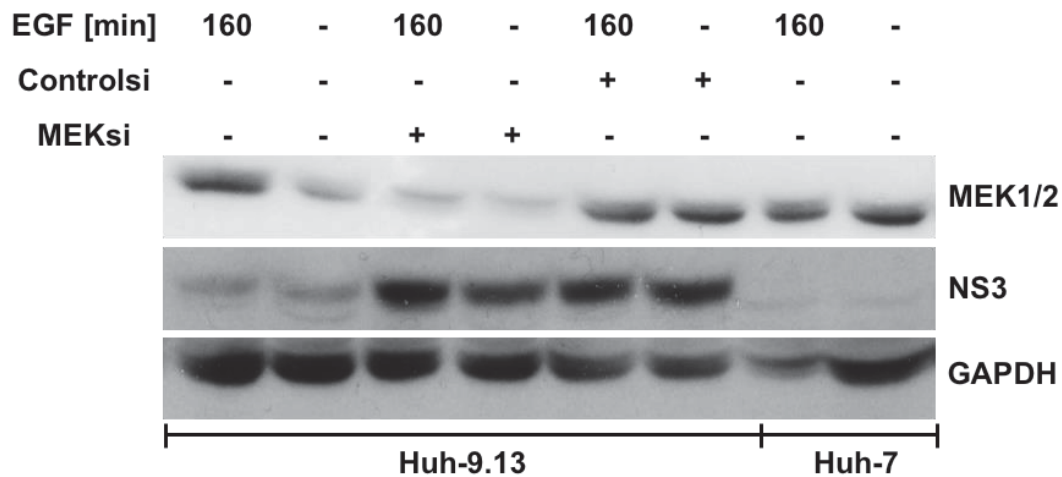


Abbildung 35: Nachweis des erfolgreichen Gen-knockdowns von MEK1 auf Protein-Ebene mittels siRNA. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Huh-9.13 Zellen wurden mit 50 nM MEK1si bzw. 50 nM Controlsi transfiziert und nach 72 Stunden Inkubation wurden Huh-9.13 und Huh-7 Zellen mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden aus den Zellen isoliert und 30 µg Protein in einem 12 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von MEK1/2 und NS3 analysiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt.

Um sicher zu gehen, dass MEK1 spezifisch an der Regulation der CXCL8-Expression und potentiell an der Regulation der CXCL2-Expression beteiligt ist, CXCL1 und CXCL3 jedoch unabhängig von der MEK1-Aktivierung reguliert werden, wurden zur Verifizierung Huh-7.5 Zellen für 72 Stunden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 infiziert. Der spezifische Inhibitor von MEK1/2, U0126 wurde den Zellen eine Stunde vor der EGF-Stimulation in einer Konzentration von 10 µM hinzugesetzt.

Durch den Einsatz des nicht-kompetitiven MEK1/2-Inhibitors, der selektiv MEK1 und mit geringerer Affinität auch MEK2 hemmt, ergab sich eine deutliche Reduktion der CXCL8-Expression auf transkriptioneller Ebene, was aus der Abbildung 36D ersichtlich wird. Die Beteiligung von MEK1/2 an der Regulation der CXCL2-Expression (Abbildung 36B) ließ sich an dieser Stelle nicht evaluieren. Zugleich konnte MEK1/2 als HCV-modifizierter Induktor der CXCL1- (Abbildung 36A) sowie CXCL3-Expression (Abbildung 36C) ausgeschlossen werden.

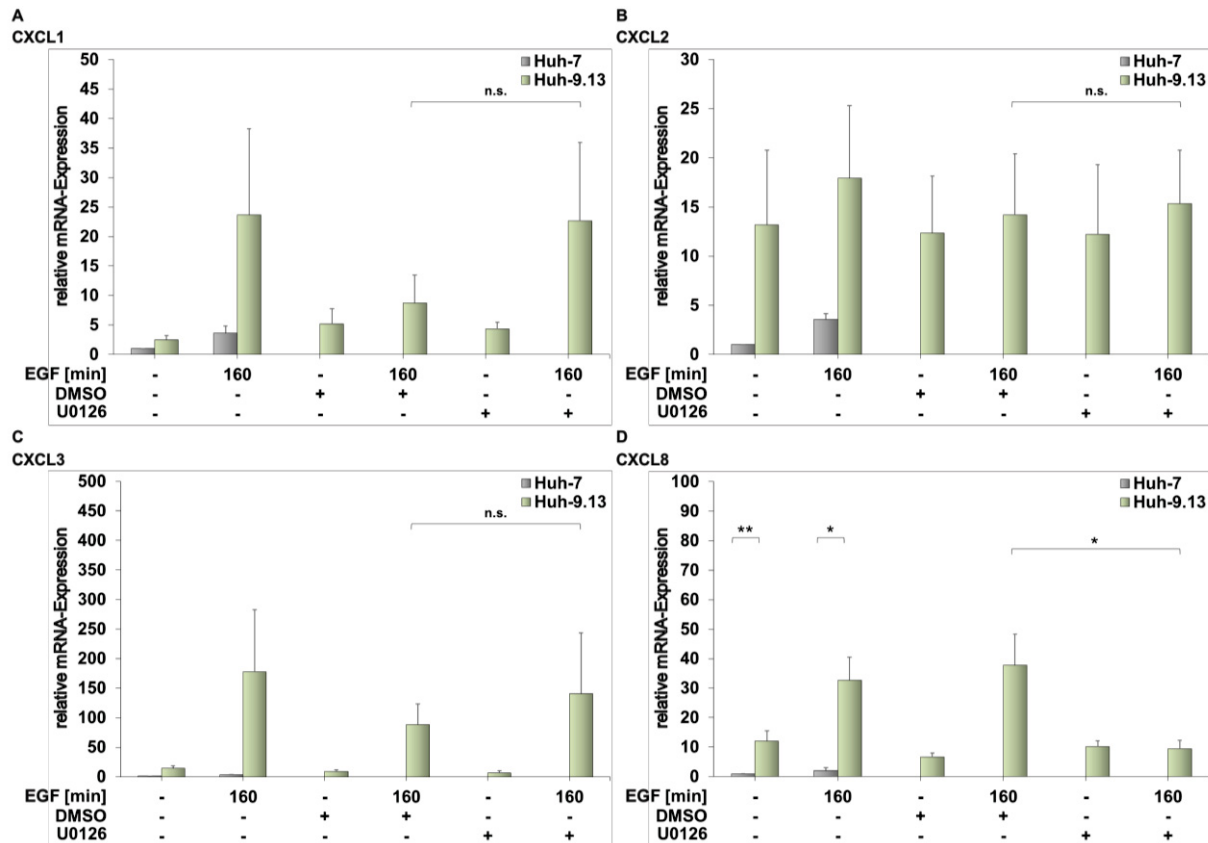


Abbildung 36: Der Inhibitor des MEK1/2-Signalweges hemmt spezifisch CXCL8 auf mRNA-Ebene, CXCL1 bis CXCL3 werden MEK1/2-unabhängig reguliert. Huh-7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 infiziert und nach 72 Inkubation für eine Stunde mit 10 μ M U0126, dem spezifischen Inhibitor der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase 1/2, prä-inkubiert und anschließend mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Huh-7.5 Zellen dienten der Kontrolle. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A** CXCL1, **B** CXCL2, **C** CXCL3 und **D** CXCL8 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7.5 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse jeweils drei unabhängige Experimenten berücksichtigt wurden.

Die Daten belegen zusammenfassend, dass die HCV-induzierte Aktivierung von MEK1 spezifisch in die basale und EGF-induzierte Expression von CXCL8 als Signaltransduktor involviert ist, während MEK1 vermutlich keine oder nur eine partielle Rolle in der molekularen Regulation der Expression von CXCL1 bis CXCL3 spielt. Dies wird von weiteren Inhibitor-Studien im Replikonsystem gestützt (unveröffentlichte Daten Triller und Bode). Davon abgesehen gibt es keine Hinweise auf eine Beteiligung der durch das Hepatitis C Virus verstärk-

aktivierten Signalmoleküle ERK1/2, JNK und p38^{MAPK} für die Induktion und Regulation der CXCR2-Liganden-Expression.

3.11 Akt ist an der HCV-induzierten CXCL1- bis CXCL3-Expression beteiligt, die Expression von CXCL8 wird unabhängig von Akt reguliert

In den fortführenden Untersuchungen galt es nun zu überprüfen, ob die verstärkte Expression der CXCR2-Liganden von dem durch HCV-verstärkt aktivierten Signalmolekül Akt abhängig reguliert wird. Publierte Daten der Arbeitsgruppe weisen bereits auf die Interferenz des Hepatitis C Virus mit der Proteinkinase B (Akt) hin. Die Präsenz des HCV-Replikons resultierte in einer Steigerung der basalen und EGF-induzierten Aktivierung von Akt, initiiert durch die NS3/4A-vermittelte Suppression von TC-PTP auf Protein-Ebene. Des Weiteren wurde die Relevanz von Akt für die virale Replikation nachgewiesen.^{156,401}

Um den potentiellen Zusammenhang von Akt und der Regulation der HCV-induzierten Chemokinexpression aufzuklären, wurde mittels RT-PCR der Einfluss von gegen Akt gerichteter siRNA in Huh-9.13 Zellen auf die Transkriptmenge der Chemokine untersucht.

Die Transfektion der Zellen mit spezifischer Akt siRNA hatte in der Gegenwart des HCV-Replikationskomplexes eine Reduktion der basalen und EGF-induzierten Expression von CXCL1 (Abbildung 37A), CXCL2 (Abbildung 37B) und CXCL3 (Abbildung 37C) im Vergleich zu den entsprechenden Huh-9.13 Kontrollzellen zur Folge. Währenddessen konnte, wie aus der Abbildung 37D ersichtlich ist, kein deutlicher Effekt des *knockdowns* von Akt auf die CXCL8-Expression festgestellt werden. Der Einsatz des Inhibitors Triciribine, der spezifisch die Akt-Aktivität hemmt, verifizierte die Ergebnisse des Gen-*knockdowns* (Daten nicht abgebildet).

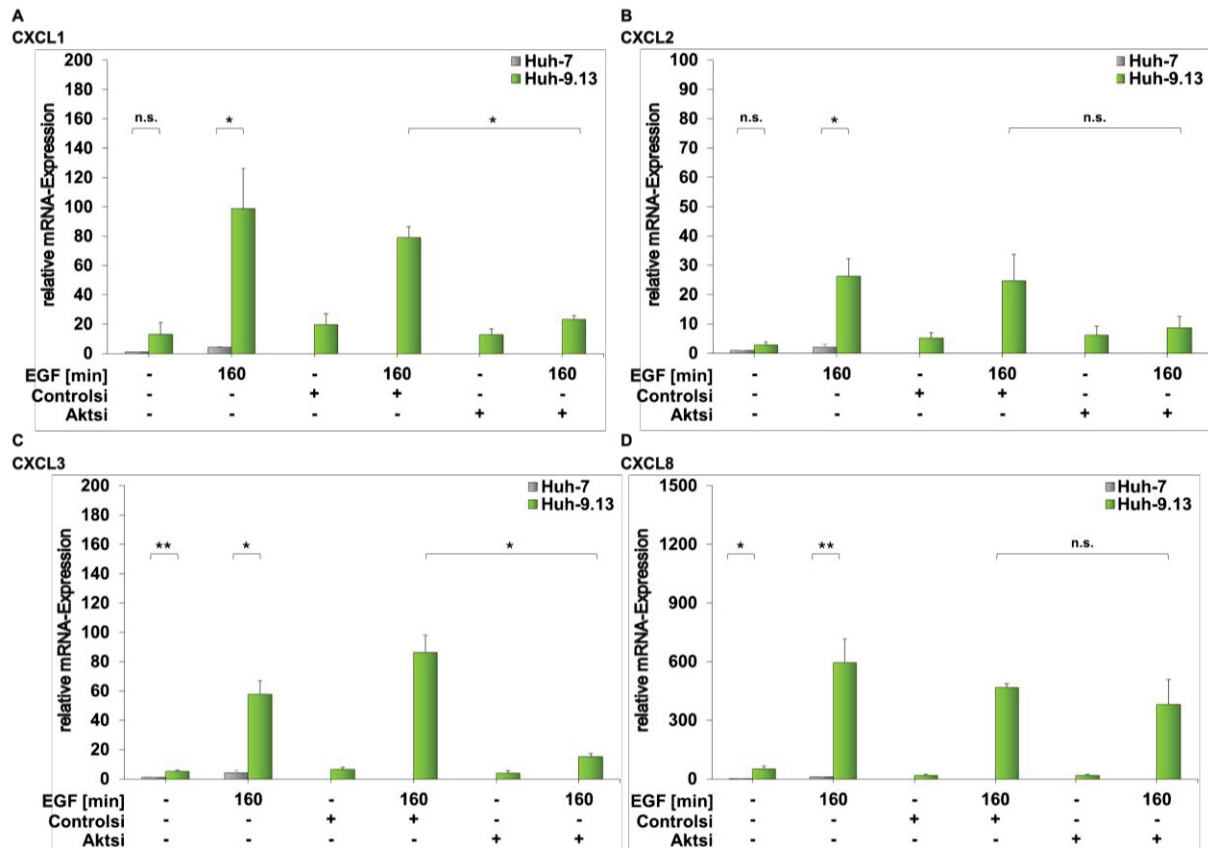


Abbildung 37: Akt ist an der HCV-induzierten CXCL1- bis CXCL3-Expression involviert. CXCL8 wird Akt-unabhängig reguliert. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. Huh-9.13 Zellen wurden für 72 Stunden mit 50 nM Akt-siRNA bzw. 50 nM Control-siRNA transfiziert. Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A** CXCL1, **B** CXCL2, **C** CXCL3 und **D** CXCL8 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse jeweils drei unabhängigen Experimente berücksichtigt wurden.

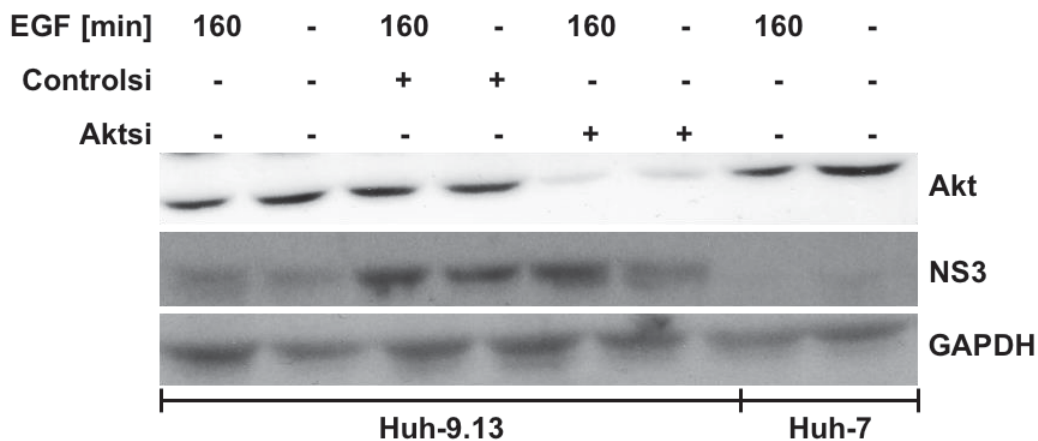


Abbildung 38: Nachweis des erfolgreichen Gen-*knockdowns* von Akt auf Protein-Ebene mittels siRNA. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Huh-9.13 Zellen wurden mit 50 nM Akt-siRNA bzw. 50 nM Control-siRNA transfiziert und nach 72 Stunden Inkubation wurden Huh-9.13 und Huh-7 Zellen mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden aus den Zellen isoliert und 30 µg Protein in einem 12 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von Akt und NS3 analysiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt.

Die *knockdown*-Studien belegen in ihrer Gesamtheit, dass MEK1 im Rahmen einer HCV-Infektion ein spezifischer Mediator in der Signaltransduktionskaskade der CXCL8-Expression ist und Akt eine wesentliche Rolle in dem Signalweg der Genexpression von CXCL1, CXCL2 und von CXCL3 spielt.

3.12 Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist an der HCV-vermittelten CXCR2-Liganden-Expression beteiligt

Im Anschluss stellte sich nun die Frage, welcher Transkriptionsfaktor HCV-vermittelt für die Induktion der CXCR2-Liganden-kodierenden Zielgene von Bedeutung ist.

Aus der Literatur geht hervor, dass der Promotor von CXCL8 eine regulatorische Sequenz mit spezifischen Bindungsmotiven für die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF-κB sowie für C/EBP aufweist.³²⁵ Zudem ist bekannt, dass die Gen-Transkription von CXCL1 und von CXCL2 ebenfalls durch NF-κB sowie auch durch den Transkriptionsfaktor STAT1 reguliert wird.⁴⁶² Zugleich wird NF-κB-abhängig die transkriptionelle Aktivierung des CXCL3-Gens induziert und kontrolliert.⁴⁶³ Auch im Rahmen einer HCV-Infektion ist bereits ein Zusammenhang zwischen NF-κB und der Induktion der Genexpression von CXCL2 und CXCL8 beschrieben.^{321,331,464} So konnte in HCV-infizierten primären Hepatozyten eine verstärkte HCV-bedingte Translokation von NF-κB in den Nukleus zur Induktion der Genexpression von

MCP-1 und CXCL2 belegt werden.³²¹ Auch die Expression von CXCL8 wird im Rahmen einer HCV-Infektion transkriptionell durch NF- κ B reguliert.^{331,464}

Zahlreiche Publikationen legen ferner nahe, dass es während einer Hepatitis C Virus Infektion zu einer verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt (vgl. Abschnitt 1.4.4). So führt beispielsweise das virale Nicht-Strukturprotein NS5A von HCV zu einer verstärkten Freisetzung, nukleären Translokation und somit zur konstitutiven Aktivierung von NF- κ B.¹⁹⁴ Zudem reguliert NS5A im Zytoplasma lokalisierte NF- κ B-Dimere durch eine verstärkte Degradierung seines inhibitorischen Proteins I κ B α .¹⁹⁵ Diese NS5A-abhängige, konstitutive Aktivierung von NF- κ B steht hierbei in enger Assoziation mit der Entstehung hepatozellulärer Karzinome durch die gesteigerte Zellproliferation und Inhibierung der Apoptose.^{194,195} Vorausgegangene Befunde der Arbeitsgruppe deuten zudem auf eine verstärkte HCV-abhängige Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65 hin, die in nukleären Extrakten aus Lebern NS3/4A-transgener Mäuse, welche intrahepatisch NS3/4A exprimieren, beobachtet wurde.^{400,401}

Auf dieser Grundlage wurde initial analysiert, ob durch die Präsenz des HCV-Replikationskomplexes in Huh-9.13 Zellen die Untereinheit p65 von NF- κ B basal sowie nach EGF-Stimulation verstärkt aus dem Zytoplasma in den Nukleus transloziert wird und ob die Signalmoleküle MEK1 oder Akt, welche an der HCV-vermittelten Induktion der CXCR2-Liganden-Expression beteiligt sind, einen direkten Einfluss auf die p65-Translokation ausüben.

Hierzu wurden Huh-7 und Huh-9.13 Zellen zunächst für eine Stunde mit 10 μ M des spezifischen MEK1/2-Inhibitors U0126 oder des Akt-Inhibitors Triciribine vorinkubiert und anschließend mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Der Einfluss der Inhibitoren und des subgenomischen HCV-Replikons auf die Expression von p65 wurde mittels Western Blot in nukleären Extrakten analysiert. So ergab die Detektion von p65 Hinweise einer durch HCV-verstärkten Translokation von p65 in den Nukleus (Abbildung 39A und Abbildung 39B), jedoch resultierte weder die Inhibierung von MEK1/2 (Abbildung 39A) noch von Akt (Abbildung 39B) in einer reduzierten nukleären Translokation von p65. So ist davon auszugehen, dass die Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B nicht durch die für die Regulation der Chemokine relevanten Signalmoleküle MEK1 und Akt bedingt wird.

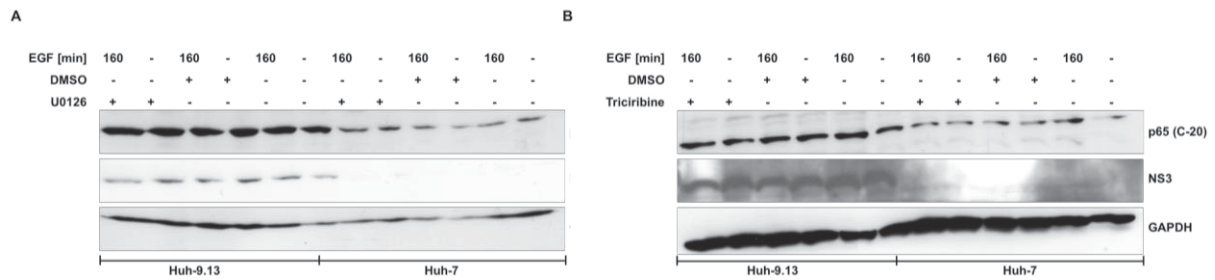


Abbildung 39: Die Gegenwart des HCV-Replikons verstärkt die Translokation der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Nukleus. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Huh-7 und Huh-9.13 Zellen für eine Stunde **A** mit 10 μ M U0126, dem spezifischen Inhibitor von MEK1/2 oder **B** mit 10 μ M Triciribine, dem spezifischen Akt-Inhibitor, prä-inkubiert und anschließend mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Nukleäre Kernextrakte wurden aus den Zellen isoliert und 30 μ g Protein in einem 12 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. **A** und **B** Mittels Western Blot wurde die Expression von p65 und NS3 analysiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt.

Da durch die Präsenz des subgenomischen HCV-Replikationskomplexes die p65-Untereinheit von NF- κ B verstärkt in den Kern transloziert wird und in den Gen-Promotoren der CXCR2-Liganden eine κ B-regulatorische Region lokalisiert ist, die potentiell eine Bindung von NF- κ B zur transkriptionellen Regulation ermöglicht, kam weiterführend die Überlegung auf, ob NF- κ B HCV-abhängig die Transkription der Gene der CXCR2-Liganden induziert.

Aufgrund dessen wurde posttranskriptionell mittels spezifischer gegen p65 gerichteter siRNA in Huh-9.13 Zellen eine Inhibierung von NF- κ B durchgeführt und folglich der Einfluss des *knockdowns* auf die HCV-induzierte und als Reaktion auf externes EGF gesteigerte CXCR2-Liganden-Expression in der RT-PCR analysiert.

Die Transfektion der HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Zellen mit der spezifischen p65-siRNA hatte eine Abnahme der basalen als auch der EGF-induzierten Expression der zu analysierenden Zielgene zur Folge, was aus der Abbildung 40 hervorgeht. Der erfolgreiche Gen-*knockdown* von p65 wurde in der RT-PCR mit Hilfe eines spezifisch gegen p65 gerichteten Primers analysiert (Abbildung 41).

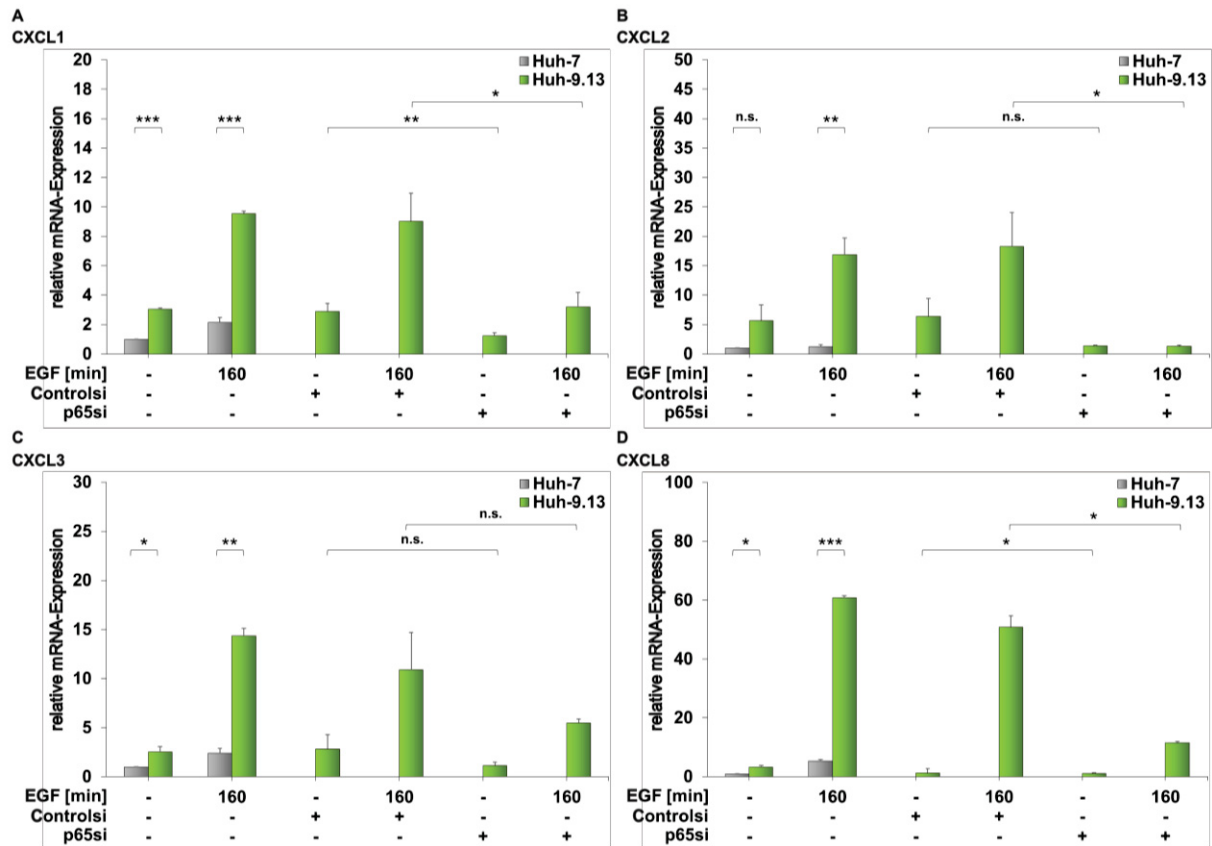
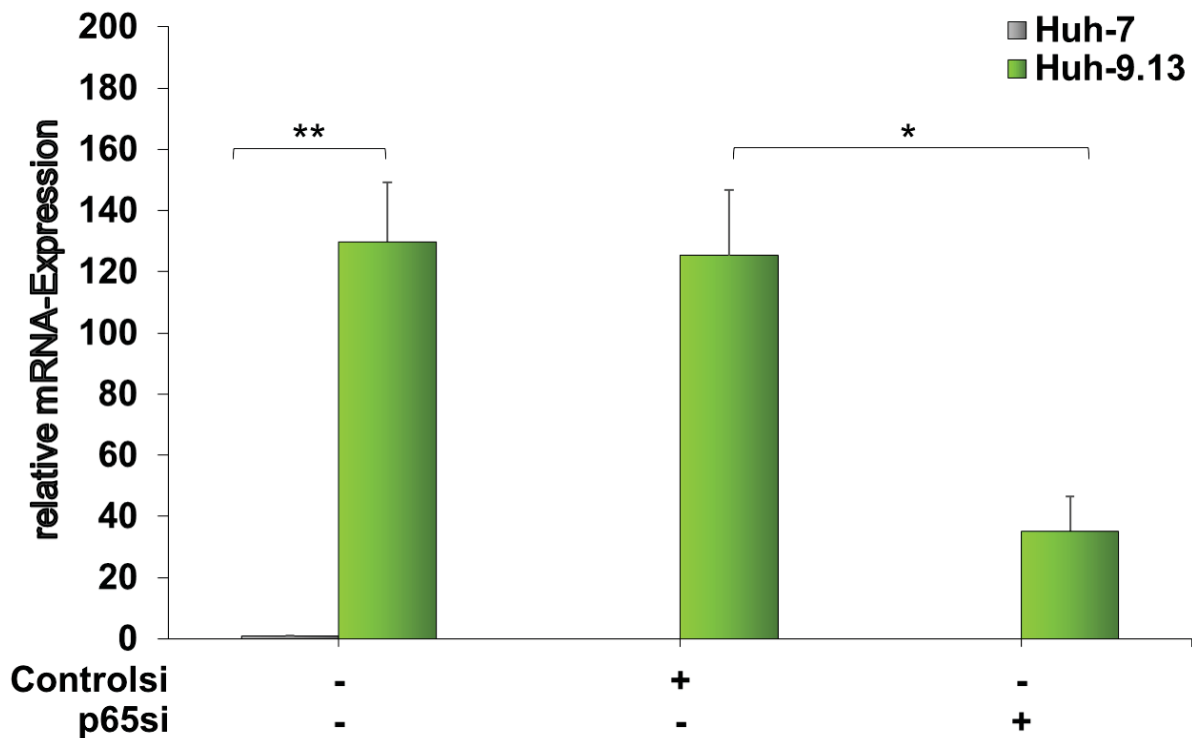


Abbildung 40: NF- κ B (p65) ist an der verstärkten CXCR2-Liganden-Expression beteiligt. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Huh-9.13 Zellen wurden für 72 Stunden mit 50 nM p65-siRNA bzw. 50 nM Control-siRNA transfiziert. Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A** CXCL1, **B** CXCL2, **C** CXCL3 und **D** CXCL8 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.



Abbildungung 41: Nachweis des erfolgreichen Gen-knockdowns von p65 auf Ebene der Transkription mittels siRNA. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Huh-9.13 Zellen wurden für 72 Stunden mit 50 nM p65-siRNA bzw. 50 nM Control-siRNA transfiziert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung eines spezifischen Primers die Expression von p65 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Fundierend auf diesen Ergebnissen sowie ferner Arbeiten der Literatur konnte nachgewiesen werden, dass NF- κ B HCV-abhängig maßgeblich an der Transkription der CXCR2-Liganden-Gene beteiligt ist. Die Involvierung von STAT1 an deren Transkriptionsregulation in der Gegenwart des HCV-Replikons konnte durch Studien mit dem selektiven JAK1-Inhibitor, Filgotinib, exkludiert werden (Daten nicht abgebildet).

3.13 Die virale Replikation wird in Antwort auf EGF verstärkt

Basierend auf bereits publizierten Daten der Arbeitsgruppe ist davon auszugehen, dass der epidermale Wachstumsfaktor zelluläre Signalwege induziert, deren Aktivierung in einer Steigerung der Replikation des subgenomischen HCV-Replikons resultiert. So bedingt EGF HCV-vermittelt beispielsweise eine verstärkte Aktivierung des EGFR und nachgeschalteter

Signalwege und auf diese Weise die konstitutive Akt-Phosphorylierung. Diese wird wiederum mit der Persistenz der viralen Replikation assoziiert.^{156,401}

Die Steigerung der viralen Replikation in Antwort auf 40 ng/ml EGF wurde in Huh-9.13 Replikonzellen initial verifiziert. In Übereinstimmung mit den vorherigen Studien der Arbeitsgruppe ergab die Analyse der mRNA mittels RT-PCR eine deutliche Steigerung der NS3-Expression auf Ebene der Transkription (Abbildung 42A).

Im Anschluss sollte nun die EGF-induzierte Stimulation der viralen Replikation in der Anwesenheit des HCV-Stamms JC1 validiert werden.

So führte ebenso die Infektion von Huh-7.5 Zellen mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 und die nachfolgende Behandlung der Zellen mit 40 ng/ml EGF zu einer deutlichen Zunahme der NS3-Expression auf Transkript-Ebene (Abbildung 42B).

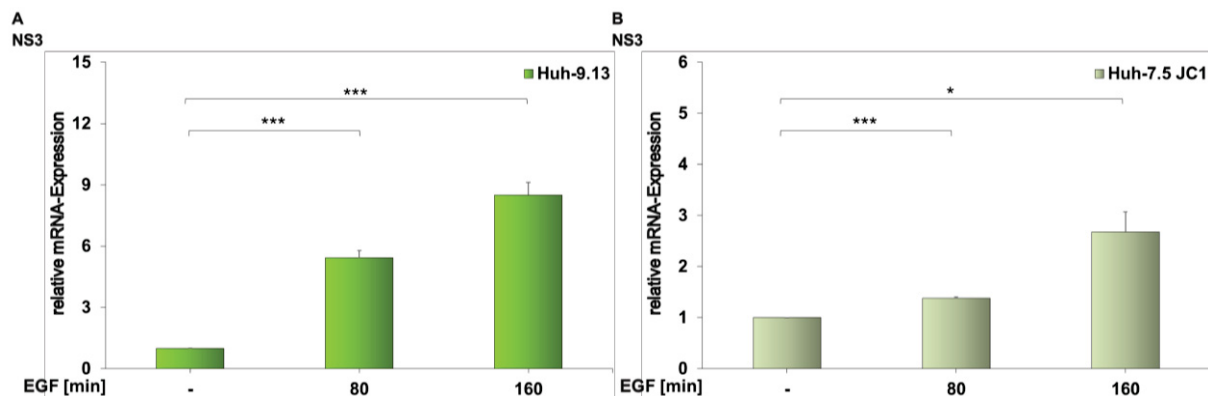


Abbildung 42: EGF verstärkt die virale Replikation sowohl in Anwesenheit des HCV-Replikons als auch in Anwesenheit des HCV-Stamms JC1. **A** Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-9.13 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. **B** Huh-7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 infiziert und nach 72 Inkubation mit 40 ng/ml EGF stimuliert. **A** und **B** Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung eines spezifischen Primers die Expression von NS3 mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind **A** relativ zur unstimulierten Huh-9.13 Kontrolle bzw. **C** relativ zur unstimulierten Huh-7.5 JC1 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

3.14 HCV induziert konstitutiv die Expression von EGF auf Ebene der Transkription und auf Ebene des Proteins

Wie aus den bisherigen Resultaten und ferner aus veröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe geschlossen werden kann, interferiert das Hepatitis C Virus mit der Signalweiterleitung des

epidermalen Wachstumsfaktors zur Steigerung der Replikation des viralen Genoms durch die verstärkte Aktivierung zellulärer Komponenten des EGF-induzierten Signalweges.^{156,401} Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob das Hepatitis C Virus umgekehrt zugleich die Fähigkeit aufweist EGF zu seinen Gunsten zu manipulieren und die basale Expression von EGF zu induzieren, um so die Korrelation der HCV-induzierten und durch EGF gesteigerten CXCR2-Liganden-Expression genauer charakterisieren zu können.

Vor diesem Hintergrund wurde die basale EGF-Transkriptmenge mittels RT-PCR und das Maß der EGF-Protein-Expression mittels spezifischem EGF-ELISA in der Gegenwart des HCV-Replikons als auch in der Anwesenheit des HCV-Stamms JC1 sowie *in vivo* in Seren von HCV-infizierten Patienten quantifiziert.

Auf der Ebene der RNA wurde eine deutliche Steigerung der basalen Expression von EGF durch die Präsenz der viralen Nicht-Strukturproteine in humanen Huh-9.13 Zellen (Abbildung 43A) und in Huh-5.15 Zellen (Abbildung 43B) beobachtet. Wie der Abbildung 43C zu entnehmen ist, ergab die Untersuchung mittels RT-PCR in mit dem HCV-Stamm JC1 infizierten verglichen mit nicht-infizierten Huh-7.5 Zellen äquivalent eine deutliche Heraufregulation des basalen EGF-Transkriptes.

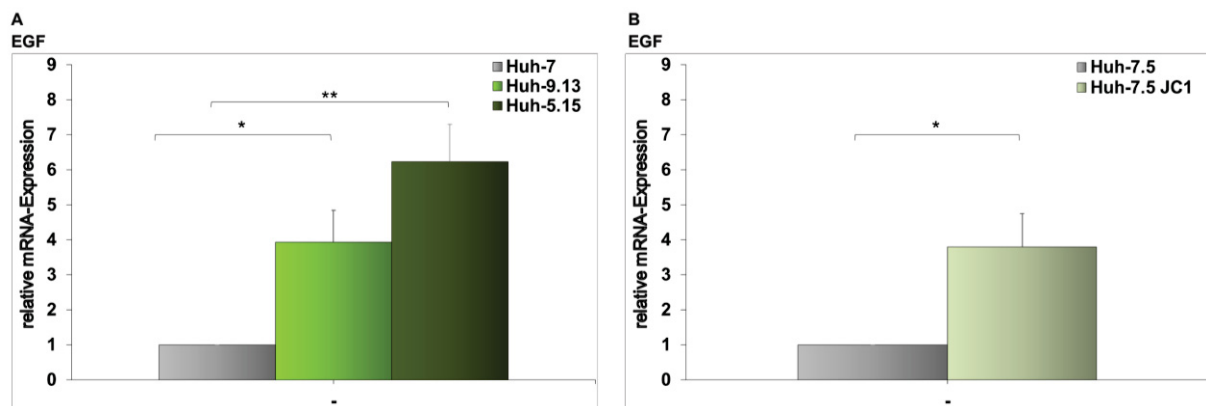


Abbildung 43: HCV induziert die basale Expression von EGF auf Ebene der Transkription. **A** Huh-9.13 und Huh-5.15 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. **B** Huh-7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 für 72 Stunden infiziert. Huh-7.5 Zellen dienen der Kontrolle. **A** und **B** Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung eines spezifischen Primers die Expression von EGF mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur **A** Huh-7 und **B** Huh-7.5 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Die Resultate des spezifischen EGF-ELISAs in unstimulierten Zellkulturüberständen der Replikon-enthaltenden Huh-9.13 (Abbildung 44A) bzw. Huh-5.15 Zellen (Abbildung 44B) ergaben übereinstimmend mit den RT-PCR-Daten eine Zunahme der EGF-Proteinmenge. Wie aus der Abbildung 44C ersichtlich ist, sekretierten die mit dem HCV-Stamm JC1 infizierten Huh-7.5 Zellen eine deutlich erhöhte Menge an EGF.

In Übereinstimmung mit den *in vitro* Zellkulturdaten konnte zugleich *in vivo* in Seren von HCV-infizierten Patienten eine deutliche Steigerung der EGF-Konzentration, im Vergleich mit der detektierten Menge in Seren von gesunden Patienten, quantifiziert werden (Abbildung 44D).

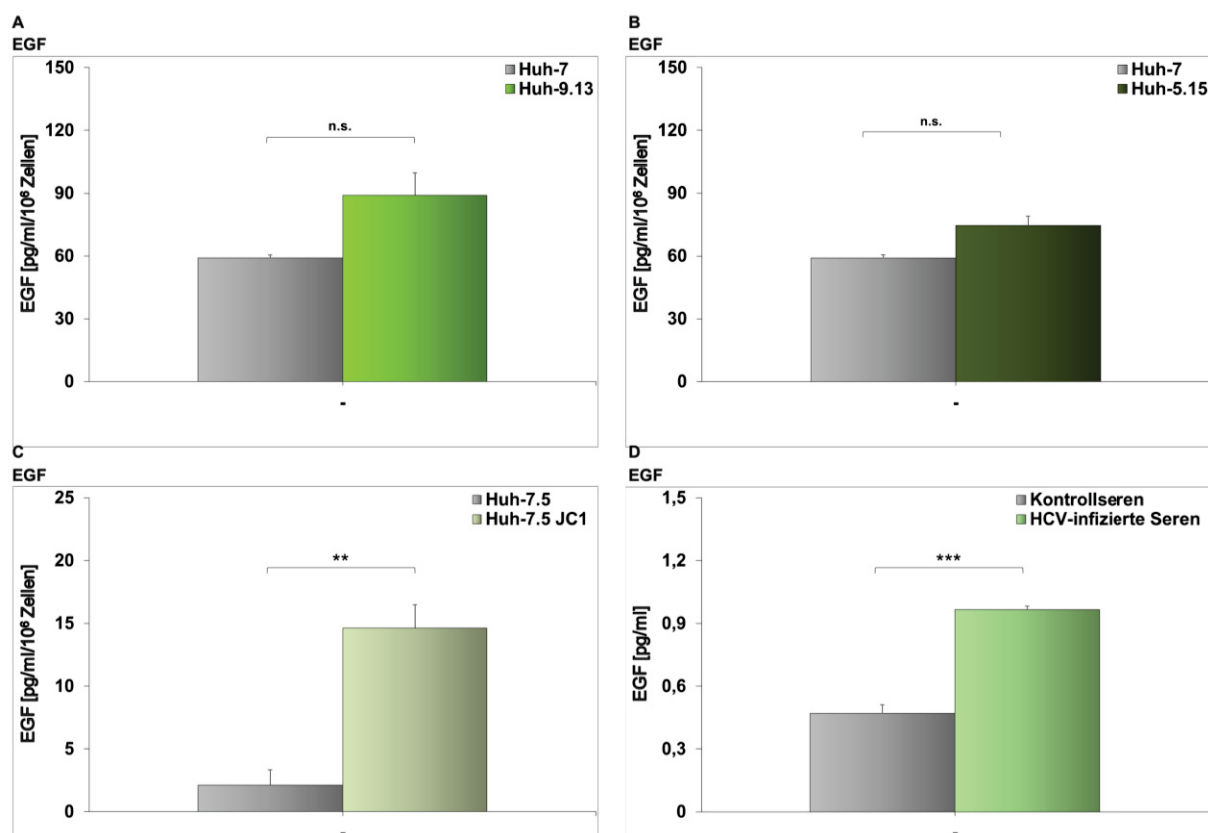


Abbildung 44: HCV induziert die basale EGF-Expression auf Protein-Ebene. A und B Huh-9.13 und Huh-5.15 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. C Huh-7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 für 72 Stunden infiziert. Huh-7.5 Zellen dienen der Kontrolle. A, B und C Quantitative Analyse der basalen Proteinkonzentration von EGF in unstimulierten Zellkulturüberständen von A Huh-9.13 B Huh-5.15 und C Huh-7.5 Zellen mittels spezifischem EGF-ELISA. D Quantitative Analyse der EGF-Proteinkonzentration in Seren von gesunden Patienten und Seren von HCV-infizierten Patienten mittels spezifischem EGF-ELISA. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus A und B drei, C vier und D neun unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Um zu belegen, dass das HCV-Replikon die Gen-Expression des epidermalen Wachstumsfaktors induziert, wurden in der Folge der vorangegangenen Befunde Huh-9.13 Zellen mit 10 μM 2-C'-Methylcytidin, einem Inhibitor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B, zur Inhibierung der viralen Replikation versetzt und nach 48 Stunden mit 40 ng/ml EGF stimuliert.

Der Einfluss von Methylcytidin auf die virale Replikation wurde anhand der NS3-Expression im Western Blot analysiert. Wie in der Abbildung 45B dargestellt, kommt es unter Einsatz von Methylcytidin zu einer fast vollständigen Inhibition der subgenomischen Replikation.

Um weiterführend sicherzustellen, dass HCV die EGF-Expression eigenständig konstitutiv induziert, wurde zugleich auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR der Einfluss von 2-C'-Methylcytidin auf das Zielgen überprüft. Wie aus der Abbildung 45A hervorgeht, konnte die HCV-bedingte Steigerung der basalen EGF-Expression durch die Methylcytidin-vermittelte Hemmung der viralen Replikation fast vollständig aufgehoben werden.

Diese Hinweise belegen, dass HCV ein relevanter Induktor für die konstitutive EGF-Expression in seiner Wirtszelle ist.

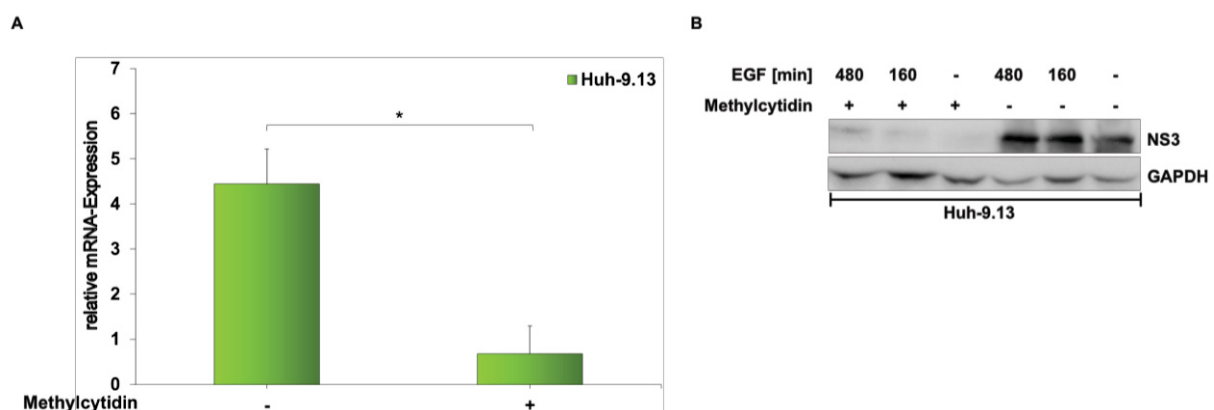


Abbildung 45: Die durch EGF-verstärkte virale Replikation wird durch den Einsatz von 2-C'-Methylcytidin inhibiert. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. **A** Huh-9.13 Zellen wurden für 48 Stunden mit 10 μM 2-C'-Methylcytidin inkubiert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung eines spezifischen Primers die Expression von EGF mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden. **B** Huh-9.13 Zellen wurden mit 10 μM 2-C'-Methylcytidin für 48 Stunden inkubiert und anschließend mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden aus den Zellen isoliert und 30 μg Protein in einem 12 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von NS3 analysiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Zwischen

den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt.

Weiterführend sollte analysiert werden, inwieweit die HCV-bedingte Expression von EGF auch während einer chronischen Hepatitis C Virus Infektion vorliegt. Hierfür wurde ein Modell für die chronische Infektion unter Verwendung von DMSO-differenzierten Huh-7.5 Zellen genutzt. Initial erfolgte die Kultivierung der Zellen mit 2 % DMSO-supplementiertem Kulturmedium für 14 Tage. Anschließend wurden die Zellen mit zwei MOI des HCV-Stamms JC1 für 48 Stunden infiziert und für weitere vier Wochen mit DMSO-haltigem Medium kultiviert. Die Chronifizierung resultierte in einer permanenten Virussynthese und schaffte die Voraussetzung für die Simulation einer chronischen HCV-Infektion *in vitro*.

Die Analyse des EGF-Zielgens in differenzierten, mit dem HCV-Stamm JC1 chronisch infizierten Huh-7.5 Hepatomazellen erbrachte das Resultat einer deutlichen Steigerung der transkriptionellen Expression von EGF (Abbildung 46A).

Zum Nachweis der erfolgreichen Infektion der Huh-7.5 Zellen mit dem HCV-Stamm JC1 nach vier Wochen, wurde das virale Nicht-Strukturprotein NS5A über den Primärantikörper Anti-HCV NS5A (Genotyp 2a) und einem *dye*-konjugierten Sekundärantikörper, versetzt mit dem Kernfarbstoff DAPI, gefärbt und mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie und Anregung der Fluorophore entsprechend ihrer Absorptionsspektren, visualisiert (Abbildung 46B).

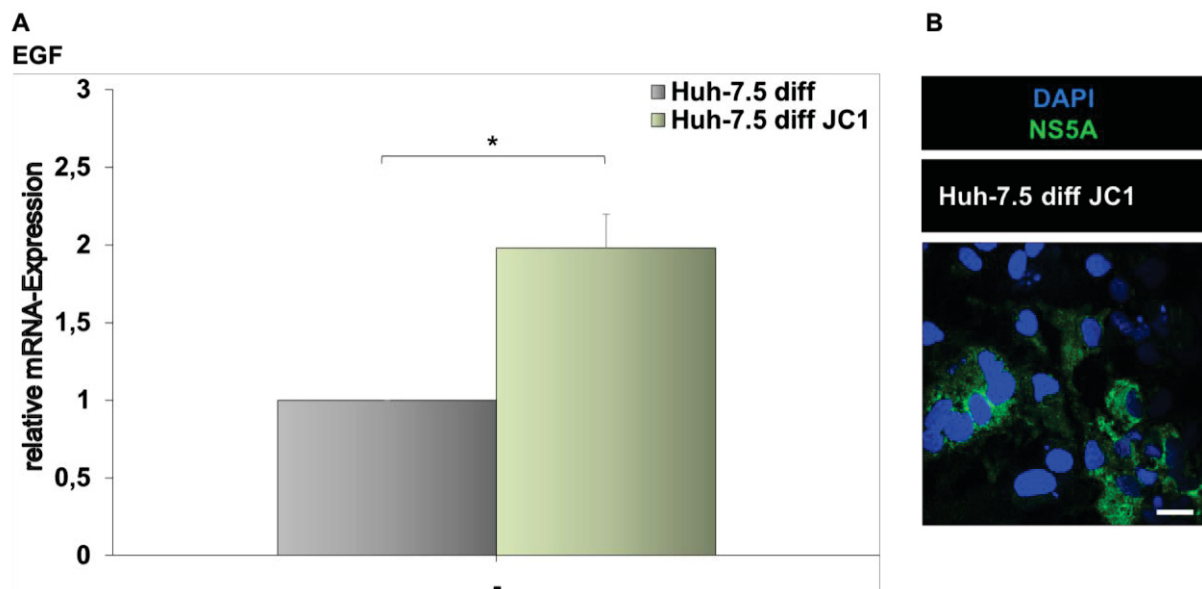


Abbildung 46: Die basale EGF-Expression ist im Modell der chronischen HCV-Infektion erhöht. A Huh-7.5 Zellen wurden für 14 Tage mit 2 % DMSO-supplementiertem Kulturmedium kultiviert. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit zwei MOI des HCV-Stamms JC1 für 48 Stunden und die Inkubation für weitere vier Wochen mit DMSO-haltigem Medium. DMSO-differenzierte Huh-7.5 Zellen dienen der Kontrolle. Die mRNA

wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung eines spezifischen Primers die Expression von EGF mittels RT-PCR untersucht. Die quantitative Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ Huh-7.5 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden. **B** Huh-7.5 Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und für 14 Tage mit 2 % DMSO-supplementiertem Kulturmedium kultiviert. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit zwei MOI des HCV-Stamms JC1 für 48 Stunden, die Inkubation für weitere vier Wochen mit DMSO-haltigem Medium und die Fixierung der Zellen mit Methanol. NS5A wurde über den Primärantikörper Anti-HCV NS5A (Genotyp 2a) und einem *dye*-konjugierten Sekundärantikörper (Anregung bei 490 nm), versetzt mit dem Kernfarbstoff DAPI (Anregung bei 358 nm), visualisiert. Die Färbung wurde mittels konfokalem *Laserscanning* Mikroskop analysiert (Vergrößerung: 63-fach, Balken=50 μ M).

3.15 HCV reguliert die Induktion der CXCR2-Liganden-Expression durch einen autokrinen und parakrinen positiven EGF *feedback loop*

Im Hinblick auf die bisher erbrachten Befunde der HCV-induzierten konstitutiven Expression des epidermalen Wachstumsfaktors, entstand als nächstes die Überlegung, ob die Expression der CXCR2-Liganden möglicherweise durch einen HCV-vermittelten autokrinen und parakrinen EGF *feedback loop* reguliert wird.

Hierzu wurde posttranskriptionell ein spezifischer Gen-*knockdown* von EGF mittels siRNA in Huh-9.13 Zellen induziert und der Einfluss des *knockdowns* auf die Expression von CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8 auf mRNA-Ebene in der RT-PCR eruiert.

Diese posttranskriptionelle Inhibierung von EGF führte in der Anwesenheit des HCV-Replikons zu einer deutlichen Suppression der Expression von CXCL1 (Abbildung 47A), CXCL2 (Abbildung 47B), CXCL3 (Abbildung 47C) und CXCL8 (Abbildung 47D) auf Transkript-Ebene im Vergleich zu den entsprechend behandelten Huh-9.13 Kontrollzellen.

Der Nachweis des erfolgreichen *knockdowns* von EGF wurde mittels RT-PCR mit Hilfe eines spezifischen Primers belegt (Abbildung 47E).

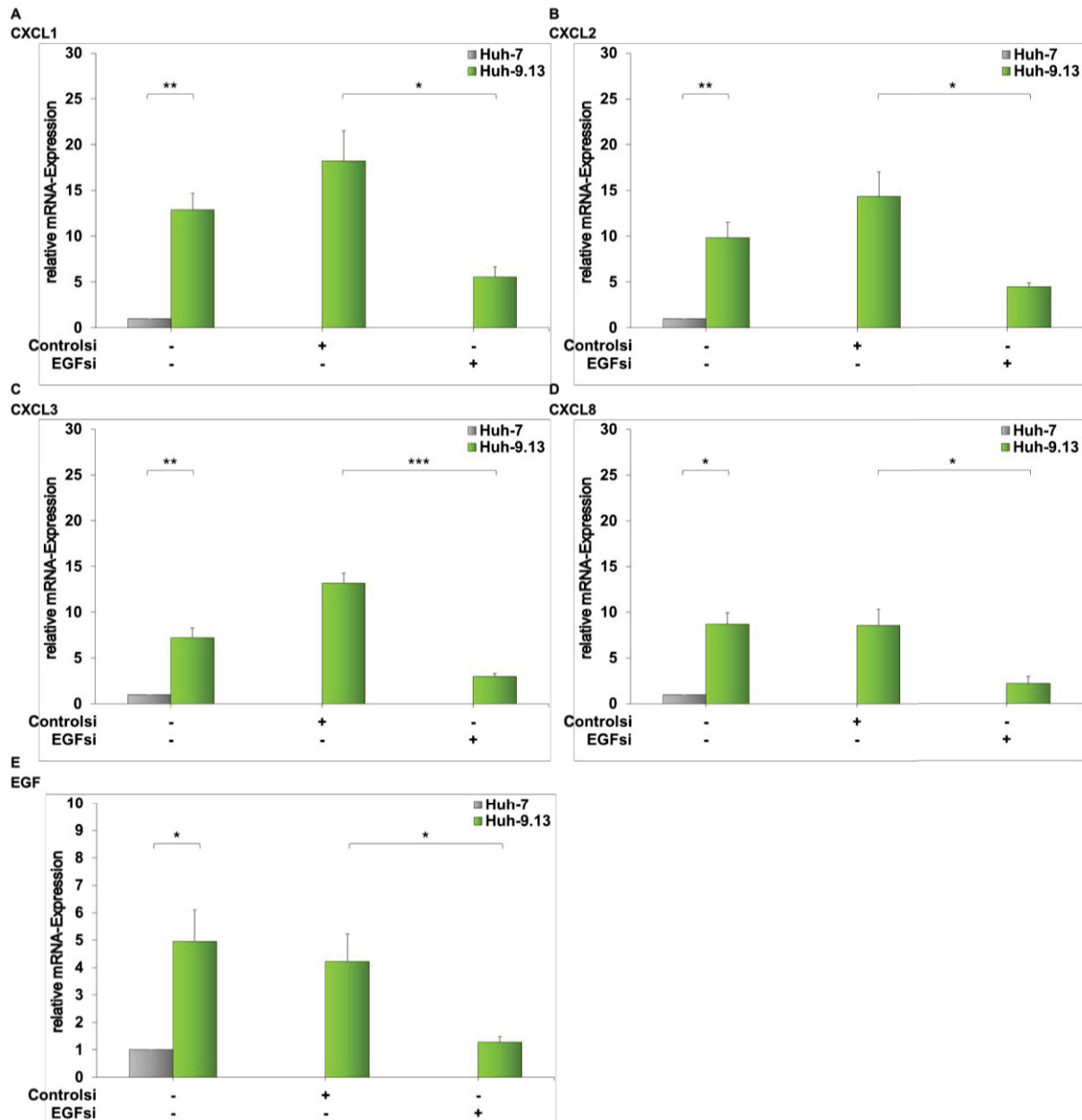


Abbildung 47: Das HCV-Replikon induziert und reguliert die CXCR2-Liganden-Expression durch einen positiven autokrinen und parakrinen EGF *feedback loop*. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Huh-9.13 Zellen wurden für 72 Stunden mit 50 nM EGF-siRNA bzw. 50 nM Control-siRNA transfiziert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A** CXCL1, **B** CXCL2, **C** CXCL3 **D** CXCL8 und **E** EGF mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh-7 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

In der Gesamtheit ist aus den bisherigen Befunden anzunehmen, dass das Hepatitis C Virus eigenständig die Expression der CXCR2-Liganden durch eine konstitutive EGF-Expression in seiner Wirtszelle induziert und durch einen positiven autokrinen und parakrinen EGF *feedback loop* zugleich reguliert.

3.16 Der CXC-Rezeptor-2 führt zu keiner deutlichen Verstärkung der viralen Replikation

Im Anschluss an die mechanistische Untersuchung der HCV-vermittelten Induktion der CXCR2-Liganden-Expression galt es nun die funktionelle und biologische Relevanz der HCV-induzierten Chemokinüberexpression genauer aufzuklären.

EGF führt, wie bereits beschrieben, in der Anwesenheit des HCV-Replikons^{156,401} und in der Anwesenheit des HCV-Stamms JC1 (vgl. Abschnitt 3.13) zur Steigerung der viralen Replikation. In Anbetracht dessen sollte initial evaluiert werden, welchen Einfluss die Inhibition des CXC-Rezeptors 2 auf die virale Replikation ausübt.

Hierzu wurden Huh-9.13 Zellen, die das virale subgenomische HCV-Replikon enthalten, für 24, 48 und 72 Stunden mit 50 nM SB225002, dem spezifischen Inhibitor des CXCR2, inkubiert und nachfolgend die Expression von NS3, NS5A und NS5B auf transkriptioneller Ebene untersucht.

Durch den Einsatz des CXC-Rezeptor-2-Inhibitors kam es, wie der Abbildung 48 zu entnehmen ist, zu keinem deutlichen Unterschied in der Expression der viralen Nicht-Strukturproteine im Vergleich zur entsprechenden, unstimulierten Huh-9.13 Kontrolle.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der CXC-Rezeptor 2 keinen Einfluss auf die Replikation des viralen HCV-Genoms ausübt und es dementsprechend zu keiner Verstärkung der viralen Replikation des Hepatitis C Virus kommt.

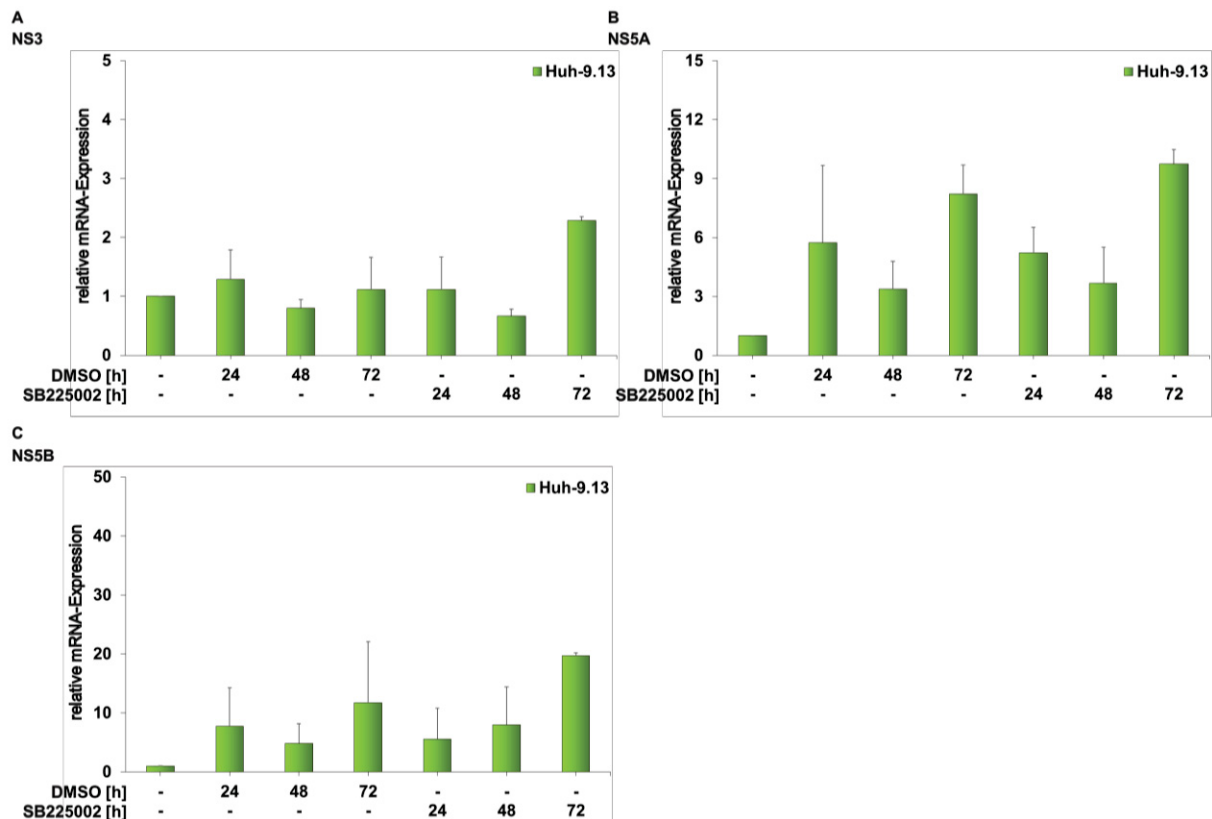


Abbildung 48: Die Inhibition des CXCR2-Rezeptors-2 übt keinen Einfluss auf die virale Replikation aus. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-9.13 Zellen wurden für 24, 48 bzw. 72 Stunden mit 50 nM SB225002, dem spezifischen Inhibitor des CXCR2-Rezeptors 2, inkubiert. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten extrahiert und unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von **A** NS3, **B** NS5A und **C** NS5B mittels RT-PCR analysiert. Die quantitative Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh-9.13 Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an, wobei die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

3.17 Die HCV-induzierte CXCR2-Liganden-Expression führt zu einer verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Aus der Literatur ist ersichtlich, dass der G-Protein gekoppelte CXCR2-Rezeptor 2 vorwiegend auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten lokalisiert ist.³¹⁴ Die CXCR2-Chemokine -1, -2, -3 und -8 weisen ein charakteristisches ELR Motiv mit der präferenziellen Aminosäureabfolge Glutamin, Leucin und Arginin auf,^{311,312} durch dessen Interaktion mit dem CXCR2 sie wesentlich an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten zum Ort der Infektion entsprechend eines Chemokingradienten beteiligt sind.^{315,317} Insbesondere das CXCR2-Motiv-Chemokin 8 als pro-inflammatorischer Schlüsselmediator induziert die Attraktion neutrophiler Granulozyten.^{312,397,398}

Weiterhin geht aus vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe sowie Daten der Literatur hervor, dass das Hepatitis C Virus mit Chemokinen und Zytokinen interferiert und auf diese Weise die Zusammensetzung der Immunzellpopulationen in der Leber modifiziert.^{399–401}

Basierend auf den initialen Ergebnissen dieser Arbeit und ferner den Literaturbefunden entstand die Überlegung, ob die HCV-induzierte und durch die externe Zugabe von EGF gesteigerte Chemokinexpression einen möglichen Einfluss auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten oder von Monozyten ausübt und auf diese Weise HCV-vermittelt die lokale Entzündungs- und Immunmikro-Umgebung zu Gunsten des Virus moduliert wird.

So wurden initial humane neutrophile Granulozyten bzw. humane Monozyten aus humanen Buffy Coats extrahiert (vgl. Abschnitt 2.2.1.3 und Abschnitt 2.2.1.7).

Die erfolgreiche Extraktion neutrophiler Granulozyten aus den humanen Buffy Coats wurde durch die spezifische Färbung mit APC-konjugierten Antikörpern und anschließender Analyse der Oberflächenexpression von CD15 mittels zytometrischer Messung überprüft (Abbildung 49).

Ebenso wurde, wie aus der Abbildung 50 zu entnehmen ist, die erfolgreiche Isolation humaner Monozyten aus den PBMCs humaner Buffy Coats mit Hilfe spezifischer PE-konjugierter Antikörper und zytometrischer Analyse der Oberflächenexpression von CD11c, CD14 sowie CD163 sichergestellt.

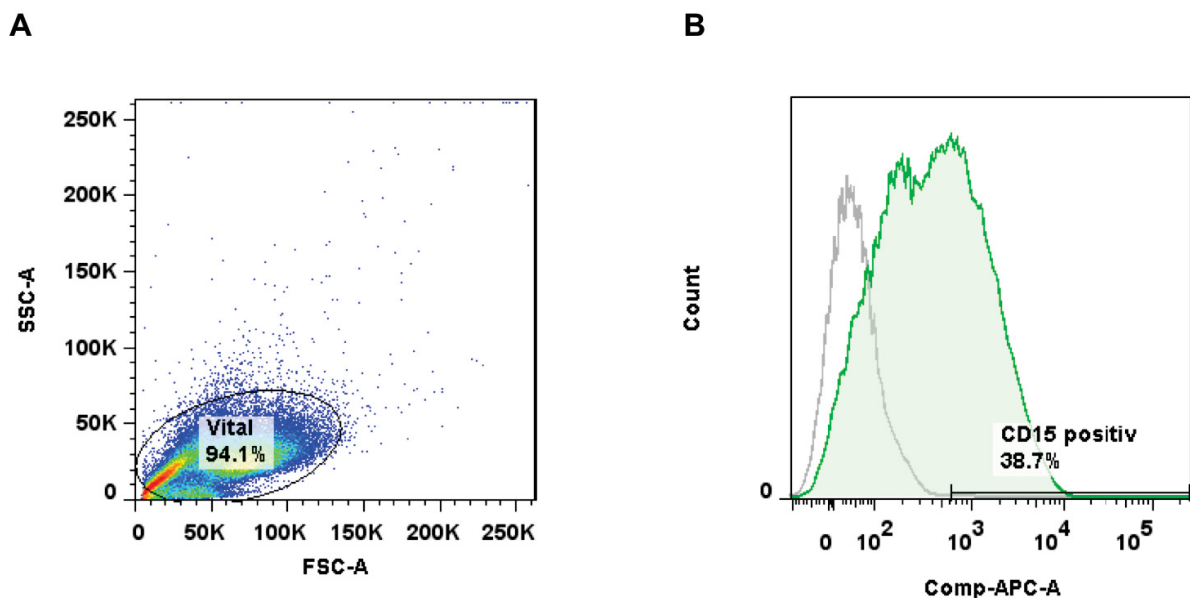


Abbildung 49: Erfolgreiche Extraktion neutrophiler Granulozyten aus humanen Buffy Coats. Als Ausgangsmaterial dienen Buffy Coats, die aus peripherem Vollblut gesunder weiblicher als auch männlicher Blutspender gewonnen wurden. Mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum erfolgte die

Fraktionierung der zellulären Blutbestandteile entsprechend ihrer Zellgrößen und Zelldichten.^{413,414} Blutplasma, Interphase und Ficoll-Schicht wurden verworfen. Extraktion neutrophiler Granulozyten aus dem gebildeten Sediment erfolgte durch die hypotone Lyse der Erythrozyten. **A** *Forward* und *side scatter* wurden entsprechend der Größe und Granularität der neutrophilen Granulozyten eingestellt. **B** Zytometrische Analyse der Oberflächenexpression von CD15 auf neutrophilen Granulozyten mittels APC-konjugierter Antikörper. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mittels FlowJo Software gegen die entsprechende Isotypenkontrolle. Grau: Histogramm der APC-Kontrollanalyse, Grün: Histogramm der CD15-Analyse.

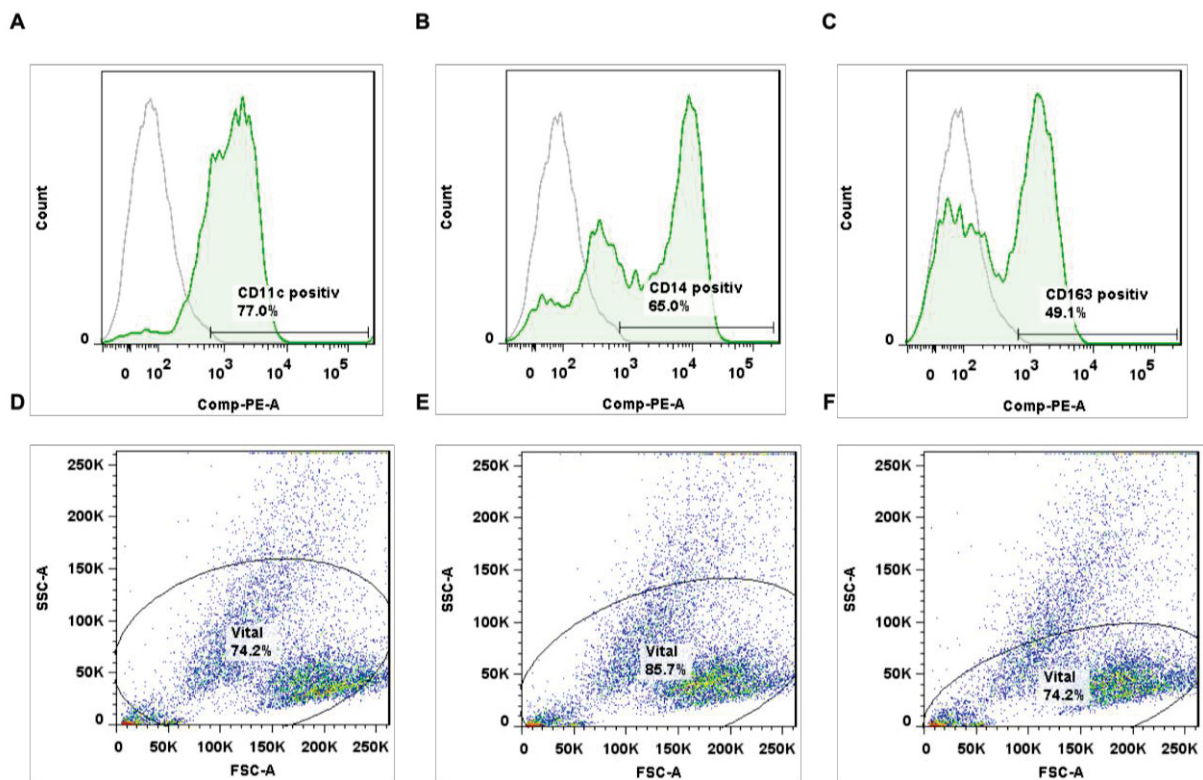


Abbildung 50: Erfolgreiche Extraktion humaner Monozyten aus PBMCs humaner Buffy Coats. Extraktion peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum.^{413,414} Als Ausgangsmaterial dienten Buffy Coats, die aus peripherem Vollblut gesunder männlicher Blutspender gewonnen wurden. Mittels einer Ficoll-Separationslösung erfolgte die Fraktionierung der zellulären Blutbestandteile entsprechend ihrer Zellgrößen und Zelldichten. Monozyten wurden aus den PBMCs durch positive Zellseparation mittels MACS mit Hilfe spezifischer CD14 MicroBeads isoliert.^{419,420} Zytometrische Analyse der Oberflächenexpression von **A** CD11c, **B** CD14 und **C** CD163 auf humanen Monozyten mittels PE-konjugierter Antikörper. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mittels FlowJo Software gegen die entsprechende Isotypenkontrolle. Grau: Histogramm der PE-Kontrollanalyse, Grün: Histogramm der **A** CD11c-Analyse, **B** CD14-Analyse und **C** CD163-Analyse. **D**, **E** und **F** Einstellung des *forward* und *side scatter* entsprechend der Größe und Granularität der Monozyten.

Für die Migrations-Assays wurden Huh-7 und Huh-9.13 Zellen mit 40 ng/ml EGF stimuliert und Serum-freie Zellkulturüberstände generiert. Diese konditionierten Zellkulturüberstände wurden in das untere Kompartiment einer 24-Well Gewebekulturplatte überführt und isolierte

neutrophile Granulozyten oder Monozyten in Serum-freiem Medium in darüber positionierten, speziellen Zellkultur-Einsätzen mit einer permeablen Membran, welche eine Porengröße von 3 µm aufweist, kultiviert. Auf diese Weise konnten die Zellen in das untere Kompartiment, entsprechend des HCV-induzierten Chemokingradienten, migrieren. Unter Zusatz von 40 µl WST-1 Reagenz wurde nach weiteren drei Stunden Inkubation die relative Anzahl migrierter Zellen anhand des gebildeten rötlich-bräunlichen Farbstoffs Formazan photometrisch bestimmt.

Wie in der Abbildung 51, dargestellt, migrierten die neutrophilen Granulozyten durch die Präsenz unstimulierter Huh-9.13 Zellkulturüberständen um den Faktor 1,3 stärker verglichen mit der relativen Anzahl migrierter Neutrophiler in der Anwesenheit unstimulierter Huh-7-Überständen. Die vorausgegangene Stimulation der HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Zellen mit EGF hatte ein deutlich verstärktes Migrationsverhalten der Neutrophilen zur Folge, bezogen auf die entsprechend stimulierte Huh-7 Kontrolle. In der Folge der IL-1β Stimulation humaner Huh-9.13 Zellen konnte hingegen keine deutliche Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beobachtet werden. Die mit EGF und IL-1β ko-stimulierten Überstände der Huh-9.13 Hepatomazellen resultierten wiederum in einem deutlich verstärkten Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu den entsprechenden Huh-7 Kontrollen. Des Weiteren ist aus der Abbildung 51 ersichtlich, dass die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit der HCV-induzierten CXCR2-Liganden-Expression nach erfolgter EGF-Stimulation und zugleich nach vorausgegangener Ko-Stimulation mit IL-β im Vergleich zur unstimulierten Huh-9.13 Kontrolle deutlich gesteigert wurde. Ebenso migrierten die Neutrophilen in der Anwesenheit EGF-stimulierter und/oder IL-1β-behandelter Überstände der HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Zellen deutlich stärker als in der Gegenwart des Kontrollmediums.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Hepatitis C Virus durch die Induktion der Expression von CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8 in seiner Wirtszelle die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten initiiert und diese durch die HCV-bedingte Konvertierung des epidermalen Wachstumsfaktors in einen potenten Induktor der Chemokinsynthese verstärkt wird. Ob weitere chemotaktische Faktoren an dieser Rekrutierung der Neutrophilen beteiligt sind kann an dieser Stelle nicht vollständig ausgeschlossen werden.

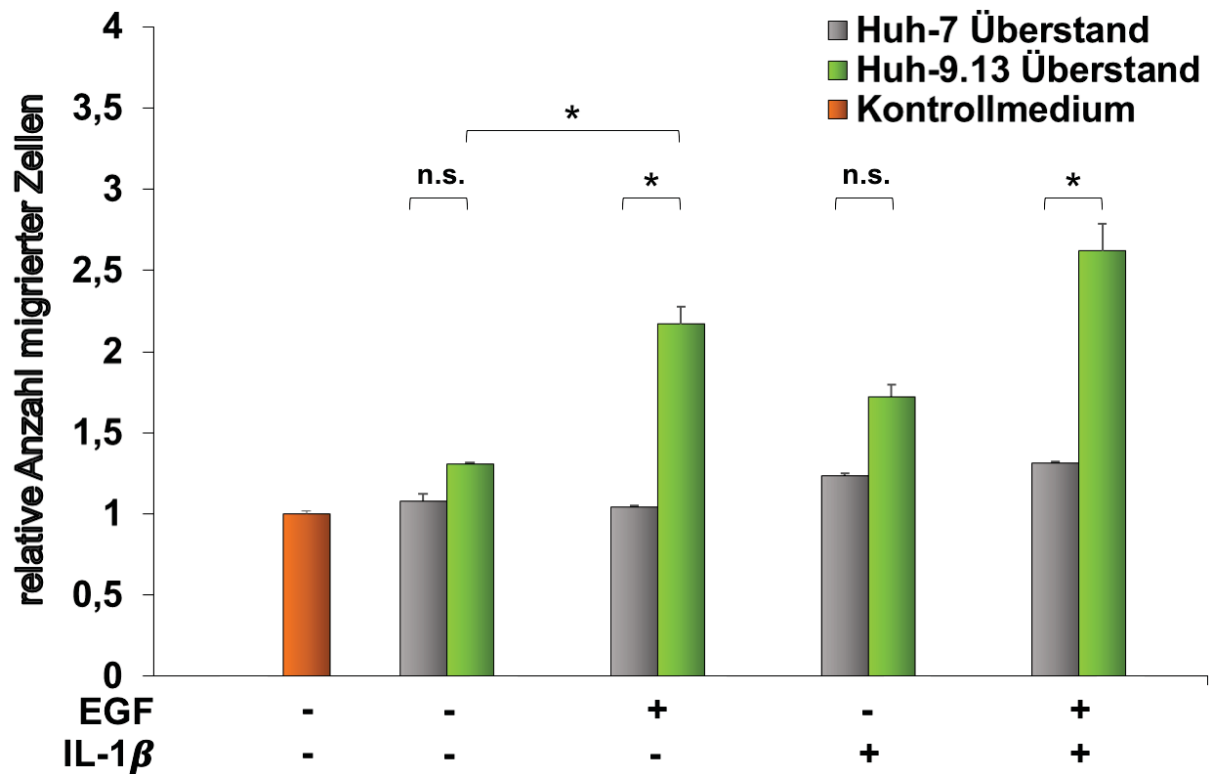


Abbildung 51: Steigerung des Migrationsverhaltens neutrophiler Granulozyten durch die HCV- und EGF-induzierte CXCR2-Liganden-Expression. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienen der Kontrolle. Als Kontrolle diente Zell-freies Kulturmedium. Humane Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF und/oder 50 U/ml IL-1β für 8 Stunden stimuliert. Konditionierte Zellkulturüberstände wurden generiert und in das untere Kompartiment des Transwellsystems überführt (vgl. Abbildung 18). Neutrophile Granulozyten wurden aus humanen Buffy Coats extrahiert und in Zellkultur-Einsätze mit einer Porengröße von 3 µm kultiviert. Die relative Anzahl migrierter Zellen wurde photometrisch bei 450 nm und 620 nm unter Zusatz von WST-1 Reagenz-gebildeten Formazan analysiert. Die Ergebnisse sind relativ zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse jeweils vier unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Im Vergleich dazu migrierten humane Monozyten HCV-unabhängig, da bereits in der Anwesenheit von unstimulierten und mit EGF-stimulierten Huh-7 Zellkulturüberständen ein verstärktes Migrationsverhalten der Monozyten beobachtet wurde (Abbildung 52). Eine verstärkte Rekrutierung der Monozyten konnte auch in Antwort auf EGF-behandelte Zellkulturüberstände der Huh-9.13 Replikonzellen beobachtet werden.

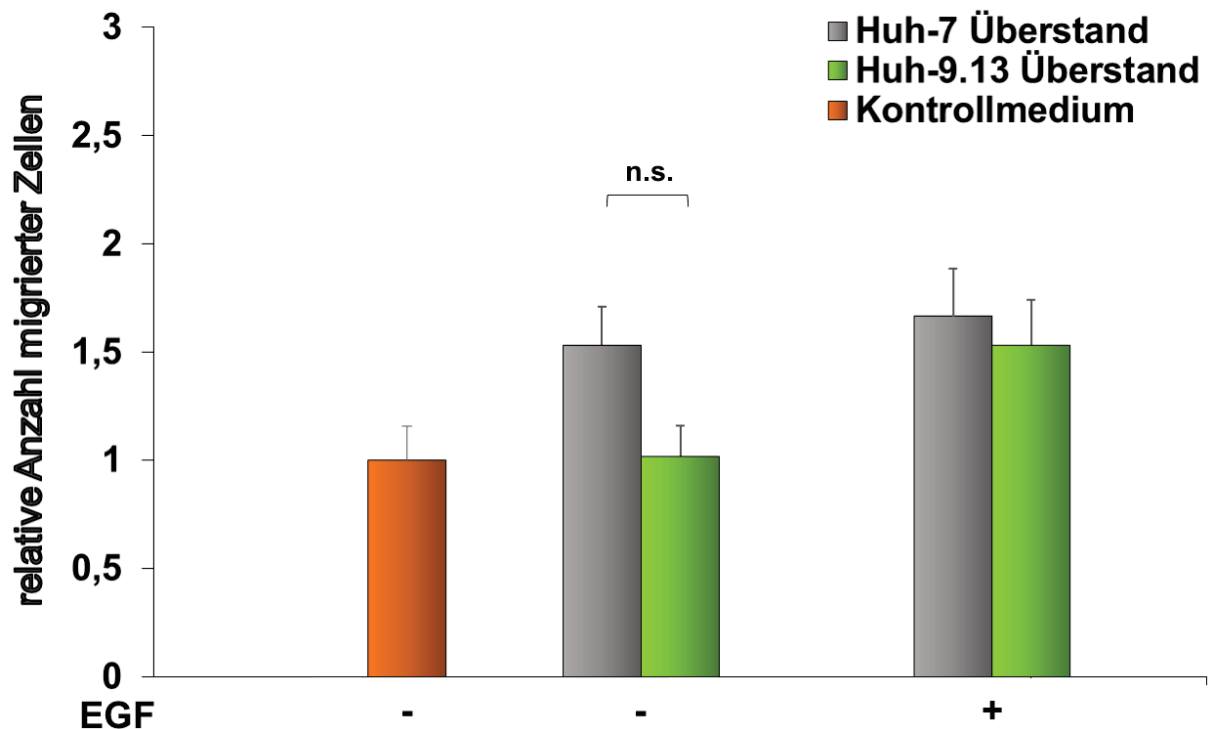


Abbildung 52: Das Migrationsverhalten humaner Monozyten ist HCV-unabhängig. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Als Kontrolle diente Zell-freies Kulturmedium. Humane Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF und/oder 50 U/ml IL-1 β für 8 Stunden stimuliert. Konditionierte Zellkulturüberstände wurden generiert und in das untere Kompartiment des Transwellsystems überführt (vgl. Abbildung 18). Monozyten wurden aus PBMCs humaner Buffy Coats extrahiert und in Zellkultur-Einsätze mit einer Porengröße von 3 μ m kultiviert. Die relative Anzahl migrierter Zellen wurde photometrisch bei 450 nm und 620 nm unter Zusatz von WST-1 Reagenz-gebildeten Formazan analysiert. Die Ergebnisse sind relativ zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse vier unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Weiterführende Untersuchungen sollten nun sicherstellen, dass die verstärkte Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten durch die durch das HCV-Replikon induzierte und durch EGF gesteigerte CXCR2-Liganden-Expression und nicht durch andere chemotaktischen Substanzen, die durch das Virus und/oder in Antwort auf IL-1 β oder EGF von den infizierten Zellen synthetisiert werden, ausgelöst wird.

Hierzu wurde den extrahierten neutrophilen Granulozyten 50 nM SB225002, der spezifische Inhibitor des CXCR2, vor der Überführung in die Inserts und damit vor der Kultivierung mit den konditionierten Zellkulturüberständen der humanen Huh-7 und Huh-9.13 Zellen hinzugesetzt.

Die Hemmung des Chemokinrezeptors hatte, wie in der Abbildung 53 dargestellt, eine deutliche Reduktion der Migration neutrophiler Granulozyten zur Folge. So konnte durch den Einsatz des CXCR2-Inhibitors keine oder nur eine geringe Rekrutierung der Neutrophilen in der Anwesenheit unstimulierter, zuvor mit EGF-stimulierter oder EGF/IL-1 β -ko-stimulierter Überstände von humanen Huh-9.13 Zellen bestimmt werden.

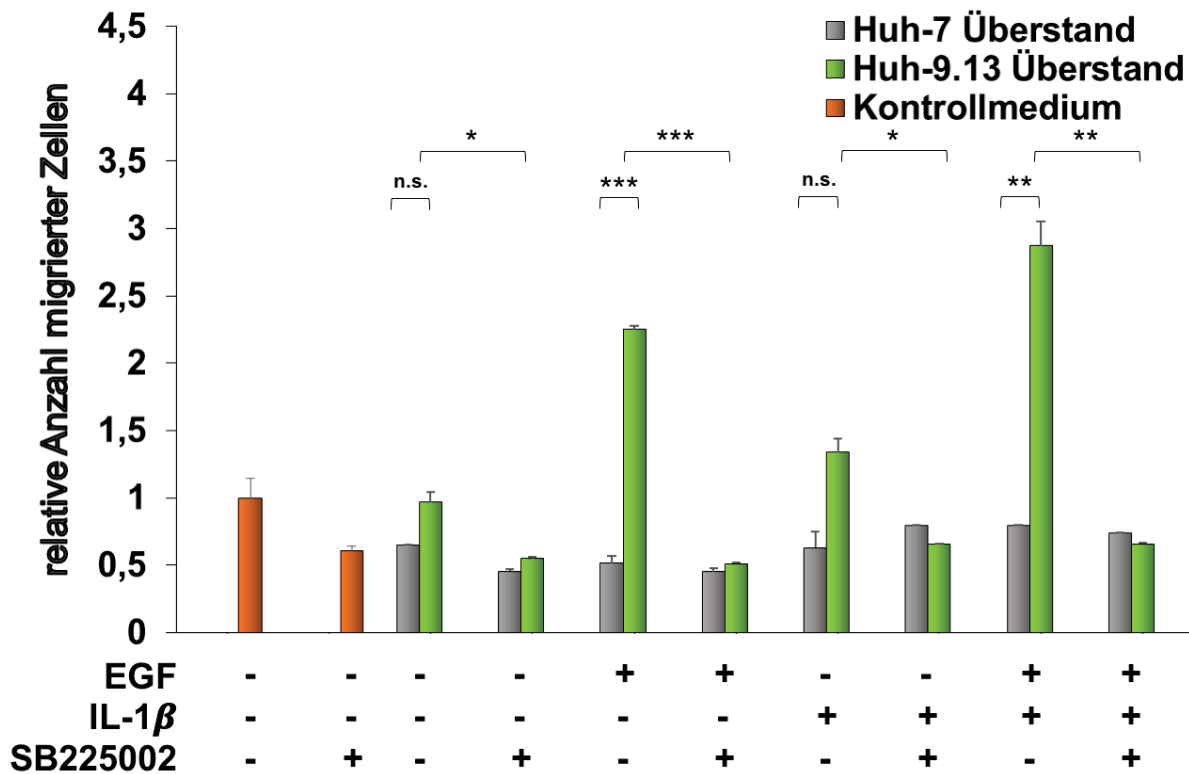


Abbildung 53: Die HCV-induzierte Migration neutrophiler Granulozyten ist abhängig von der CXCR2-Liganden-Expression. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Als Kontrolle diente Zell-freies Kulturmedium. Humane Huh-7 und Huh-9.13 Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF und/ oder 50 U/ml IL-1 β für 8 Stunden stimuliert. Konditionierte Zellkulturüberstände wurden generiert und in das untere Kompartiment des Transwellsystems überführt (vgl. Abbildung 18). Neutrophile Granulozyten wurden aus humanen Buffy Coats extrahiert und in Zellkultur-Einsätze mit einer Porengröße von 3 μ m, unter Zusatz von 50 nM SB225002, dem spezifischen CXCR2-Inhibitor, kultiviert. Die relative Anzahl migrierter Zellen wurde photometrisch bei 450 nm und 620 nm unter Zusatz von WST-1 Reagenz-gebildeten Formazan analysiert. Die Ergebnisse sind relativ zur Negativkontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse jeweils drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Die Befunde führen in der Gesamtheit zu der Annahme, dass vorrangig die durch HCV sezernierten CXCR2-Liganden CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8 die gesteigerte Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten induzieren, da durch die Inhibition des CXCR2 die verstärkte

Migration der Immunzellen fast vollständig aufgehoben wurde, sofern EGF und/oder IL-1 β stimulierte Überstände humaner Huh-9.13 Zellen verwendet wurden.

3.18 Das HCV-Replikon verhindert die verstärkte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche von humanen ko-kultivierten CD14⁺ Makrophagen im indirekten Transwellsystem

In der Literatur sind bereits Interferenzen des Hepatitis C Virus mit der Expression von Chemokinrezeptoren beschrieben.^{310,318} Inwieweit HCV in deren Regulation eingreift ist bislang wenig erforscht. Vor diesem Hintergrund sollte zur Aufklärung der funktionellen und biologischen Relevanz der HCV-induzierten CXC-Motiv-Chemokine 1, 2, 3 und 8 initial ein leberähnliches Ko-Kultur-Modell humaner Makrophagen und humaner Huh-7 bzw. den HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Hepatomazellen etabliert werden. Mit Hilfe dieses Ko-Kultur-Modells sollte folglich der Einfluss der durch das HCV-Replikon induzierten und durch EGF gesteigerten Chemokinsynthese auf die Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 sowie CXCR4, welche wesentlich am Eintritt des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) in seiner Wirtszelle involviert sind,^{375,373,381} auf der Oberfläche der ko-kultivierten Makrophagen untersucht werden.

Bei dem in dieser Arbeit etablierten Ko-Kultur-Modell handelt es sich um ein indirektes *in vitro* Transwellsystem zur Analyse der Zell-Zell-Kommunikation über freigesetzte im Medium lösliche Mediatoren, zwischen den humanen Makrophagen und den humanen Huh-7 bzw. den HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Hepatomazellen.

Für das Transwellsystem wurden spezielle Zellkultur-Einsätze mit permeabler Membran mit einem Porendurchmesser von 0,4 μ m und entsprechende 6-Well Gewebekulturschalen mit Vorkehrungen zum Positionieren der Inserts verwendet. Humane Monozyten wurden aus PBMCs humaner Buffy Coats, gesunder männlicher Blutspender extrahiert und die Ausdifferenzierung zu Makrophagen unter Zusatz von humanem M-CSF induziert. Die ausdifferenzierten Makrophagen wurden in den oberen Inserts kultiviert und durch die permeable Membran, von den in den darunter gelegenen 6-Wells ko-kultivierten Hepatomazellen, separiert. Die Zelldichte der Hepatomazellen zu den Makrophagen wurde hierzu in einem möglichst exakten Verhältnis von 8:1 zum Zeitpunkt der Ernte eingestellt, um *in vitro* das ungefähre *in vivo* Verhältnis der Zellpopulationen zueinander in der Leber zu simulieren.⁴⁶⁵ Dies ermöglichte realitätsbezogene Analysen zur Zell-Zell-Kommunikation *in*

vitro. Dabei musste stets die hohe Proliferationsrate der Hepatomazelllinien berücksichtigt werden.

Als Negativkontrolle wurde eine Mono-Kultur humaner Makrophagen in den oberen Zellkultur-Einsätzen mit Ko-Kulturmedium in den entsprechend unteren Kompartimenten angelegt. Der schematische Aufbau sowie die Anordnung der Zellen des Ko-Kultur-Modells ist der Abbildung 54A und Abbildung 54B bzw. der Mono-Kultur der Abbildung 54C zu entnehmen.

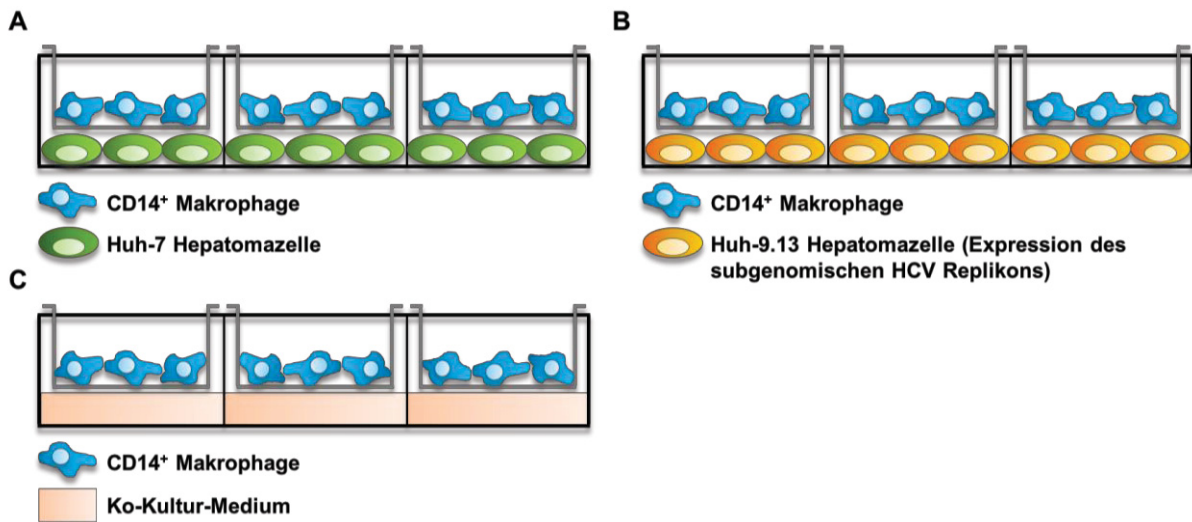


Abbildung 54: Schematischer Aufbau des Ko-Kultur-Modells sowie der Mono-Kultur. **A** Ko-Kultur-Modell bestehend aus humanen CD14⁺ Makrophagen im oberen Kompartiment und Huh-7 Hepatomazellen im unteren Kompartiment. **B** Ko-Kultur-Modell aus humanen CD14⁺ Makrophagen im oberen Kompartiment und humanen Huh-9.13 Hepatomazellen im unteren Kompartiment. **C** Mono-Kultur bestehend aus humanen CD14⁺ Makrophagen im oberen Kompartiment und Ko-Kultur-Medium im unteren Kompartiment.

Potentielle morphologische Differenzierungen der vitalen Zellen während der Mono- bzw. Ko-Kultivierung sowie das Verhältnis humaner Makrophagen zu humanen Hepatomazellen wurden täglich lichtmikroskopisch durch schonendes konfokales Observieren im Cell Observer überprüft. Die Zelldichte sowie die Zellvitalität humaner Makrophagen der Mono-Kultur sind aus den entsprechenden Bildaufnahmen der Abbildung 55 zu entnehmen. Das Verhältnis der Zelldichten humaner Makrophagen zu humanen Huh-7 Hepatomazellen ist in den Bildaufnahmen der Abbildung 56 bzw. zu den Huh-9.13 Hepatomazellen in den Bildaufnahmen der Abbildung 57 dargestellt.

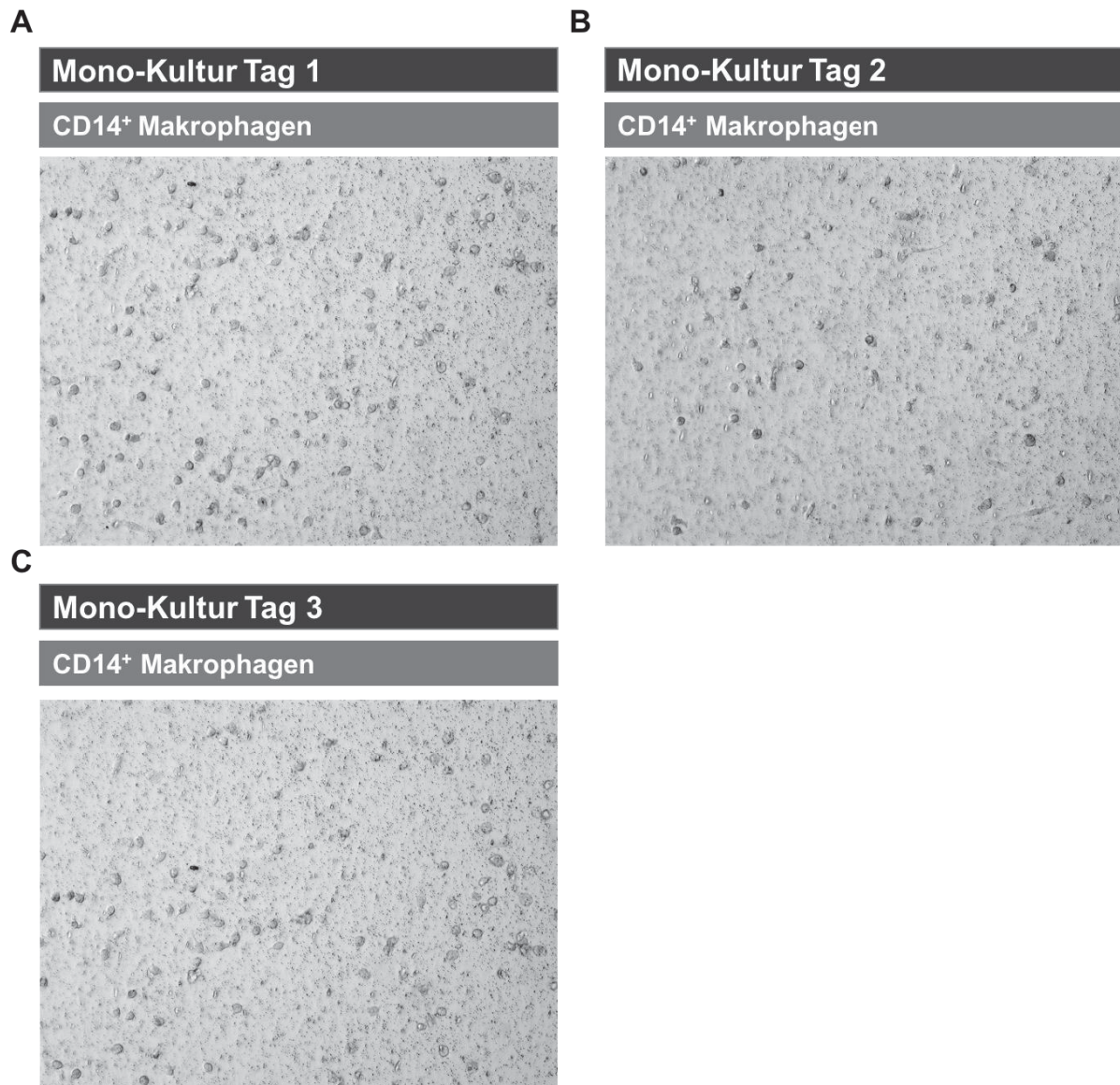
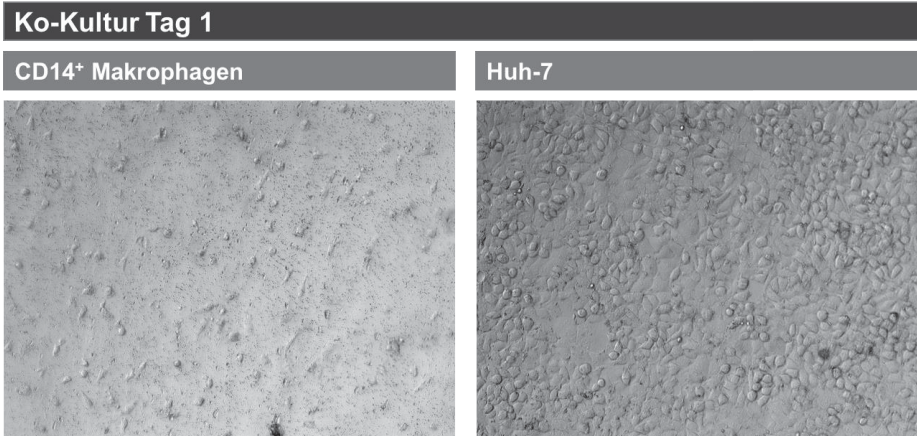
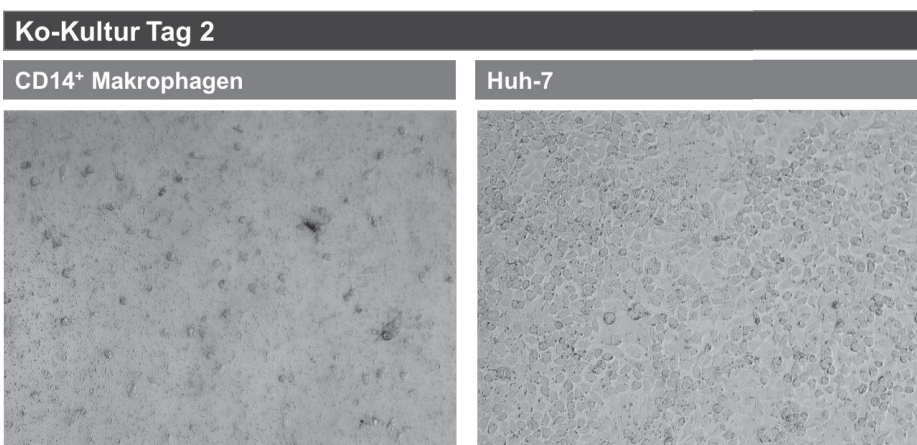


Abbildung 55: Zelldichte humaner CD14⁺ Makrophagen in Mono-Kultur. Initial wurden PBMCs aus humanen Buffy Coats, welche aus peripherem Vollblut gesunder, männlicher Blutspender gewonnen wurden, extrahiert. Humane Monozyten wurden im Anschluss mittels MACS und mit Hilfe spezifischer CD14 MicroBeads magnetisch markiert und von den anderen mononukleären Zellen separiert. Die Induktion der Ausdifferenzierung zu CD14⁺ Makrophagen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 40 ng/ml humanem M-CSF für sieben Tage. Die Mono-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen erfolgte im Transwellssystem mit Ko-Kulturmedium für drei Tage (vgl. Abbildung 54C). Konfokale Lebend-Zell-Observation humaner CD14⁺ Makrophagen in Mono-Kultur am **A** Tag 1, **B** Tag 2 und **C** Tag 3. Die Bildaufnahmen erfolgten durch lichtmikroskopische Aufnahme mit dem Cell Observer (Vergrößerung 250-fach) und zugehöriger AxioVision Software (Version 4.8).

A



B



C

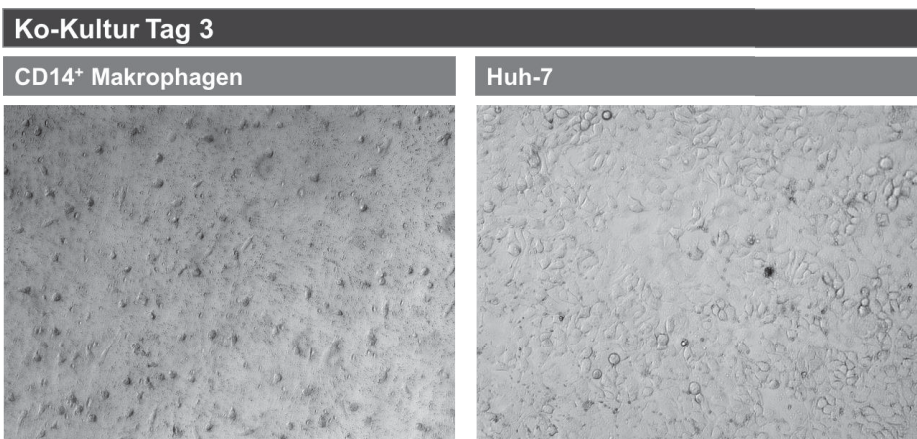
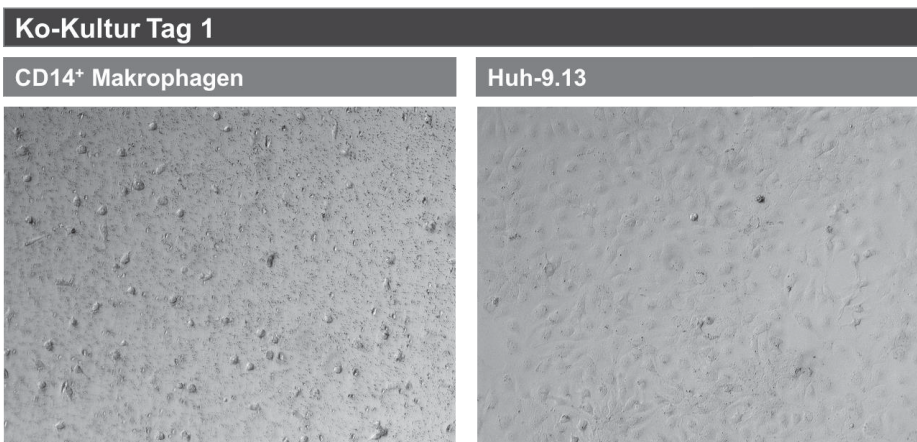


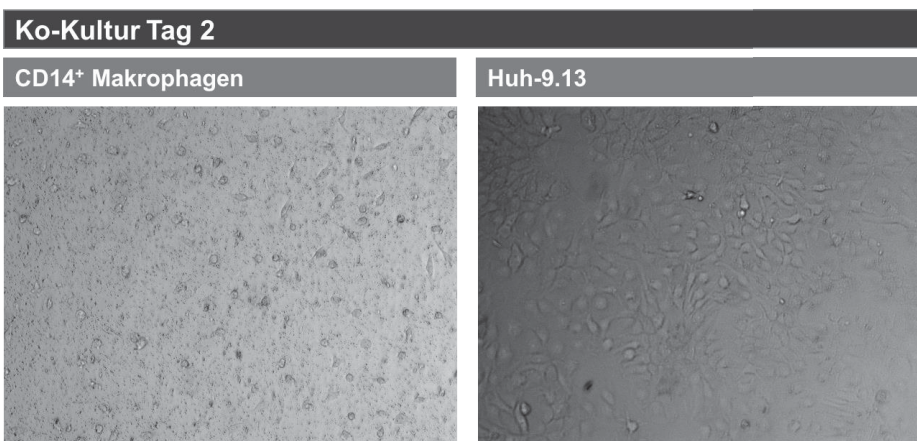
Abbildung 56: Zelldichte humaner CD14⁺ Makrophagen und humaner Huh-7 Hepatomazellen in Ko-Kultur. Initial wurden PBMCs aus humanen Buffy Coats, welche aus peripherem Vollblut gesunder, männlicher Blutspender gewonnen wurden, extrahiert. Humane Monozyten wurden im Anschluss mittels MACS und mit Hilfe spezifischer CD14 MicroBeads magnetisch markiert und von den anderen mononukleären Zellen separiert. Die Induktion der Ausdifferenzierung zu CD14⁺ Makrophagen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 40 ng/ml humanem M-CSF für sieben Tage. Ko-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen und humaner Huh-7 Hepatomazellen erfolgte im Transwellsystem für drei Tage (vgl. Abbildung 54A und B). Konfokale Lebend-Zell-Observation humaner CD14⁺ Makrophagen bzw. humaner Huh-7 Hepatomazellen in Ko-Kultur am **A** Tag 1, **B** Tag 2 und **C**

Tag 3. Die Bildaufnahmen erfolgten durch lichtmikroskopische Aufnahme mit dem Cell Observer (Vergrößerung 250-fach) und zugehöriger AxioVision Software (Version 4.8).

A



B



C

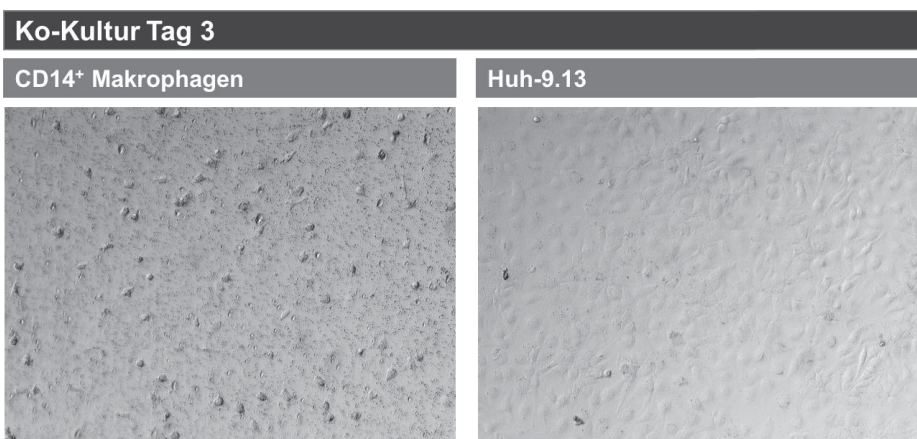


Abbildung 57: Zelldichte humaner CD14⁺ Makrophagen und humaner Huh-9.13 Hepatomazellen in Ko-Kultur. Initial wurden PBMCs aus humanen Buffy Coats, welche aus peripherem Vollblut gesunder, männlicher Blutspender gewonnen wurden, extrahiert. Humane Monozyten wurden im Anschluss mittels MACS und mit Hilfe spezifischer CD14 MicroBeads magnetisch markiert und von den anderen mononukleären Zellen separiert. Die Induktion der Ausdifferenzierung zu CD14⁺ Makrophagen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 40 ng/ml humanem M-CSF für sieben Tage. Ko-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen und humaner Huh-9.13

Hepatomazellen erfolgte im Transwellsystem für drei Tage (vgl. Abbildung 54A und B). Konfokale Lebend-Zell-Observation humaner CD14⁺ Makrophagen bzw. humaner Huh-9.13 Hepatomazellen in Ko-Kultur am **A** Tag 1, **B** Tag 2 und **C** Tag 3. Die Bildaufnahmen erfolgten durch lichtmikroskopische Aufnahme mit dem Cell Observer (Vergrößerung 250-fach) und zugehöriger AxioVision Software (Version 4.8).

Nach der erfolgreichen Etablierung des Ko-Kultur-Modells sollte im Anschluss die Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche der mit Hepatomazellen ko-kultivierten Makrophagen bzw. zur Kontrolle auf mono-kultivierten Makrophagen untersucht werden.

Hierzu wurden Huh-7 und Huh-9.13 Zellen am Tag 2 der Ko-Kultur mit 40 ng/ml EGF, mit 10 ng/ml rekombinantem CXCL8 oder 10 ng/ml rekombinantem IL-10 stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden mono- bzw. mit Hepatomazellen ko-kultivierte Makrophagen durch die spezifische Färbung mit FITC-konjugierten Antikörpern hinsichtlich der Oberflächenexpression von CCR5 und mittels PE-konjugierter Antikörper auf die Oberflächenexpression von CXCR4 zytometrisch analysiert. Zur Reinheitsanalyse der Makrophagen erfolgte die Analyse der Oberflächenexpression von CD11c, CD14 und CD163 durch die spezifische Färbung mit PE-konjugierten Antikörpern mittels Durchflusszytometrie, welche charakteristische Oberflächenmarker für humane Makrophagen darstellen (Abbildung 58).

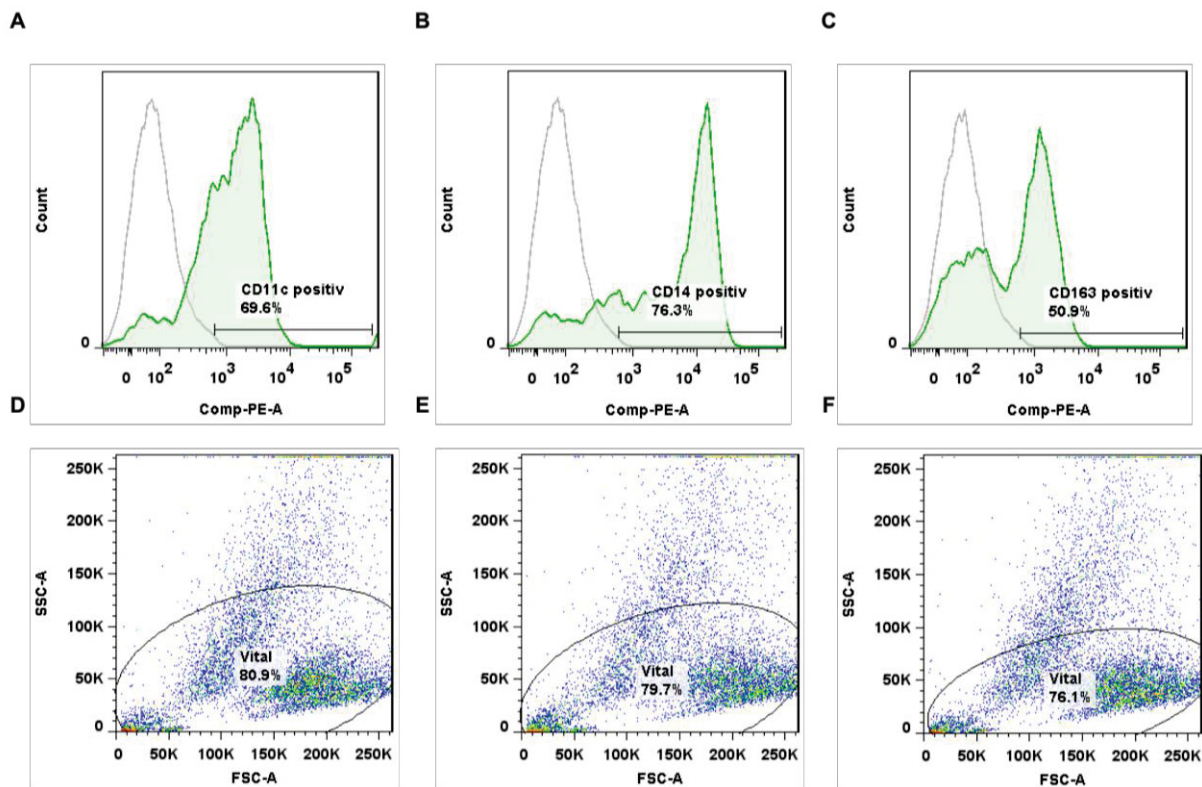


Abbildung 58: Oberflächenexpression von CD11c, CD14 und CD163 auf CD14⁺ Makrophagen in Mono-Kultur. Extraktion peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum.^{413,414} Als Ausgangsmaterial dienten Buffy Coats, die aus peripherem Vollblut gesunder männlicher Blutspender gewonnen wurden. Mittels einer Ficoll-Separationslösung erfolgte die Fraktionierung der zellulären Blutbestandteile entsprechend ihrer Zellgrößen und Zelldichten. Monozyten wurden aus den PBMCs durch positive Zellseparation mittels MACS mit Hilfe spezifischer CD14 MicroBeads isoliert.^{419,420} Die Induktion der Ausdifferenzierung zu CD14⁺ Makrophagen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 40 ng/ml M-CSF für sieben Tage. Mono-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen im Transwellsystem für weitere drei Tage (vgl. Abbildung 54). Die zytometrische Analyse der Oberflächenexpression von **A** CD11c, **B** CD14 und **C** CD163 auf humanen CD14⁺ Makrophagen mittels PE-konjugierter Antikörper. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mittels FlowJo Software gegen die entsprechende Isotypenkontrolle. Grau: Histogramm der PE-Kontrollanalyse, Grün: Histogramm der **A** CD11c-Analyse, **B** CD14-Analyse und **C** CD163-Analyse. **D**, **E** und **F** Einstellung des *forward* und *side scatter* entsprechend der Größe und Granularität der Monozyten.

Wie aus der Abbildung 59 und Abbildung 61A hervorgeht, resultierte die Ko-Kultivierung von CD14⁺ Makrophagen mit Huh-7 Hepatomazellen in einer Heraufregulation der Rezeptorexpression von CCR5 und analog auch von CXCR4 (Abbildung 60 und Abbildung 61B) auf der Oberfläche der CD14⁺ Makrophagen im Vergleich zu mono-kultivierten Makrophagen. Diese verstärkte Expression des CCR5-Rezeptors (Abbildung 59 und Abbildung 61A) sowie homolog des CXCR4-Rezeptors (Abbildung 60 und Abbildung 61B) auf der Zelloberfläche der Makrophagen wurde hingegen in der Anwesenheit des HCV-Replikons verhindert, sofern diese zu vorher mit den HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Zellen ko-

kultiviert wurden. Die Stimulation der Huh-7 oder Huh-9.13 Zellen am Tag 2 der Ko-Kultur führte weder mit EGF noch mit CXCL8 oder IL-10 zu weiteren Differenzen in der Expressionsdichte von CCR5 oder CXCR4 auf den ko-kultivierten Makrophagen. Die Ko-Kultivierung der CD14⁺ Makrophagen mit Huh-7 als auch mit Huh-9.13 Zellen führte verglichen zu mono-kultivierten CD14⁺ Makrophagen zu einer Zunahme der Rezeptorexpression von CCR5 und auch von CXCR4, die ebenfalls unabhängig von jedweden Stimulanzien war (Abbildung 59 bis Abbildung 61).

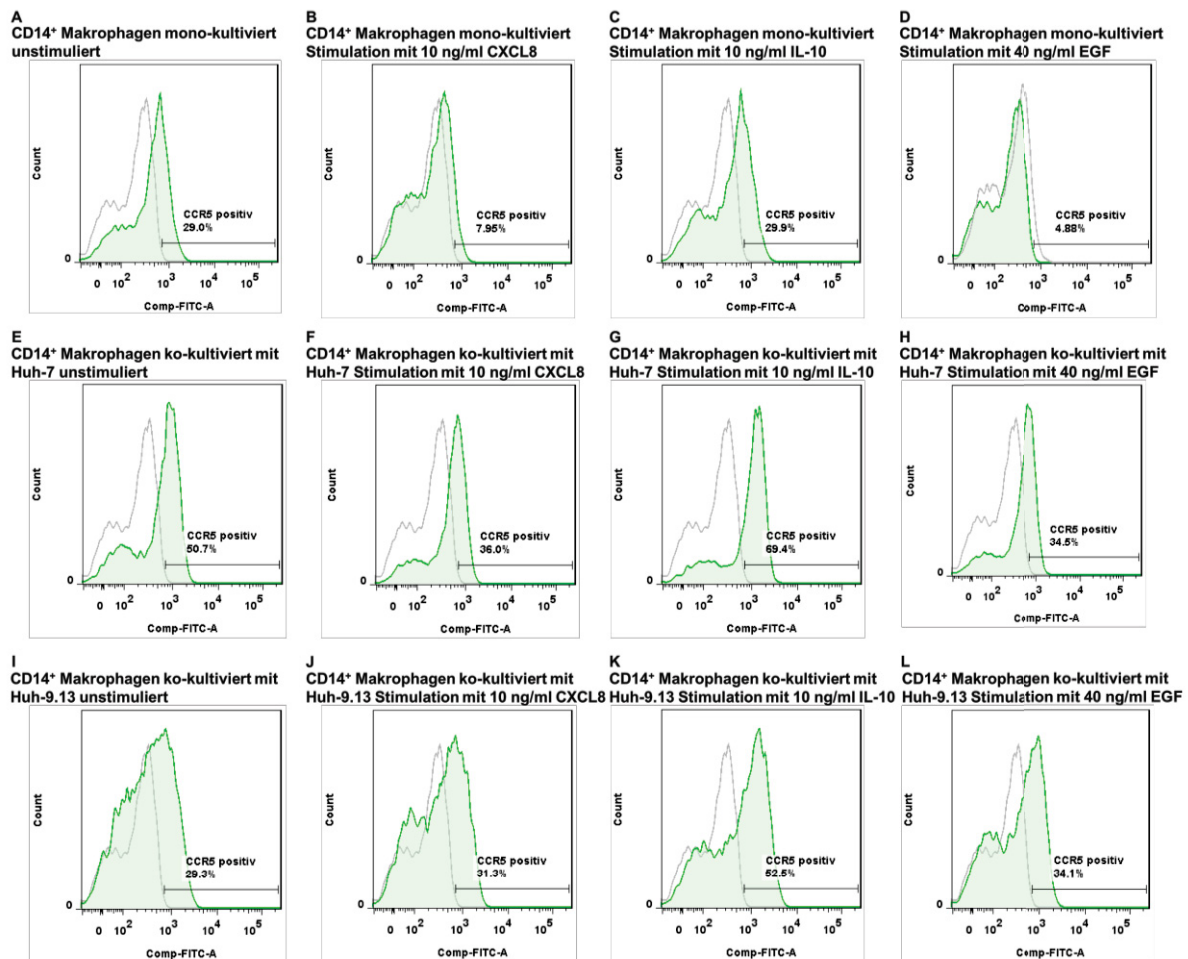


Abbildung 59: Oberflächenexpression von CCR5 auf mono-kultivierten und ko-kultivierten Makrophagen.

Initial wurden PBMCs aus humanen Buffy Coats, welche aus peripherem Vollblut gesunder, männlicher Blutspender gewonnen wurden, extrahiert. Humane Monozyten wurden im Anschluss mittels MACS und mit Hilfe spezifischer CD14 MicroBeads magnetisch markiert und von den anderen mononukleären Zellen isoliert. Die Induktion der Ausdifferenzierung zu CD14⁺ Makrophagen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 40 ng/ml humanem M-CSF für sieben Tage. **A bis D** Mono-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen im Transwellssystem für weitere drei Tage (vgl. Abbildung 54). **E bis H** Ko-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen und humaner Huh-7 Hepatomazellen im Transwellssystem für weitere drei Tage (vgl. Abbildung 54). **I bis L** Ko-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen und humaner Huh-9.13 Hepatomazellen im Transwellssystem für weitere drei Tage (vgl. Abbildung 54). Stimulation am Tag 2 der Mono-Kultur mit den angegebenen Stimuli für jeweils 24 Stunden. Die

zytometrische Analyse der Oberflächenexpression von CCR5 auf humanen CD14⁺ Makrophagen mittels FITC-konjugierter Antikörper. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mittels FlowJo Software gegen die entsprechende Isotypenkontrolle. Grau: Histogramm der FITC-Kontrollanalyse, Grün: Histogramm der CCR5-Analyse.

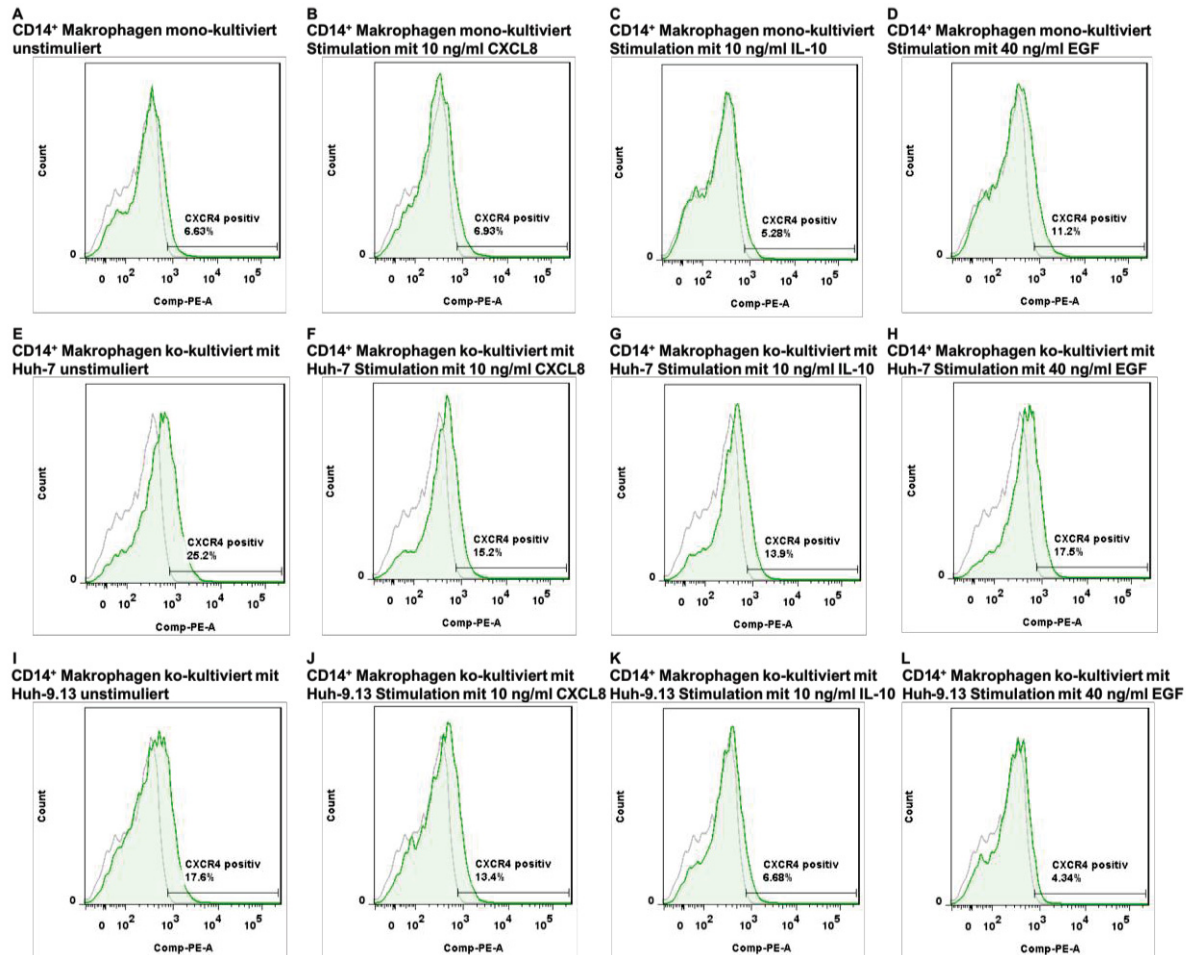


Abbildung 60: Oberflächenexpression von CXCR4 auf mono- und ko-kultivierten Makrophagen.

Initial wurden PBMCs aus humanen Buffy Coats, welche aus peripherem Vollblut gesunder, männlicher Blutspender gewonnen wurden, extrahiert. Humane Monozyten wurden im Anschluss mittels MACS und mit Hilfe spezifischer CD14 MicroBeads magnetisch markiert und von den anderen mononukleären Zellen separiert. Die Induktion der Ausdifferenzierung zu CD14⁺ Makrophagen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 40 ng/ml humanem M-CSF für sieben Tage. **A bis D** Mono-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen im Transwellsystem für weitere drei Tage (vgl. Abbildung 54). **E bis H** Ko-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen und humaner Huh-7 Hepatomazellen im Transwellsystem für weitere drei Tage (vgl. Abbildung 54). **I bis L** Ko-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen und humaner Huh-9.13 Hepatomazellen im Transwellsystem für weitere drei Tage (vgl. Abbildung 54). Stimulation am Tag 2 der Mono-Kultur bzw. Ko-Kultur mit den angegebenen Stimuli für jeweils 24 Stunden. Die zytometrische Analyse der Oberflächenexpression von CXCR4 auf humanen CD14⁺ Makrophagen mittels PE-konjugierter Antikörper. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mittels FlowJo Software gegen die entsprechende Isotypenkontrolle. Grau: Histogramm der FITC-Kontrollanalyse, Grün: Histogramm der CXCR4-Analyse.

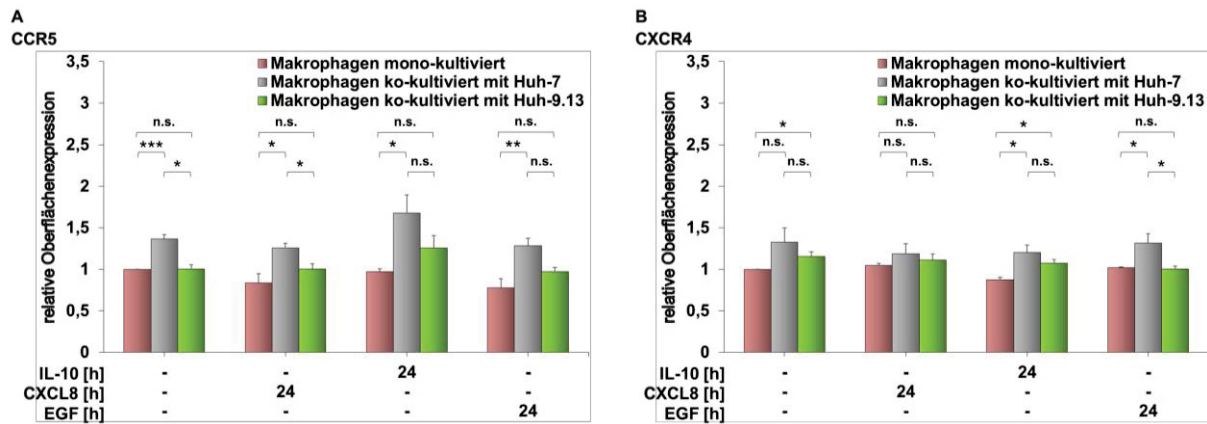


Abbildung 61: Das HCV-Replikon verhindert die verstärkte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf ko-kultivierten CD14⁺ Makrophagen. Huh-9.13 Zellen enthalten das subgenomische HCV-Replikon. Huh-7 Zellen dienten der Kontrolle. Initial wurden PBMCs aus humanen Buffy Coats, welche aus peripherem Vollblut gesunder, männlicher Blutspender gewonnen wurden, extrahiert. Humane Monozyten wurden im Anschluss mittels MACS und mit Hilfe spezifischer CD14 MicroBeads magnetisch markiert und von den anderen mononukleären Zellen separiert. Die Induktion der Ausdifferenzierung zu CD14⁺ Makrophagen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 40 ng/ml humanem M-CSF für sieben Tage. Die Mono-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen bzw. die Ko-Kultur humaner CD14⁺ Makrophagen mit Huh-7 bzw. Huh-9.13 Hepatomazellen erfolgte im Transwellsystem für weitere drei Tage (vgl. Abbildung 54). Am Tag 2 erfolgte die Stimulation der CD14⁺ Makrophagen der Mono-Kultur bzw. der Huh-7 oder Huh-9.13 Hepatomazellen der Ko-Kultur mit 40 ng/ml EGF, 10 ng/ml CXCL8 oder 10 ng/ml IL-10 für 24 Stunden. Die zytometrische Analyse der Oberflächenexpression von **A** CCR5 auf humanen CD14⁺ Makrophagen mittels FITC-konjugierter Antikörper oder von **B** CXCR4 mittels PE-konjugierter Antikörper. Die quantitative Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mittels FlowJo Software gegen die entsprechende Isotypenkontrolle über die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten (geometrischer Mean). Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten, mono-kultivierten Makrophagen Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni Post Hoc t-Test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; n. s. = nicht signifikant) erstellt, wobei die Ergebnisse aus jeweils vier unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Die Befunde lassen zusammenfassend vermuten, dass das Hepatitis C Virus Replikon indirekt durch die Sekretion spezifischer im Medium löslicher Mediatoren die verstärkte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der Zelloberfläche humaner ko-kultivierter Makrophagen inhibiert. Welche Mediatoren genau für die reduzierte Expression der Chemokinrezeptoren verantwortlich sind gilt es in weiterführenden Studien abzuklären. Die Befunde legen nahe, dass die HCV-induzierte Sekretion der CXCR2-Liganden keinen oder nur einen partiellen Einfluss auf die Suppression der Rezeptoren ausübt.

4 Diskussion

4.1 HCV modifiziert die basale Expression von Chemokinen in seiner Wirtszelle

Hepatitis C ist eine durch das Hepatitis C Virus übertragene und zumeist chronisch verlaufende Infektionskrankheit mit aktuell 130-150 Millionen Infizierten weltweit.^{5,10-12} Jährlich sterben etwa 500.000 Menschen an den schwerwiegenden HCV-bedingten Lebererkrankungen.^{5,13,14} Zur Etablierung einer persistierenden Infektion ist die Unterbindung der antiviralen und angeborenen Immunität unabdingbar. Hierzu beeinflusst das Virus die wirtsspezifische Entzündungsantwort, greift in zelluläre Signaltransduktionskaskaden des angeborenen Immunsystems ein¹⁵⁵ und nutzt wirtsspezifische Mediatoren für seine effiziente Replikation, ohne die Vitalität seiner Wirtszelle schwerwiegend zu beeinträchtigen.^{153,156,157}

Zu den wirtsspezifischen Mediatoren, mit denen das Virus interferiert, gehören unter anderem die Chemokine.^{310,318,319} Diese chemotaktischen Zytokine sind essentielle Determinanten für die Konstitution von Immun- und Entzündungszellen der angeborenen und adaptiven Immunität.^{305,309,310} Die angeborene Immunität repräsentiert eine primäre Abwehr viraler Infektionen. Zur erfolgreichen Abwehr einer Virus-Infektion müssen die entsprechenden Immunzellen zum Ort der Infektion rekrutiert werden. Chemokine übernehmen hierbei eine wesentliche Rolle. So ist insbesondere die Interferenz des Hepatitis C Virus mit der angeborenen Immunität unerlässlich für die erfolgreiche Etablierung viraler Persistenz und die Umgehung der antiviralen Immunantwort, wobei die Wechselwirkung mit der Expression von Chemokinen oder von Chemokinrezeptoren im Vordergrund steht.^{310,318,155} Inwieweit HCV in die molekulare Regulation dieser Chemokinexpressionen eingreift und welche biologische Relevanz die Chemokinsynthese aufweist ist bislang wenig untersucht.

Vor diesem Hintergrund lag der Fokus der hier vorgelegten Arbeit auf der detaillierten Charakterisierung der Interferenz des Hepatitis C Virus mit den wirtsspezifischen Chemokinen, unter besonderer Berücksichtigung der CXCR2-Liganden CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8.

Im Rahmen der ausgeführten Untersuchungen konnte initial mittels eines *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays* belegt werden, dass HCV führend mit der Expression von CXCL1 und CXCL8 in seiner Wirtszelle interferiert. So führte die Präsenz des subgenomischen HCV-Replikons zu einer deutlich verstärkten Expression der CXC-Chemokine 1 und 8 auf Protein-Ebene. Des Weiteren konnte tendenziell eine Zunahme der Expression der CC-Chemokine 22 und 26, der CXC-Chemokine 5 und 10, des Neurotaktins sowie des Midkins beobachtet werden. Zugleich hatte die Anwesenheit des HCV-Replikationskomplexes tendenziell eine

Herabregulation der basalen Expression von CCL20 und CXCL16 zur Folge (Abbildung 21). Eine eindeutige HCV-bedingte Regulation der zuletzt genannten Chemokine konnte somit nicht festgestellt werden und bedarf weiterer Untersuchungen, die jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit waren. In Übereinstimmung mit der Literatur induziert HCV jedoch die gesteigerte Expression von CCL22, CXCL5 sowie von Midkin, als auch von CXCL10 und von Neurotactin (Abbildung 21).^{155,466,467} Abweichend von Literaturbefunden konnte in dieser Arbeit in der Gegenwart des HCV-Replikons eine tendenzielle Herabregulation der Protein-Expression von CCL20 und CXCL16 beobachtet werden (Abbildung 21).^{468,469}

4.2 HCV verstärkt die basale Expression der CXCR2-Liganden

Initiale Hinweise, dass das Hepatitis C Virus führend mit den CXCR2-Liganden in seiner Wirtszelle interferiert, konnten aus den Ergebnissen des *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays* geschlossen werden (Abbildung 21). Ebenso wiesen unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe auf die HCV-bedingte Deregulation der Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL8 hin (Triller und Bode), welche in dieser Arbeit noch einmal verifiziert werden konnte (Abbildung 23). Aufgrund dessen wurde in den weiterführenden Untersuchungen der Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Expression der chemotaktischen CXCR2-Liganden fokussiert, zu denen sowohl CXCL1, CXCL2, CXCL3 als auch CXCL8 gehören.^{312,313} Auffällig ist hierbei, dass diese wirtsspezifischen Mediatoren aufgrund ihrer definierten Anzahl und Lokalisation ihrer Cysteine und einem homologen ELR-Motiv aus der präferenziellen Aminosäureabfolge Glutamin, Leucin und Arginin,^{311,312} in dieselbe Unterfamilie der CXC-Motiv-Chemokine eingeordnet werden.³⁰⁶ Des Weiteren vermitteln sie ihre Funktionen, zu denen die Induktion der Zellproliferation und der Angiogenese sowie führend die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten gehören, durch die Bindung und die Aktivierung desselben spezifischen CXC-Rezeptors 2.^{312,307,315,317}

Im Rahmen der ausgeführten Untersuchungen konnte erstmalig die Annahme belegt werden, dass das Hepatitis C Virus einen tiefgreifenden Einfluss auf die Induktion und Regulation der CXCR2-Liganden ausübt, die unter physiologischen Konditionen lediglich in geringen Konzentrationen in der Leber sekretiert werden.^{305,325} So hatte die Präsenz des subgenomischen HCV-Replikons in den humanen Hepatomazellen der Linien Huh-9.13 (Abbildung 23A) und Huh-5.15 (Abbildung 23B) sowie die Infektion der Huh-7.5 Hepatomazellen mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 (Abbildung 23C) eine deutlich verstärkte Expression dieser Chemokine auf mRNA-Ebene zur Folge. Die verstärkte Expression von CXCL1 ließ sich zugleich auf der Ebene des Proteins in der Gegenwart des Replikationskomplexes des Hepatitis C Virus in Huh-

9.13 Zellen belegen (Abbildung 21). Des Weiteren konnte eine deutliche Steigerung der Protein-Expression von CXCL8 in den humanen Huh-9.13 (Abbildung 22A) und in Huh-5.15 Hepatomazellen (Abbildung 22B) und erstmals in mit dem HCV-Stamms JC1 infizierten Huh-7.5 Hepatomazellen (Abbildung 22C) nachgewiesen werden. Diese verstärkte Expression des CXCL8-Chemokins fand sich zugleich *in vivo* in Seren von HCV-infizierten Patienten wieder (Abbildung 22D), was die physiologische Relevanz der *in vitro* Daten unterstreicht.

Aus Patientenstudien der Literatur gehen übereinstimmend erhöhte Konzentrationen von CXCL1 bis CXCL3 und CXCL8 im Plasma HCV-infizierter Patienten vom Genotyp 1 hervor, welche aufgrund von rekrutierten Immunzellen in die Leber mit der Fibroseprogression während einer HCV-Infektion assoziiert werden.³¹⁹ Die Behandlung mit pegyliertem IFN- α und Ribavirin in Kombination führte zur Herabregulation dieser erhöhten Plasmakonzentrationen und weist damit auf die Bedeutung von diesen zellulären Mediatoren als potentielle therapeutische Targets hin.³¹⁹ Des Weiteren wird die HCV-vermittelte Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Nukleus mit der Induktion der Überexpression von MCP-1 und CXCL2 in infizierten primären Hepatozyten assoziiert.³²¹ Im Rahmen einer HCV-Infektion konnte außerdem, analog zu den Befunden dieser Arbeit, eine verstärkte HCV-induzierte CXCL8-Expression belegt werden (Abbildung 23).³³¹ So ist bekannt, dass das virale Nicht-Strukturprotein NS5A die Expression von CXCL8 sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch auf Protein-Ebene in NS5A-exprimierenden HeLa Zellen verstärkt.³³¹ Die Expression von CXCL8 wird dabei in Zusammenhang mit der NS5A-induzierten partiellen Inhibition der Interferon- α -induzierten antiviralen Immunantwort gebracht.^{331,332,457} Mutagenesestudien im CXCL8-Promotor legen weiterhin nahe, dass NS5A in die transkriptionelle Aktivierung des CXCL8-Promotors involviert ist.^{331,332} Ebenso steht die Stabilisierung der mRNA von CXCL8 im Kontext mit einer HCV-Infektion.^{331,332} Die verstärkte Expression von CXCL8 wird jedoch nicht nur im Rahmen einer HCV-Infektion beobachtet, sondern geht zugleich mit zahlreichen Virus-Infektionen, darunter Infektionen mit dem Respiratorischen Synzytial Virus (RS-Virus) und dem Cytomegalovirus (CMV) einher, was die erbrachten Befunde dieser Arbeit stützt.^{329,470} Eine verstärkte HCV-bedingte Expression von CXCL1 wird übereinstimmend mit den Resultaten der hier vorgelegten Arbeit (Abbildung 23) auch in hepatozellulären Karzinomen (HCC) beobachtet. Durch die Interaktion von CXCL1 mit dem CXCR2 wird folglich die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in hepatozelluläre Karzinome reguliert und stellt ein potentielles Angriffsziel für die HCC-Therapie dar.³²⁴

Zusammenfassend konnte in der hier vorgelegten Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, dass das Hepatitis C Virus eindeutig in die molekulare Regulation der Überexpression von CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL8 eingreift (Abbildung 23).

4.3 HCV konvertiert EGF und IL-1 β in potente Induktoren der CXCR2-Liganden-Expression

Weiterführend ließ sich eine Steigerung der bereits basal durch HCV-induzierten Überexpression der CXCR2-Liganden in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor in der Anwesenheit des HCV-Replikons (Abbildung 26) als auch in der Gegenwart des HCV-Stamms JC1 (Abbildung 27) auf Transkript-Ebene und für CXCL1 (Abbildung 25) und CXCL8 (Abbildung 27 und Abbildung 28) zugleich auf Protein-Ebene belegen. Spezifisch für die basale und EGF-induzierte CXCL8-Expression konnte die Beteiligung des viralen Nicht-Strukturproteins NS3/4A nachgewiesen werden (Abbildung 30), wenngleich auch aus der Literatur eine Involvierung weiterer HCV-Proteine, darunter das Strukturprotein Core sowie die viralen Nicht-Strukturproteine NS4B und NS5A, hervorgeht.^{155,331,332} So belegen die Befunde dieser Arbeit, dass die alleinige Präsenz von NS3/4A für die verstärkte Expression von CXCL8 zwar ausreicht, die Beteiligung weiterer viraler Proteine an dieser Überexpression des Chemokins dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Zur Aufklärung einer Beteiligung weiterer viraler Proteine sind weitere Studien erforderlich.

Die Expression der CXCR2-Liganden konnte nicht nur in Antwort auf EGF, sondern auch in Antwort auf das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β deutlich heraufreguliert werden (Abbildung 29). Bereits aus der Literatur ist bekannt, dass die Sekretion von CXCL8 führend von Kupffer-Zellen, Hepatozyten und LSECs durch unterschiedliche Stimuli induziert wird.¹⁵⁵ Hierzu zählen insbesondere pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- α oder IL-1,^{326,332} aber auch oxidativer Stress,³²⁷ sowie bakterielle³²⁸ und virale Infektionen³²⁹ führen zu einem Anstieg der CXCL8-Expression, während es in gesundem Gewebe lediglich in geringen Mengen detektierbar ist.³²⁵ Eine verstärkte HCV-induzierte Überexpression von CXCL8 in Antwort auf TNF- α kann aus Literaturbefunden entnommen werden und passt zu den Resultate dieser Arbeit.³³² Des Weiteren induzieren HCV-infizierte Hepatozyten die Expression von CXCL8 in Antwort auf IL-1 α , welches von entsprechend ko-kultivierten hepatischen Sternzellen sekretiert wird.³³³ So führte die Ko-Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 β und EGF in den ausgeführten Untersuchungen dieser Arbeit nochmals zu einer weiteren Verstärkung der überexprimierten Chemokinsynthese (Abbildung 29D).

Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass das Hepatitis C Virus IL-1 β und insbesondere den epidermalen Wachstumsfaktor in einen potenten Induktor der CXCR2-Liganden-Expression konvertiert und diese Überexpression der Chemokine zugleich durch entsprechend nachgeschaltete EGFR/EGF-induzierte Signalwege durch eine Sensibilisierung des EGFR reguliert (Abbildung 31).

Funktional lässt dies eine erste Vermutung zu, dass die Expression der CXCR2-Liganden durch das Hepatitis C Virus hinsichtlich pro-regenerativer und proliferationsfördernder Mechanismen moduliert wird. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass EGF als extrazellulärer Ligand des EGFR ein essentieller Regulator und Induktor von Zellmigration, Zelldifferenzierung, Zellproliferation sowie überlebenssignalisierender Wirkungen, vermittelt durch EGFR-induzierte zelluläre Signaltransduktionskaskaden, ist^{233,234} und des Weiteren im Rahmen der Leberregeneration als mitogener Stimulator die DNA-Synthese in Hepatozyten induziert.⁴⁷¹ Vorausgegangene Befunde der Arbeitsgruppe belegen weiterhin Interferenzen des Hepatitis C Virus mit dem epidermalen Wachstumsfaktor.¹⁵⁶ So wurde eine Steigerung der Replikation des viralen Genoms in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor sowie eine HCV-vermittelte Sensibilisierung der Wirtszelle für die EGF-induzierte Signalantwort beobachtet.^{156,401} Zudem assoziieren unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe (Knievel und Bode *et al.*) die Induktion der verstärkten CXCR2-Liganden-Synthese mit leberregenerations-relevanten Faktoren wie HGF und TNF- α .⁴⁷² Auch die physiologische Funktion der CXC-Chemokine untermauern diese These bezüglich proliferationsfördernder und chemotaktisch-induzierender Effekte.^{312,307,315,317}

Neben der EGF-vermittelten Überexpression der CXCR2-Liganden, getriggert durch das HCV-Replikon, erbrachten die weiterführenden Untersuchungen zudem Hinweise einer tendenziell durch EGF-vermittelten Zunahme der Expression der CC-Motiv-Chemokine 7 und 20, des CXC-Motiv-Chemokins 5 und des Midkins und zugleich von einer tendenziellen EGF-bedingten Herabregulation der CC-Chemokine 17 und 22, der CXC-Chemokine 10, 12 und 16 sowie des Neurotaktins (Abbildung 24). Wie genau das Hepatitis C Virus in die Regulation dieser EGF-überexprimierten Chemokine eingreift und welche funktionelle Relevanz dieser Genexpressionen zu Grunde liegt war nicht Gegenstand dieser Arbeit und gilt es weiter zu untersuchen.

4.4 HCV induziert die CXCR2-Liganden-Expression durch eine konstitutive EGF-Expression in seiner Wirtszelle

Wie aus den bisherigen Ergebnissen anzunehmen ist, konvertiert das Hepatitis C Virus den epidermalen Wachstumsfaktor in einen potenten Induktor der CXCR2-Liganden-Expression (Abbildung 26 und Abbildung 27). Es ist bekannt, dass das Hepatitis C Virus die Signalvermittlung des epidermalen Wachstumsfaktors durch die verstärkte Aktivierung zellulärer Komponenten des EGFR-induzierten Signalweges manipuliert und zur Steigerung der Replikation des viralen Genoms nutzt.^{156,401} So bedingt es beispielsweise eine verstärkte Aktivierung des EGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signalwege in Abhängigkeit von externem EGF, welches unter anderem die konstitutive Akt-Phosphorylierung zur Folge hat. Diese wird wiederum mit der Persistenz der viralen Replikation assoziiert.^{156,401} Die Steigerung der viralen Replikation durch den präsenten HCV-Replikationskomplex in Hepatomazellen der Linie Huh-9.13 als Reaktion auf EGF konnte initial auf Ebene der Transkription verifiziert werden (Abbildung 42A). In diesem Kontext führte ebenso die Infektion humaner Huh-7.5 Hepatomazellen mit einer MOI des HCV-Stamms JC1 vom Genotyp 2a und die nachfolgende Behandlung der Zellen mit EGF zu einer deutlichen Zunahme der Expression des viralen Nicht-Strukturproteins NS3 auf transkriptioneller Ebene (Abbildung 42B). Dadurch konnte erstmals die EGF-bedingte Steigerung der viralen Replikation im HCV Infektionssystem belegt werden.

Im Anschluss galt es zum einen zu validieren, ob das Hepatitis C Virus die basale Expression von EGF eigenständig in seiner Wirtszelle induziert und zum anderen den Zusammenhang der HCV-induzierten und durch EGF gesteigerten CXCR2-Liganden-Expression genauer zu charakterisieren. Dementsprechend konnte erstmals in dieser Arbeit eine deutliche Steigerung der basalen EGF-Transkriptmenge in der Anwesenheit des HCV-Replikons in humanen Huh-9.13 Zellen (Abbildung 43A) sowie in Huh-5.15 Zellen (Abbildung 43B) und ebenso in mit dem HCV-Stamm JC1 infizierten Huh-7.5 Hepatomazellen (Abbildung 43C) nachgewiesen werden. Zugleich wurde eine deutliche Zunahme des sekretierten EGF in Zellkulturüberständen der Replikon-enthaltenden Huh-9.13 (Abbildung 44A) bzw. Huh-5.15 Zellen (Abbildung 44A) und ebenso in Zellkulturüberständen der HCV JC1-infizierten Huh-7.5 Hepatomazellen (Abbildung 44C) belegt. In Seren von HCV-infizierten Patienten konnte *in vivo* ebenfalls eine deutlich erhöhte Proteinkonzentration von EGF festgestellt werden (Abbildung 44D), was die physiologische Relevanz der *in vitro* Zellkulturdaten untermauert.

Die Befunde lassen darauf schließen, dass HCV in seiner Wirtszelle konstitutiv die EGF-Expression induziert. Diese Vermutung ließ sich durch die weiterführenden Studien der hier

vorgelegten Dissertation bestätigen, da die HCV-bedingte Induktion der basalen EGF-Expression durch die 2-C'-Methylcytidin-vermittelte Hemmung der viralen Replikation (Abbildung 45B) fast vollständig aufgehoben werden konnte (Abbildung 45A). Zudem erbrachten die ausgeführten Untersuchungen in DMSO-differenzierten und mit dem HCV-Stamm JC1-chronisch-infizierten Huh-7.5 Hepatomazellen den gleichen Schluss, einer deutlichen Steigerung der transkriptionellen Expression von EGF (Abbildung 46A). Aufgrund der leberregenerativen Eigenschaften von EGF⁴⁷¹ konnten durch diese Daten weitere Hinweise bezüglich der pro-regenerativen Eigenschaften der durch HCV-induzierten und durch EGF-vermittelten Überexpression der CXCR2-Liganden gesammelt werden.

4.5 HCV reguliert die Induktion der CXCR2-Liganden-Expression durch einen autokrinen und parakrinen positiven EGF *feedback loop*

Im Hinblick auf die bisher erbrachten Befunde entstand folglich die Hypothese eines HCV-vermittelten positiven auto- und parakrinen EGF *feedback loops* im Zusammenhang mit der konstitutiv-induzierten EGF-Expression durch das Virus und der Regulation der durch EGF gesteigerten CXCR2-Liganden-Expression.

Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde der Einfluss der posttranskriptionellen Inhibition von EGF auf die mRNA-Expression der Chemokine eruiert. So konnte eine deutliche Reduktion der durch HCV basal gesteigerten CXCR2-Liganden-Expression belegt werden (Abbildung 47). In Anbetracht dessen ist anzunehmen, dass das Hepatitis C Virus eigenständig die Expression der CXCR2-Liganden durch eine konstitutive EGF-Expression in seiner Wirtszelle induziert und durch einen autokrinen und parakrinen positiven EGF *feedback loop* zugleich reguliert. So wird der epidermale Wachstumsfaktor in einen potenten Induktor der CXCR2-Liganden HCV-bedingt konvertiert, um die Produktion der Chemokine in seiner Wirtszelle weiter zu steigern.

In der Folge der durchgeführten Untersuchungen wurde nun die Interferenz des Hepatitis C Virus mit der regulatorischen und funktionalen Re-Programmierung der durch den epidermalen Wachstumsfaktor induzierten Chemokin-Genexpression und die nachhaltige Beeinflussung des interzellulären Kommunikationsverhaltens der Wirtszelle im Rahmen der Entzündungsreaktion charakterisiert.

4.6 HCV sensibilisiert den EGF-Rezeptor durch eine HCV-vermittelte Suppression von TC-PTP zur Induktion und Regulation der CXCR2-Liganden-Expression

In der hier vorgelegten Arbeit galt es weiterführend den molekularen Mechanismus aufzuklären, über den das Hepatitis C Virus die basale und EGF-induzierte Überexpression der CXCR2-Liganden auf der Transkript-Ebene reguliert.

Bereits aus der Literatur wird die Interaktion des Hepatitis C Virus mit der EGF-vermittelten Aktivierung des EGFR und der entsprechend induzierten Signalkaskade ersichtlich. So spielt EGFR eine maßgebliche Rolle beim Eintritt des Virus in seine Wirtszelle sowie für die Infektion.¹³² Zudem führt das virale Nicht-Strukturprotein NS5A zur Modifikation der EGFR-induzierten Signaltransduktionskaskade.²⁸⁴ Hierzu bindet NS5A spezifisch aufgrund hoch konservierter Prolin-reicher Sequenzen an die SH3-Domäne des Adaptorproteins Grb2 und damit an den aktivierten EGFR.²⁸⁴ Diese Wechselwirkung resultiert in der Inhibierung der EGFR-induzierten Aktivierung von ERK1/2.²⁸⁴ Zusätzlich interagiert die N-terminale Domäne von NS5A mit dem Gab1 (*GRB2-associated binder 1*) Protein. Diese NS5A/Gab1-Assoziation führt indirekt durch die Wechselwirkung mit der p85-Untereinheit der PI3K zu einer verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung von p85 in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor.²⁸⁵ Dies aktiviert die *downstream* lokalisierte Kinase Akt durch verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung sowie den pro-apoptotischen Faktor BAD durch Serin-Phosphorylierung.²⁸⁵ NS5A induziert durch die Hemmung des MAPK-Signalweges und der gleichzeitig verstärkten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges die Zellproliferation und inhibiert die Apoptose, was zu einer verstärkten Persistenz sowie Pathogenese des HCV führt.²⁸⁵ Des Weiteren inhibiert NS5A die EGF-induzierte Aktivierung des Ras-ERK-Signalweges.²⁸⁶ Auch publizierte Daten der Arbeitsgruppe legen eine HCV-vermittelte Sensibilisierung der Wirtszelle für die EGF-induzierte Signalantwort nahe.^{156,401} Die Befunde belegen, dass EGF einerseits die Aktivierung der MAP-Kinasen induziert und andererseits durch die Phosphorylierung der Tyrosinreste 1068 und 1086 des EGFR den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert und durch Phosphorylierung der Tyrosinreste 992 und 1173 im zytoplasmatischen Bereich des Rezeptors zu einer verstärkten Aktivierung des PLC- γ -Signalweges führt.^{156,401} Weiterhin deuten veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe auf die verstärkte HCV-vermittelte Expression des EGF-Rezeptors auf der Oberfläche von Replikonzellen hin.^{460,461}

Außerdem greift das Hepatitis C Virus strategisch in die Aktivierung und Regulation des EGFR ein. Hierzu wird der unter physiologischen Bedingungen endogene Negativregulator des EGFR, die *T cell protein tyrosine phosphatase* (TC-PTP),^{270,271} durch die virale NS3/4A-Protease an zwei definierten Stellen proteolytisch supprimiert. Folglich resultiert die verstärkte EGF-vermittelte Aktivierung des PLC- γ - sowie des PI3K/Akt-Signalweges.^{156,401} *In vivo* konnte die NS3/4A-vermittelte Herabregulation der Protein-Expression von TC-PTP in HCV-infizierten Patienten als auch in NS3/4A-transgenen Mäusen, die intraheptisch NS3/4A exprimieren, belegt werden.^{95,41}

Vor diesem Hintergrund entstand die Überlegung, ob HCV die EGFR-bedingten Signaltransduktionskaskaden als Induktor und als Regulator für die Expression der CXCR2-Zielgene moduliert, zumal die Stimulation mit EGF zu einer deutlichen Steigerung der CXCR2-Liganden-Synthese in den HCV-infizierten Zellen führte (Abbildung 26 und Abbildung 27). Diese Vermutung ließ sich verifizieren. So hatte die Inhibierung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität sowohl basal als auch EGF-induziert in Huh-9.13 Hepatomazellen (Abbildung 31) eine Herabregulation der CXCR2-Liganden-Expression zur Folge. Ebenso resultierte die Simulation der HCV-vermittelten Degradierung der *T cell protein tyrosine phosphatase*, induziert durch einen spezifischen *knockdown* in Huh-7 Hepatomazellen, in einer verstärkten mRNA-Expression der CXCR2-Liganden, sowohl EGF-abhängig als auch EGF-unabhängig (Abbildung 32A). ELISA-Analysen ließen letztlich denselben Schluss einer verstärkten CXCL8-Expression auf Ebene des Proteins nach der posttranskriptionellen Inhibition von TC-PTP mittels siRNA zu (Abbildung 32B).

Die Sensibilisierung der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität, bedingt durch die HCV-vermittelte Reduktion von TC-PTP, vermag aus diesem Grund eine unabdingbare Voraussetzung für die HCV-induzierte und als Reaktion auf externes EGF gesteigerte CXCL8-Expression in HCV-infizierten Zellen zu sein. Zugleich liefern die Befunde erste Hinweise darauf, dass der EGFR an der Induktion der CXCL1-, CXCL2- und CXCL3-Expression beteiligt ist. So konnte einerseits der EGF-Rezeptor als Schlüsselmediator für die Induktion und Regulation der untersuchten Zielgene durch die HCV-vermittelte Suppression von TC-PTP identifiziert und andererseits die spezifische Modifizierung der EGFR/EGF-induzierten Signaltransduktion mit dem Resultat einer verstärkten Chemokinsynthese belegt werden.

4.7 Die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1 ist an der HCV-induzierten CXCL8-Expression und die Proteinkinase B (Akt) an der Expression von CXCL1 bis CXCL3 beteiligt

Die maßgebliche Involvierung des EGFR an der HCV-induzierten und durch EGF verstärkten CXCR2-Liganden-Expression führte folglich zu der Annahme, dass HCV die durch EGF-induzierten nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden zur weiteren molekularen Regulation der Chemokine moduliert. Wie bereits aus der Literatur hervorgeht, interferiert das Hepatitis C Virus mit einer Vielzahl dieser zellulären Signalkaskaden und führt im Wesentlichen zur verstärkten Aktivierung der Signalmoleküle Akt, ERK1/2, JNK, MEK1/2 und p38^{MAPK}.^{156,192,193,288,401} Des Weiteren legen Literaturbefunde nahe, dass die Expression von CXCL8 unter physiologischen Bedingungen ERK-, JNK-, und p38^{MAPK}-abhängig reguliert wird.³²⁵ Entsprechend sollte untersucht werden, ob HCV die Überexpression von CXCL8 und möglicherweise auch von CXCL1 bis CXCL3 in Abhängigkeit der genannten Signalmoleküle reguliert. Diese Annahme konnte jedoch durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren für die Signalproteine p38^{MAPK} und ERK1/2 sowie durch die posttranskriptionelle Inhibition von JNK nicht validiert werden, während hingegen die verstärkte Aktivierung von ERK1/2, JNK und p38^{MAPK} durch die Präsenz des subgenomischen HCV-Replikons und nachfolgender EGF-Stimulation verifiziert werden konnte (Daten nicht abgebildet). So deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die durch HCV-verstärkt aktivierten Signalmoleküle ERK1/2, JNK und p38^{MAPK} nicht für die HCV-bedingte Überexpression der CXCR2-Liganden von Bedeutung sind.

Die in dieser Arbeit ermittelten Befunde legen nahe, dass führend die basal durch HCV-induzierte und als Reaktion auf EGF gesteigerte Expression von CXCL8 MEK1-abhängig reguliert wird, da der Einfluss des spezifischen MEK1 Gen-*knockdowns* auf Ebene des Transkriptes eine deutliche Herabregulation der CXCL8-Überexpression zur Folge hatte (Abbildung 34D). Dieser Befund wird durch unveröffentlichte Inhibitor-Studien der Arbeitsgruppe (Triller und Bode) sowie durch die erbrachten Ergebnisse im HCV Infektionssystems gestützt. Die zugrunde liegende MEK1-abhängige Regulation des CXCL8-Chemokins konnte durch die Präsenz des HCV-Stamms JC1 durch eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression, unter dem Einfluss des nicht-kompetitiven MEK1/2-Inhibitors evaluiert werden (Abbildung 36D). Des Weiteren lassen die Resultate annehmen, dass die CXCL-Motiv-Chemokine 1 bis 3 unabhängig von MEK1, durch einen anderen EGF-induzierten Signalweg reguliert werden. So konnte durch die posttranskriptionelle Suppression von MEK1 in der Anwesenheit des HCV-Replikons keine deutliche Differenz in der mRNA-Expression

von CXCL1 (Abbildung 34A) und CXCL3 (Abbildung 34C) festgestellt werden. Währenddessen deuteten die Ergebnisse des *knockdowns* zunächst durch eine deutliche Abnahme des CXCL2-Transkriptes auf eine Beteiligung von MEK1 hin (Abbildung 34B), welche sich jedoch unter Einsatz des MEK1/2-Inhibitors in mit dem HCV-Stamm JC1-infizierten Huh-7.5 Zellen nicht widerspiegeln ließ (Abbildung 36B). Dementsprechend ist für die molekulare Regulation der CXCL2-Expression keine oder lediglich eine partielle Beteiligung von MEK1 anzunehmen. MEK1 als HCV-modulierter Signaltransduktor der CXCL1- (Abbildung 36A) sowie CXCL3-Expression (Abbildung 36C) konnte an dieser Stelle exkludiert werden.

Fortführend galt es nun zu überprüfen, ob die verstärkte Chemokinexpression, vorrangig der CXC-Chemokine 1, 2 und 3, aber auch potentiell von CXCL8 von dem durch HCV-verstärkt aktivierten Signalmolekül Akt reguliert wird. Die Interferenz des Hepatitis C Virus mit der Proteinkinase B (Akt) ist bereits aus publizierten Daten der Arbeitsgruppe zu entnehmen.^{156,401} So führte die Präsenz der viralen Nicht-Strukturproteine zu einer verstärkten basalen und ebenso EGF-induzierten Aktivierung von Akt, initiiert durch die NS3/4A-vermittelte Suppression von TC-PTP auf Protein-Ebene. Diese verstärkte Akt-Aktivierung resultierte wiederum in einer gesteigerten Zellvitalität und Apoptose-Inhibition. Weiterhin konnte die Relevanz von Akt für die virale Replikation belegt werden.^{156,401}

Im nächsten Schritt wurde die potentielle Korrelation der verstärkten HCV-bedingten Akt-Aktivierung und der Regulation der HCV-induzierten Chemokinexpression untersucht. So führte die posttranskriptionelle Inhibition von Akt zu einer deutlichen Supprimierung der basalen und EGF-induzierten Expression von CXCL1 (Abbildung 37A), CXCL2 (Abbildung 37B) und CXCL3 (Abbildung 37C), während hingegen kein Einfluss auf die CXCL8-Expression belegt werden konnte (Abbildung 37D). Die Akt-abhängige Deregulation von CXCL1 bis CXCL3 bzw. die Akt-unabhängige Regulation der CXCL8-Expression wurde durch den Einsatz des spezifischen Akt-Inhibitors verifiziert, wenngleich auch das Lösungsmittel DMSO reduzierende Wirkungen auf die Chemokinexpressionen ausübte (Daten nicht abgebildet). Die *knockdown*- und Inhibitor-Studien lassen davon ausgehen, dass Akt als ein HCV-modulierter Aktivator insbesondere in den Signalweg der HCV-bedingten CXCL1-, CXCL2- und CXCL3-Genexpression involviert ist und diese verstärkt, während Akt vermutlich keinen oder nur einen partiellen Einfluss auf die Induktion der CXCL8-Expression ausübt.

4.8 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist an der HCV-vermittelten CXCR2-Liganden-Expression beteiligt

Im Anschluss stellte sich nun die Frage, welche Transkriptionsfaktoren für die Induktion der CXCR2-Liganden-kodierenden Zielgene von Bedeutung sind und inwieweit das Hepatitis C Virus mit diesen interferiert. Erste Hinweise hierzu lieferte die Literatur. So wird unter physiologischen Bedingungen die Gen-Transkription der CXC-Chemokine 1 und 2 einerseits durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B und andererseits durch den Transkriptionsfaktor STAT1 reguliert.⁴⁶² Zugleich ist bekannt, dass NF- κ B-abhängig die transkriptionelle Aktivierung des CXCL3-Gens induziert und kontrolliert wird.⁴⁶³ Auch der CXCL8-Promotor weist dementsprechend eine regulatorische Sequenz mit spezifischen Bindungsmotiven sowohl für NF- κ B als auch für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und C/EBP auf.³²⁵

Zudem ist beschrieben, dass die Aktivierung des ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktors NF- κ B dabei durch zahlreiche Stimuli, darunter auch virale Antigene, induziert wird.³³⁵ Als Transkriptionsfaktor reguliert NF- κ B ein komplexes Repertoire an Zielgenen, darunter Chemokine und inflammatorische Zytokine. So übernimmt NF- κ B eine bedeutende Rolle in der Regulation der zellulären Proliferation und Differenzierung sowie der Inhibierung der Apoptose.³³⁵ Diese Eigenschaften manipuliert das Hepatitis C Virus strategisch zu seinen Gunsten. So wird NF- κ B beispielsweise konstitutiv aktiviert, indem das virale Nicht-Strukturprotein NS5A die Regulation im Zytoplasma lokalisierter NF- κ B-Dimere durch eine verstärkte Degradierung seines inhibitorischen Proteins I κ B α vermittelt.¹⁹⁵ Diese NS5A-abhängige Aktivierung von NF- κ B steht hierbei in enger Assoziation mit der Entstehung hepatozellulärer Karzinome durch die gesteigerte zelluläre Proliferation und Inhibierung der Apoptose.^{194,195} Auch *in vivo* konnte in NS3/4A-transgenen Mäusen eine gesteigerte Aktivierung von NF- κ B durch eine HCV-induzierte Überexpression von TNF- α und von CCL2 nachgewiesen werden. Dahingehend wird die verstärkte NF- κ B Aktivierung mit der Inhibierung der Apoptose sowie interessanterweise mit der Stimulation der Hepatozyten-Regeneration und Hepatozyten-Protektion assoziiert.¹⁵⁶ Weiterhin deuten vorausgegangene Befunde der Arbeitsgruppe bereits auf eine verstärkte HCV-abhängige Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65 in den Nukleus hin, die in nukleären Extrakten aus Lebern NS3/4A-transgener Mäuse beobachtet wurde.^{400,401}

Vor diesem Hintergrund wurde initial in der Anwesenheit des HCV-Replikationskomplexes in Huh-9.13 Hepatomazellen die Translokation der Untereinheit p65 von NF- κ B nach EGF-Stimulation in Kernextrakten mittels Immunoblot analysiert und überprüft, ob die Mitogen-

aktivierte Protein Kinase Kinase 1 oder die Proteinkinase B (Akt), die an der Regulation der HCV-bedingten Chemokin-Überexpression involviert sind, potentiell einen direkten Einfluss auf die p65-Translokation ausüben. Die Annahme, dass das Hepatitis C Virus Replikon die Translokation von p65 in den Nukleus verstärkt konnte validiert werden (Abbildung 39A und Abbildung 39B). Jedoch konnte weder ein direkter Einfluss der Inhibition von MEK1/2 (Abbildung 39A) noch von Akt (Abbildung 39B) auf die p65-Expression belegt werden. Daher ist davon auszugehen, dass die HCV-vermittelte Aktivierung und Translokation von NF- κ B durch die Beteiligung weiterer in dieser Signaltransduktionskaskade *upstream* lokalisierter Signalproteine bedingt wird oder direkt durch virale HCV-Proteine aktiviert werden kann. Dies gilt es entsprechend weiter zu untersuchen. So weisen Literaturbefunde darauf hin, dass das virale Nicht-Strukturprotein NS5A durch die Phosphorylierung der Tyrosine 42 und 305 des inhibitorischen NF- κ B-Proteins I κ B α eine verstärkte Degradierung dieses regulatorischen Proteins unter einer potentiellen Beteiligung der Calpain-Protease und eine gesteigerte Aktivierung von NF- κ B direkt induziert.¹⁹⁵

Weiterführend wurde nun analysiert ob NF- κ B HCV-bedingt die Gen-Transkription der CXCR2-Liganden-kodierenden Zielgene initiiert. So führte die posttranskriptionelle Inhibition von p65 mittels spezifischer siRNA in Huh-9.13 Hepatomazellen zu einer Herabregulation der durch HCV-induzierten und durch EGF gesteigerten Überexpression von CXCL1, CXCL2, CXCL3 und ebenso von CXCL8 (Abbildung 41). Fundierend auf diesen Resultaten ist anzunehmen, dass im Rahmen einer HCV-Infektion NF- κ B verstärkt in den Nukleus transloziert und folglich die transkriptionelle Aktivierung der CXCR2-Liganden-Gene NF- κ B-abhängig induziert wird. Eine weitere Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren an der HCV-induzierten Chemokinsynthese ist durchaus möglich. Durch den Einsatz des selektiven JAK1-Inhibitors, Filgotinib, konnte jedoch kein inhibitorischer Effekt auf die Genexpression der Chemokine festgestellt werden, sodass STAT1 für die Initiation der CXCR2-Liganden-kodierenden Zielgene an dieser Stelle ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht abgebildet).

Die verstärkte HCV-bedingte Translokation von NF- κ B in den Nukleus sowie die Beteiligung von NF- κ B an der Induktion der transkriptionellen Aktivierung der Chemokin-Transkription stützt die Vermutung, dass HCV die Überexpression der Chemokine unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B moduliert, um auf diese Weise die Protektion und Regeneration in den Hepatozyten zu induzieren.^{400,472}

Analoge Arbeiten der Literatur untermauern die Beteiligung von NF- κ B als Transkriptionsfaktor an der HCV-bedingten Genexpression von CXCL2⁴⁶⁴ und CXCL8.^{155,464} Dementsprechend konnte in primären HCV-infizierten Hepatozyten (*Tupaia belangeri chinensis*) eine verstärkte Aktivierung und Translokation von NF- κ B in den Nukleus und die folgende Induktion der Genexpression von MCP-1 und CXCL2 belegt werden.³²¹ In Übereinstimmung mit der Literatur wird auch die Expression von CXCL8 im Rahmen einer HCV-Infektion transkriptionell durch NF- κ B reguliert.^{331,464} Bezüglich dieser NF- κ B-abhängigen Regulation der HCV-bedingten CXCL8-Expression ist ein Zusammenhang mit dem durch doppelsträngige RNA-aktivierten RIG-I-Signalwegs der angeborenen Immunität bekannt. Mutagenese-Studien im CXCL8-Promotor belegen dementsprechend, dass NF- κ B und *interferon (IFN)-stimulated response element (ISRE) binding sites*, unter anderem IRF3, in die Regulation der CXCL8-Transkription involviert sind.^{155,464} Ebenso wird die Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 an der HCV-induzierten und durch TNF- α gesteigerten CXCL8-Expression vermutet.³³¹

Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass das Hepatitis C Virus die Überexpression von CXCL8 und möglicherweise auch von CXCL1 bis CXCL3 nicht ausschließlich über den EGFR/EGF-induzierten Signalweg reguliert, sondern potentiell in Kombination mit dem RIG-I-Signalweg oder parallel durch weitere HCV-modifizierte zelluläre Signalwege.^{155,464} Dennoch spielt in beiden Signalwegen die HCV-vermittelte Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine maßgebliche Rolle in der Induktion der CXCL8-Gen-Transkription. Weitere durch HCV-modulierte Signalwege zur Induktion der CXCR2-Liganden-Expression gilt es aufgrund dessen weiter zu charakterisieren. Dies verdeutlicht an dieser Stelle mit welcher Vielzahl an zellulären Signaltransduktionskaskaden der angeborenen Immunität das Hepatitis C Virus zur Etablierung einer persistierenden Infektion und zur Umgehung der antiviralen Immunantwort letztlich interferiert und wie essentiell die Interferenz des Hepatitis C Virus mit den CXCR2-Liganden ist.

In der Gesamtheit lassen die bisherigen Resultate darauf schließen, dass die HCV-vermittelte und durch EGF verstärkte Überexpression der CXCR2-Liganden eng mit der Regulation der wirtsspezifischen Entzündungsantwort assoziiert ist. So ist hypothetisch die Interferenz des Hepatitis C Virus mit den Chemokinen ein möglicher Faktor für die erfolgreiche Etablierung viraler Persistenz unter Aufrechterhaltung eines erzielten Gleichgewichts zwischen HCV-bedingten leberschädigenden und pro-regenerativen Mechanismen in der Leber. Auf diese Weise könnte HCV die Vitalität seiner Wirtszelle durch die Induktion der Chemokinsynthese

so lange wie möglich aufrecht erhalten, ohne bereits nach kurzer Zeit schwerwiegende Leberschädigungen zu induzieren und das Überleben der Wirtszelle zu gefährden. Diese Hypothese wird durch drei Umstände gestützt. Zum einen ist EGF ein maßgeblicher Regulator und Induktor von Zellmigration, Zelldifferenzierung, Zellproliferation sowie überlebenssignalisierender Wirkungen^{233,234} und zum anderen ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B in die Induktion der Chemokinproduktion involviert, der einerseits Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie die Inhibierung der Apoptose³³⁵ und andererseits im Rahmen einer HCV-Infektion regenerationsfördernde und protektive Mechanismen in Hepatozyten induziert.⁴⁰⁰ Interessanterweise wird des Weiteren durch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe (Knievel und Bode *et al.*) die Transkription und Translation der CXCR2-Liganden in murinen Hepatozyten bereits mit leberregenerations-relevanten Faktoren assoziiert. So konnte in Antwort auf EGF und HGF in geringem Maße sowie als Reaktion auf TNF α und IL-1 β in größerem Maße eine verstärkte Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 belegt werden.⁴⁷² Dadurch wäre zugleich die im Rahmen dieser Arbeit verstärkte Überexpression der Chemokine in Antwort auf IL-1 β und die weitere Verstärkung in Antwort auf EGF und IL-1 β in Kombination potentiell zu erklären.

4.9 Die HCV-induzierte CXCR2-Liganden-Expression führt zu einer verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Im Rahmen der durchgeführten Analysen galt es nicht ausschließlich die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der HCV-induzierten Chemokinsynthese aufzuklären, sondern zugleich die funktionelle Konsequenz dieser Überexpression genauer zu charakterisieren.

Initial lag die Vermutung nahe, dass der Chemokinrezeptor der CXCR2-Liganden einen potentiellen Einfluss auf die virale Replikation ausüben könnte, wenngleich auch die Inhibition des CXC-Rezeptors 2 zu keinem deutlichen Befund führte (Abbildung 48).

Aus der Literatur wird bereits ersichtlich, dass die Interaktion der CXC-Chemokine 1, 2, 3 und 8 mit dem CXCR2 essentiell für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten als auch für die Infiltration von Monozyten zum Ort der Infektion ist.^{315,317} In Anbetracht dessen, entwickelte sich folglich die Überlegung, ob die verstärkte HCV-induzierte und durch EGF gesteigerte Chemokinsynthese das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten bzw. humaner Monozyten beeinflussen kann. Vor diesem Hintergrund wurden entsprechend unstimulierte und mit EGF-konditionierte Zellkulturüberstände humaner Huh-7 und HCV-Replikon-enthaltender Hepatomazellen generiert und mittels Migrations-Assay der Einfluss der HCV-induzierten

Chemokinsynthese auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bzw. Monozyten analysiert. Demzufolge führte die basale HCV-induzierte Chemokinsynthese lediglich tendenziell zu einer gesteigerten Migration der Neutrophilen. Die Induktion eines deutlich verstärkten Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten war erst in Antwort auf Überstände humaner Huh-9.13 Hepatomazellen nach zuvor erfolgter EGF-Stimulation sowie nach IL-1 β /EGF-Ko-Stimulation zu belegen (Abbildung 51). So lassen die Befunde annehmen, dass das Hepatitis C Virus strategisch durch die Induktion einer konstitutiven EGF-Expression eine bestimmte Chemokinkonzentration in seiner Wirtszelle erzielt, um eine Infiltration CXCR2-positiver neutrophiler Granulozyten zu induzieren. Dies wurde besonders deutlich, nachdem die Inhibition des CXCR2 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten kaum mehr eine Migration in der Gegenwart von EGF-stimulierten bzw. IL-1 β /EGF-ko-stimulierten Überständen der Replikonzellen induzieren konnte (Abbildung 53).

Die Daten der ausgeführten Untersuchungen legen eine Abhängigkeit dieser Rekrutierung von einer spezifisch durch das Virus erzielten Chemokinkonzentration in den HCV-infizierten Zellen, induziert durch die Steigerung der HCV-bedingten Chemokinsynthese in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor sowie eine selektiv über den CXC-Rezeptor 2-regulierte Migration und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten nahe. Es ist anzunehmen, dass führend die CXC-Chemokine 1, 2 und 3 die Aktivierung des Rezeptors auf der Oberfläche der Neutrophilen initiieren, nicht zuletzt da sie den CXCR2 selektiv binden.⁴⁷³ Dennoch spielt ebenso CXCL8 eine maßgebliche Rolle in der CXCR2-Aktivierung, wenngleich es auch in der Lage ist CXCR1 zu binden.⁴⁷³ Auch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe (Knievel und Bode *et al.*) konnten bereits eine verstärkte Rekrutierung muriner Neutrophiler nur als Reaktion auf HGF/TNF- α -ko-stimulierte Maus-Hepatozyten-Überstände belegen. Die Behandlung muriner Hepatozyten mit den leberregenerations-relevanten Faktoren HGF und TNF- α in Kombination resultierte in einer verstärkten Produktion der CXC-Motiv-Chemokine 1, 2 und 3. Die alleinige Stimulation der Maus-Hepatozyten mit HGF oder TNF- α führte zu einer geringeren Synthese der Chemokine im Vergleich zu unstimulierten murinen Hepatozyten und damit zu keiner Induktion der Migration.⁴⁷² So wird auch hier die Korrelation einer bestimmten erzielten Chemokinkonzentration und der verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, die bisweilen immer stärker mit der Leberregeneration assoziiert wird, vermutet.⁴⁷² Ebenso konnte durch den Einsatz von SB225002 eine über den CXCR2-gesteuerte Neutrophilen Migration nachgewiesen werden, was die erbrachten Resultate dieser Arbeit stützt.⁴⁷²

Eine HCV-abhängige Rekrutierung humaner Monozyten durch die gesteigerte CXCR2-Liganden-Synthese konnte nicht nachgewiesen werden und ist zugleich ein wichtiger Beleg, dass das Hepatitis C Virus selektiv neutrophile Granulozyten zu seiner Wirtszelle rekrutiert. Interessanterweise war eine deutliche Steigerung der Monozyten-Migration bereits in der Anwesenheit unstimulierter und EGF-stimulierter Überstände humaner Hepatomazellen der Linie Huh-7 detektierbar (Abbildung 52). Dies lässt sich potentiell durch zwei Umstände erklären. Zum einen infiltrieren Monozyten und auch Makrophagen verstärkt in Tumore, darunter auch in hepatozelluläre Karzinome, induziert durch die Interaktion des CC-Chemokins 2 mit dem CC-Rezeptor 2.⁴⁷⁴ Die humane Huh-7 Hepatomazelllinie leitet sich von einem hepatozellulären Karzinom ab⁴¹⁰ und lässt deshalb eine mögliche Erklärung der gesteigerten Monozyten-Rekrutierung in Antwort auf Huh-7 Zellkulturüberstände zu. Zum anderen werden spezifisch jeweils die Leukozyten durch die Sekretion von Chemokinen rekrutiert, die die entsprechenden Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche exprimieren. Aus der Literatur geht hervor, dass CXCR2 insbesondere von neutrophilen Granulozyten, jedoch in geringerem Maße auch auf Monozyten und Mastzellen exprimiert wird.¹⁵⁵ Währenddessen wird CCR2 im Wesentlichen auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert.¹⁵⁵ Die Interaktion mit dem spezifischen Liganden CCL2 oder auch MCP-1 genannt (*monocyte chemotactic protein*) ist durch die Aktivierung von CCR2 essentiell für die Chemotaxis humaner Monozyten.¹⁵⁵ Basierend auf den densitometrischen Daten des in dieser Arbeit durchgeführten *Proteome Profiler Human Chemokine Arrays* (Abbildung 21 und Abbildung 24) konnte eine Expression von CCL2 in den humanen Huh-7 Hepatomazellen nachgewiesen werden (Daten nicht abgebildet). Vor diesem Hintergrund könnte weiterhin die verstärkte Migration der Monozyten durch die in den Huh-7 Zellen exprimierten chemotaktischen Faktoren zugleich erklärt werden. Welche chemotaktischen Mediatoren jedoch genau für die verstärkte Rekrutierung der Monozyten als Reaktion auf unstimulierte und EGF-stimulierte Überstände der Huh-7 Hepatomazellen bzw. als Reaktion auf EGF-stimulierte Überstände der HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Hepatomazellen verantwortlich waren wurde nicht weiter in dieser Arbeit untersucht.

In der Gesamtheit der erbrachten Befunde stellt sich im Wesentlichen an dieser Stelle die Frage, welche funktionale Konsequenz die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer HCV-Infektion ausübt. Rekrutierte Neutrophile repräsentieren in ihrer physiologischen Funktion eine primäre Abwehr viraler Infektionen.^{155,378,155,391} Zur Aktivierung der antiviralen Immunantwort sekretieren sie ein spezifisches Profil aus pro-inflammatorischen Zytokinen,

darunter TNF- α , IL-12 und IL-1 β und aus Chemokinen, wie CCL2, CXCL8 und CXCL10, was letztlich zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Zellen der angeborenen und auch der adaptiven Immunität führt.⁴⁷⁵ Des Weiteren ist bekannt, dass aktivierte Neutrophile verstärkt CXCL8 als limitierenden Faktor der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α sekretieren.⁴⁷⁶

Im Rahmen der Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie übt das Zytokin TNF- α indirekte proliferationsfördernde Effekte auf Hepatozyten aus, indem es einerseits pro-regenerative Mechanismen in Hepatozyten fördert und andererseits Wachstums-inhibierende Mechanismen in Hepatozyten reduziert.⁴⁷¹ Intrazellulär aktiviert TNF- α den Transkriptionsfaktor NF- κ B, was letztlich in der Proliferation der Hepatozyten resultiert.⁴⁷⁷ Des Weiteren geht aus der Literatur auch im Rahmen einer Hepatitis C Virus Infektion eine verstärkte Expression von TNF- α und CCL2 hervor, was zur verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt, wodurch die Apoptose inhibiert und die Regeneration und Protektion von Hepatozyten induziert wird.⁴⁰⁰ Die in dieser Arbeit erbrachten Resultate konnten zugleich die verstärkte Präsenz von NF- κ B in nukleären Extrakten (Abbildung 39) und die verstärkte Aktivierung und Translokation von NF- κ B im Rahmen der Regulation der HCV-induzierten Überexpression der CXCR2-Liganden (Abbildung 40) nachweisen. Auch der epidermale Wachstumsfaktor ist aufgrund seiner Eigenschaften als mitogener Stimulator der DNA-Synthese in Hepatozyten ein relevanter Faktor in der Leberregeneration.⁴⁷¹

Zudem korrelieren weitere Virus-Infektionen, nicht nur Infektionen mit dem Hepatitis C Virus (Abbildung 22 und Abbildung 28), mit einem Anstieg der CXCL8-Konzentration.³²⁹ So induziert auch das humane Cytomegalovirus eine gesteigerte Expression von CXCL8.⁴⁷⁰ Diese wird einerseits mit einer gesteigerten Produktion infektiöser Viren und andererseits mit einer verstärkten CMV-Replikation assoziiert,⁴⁷⁸ was ebenfalls im Rahmen einer HCV-Infektion denkbar wäre und es weiterführend zu untersuchen und zu verifizieren gilt. Zugleich führt die CMV-induzierte CXCL8-Expression zu einer gesteigerten Rekrutierung transendothelialer neutrophiler Granulozyten.⁴⁷⁰ Interessanterweise induziert das Cytomegalovirus des Weiteren die Infiltration von Neutrophilen durch die Produktion der chemotaktischen CXC-Chemokine 1 und 2. Als funktionale Konsequenz der rekrutierten neutrophilen Granulozyten wird die effiziente Ausbreitung der Virus-Infektion im gesamten Körper vermutet, da die Neutrophilen als Transporter des Virus fungieren.^{470,479}

Vor diesem gesamten Hintergrund könnte man spekulieren, dass das Hepatitis C Virus durch die konstitutive EGF-Expression in seiner Wirtszelle eine bestimmte Chemokinkonzentration

der CXCR2-Liganden erzielt, um die lokale Entzündungs- und Immunmikro-Umgebung durch die verstärkte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten einerseits zu Gunsten pro-leberregenerativer Mechanismen und andererseits zur verstärkten viralen Replikation sowie zur Etablierung und effizienten Ausbreitung einer persistierenden Infektion in der Leber moduliert.

Dies würde folglich bedeuten, dass HCV die sensible Balance zwischen Chemokin-induzierten pro-leberregenerativen und aus der Literatur bekannten pro-inflammatorischen und damit leberschädigenden Mechanismen zu Gunsten der Regeneration verschiebt. Dieser Umstand könnte potentiell zum einen durch die rekrutierten neutrophilen Granulozyten und ihr spezifisch sekretiertes Zytokin- und Chemokinprofil, insbesondere durch TNF- α , CXCL8 und CCL2 und zum anderen durch das direkte HCV-induzierte Zytokin- und Chemokinnetzwerk aus TNF- α , CXCR2-Liganden und EGF erklärt werden. Diese Annahme wird fortführend von Arbeiten der Literatur gestützt, in denen einerseits die HCV-induzierte Chemokinsynthese im Zusammenhang mit der Fibroseprogression^{318,319,321} und andererseits mit hepatozellulär-protektiven und regenerativen Effekten kontrovers diskutiert wird.⁴⁰⁰ Des Weiteren könnte man die HCV-induzierte Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in Zusammenhang mit dem Gleichgewicht vorteilhafter und nachteilhafter Immunantworten bringen. Die HCV-vermittelte Induktion der chemotaktischen Faktoren und die so induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten kann auf diese Weise mit der erfolgreichen Etablierung einer persistierenden Infektion unter Aufrechterhaltung der Vitalität der Wirtszelle assoziiert werden und verdeutlicht an dieser Stelle nochmals die Relevanz der Interaktion des Hepatitis C Virus mit der angeborenen Immunität, die deutlich aus der Literatur hervorgeht, und damit mit den CXCR2-Liganden.^{155,157}

So gilt es zukünftig zu untersuchen, inwieweit CXCL8 auch im Rahmen einer Hepatitis C Virus Infektion zu einer verstärkten viralen Replikation und Produktion infektiöser Viren führt und ob die rekrutierten neutrophilen Granulozyten in der Lage sind durch ihr spezifisches Zytokinprofil leberregenerative Effekte zu Gunsten des Hepatitis C Virus zu induzieren und die Infektion weiterer Hepatozyten in der Leber zu begünstigen.

Ein zusammenfassendes Modell der bisher erbrachten Befunde ist in der Abbildung 62 dargestellt. Diesem Modell ist einerseits die charakterisierte Regulation der HCV-induzierten Überexpression der CXCR2-Liganden und die entsprechende funktionale Konsequenz der verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sowie die hypothetische Deutung der gesamten Resultate zu entnehmen.



Aktivierung von Akt. Die durch HCV- und EGF-verstärkt aktivierten Signalmoleküle ERK1/2, JNK und p38^{MAPK} sind irrelevant für die Regulation der CXCR2-Liganden-Expression. Der durch HCV-verstärkt in den Nukleus translozierte Transkriptionsfaktor NF- κ B initiiert die Transkription der EGF-induzierten CXCR2-Ligandenkodierenden Zielgene. MEK1 und Akt haben jedoch keinen direkten Einfluss auf die p65-Expression. So sind möglicherweise weitere in dieser Signaltransduktionskaskade *upstream* lokalisierte Signalmoleküle oder direkt virale HCV-Proteine in der basalen und EGF-induzierten Aktivierung und Translokation von NF- κ B involviert. Potentiell könnte die verstärkte Aktivierung und nukleäre Translokation von NF- κ B zugleich die Regeneration und Protektion der Hepatozyten steigern. Die HCV-induzierte und durch EGF gesteigerte Überexpression der Chemokinsynthese führt zur verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, die möglicherweise durch ihr spezifisches Chemokin- und Zytokinprofil aus TNF- α , CCL2 und CXCL8 zur Regeneration und Protektion der Hepatozyten, zur verstärkten viralen Replikation, zur effizienten Ausbreitung und Etablierung der persistierenden HCV-Infektion beitragen. Eigene Abbildung.

4.10 Das HCV-Replikon verhindert die verstärkte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche von humanen ko-kultivierten CD14⁺ Makrophagen im indirekten Ko-Kultur-Modell

In einem weiteren Teil der Arbeit zur Aufklärung der funktionellen und biologischen Relevanz der HCV-induzierten und durch EGF gesteigerten Expression der CXC-Motiv-Chemokine 1, 2, 3 und 8 wurde initial ein Ko-Kultur-Modell primärer, humaner Makrophagen und humaner Huh-7 bzw. humaner HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Hepatomazellen etabliert (Abbildung 54). Mit Hilfe dieses indirekten *in vitro* Transwellsystems wurde die Zell-Zell-Kommunikation über freigesetzte im Medium lösliche Mediatoren zwischen den Makrophagen und den Huh-7 bzw. den Huh-9.13 Zellen untersucht. Vor dem Hintergrund, dass das Hepatitis C Virus mit der Expression von Chemokinrezeptoren interferiert,^{310,318} lag der Fokus der ausgeführten Untersuchungen darauf, den Einfluss der HCV-bedingten Chemokinsynthese auf die Rezeptorexpression des CC-Motiv-Chemokinrezeptors 5 (CCR5) und des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) auf der Oberfläche der ko-kultivierten Makrophagen genauer zu charakterisieren.

Wie bereits in Abschnitt 1.5 CCR5 und CXCR4 wesentlich am Eintritt des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) in seine Wirtszelle beteiligt.^{368,373,374} Ebenso wie das Hepatitis C Virus aufgrund der Interaktion des viralen Glykoproteins E2, komplexiert mit den Lipoproteinen LDL und VLDL und/oder ApoE, mit hochsulfatiertem HSPG sowie dem LDL-Rezeptor spezifisch humane Hepatozyten infiziert,^{114,120,135} infiziert auch HIV spezifisch T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen.^{368,369} Für den Viruseintritt in die genannten Zellen ist hierzu die spezifische Interaktion des viralen Glykoproteins gp120 mit

dem wirtsspezifischen Glykoprotein CD4^{370,371} sowie die Wechselwirkung mit dem CCR5³⁷³ oder CXCR4^{368,374} eine unabdingbare Voraussetzung.

Die zytometrischen Analysen der hier vorgelegten Arbeit erbrachten erste Hinweise einer durch das Hepatitis C Virus Replikon indirekt bedingten Herabregulation von CCR5 (Abbildung 59 und Abbildung 61A) und von CXCR4 (Abbildung 60 und Abbildung 61B) auf der Oberfläche ko-kultivierter CD14⁺ Makrophagen, unabhängig von jedweden Stimulanzien, im Vergleich zur deutlichen Heraufregulation der Rezeptorexpression von CCR5 (Abbildung 59 und Abbildung 61A) und von CXCR4 (Abbildung 60 und Abbildung 61B) auf der Oberfläche der CD14⁺ Makrophagen in der Folge der Ko-Kultivierung mit humanen Huh-7 Hepatomazellen.

Die Befunde führen zu der Annahme, dass das Hepatitis C Virus Replikon indirekt durch die Sekretion spezifischer Mediatoren die Suppression von CCR5 und CXCR4 auf der Zelloberfläche der Makrophagen induziert bzw. die verstärkte Expression der Rezeptoren inhibiert. Welche spezifischen Mediatoren genau für die reduzierte Expression der Chemokinrezeptoren verantwortlich sind gilt es in weiterführenden Studien abzuklären. Die Befunde dieser Arbeit legen nahe, dass die HCV-induzierte Sekretion der CXCR2-Liganden keinen oder nur einen partiellen Einfluss auf die Suppression der Rezeptoren ausübt, da auch die Stimulation der Huh-9.13 Zellen mit CXCL8 oder IL-10 zur Herabregulation der Rezeptoren führte.

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation sind aktuell etwa 130-150 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis C Virus⁵ und etwa 36,9 Millionen Menschen mit dem Humanen Immundefizienz Virus infiziert.³⁶⁰ In den USA und in Europa sind etwa 13 bis 42 % der HIV-1-infizierten Patienten mit dem Hepatitis C Virus ko-infiziert.⁴⁸⁰ Bisweilen ist noch unzureichend erforscht, wie die Viren sich gegenseitig in HIV/HCV-ko-infizierten Patienten bezüglich der Replikation oder des Viruseintritts in ihren spezifischen Wirtszellen auf molekularer Ebene beeinflussen. Klinische Daten der Literatur konnten jedoch in HIV/HCV-ko-infizierten Patienten deutlich erhöhte Titer viraler HCV-RNA^{481,482} und eine deutliche Reduktion der antiviralen Immunantwort gegen das Hepatitis C Virus aufgrund der HIV-Infektion supprimierenden Einflüsse auf das Immunsystem nachweisen.⁴⁸⁰

Ob ein potentieller Zusammenhang zwischen der in dieser Arbeit beobachteten indirekten HCV-Replikon-bedingten Herabregulation der HIV-Eintrittsrezeptoren und der gesteigerten Replikation des Hepatitis C Virus in HIV/HCV-ko-infizierten Patienten besteht, kann an dieser Stelle nur hypothetisch betrachtet werden und bedarf zur Bestätigung weitere Untersuchungen.

Dementsprechend gilt es zu prüfen, ob die Rezeptorexpression von CCR5 und CXCR4 auch auf T-Zellen und/oder dendritischen Zellen ebenfalls indirekt durch das Hepatitis C Virus Replikon supprimiert wird oder ob die Affinität des Humanen Immundefizienz Virus zu T-Zellen und/oder dendritischen Zellen durch die HCV-bedingte Herabregulation von CCR5 und CXCR4 auf den Makrophagen gesteigert wird und so ein potentieller Wirtszell-Infektions-*Switch* initiiert wird. Ein Modell der erbrachten Befunde ist der Abbildung 63 zu entnehmen.

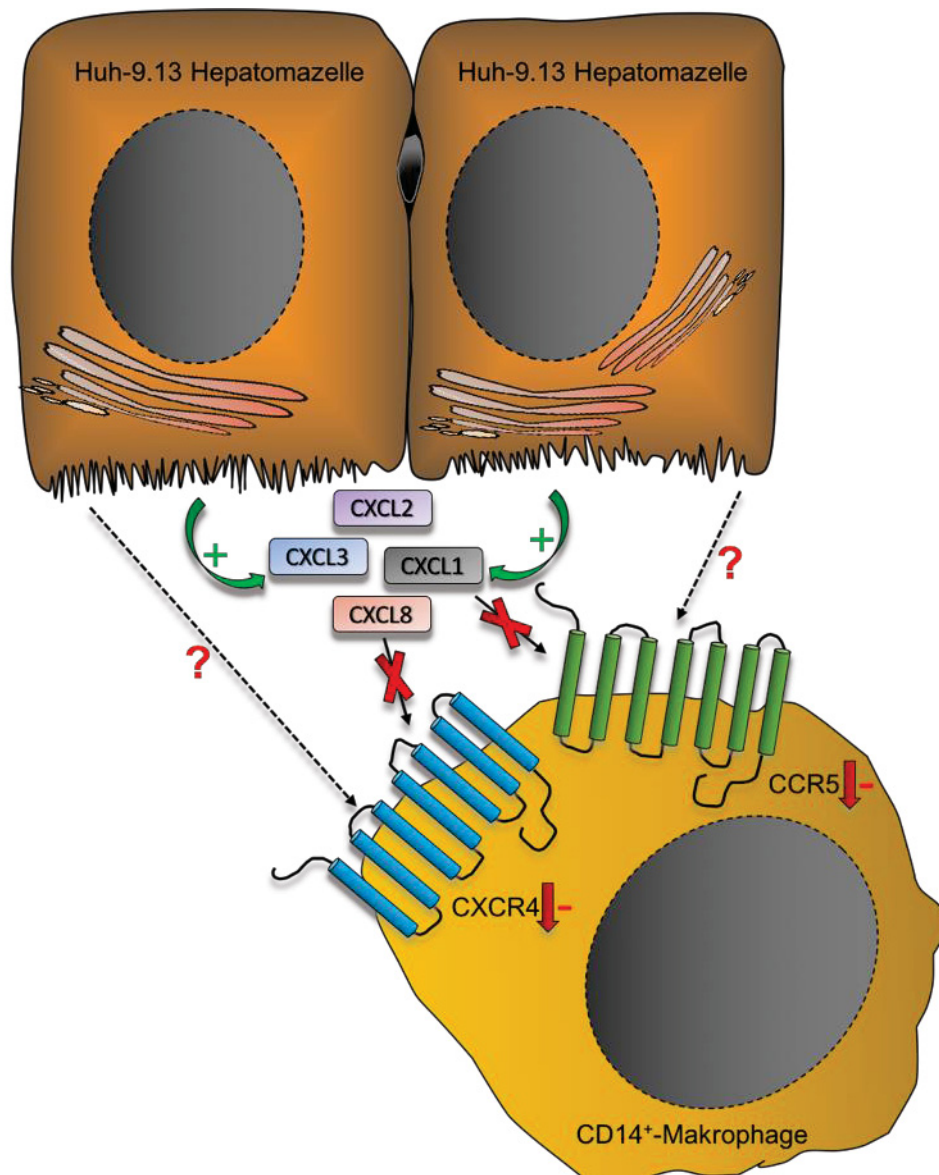


Abbildung 63: Modell der durch das Hepatitis C Virus Replikon indirekt bedingten Herabregulation der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche ko-kultivierter CD14⁺ Makrophagen. In dem in dieser Arbeit etablierten leber-realitätsbezogenen Ko-Kultur-Modell führte die Ko-Kultivierung primärer CD14⁺ Makrophagen mit humanen Huh-7 Hepatomazellen zu einer deutlich verstärkten Expression der für das Humane Immundefizienz Virus (HIV) relevanten Eintrittsrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche ko-kultivierter CD14⁺ Makrophagen, unabhängig von CXCL8, IL-10 sowie der durch HCV und EGF-induzierten Überexpression der CXCR2-Liganden. Diese verstärkte Expression sowohl von CCR5 als auch von CXCR4 wurde hindessen durch die Ko-Kultivierung der CD14⁺ Makrophagen mit den HCV-Replikon-enhaltenden Hepatomazellen inhibiert. Welche im Medium lösliche Mediatoren von den Huh-9.13 Zellen sezerniert werden und für diese Suppression der Rezeptoren verantwortlich sind gilt es weiter zu untersuchen. Eine ausschließlich durch die CXCR2-Liganden induzierte Herabregulation bzw. Inhibition der verstärkten Rezeptorexpression kann jedoch ausgeschlossen werden. Eigene Abbildung.

5 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Interferenz des Hepatitis C Virus mit der Re-Programmierung der durch den epidermalen Wachstumsfaktor induzierten Chemokin-Genexpression und die nachhaltige Beeinflussung des interzellulären Kommunikationsverhaltens der Wirtszelle im Rahmen der Entzündungsantwort charakterisiert. Chemokine sind wichtige Determinanten für die Konstitution des lokalen Immunmilieus. Die Interferenz von HCV mit Chemokinen ist unerlässlich für die erfolgreiche Etablierung viraler Persistenz. Der Fokus der Untersuchungen lag auf den CXCR2-Liganden.

In diesem Kontext belegen die erhobenen Daten, dass das Hepatitis C Virus die verstärkte Expression der CXCR2-Liganden in seiner Wirtszelle induziert, deren Expression in Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor verstärkt wird. Sowohl in der Anwesenheit des HCV-Replikons als auch des HCV-Stamms JC1 wird EGF in einen potenten Induktor der Chemokinsynthese konvertiert. Interessanterweise legen die Befunde der posttranskriptionellen EGF-Inhibition nahe, dass HCV die Überexpression der CXCR2-Liganden durch eine konstitutive EGF-Expression in seiner Wirtszelle induziert und durch einen EGF-vermittelten auto- und parakrinen *feedback loop* reguliert. Daten der Inhibitor- und Gen-*knockdown*-Analysen weisen darauf hin, dass die Sensibilisierung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität durch die HCV-vermittelte Suppression des endogenen Negativregulators des EGFR, der T-Zell Protein Tyrosinphosphatase, eine in den HCV-infizierten Zellen unabdingbare Voraussetzung für die verstärkte EGF-induzierte Expression von CXCL8 und in die EGF-induzierte Überexpression von CXCL1 bis CXCL3 involviert ist. Weiterhin lassen die Befunde annehmen, dass die EGF-induzierte CXCL8-Expression die Aktivierung von MEK1 und die verstärkte Expression von CXCL1 bis CXCL3 die Aktivierung von Akt erfordert, während der Transkriptionsfaktor NF- κ B in die Transkription aller CXCR2-Liganden-kodierenden Zielgene involviert ist. ERK1/2, JNK und p38^{MAPK} sind für diese HCV-bedingte Deregulation scheinbar nicht von Bedeutung. Weiterhin konnte eine verstärkte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in der Anwesenheit von EGF-konditionierten Zellkulturüberständen HCV-Replikon-enthaltenden Huh-9.13 Zellen belegt werden. Eine verstärkte Migration humaner Monozyten war HCV-unabhängig bereits in der Gegenwart unstimulierter und EGF-stimulierter Überstände von Huh-7 Zellen detektierbar. Mittels eines etablierten indirekten *in vitro* Ko-Kultur Modells konnte eine HCV-abhängige Reduktion der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche ko-kultivierter Makrophagen beobachtet werden.

6 Summary

The present study analyses the interference of the Hepatitis C Virus with EGF-induced re-programming chemokine gene expression and the sustained effect on the intercellular communication behavior of the host cell as a part of the inflammatory response. Chemokines are important determinants of the constitution of immune cells. The interference of HCV with chemokines are essential to establish viral persistence. The focus of the investigations was on the CXCR2 ligands.

In this context, the data collected demonstrates that the Hepatitis C Virus induces the increased expression of CXCR2 ligands in its host cell, whereas expression is enhanced in response to the epidermal growth factor. In the presence of either the Hepatitis C Virus replicon or the HCVcc strain JC1 EGF is converted into a potent inducer of the chemokine production. Most interestingly post-transcriptional inhibition of EGF suggests that HCV induces overexpression of CXCR2 ligands via induction of constitutive EGF expression in its host cell and is regulated by an EGF-mediated positive auto- and paracrine feedback loop. Furthermore, inhibitor studies and data from gene knockdown experiments revealed that sensitization of EGF receptor tyrosine kinase activity by HCV-mediated suppression of the endogenous negative regulator of EGFR, the T cell protein tyrosine phosphatase is a pre-requisite for increased EGF-induced CXCL8 expression and is also involved in the EGF-induced overexpression of CXCL1, CXCL2 and CXCL3 in HCV infected cells. In addition, from the data collected it can be assumed that EGF-induced CXCL8 expression needs activation of MEK1 and the increased expression of CXCL1 to CXCL3 the activation of act, while the transcription factor NF- κ B is involved in transcription of all CXCR2-ligands encoding target genes. ERK1/2, JNK and p38^{MAPK} seem to be irrelevant for this HCV-mediated deregulation. Furthermore an enhanced recruitment of neutrophil granulocytes was measured in the presence of EGF-conditioned cell-culture supernatants from Huh-9.13 cells, which are harboring the subgenomic HCV replicon. An increased migration of human monocytes was already detectable HCV-independently in the presence of untreated and EGF-treated supernatants of Huh-7 cells. By means of an established indirect *in vitro* co-culture model an HCV-dependent reduction of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 could be detected on the surface of co-cultured macrophages.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW *et al.* Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *The Lancet* 1974; **2(7875)**: 241–6.
- 2 Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England Journal of Medicine* 1975; **292(15)**: 767–70.
- 3 Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *The Lancet* 1975; **2(7940)**: 838–41.
- 4 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; **244(4902)**: 359–62.
- 5 World Health Organization. Hepatitis C-Fact Sheet N°164. Stand Juli 2015.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
- 6 Epidemiologisches Bulletin-Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Hepatitis C im Jahr 2014. *Robert Koch Institut: Statistisches Bundesamt* 2015; **31**: 290–302.
- 7 Poethko-Muller C, Zimmermann R, Hamouda O, Faber M, Stark K, Ross RS *et al.* Die Seroepidemiologie der Hepatitis A, B und C in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2013; **56(5-6)**: 707–15.
- 8 Schreier E, Radun D, Neuhauser H, Stark K. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 15-Hepatitis C. *Robert Koch Institut: Statistisches Bundesamt* 2003; **15**.
- 9 Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology* 2008; **48(2)**: 418–31.
- 10 Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; **36(5)**: 21–9.
- 11 Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; **36(5)**: 35–46.

- 12 Pawlotsky JM. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2003; **16(6)**: 587–92.
- 13 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; **132(7)**: 2557–76.
- 14 Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 2012; **380(9859)**: 2095–2128.
- 15 Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, Hagan H, Des Jarlais D, Horyniak D *et al.* Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *The Lancet* 2011; **378(9791)**: 571–83.
- 16 Simmonds P. The origin of hepatitis C virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2013; **369**: 1–15.
- 17 Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Journal of Hepatology* 1997; **26(3)**: 15–20.
- 18 Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology* 1993; **74(11)**: 2391–9.
- 19 Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminars in Liver Disease* 1995; **15(1)**: 41–63.
- 20 Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone SM *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; **42(4)**: 962–73.
- 21 Meyers G, Thiel HJ. Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in Virus Research* 1996; **47**: 53–118.
- 22 Sampath A, Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Research* 2009; **81(1)**: 6–15.

- 23 Nakano T, Lau GM, Lau GM, Sugiyama M, Mizokami M. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver International* 2012; **32**(2): 339–45.
- 24 Sultan MT, Rahman MM, Begum S. Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Journal of Bangladesh College of Physicians and Surgeons* 2009; **27**(3): 160–165.
- 25 Agostini C, Semenzato G, James DG. Immunological, clinical and molecular aspects of sarcoidosis. *Molecular Aspects of Medicine* 1997; **18**(2): 91–165.
- 26 Waheed Y, Bhatti A, Anjum S, Ashraf M. Sequence comparison and phylogenetic analysis of hepatitis C virus genotype 3 polymerase. *Molecular Medicine Reports* 2014; **9**(4): 1266–1270.
- 27 Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Meyers G *et al.* Flaviviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus taxonomy Elsevier, Oxford* 2011; : 1003–1020.
- 28 Berg T, Hopf U, Stark K, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E. Distribution of Hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic Hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *Journal of Hepatology* 1997; **26**(3): 484–91.
- 29 Ross RS, Viazov S, Renzing-Köhler K, Roggendorf M. Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *Journal of Medical Virology* 2000; **60**(2): 122–5.
- 30 Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *Journal of General Virology* 2001; **82**(4): 693–712.
- 31 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; **24**(8): 1596–1599.
- 32 World Health Organization. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection 2014.
2014.http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111747/1/9789241548755_eng.pdf?ua=1&ua=1

- 33 Rao VB, Johari N, du Cros P, Messina J, Ford N, Cooke GS. Hepatitis C seroprevalence and HIV co-infection in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 2015; **15**(7): 819–24.
- 34 Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2000; **242**: 55–84.
- 35 Liu Y, Wimmer E, Paul AV. Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2009b; **1789**(9-10): 495–517.
- 36 Niepmann M. Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2009b; **1789**(9-10): 529–41.
- 37 Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* 1992; **66**(3): 1476–83.
- 38 Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of Virology* 1993; **67**(6): 3338–44.
- 39 Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; **39**: 5–19.
- 40 Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology* 2007; **5**(6): 453–63.
- 41 Okamoto K, Mori Y, Komoda Y, Okamoto T, Okochi M, Takeda M *et al.* Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *Journal of Virology* 2008; **82**(17): 8349–61.
- 42 Oehler V, Filipe A, Montserret R, da Costa D, Brown G, Penin F *et al.* Structural analysis of hepatitis C virus core-E1 signal peptide and requirements for cleavage of the genotype 3a signal sequence by signal peptide peptidase. *Journal of Virology* 2012; **86**(15): 7818–28.
- 43 Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology* 1994; **68**(6): 3631–41.

- 44 Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of Experimental Medicine* 2003; **197**(5): 633–42.
- 45 Goffard A, Callens N, Bartosch B, Wychowski C, Cosset FL, Montpellier C *et al.* Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology* 2005; **79**(13): 8400–9.
- 46 Carrère-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of Virology* 2002; **76**(8): 3720–30.
- 47 Clarke D, Griffin S, Beales L, Gelais CS, Burgess S, Harris M *et al.* Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; **281**(48): 37057–68.
- 48 Luik P, Chew C, Aittoniemi J, Chang J, Wentworth PJr, Dwek RA *et al.* The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106**(31): 12712–6.
- 49 Chandler DE, Penin F, Schulten K, Chipot C. The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Computational Biology* 2012; **8**(9): e1002702.
- 50 Steinmann E, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* 2010; **2**(9): 2078–95.
- 51 Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N *et al.* Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *Journal of Virology* 1993; **67**(8): 4665–75.
- 52 Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *Journal of Virology* 2001; **75**(3): 1252–64.
- 53 Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World Journal of Gastroenterology* 2007; **13**(17): 2406–2415.

- 54 Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106(13)**: 5342–7.
- 55 Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, Moradpour D *et al.* NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *Journal of Virology* 2011; **85(14)**: 6963–76.
- 56 Herod MR, Jones DM, McLauchlan J, McCormick CJ. Increasing rate of cleavage at boundary between non-structural proteins 4B and 5A inhibits replication of hepatitis C virus. *The Journal of Biological Chemistry* 2012; **287(1)**: 568–80.
- 57 Gouttenoire J, Montserret R, Kennel A, Penin F, Moradpour D. An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association. *Journal of Virology* 2009b; **83(21)**: 11378–84.
- 58 Lundin M, Monné M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *Journal of Virology* 2003; **77(9)**: 5428–38.
- 59 Gouttenoire J, Castet V, Montserret R, Arora N, Raussens V, Ruyschaert JM *et al.* Identification of a novel determinant for membrane association in hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *Journal of Virology* 2009a; **83(12)**: 6257–68.
- 60 Brass V, Berke JM, Montserret R, Blum HE, Penin F, Moradpour D. Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; **105(38)**: 14545–50.
- 61 Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; **59(12)**: 1200–1212.
- 62 Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* 2000; **81(7)**: 1631–1648.
- 63 Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *Journal of Virology* 2005; **79(5)**: 3187–94.

- 64 Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; **101(35)**: 13038–13043.
- 65 Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathogens* 2008; **4(3)**: e1000032.
- 66 Kim S, Welsch C, Yi M, Lemon SM. Regulation of the production of infectious genotype 1a hepatitis C virus by NS5A domain III. *Journal of Virology* 2011; **85(13)**: 6645–56.
- 67 Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M *et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* 2007; **9(9)**: 1089–97.
- 68 Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P *et al.* Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathogens* 2008; **4(3)**: e1000035.
- 69 Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A *et al.* Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of Virology* 2008; **82(16)**: 7964–76.
- 70 Pietschmann T, Zayas M, Meuleman P, Long G, Appel N, Koutsoudakis G *et al.* Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. *PLoS Pathogens* 2009; **5(6)**: e1000475.
- 71 Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *The EMBO Journal* 1996; **15(1)**: 12–22.
- 72 Lohmann V, Körner F, Herian U, Bartenschlager R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of Virology* 1997; **71(11)**: 8416–28.
- 73 Simister P, Schmitt M, Geitmann M, Wicht O, Danielson UH, Klein R *et al.* Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. *Journal of Virology* 2009; **83(22)**: 11926–39.

74 Gouklani H, Bull RA, Beyer C, Coulibaly F, Gowans EJ, Drummer HE *et al.* Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis. *Journal of Virology* 2012; **86**(9): 5080–5088.

75 Yao N, Reichert P, Taremi, S S, Prosis WW, Weber PC. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. 1999; **7**(11): 1353–63.

76 De Francesco R, Steinkühler C. Structure and function of the hepatitis C virus NS3-NS4A serine proteinase. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2000; **242**: 149–69.

77 Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCourt DW, Bazan JF, Fletterick RJ *et al.* Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; **87**(22): 8898–8902.

78 Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA *et al.* Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 1996; **87**(2): 343–55.

79 Wölk B, Sansonno D, Kräusslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE *et al.* Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of Virology* 2000; **74**(5): 2293–304.

80 Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RKF, Pyle AM, Penin F *et al.* The C Terminus of Hepatitis C Virus NS4A Encodes an Electrostatic Switch That Regulates NS5A Hyperphosphorylation and Viral Replication. *Journal of Virology* 2007; **81**(17): 8905–8918.

81 Phan T, Kohlway A, Dimberu P, Pyle AM, Lindenbach BD. The Acidic Domain of Hepatitis C Virus NS4A Contributes to RNA Replication and Virus Particle Assembly. *Journal of Virology* 2011; **85**(3): 1193–1204.

82 Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, Cameron CE. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; **285**(30): 22725–31.

- 83 Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; **215(1)**: 160–6.
- 84 Tai CL, Chi WK, Chen DS, Hwang LH. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *Journal of Virology* 1996; **70(12)**: 8477–84.
- 85 Frick DN, Rypma RS, Lam AM, Gu B. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; **279(2)**: 1269–80.
- 86 Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 2008; **6(9)**: 699–708.
- 87 Ishido S, Fujita T, Hotta H. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; **244(1)**: 35–40.
- 88 Lin C, Wu JW, Hsiao K, Su MS. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *Journal of Virology* 1997; **71(9)**: 6465–71.
- 89 Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Current Opinion in Microbiology* 2002; **5(4)**: 419–27.
- 90 Borowski P, Heiland M, Oehlmann K, Becker B, Kornetzky L, Feucht H *et al.* Non-structural protein 3 of hepatitis C virus inhibits phosphorylation mediated by cAMP-dependent protein kinase. *European Journal of biochemistry / FEBS* 1996; **237(3)**: 611–618.
- 91 Borowski P, Oehlmann K, Heiland M, Laufs R. Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Virology* 1997; **71(4)**: 2838–2843.
- 92 Borowski P, Schulze zur Wiesch J, Resch K, Feucht H, Laufs R, Schmitz H. Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; **274(43)**: 30722–30728.
- 93 Ishido S, Hotta H. Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *FEBS Letters* 1998; **438(3)**: 258–262.

- 94 Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M, Kato N *et al.* NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *The Journal of General Virology* 2006; **87(6)**: 1703–1713.
- 95 Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *The Journal of General Virology* 2001; **82(9)**: 2235–2241.
- 96 Muramatsu S, Ishido S, Fujita T, Itoh M, Hotta H. Nuclear localization of the NS3 protein of hepatitis C virus and factors affecting the localization. *J Virol* 1997; **71(7)**: 4954–4961.
- 97 Borowski P, Kühl R, Laufs R, Schulze zur Wiesch J, Heiland M. Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 1999; **13(1-2)**: 61–69.
- 98 Foy E, Li K, Wang C, Sumpter RJr, Ikeda M, Lemon SM *et al.* Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003; **300(5622)**: 1145–8.
- 99 Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005; **437(7062)**: 1167–72.
- 100 Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale MJr. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; **108(35)**: 14590–5.
- 101 Li K, Foy E, Ferreón JC, Nakamura M, Ferreón AC, Ikeda M *et al.* Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; **102(8)**: 2992–7.
- 102 Morikawa K, Lange CM, Gouttenoire J, Meylan E, Brass V, Penin F *et al.* Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *Journal of Viral Hepatitis* 2011; **8(5)**: 305–15.
- 103 Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *Journal of Hepatology* 2011; **55(1)**: 192–206.

- 104 Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985; **88**(3): 773–779.
- 105 He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *The Journal of Infectious Diseases* 1987; **156**(4): 636–640.
- 106 Yuasa T, Ishikawa G, Manabe S, Sekiguchi S, Takeuchi K, Miyamura T. The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre. *The Journal of General Virology* 1991; **72**(8): 2021–2024.
- 107 Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M *et al.* Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol* 2010; **84**(21): 10999–11009.
- 108 Merz A, Long G, Hiet M-S, Brügger B, Chlanda P, Andre P *et al.* Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; **286**(4): 3018–3032.
- 109 Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* 2005; **11**(7): 791–796.
- 110 Lavie M, Goffard A, Dubuisson J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Current Issues in Molecular Biology* 2007; **9**(2): 71–86.
- 111 Miyamoto H, Okamoto H, Sato K, Tanaka T, Mishiro S. Extraordinarily low density of hepatitis C virus estimated by sucrose density gradient centrifugation and the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1992; **73**(3): 715–718.
- 112 Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Medical Microbiology and Immunology* 1992; **181**(5): 293–300.
- 113 Thomssen R, Bonk S, Thiele A. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Medical Microbiology and Immunology* 1993; **182**(6): 329–334.

- 114 André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M *et al.* Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 2002; **76**(14): 6919–6928.
- 115 Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechokchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 2006; **80**(5): 2418–2428.
- 116 Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In *Fields Virology*. 5th edition. Edited by Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007.
- 117 Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 2006; **80**(4): 1734–1741.
- 118 Barth H, Liang TJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology* 2006; **44**(3): 527–535.
- 119 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; **282**(5390): 938–941.
- 120 Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(22): 12766–12771.
- 121 Monazahian M, Böhme I, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grethe S *et al.* Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999; **57**(3): 223–229.
- 122 Wünschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* 2000; **74**(21): 10055–10062.
- 123 Pöhlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G *et al.* Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003; **77**(7): 4070–4080.

- 124 Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T *et al.* L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(8): 4498–4503.
- 125 Lozach P-Y, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Foung S, Amara A *et al.* DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003; **278**(22): 20358–20366.
- 126 Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; **21**(19): 5017–5025.
- 127 Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H *et al.* Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 2003; **278**(42): 41003–41012.
- 128 Barth H, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B *et al.* Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 2006; **80**(21): 10579–10590.
- 129 Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007; **446**(7137): 801–805.
- 130 Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset F-L *et al.* The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 2008; **82**(7): 3555–3560.
- 131 Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J *et al.* Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 2007; **81**(22): 12465–12471.
- 132 Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L *et al.* EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011; **17**(5): 589–595.
- 133 Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC *et al.* L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(39): 14067–14072.

- 134 Lozach P-Y, Amara A, Bartosch B, Virelizier J-L, Arenzana-Seisdedos F, Cosset F-L *et al.* C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 2004; **279**(31): 32035–32045.
- 135 Germi R, Crance J-M, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RWH *et al.* Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* 2002; **68**(2): 206–215.
- 136 Haberstroh A, Schnober EK, Zeisel MB, Carolla P, Barth H, Blum HE *et al.* Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 2008; **135**(5): 1719–1728.e1.
- 137 Jiang J, Cun W, Wu X, Shi Q, Tang H, Luo G. Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2012; **86**(13): 7256–7267.
- 138 Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, Descamps V, Goueslain L, Bertrand-Michel J *et al.* Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 2012; **55**(4): 998–1007.
- 139 Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guérin M, Mancip J, Granio O *et al.* Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *The Journal of Biological Chemistry* 2012; **287**(37): 31242–31257.
- 140 Barth H, Cerino R, Arcuri M, Hoffmann M, Schürmann P, Adah MI *et al.* Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol* 2005; **79**(9): 5774–5785.
- 141 Barth H, Schnober EK, Neumann-Haefelin C, Thumann C, Zeisel MB, Diepolder HM *et al.* Scavenger receptor class B is required for hepatitis C virus uptake and cross-presentation by human dendritic cells. *J Virol* 2008; **82**(7): 3466–3479.
- 142 Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S *et al.* Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-BI scavenger receptor. *J Biol Chem* 2003; **278**(43): 41624–41630.
- 143 Catanese MT, Graziani R, von Hahn T, Moreau M, Huby T, Paonessa G *et al.* High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently

block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *J Virol* 2007; **81(15)**: 8063–8071.

144 Catanese MT, Ansuini H, Graziani R, Huby T, Moreau M, Ball JK *et al.* Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *J Virol* 2010; **84(1)**: 34–43.

145 Dreux M, Dao Thi VL, Fresquet J, Guérin M, Julia Z, Verney G *et al.* Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog* 2009; **5(2)**: e1000310.

146 Kapadia SB, Barth H, Baumert T, McKeating JA, Chisari FV. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol* 2007; **81(1)**: 374–383.

147 Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset F-L *et al.* Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 2007; **46(6)**: 1722–1731.

148 Sainz B, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S *et al.* Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 2012; **18(2)**: 281–285.

149 Coller KE, Berger KL, Heaton NS, Cooper JD, Yoon R, Randall G. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* 2009; **5(12)**: e1000702.

150 Meertens L, Bertaux C, Dragic T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* 2006; **80(23)**: 11571–11578.

151 Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 2008; **10(4)**: 821–827.

152 Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology* 2013; **11(10)**: 688–700.

- 153 Bode JG, Brenndörfer ED, Karthe J, Häussinger D. Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication. *Biological Chemistry* 2009; **390(10)**: 1013–1032.
- 154 Bartenschlager R, Cosset F-L, Lohmann V. Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* 2010; **53(3)**: 583–585.
- 155 Brass A, Brenndörfer ED. The role of chemokines in hepatitis C virus-mediated liver disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; **15(3)**: 4747–4779.
- 156 Brenndörfer E, Karthe J, Frelin L, Cebula P, Erhardt A, Schulte am Esch J *et al.* Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T cell protein tyrosine phosphatase. *Hepatology* 2009; **49(6)**: 1810–20.
- 157 Bode JG, Brenndörfer ED, Häussinger D. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007; **462(2)**: 254–265.
- 158 Kawasaki T, Kawai T, Akira S. Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunological Reviews* 2011; **243(1)**: 61–73.
- 159 O’Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 2007; **7(5)**: 353–364.
- 160 Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology* 2005; **6(10)**: 981–988.
- 161 Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005; **122(5)**: 669–682.
- 162 Xu L-G, Wang Y-Y, Han K-J, Li L-Y, Zhai Z, Shu H-B. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Molecular Cell* 2005; **19(6)**: 727–740.
- 163 Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 2008; **455(7213)**: 674–678.

- 164 Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009; **461(7265)**: 788–792.
- 165 Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S *et al.* IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology* 2010; **11(11)**: 997–1004.
- 166 Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature Immunology* 2003; **4(5)**: 491–496.
- 167 Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou G-P, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003; **300**: 1148–1151.
- 168 Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 2007; **282(28)**: 20047–20051.
- 169 Uzé G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S. The receptor of the type I interferon family. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2007; **316**: 71–95.
- 170 Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK *et al.* IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology* 2003; **4(1)**: 69–77.
- 171 Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology* 2003; **4(1)**: 63–68.
- 172 Stark GR, Darnell JE. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 2012; **36(4)**: 503–514.
- 173 Li X-D, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; **102(49)**: 17717–17722.
- 174 Ke P-Y, Chen SS-L. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *The Journal of Clinical Investigation* 2011; **121(1)**: 37–56.

- 175 Garaigorta U, Chisari FV. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host & Microbe* 2009; **6(6)**: 513–522.
- 176 Bowen DG, Walker CM. Mutational escape from CD8+ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *The Journal of Experimental Medicine* 2005; **201(11)**: 1709–1714.
- 177 Söderholm J, Ahlén G, Kaul A, Frelin L, Alheim M, Barnfield C *et al.* Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. *Gut* 2006; **55(2)**: 266–274.
- 178 Seifert U, Liermann H, Racanelli V, Halenius A, Wiese M, Wedemeyer H *et al.* Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *The Journal of Clinical Investigation* 2004; **114(2)**: 250–259.
- 179 Timm J, Lauer GM, Kavanagh DG, Sheridan I, Kim AY, Lucas M *et al.* CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *The Journal of Experimental Medicine* 2004; **200(12)**: 1593–1604.
- 180 Kimura Y, Gushima T, Rawale S, Kaumaya P, Walker CM. Escape mutations alter proteasome processing of major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; **79(8)**: 4870–4876.
- 181 Rosen HR. Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection. *The Journal of Clinical Investigation* 2013; **123(10)**: 4121–4130.
- 182 Moriishi K, Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Reviews in Medical Virology* 2007; **17(5)**: 343–354.
- 183 Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y *et al.* Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Molecular Cell* 2005; **19(1)**: 111–122.
- 184 Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T *et al.* Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *The EMBO Journal* 2006; **25(20)**: 5015–5025.

- 185 Gao L, Aizaki H, He J-W, Lai MMC. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology* 2004; **78(7)**: 3480–3488.
- 186 Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y *et al.* Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *Journal of Virology* 2005; **79(21)**: 13473–13482.
- 187 Lu H, Li W, Noble WS, Payan D, Anderson DC. Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *Journal of Proteome Research* 2004; **3(5)**: 949–957.
- 188 Harris D, Zhang Z, Chaubey B, Pandey VN. Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 2006; **5(6)**: 1006–1018.
- 189 Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; **279(13)**: 12232–12241.
- 190 Park C-Y, Jun H-J, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; **284(14)**: 9237–9246.
- 191 Pfannkuche A, Büther K, Karthe J, Poenisch M, Bartenschlager R, Trilling M *et al.* c-Src is required for complex formation between the hepatitis C virus-encoded proteins NS5A and NS5B: a prerequisite for replication. *Hepatology* 2011; **53(4)**: 1127–1136.
- 192 Zhao L-J, Zhao P, Chen Q-L, Ren H, Pan W, Qi Z-T. Mitogen-activated protein kinase signalling pathways triggered by the hepatitis C virus envelope protein E2: implications for the prevention of infection. *Cell Proliferation* 2007; **40(4)**: 508–521.
- 193 Li B, Li X, Li Y, Guo H, Sun S-Y, He Q-Q *et al.* The effects of hepatitis C virus non-structural protein 3 on cell growth mediated by extracellular signal-related kinase cascades in human hepatocytes in vitro. *International Journal of Molecular Medicine* 2010; **26(2)**: 273–279.
- 194 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001; **98(17)**: 9599–9604.

195 Waris G, Livolsi A, Imbert V, Peyron J-F, Siddiqui A. Hepatitis C virus NS5A and subgenomic replicon activate NF-kappaB via tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha and its degradation by calpain protease. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; **278(42)**: 40778–40787.

196 Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 1972; **177(4050)**: 705–706.

197 Lau JYN, Tam RC, Liang TJ, Hong Z. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* 2002; **35(5)**: 1002–1009.

198 Montero C, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB, Micheli V, Cant AJ *et al.* Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 1995; **238(2)**: 169–178.

199 Hultgren C, Milich DR, Weiland O, Sällberg M. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *The Journal of General Virology* 1998; **79(10)**: 2381–2391.

200 Tam RC, Lim C, Bard J, Pai B. Contact hypersensitivity responses following ribavirin treatment in vivo are influenced by type 1 cytokine polarization, regulation of IL-10 expression, and costimulatory signaling. *The Journal of Immunology* 1999; **163**: 3709–3717.

201 Baron S, Tying SK, Fleischmann WR, Coppenhaver DH, Niesel DW, Klimpel GR *et al.* The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. *JAMA* 1991; **266(10)**: 1375–1383.

202 Zeuzem S, Heathcote JE, Martin N, Nieforth K, Modi M. Peginterferon alfa-2a (40 kDa) monotherapy: a novel agent for chronic hepatitis C therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2001; **10(12)**: 2201–2213.

203 Hoofnagle JH, Seeff LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *The New England Journal of Medicine* 2006; **355(23)**: 2444–2451.

- 204 Parfieniuk A, Jaroszewicz J, Flisiak R. Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus. *World Journal of Gastroenterology* 2007; **13(43)**: 5673–5681.
- 205 Chang MH, Gordon LA, Fung HB. Boceprevir: a protease inhibitor for the treatment of hepatitis C. *Clinical Therapeutics* 2012; **34(10)**: 2021–2038.
- 206 Forestier N, Zeuzem S. Telaprevir for the treatment of hepatitis C. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2012; **13(4)**: 593–606.
- 207 Lee LY, Tong CYW, Wong T, Wilkinson M. New therapies for chronic hepatitis C infection: a systematic review of evidence from clinical trials. *International Journal of Clinical Practice* 2012; **66(4)**: 342–355.
- 208 Bartenschlager R. *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2013. Hepatitis C Virus-Specific Directly Acting Antiviral Drugs: 289-290. .*
- 209 Lam BP, Jeffers T, Younoszai Z, Fazel Y, Younossi ZM. The changing landscape of hepatitis C virus therapy: focus on interferon-free treatment. *Therap Adv Gastroenterol* 2015; **8(5)**: 298–312.
- 210 Murakami E, Niu C, Bao H, Micolochick Steuer HM, Whitaker T, Nachman T *et al.* The mechanism of action of beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine involves a second metabolic pathway leading to beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methyluridine 5'-triphosphate, a potent inhibitor of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; **52(2)**: 458–464.
- 211 Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; **285(5424)**: 110–3.
- 212 Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; **290(5498)**: 1972–1974.
- 213 Lohmann V, Körner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *Journal of Virology* 2001; **75(3)**: 1437–1449.
- 214 Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *Journal of Virology* 2001; **75(10)**: 4614–4624.

- 215 Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G *et al.* Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *Journal of Virology* 2002; **76(8)**: 4008–4021.
- 216 Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM *et al.* Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100(12)**: 7271–7276.
- 217 Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J *et al.* Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *Journal of Medical Virology* 2001; **64(3)**: 334–339.
- 218 Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M *et al.* Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 2003; **125(6)**: 1808–1817.
- 219 Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC *et al.* Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* 2005; **309**: 623–626.
- 220 Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR *et al.* Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; **102(26)**: 9294–9299.
- 221 Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; **103(19)**: 7408–7413.
- 222 Gerold G, Pietschmann T. The HCV life cycle: in vitro tissue culture systems and therapeutic targets. *Digestive Diseases* 2014; **32(5)**: 525–537.
- 223 Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology* 2002; **76(24)**: 13001–13014.
- 224 Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, Penin F, Bartenschlager R. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Journal of Virology* 2003; **77(5)**: 3007–3019.

- 225 Sumpter R, Loo Y-M, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T *et al.* Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *Journal of Virology* 2005; **79(5)**: 2689–2699.
- 226 Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M *et al.* CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* 2007; **81(10)**: 5036–5045.
- 227 Wilson GK, Stamataki Z. In vitro systems for the study of hepatitis C virus infection. *International Journal of Hepatology* 2012; **2012**: 292591.
- 228 Sainz B, Chisari FV. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *Journal of Virology* 2006; **80(20)**: 10253–10257.
- 229 Woerz I, Lohmann V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus replicons: dinosaurs still in business? *Journal of Viral Hepatitis* 2009; **16(1)**: 1–9.
- 230 Barnham KJ, Torres AM, Alewood D, Alewood PF, Domagala T, Nice EC *et al.* Role of the 6-20 disulfide bridge in the structure and activity of epidermal growth factor. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 1998; **7(8)**: 1738–1749.
- 231 Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Experimental Cell Research* 2003; **284(1)**: 2–13.
- 232 Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GAA. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006; **186(1)**: 38–53.
- 233 Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2004; **59(2)**: 21–26.
- 234 Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006; **7(7)**: 505–516.
- 235 Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984; **307(5951)**: 521–527.

- 236 Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R *et al.* ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; **117**(8): 2051–2058.
- 237 Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E *et al.* Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *The EMBO Journal* 1998; **17**(12): 3385–3397.
- 238 Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005; **6**(1): 32–43.
- 239 Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends in Immunology* 2011; **32**(8): 380–387.
- 240 Carpenter G, King L, Cohen S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* 1978; **276**(5686): 409–410.
- 241 Ward CW, Hoyne PA, Flegg RH. Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor. *Proteins* 1995; **22**(2): 141–153.
- 242 Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Molecular Cell* 2003; **11**(2): 507–517.
- 243 Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Experimental Cell Research* 2003; **284**(1): 54–65.
- 244 Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature Reviews Cancer* 2009; **9**(7): 463–475.
- 245 Earp HS, Calvo BF, Sartor CI. The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2003; **114**: 315–333; discussion 333–334.
- 246 Gadella TW, Jovin TM. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *The Journal of Cell Biology* 1995; **129**(6): 1543–1558.

- 247 Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *Journal of Molecular Biology* 2001; **311(5)**: 1011–1026.
- 248 Summerfield AE, Hudnall AK, Lukas TJ, Guyer CA, Staros JV. Identification of residues of the epidermal growth factor receptor proximal to residue 45 of bound epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; **271(33)**: 19656–19659.
- 249 Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *The FEBS Journal* 2010; **277(2)**: 301–308.
- 250 Brantley EC, Benveniste EN. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Molecular Cancer Research: MCR* 2008; **6(5)**: 675–684.
- 251 Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO Journal* 1998; **17(15)**: 4426–4441.
- 252 Batzer AG, Rotin D, Ureña JM, Skolnik EY, Schlessinger J. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Molecular and Cellular Biology* 1994; **14(8)**: 5192–5201.
- 253 Lurje G, Lenz H-J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 2009; **77(6)**: 400–410.
- 254 Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 1993; **73(3)**: 611–620.
- 255 Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 2011; **75(1)**: 50–83.
- 256 Hallberg B, Rayter SI, Downward J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; **269(6)**: 3913–3916.
- 257 Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cellular Signalling* 2001; **13(11)**: 777–785.

- 258 Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica Et Biophysica Acta* 2007; **1773**(8): 1161–1176.
- 259 Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer* 2001; **8**(1): 11–31.
- 260 Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual Review of Biochemistry* 2001; **70**: 281–312.
- 261 Oliva JL, Griner EM, Kazanietz MG. PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors. *Growth Factors* 2005; **23**(4): 245–252.
- 262 Rodrigues GA, Falasca M, Zhang Z, Ong SH, Schlessinger J. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular and Cellular Biology* 2000; **20**(4): 1448–1459.
- 263 Yu J, Wjasow C, Backer JM. Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; **273**(46): 30199–30203.
- 264 Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2002; **2**(7): 489–501.
- 265 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; **307**(5712): 1098–1101.
- 266 Harris TJR, McCormick F. The molecular pathology of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2010; **7**(5): 251–265.
- 267 Theroux SJ, Latour DA, Stanley K, Raden DL, Davis RJ. Signal transduction by the epidermal growth factor receptor is attenuated by a COOH-terminal domain serine phosphorylation site. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; **267**(23): 16620–16626.
- 268 Agazie YM, Hayman MJ. Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular and Cellular Biology* 2003; **23**(21): 7875–7886.

- 269 Haj FG, Verveer PJ, Squire A, Neel BG, Bastiaens PIH. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* 2002; **295(5560)**: 1708–1711.
- 270 Tiganis T, Bennett AM, Ravichandran KS, Tonks NK. Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Molecular and Cellular Biology* 1998; **18(3)**: 1622–1634.
- 271 Mattila E, Pellinen T, Nevo J, Vuoriluoto K, Arjonen A, Ivaska J. Negative regulation of EGFR signalling through integrin- α 1 β 1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nature Cell Biology* 2005; **7(1)**: 78–85.
- 272 Cool DE, Tonks NK, Charbonneau H, Walsh KA, Fischer EH, Krebs EG. cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; **86(14)**: 5257–5261.
- 273 Champion-Arnaud P, Gesnel MC, Foulkes N, Ronsin C, Sassone-Corsi P, Breathnach R. Activation of transcription via AP-1 or CREB regulatory sites is blocked by protein tyrosine phosphatases. *Oncogene* 1991; **6(7)**: 1203–1209.
- 274 Mosinger B, Tillmann U, Westphal H, Tremblay ML. Cloning and characterization of a mouse cDNA encoding a cytoplasmic protein-tyrosine-phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; **89(2)**: 499–503.
- 275 Lorenzen JA, Dadabay CY, Fischer EH. COOH-terminal sequence motifs target the T cell protein tyrosine phosphatase to the ER and nucleus. *The Journal of Cell Biology* 1995; **131(3)**: 631–643.
- 276 Tiganis T, Flint AJ, Adam SA, Tonks NK. Association of the T-cell protein tyrosine phosphatase with nuclear import factor p97. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; **272(34)**: 21548–21557.
- 277 Lam MH, Michell BJ, Fodero-Tavoletti MT, Kemp BE, Tonks NK, Tiganis T. Cellular stress regulates the nucleocytoplasmic distribution of the protein-tyrosine phosphatase TCPTP. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; **276(40)**: 37700–37707.

278 Simoncic PD, Lee-Loy A, Barber DL, Tremblay ML, McGlade CJ. The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Current biology: CB* 2002; **12(6)**: 446–453.

279 Yamamoto T, Sekine Y, Kashima K, Kubota A, Sato N, Aoki N *et al.* The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; **297(4)**: 811–817.

280 Aoki N, Matsuda T. A nuclear protein tyrosine phosphatase TC-PTP is a potential negative regulator of the PRL-mediated signaling pathway: dephosphorylation and deactivation of signal transducer and activator of transcription 5a and 5b by TC-PTP in nucleus. *Molecular Endocrinology* 2002; **16(1)**: 58–69.

281 Persson C, Sävenhed C, Bourdeau A, Tremblay ML, Markova B, Böhmer FD *et al.* Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase. *Molecular and Cellular Biology* 2004; **24(5)**: 2190–2201.

282 Wälchli S, Curchod ML, Gobert RP, Arkinstall S, Hooft van Huijsduijnen R. Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on ‘substrate-trapping’ mutants. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; **275(13)**: 9792–9796.

283 Galic S, Klingler-Hoffmann M, Fodero-Tavoletti MT, Puryer MA, Meng T-C, Tonks NK *et al.* Regulation of insulin receptor signaling by the protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Molecular and Cellular Biology* 2003; **23(6)**: 2096–2108.

284 Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, Neddermann P, Jacobs BL *et al.* NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; **96(10)**: 5533–5538.

285 He Y, Nakao H, Tan S-L, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S *et al.* Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Virology* 2002; **76(18)**: 9207–9217.

- 286 Macdonald A, Chan JKY, Harris M. Perturbation of epidermal growth factor receptor complex formation and Ras signalling in cells harbouring the hepatitis C virus subgenomic replicon. *The Journal of General Virology* 2005; **86**(4): 1027–1033.
- 287 Pei R, Chen H, Lu L, Zhu W, Beckebaum S, Cicinnati V *et al.* Hepatitis C virus infection induces the expression of amphiregulin, a factor related to the activation of cellular survival pathways and required for efficient viral assembly. *The Journal of General Virology* 2011; **92**(10): 2237–2248.
- 288 Menzel N, Fischl W, Hueging K, Bankwitz D, Frentzen A, Haid S *et al.* MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2012; **8**(7): e1002829.
- 289 Min L, He B, Hui L. Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. *Seminars in Cancer Biology* 2011; **21**(1): 10–20.
- 290 Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *The New England Journal of Medicine* 2000; **343**(20): 1467–1476.
- 291 Dinarello CA, Renfer L, Wolff SM. Human leukocytic pyrogen: purification and development of a radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**(10): 4624–4627.
- 292 Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011; **127**(3): 701–721.e1–70.
- 293 Dinarello CA. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Seminars in Immunology* 2013; **25**(6): 389–393.
- 294 Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2011; **22**(4): 189–195.
- 295 Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology* 2009; **27**: 519–550.
- 296 Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine* 1989; **170**(6): 2081–2095.

- 297 Zdanov A, Schalk-Hihi C, Wlodawer A. Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6 Å resolution and a model of a complex with its soluble receptor. *Protein Science* 1996; **5**(10): 1955–1962.
- 298 Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *The Journal of Immunology* 1994; **152**(4): 1821–1829.
- 299 de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of Experimental Medicine* 1991; **174**(4): 915–924.
- 300 de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1991; **174**(5): 1209–1220.
- 301 Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DTY, Doehle B, Papic N *et al.* IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathogens* 2013; **9**(4): e1003330.
- 302 Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1 β via caspase-1-inflammasome complex. *The Journal of General Virology* 2012; **93**(2): 235–246.
- 303 Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; **24**(4): 759–765.
- 304 Helal SF, Gomaa HE, Thabet EH, Younan MA, Helmy NA. Impact of IL-10 (-1082) promoter-single nucleotide polymorphism on the outcome of hepatitis C virus genotype 4 infection. *Clinical Medicine Insights Gastroenterology* 2014; **7**: 19–24.
- 305 Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2002; **42**: 469–499.

- 306 Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; **12**(2): 121–127.
- 307 Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature Reviews Neuroscience* 2007; **8**(11): 895–903.
- 308 Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual Review of Immunology* 2007; **25**: 787–820.
- 309 Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000; **95**(10): 3032–3043.
- 310 Fahey S, Dempsey E, Long A. The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection. *Cellular & Molecular Immunology* 2014; **11**(1): 25–40.
- 311 Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, Moser B, Baggiolini M. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; **90**(8): 3574–3577.
- 312 Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J *et al.* The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; **270**(45): 27348–27357.
- 313 Van Sweringen HL, Sakai N, Tevar AD, Burns JM, Edwards MJ, Lentsch AB. CXC chemokine signaling in the liver: impact on repair and regeneration. *Hepatology* 2011; **54**(4): 1445–1453.
- 314 Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K *et al.* International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological Reviews* 2000; **52**(1): 145–176.
- 315 Townson DH, Liptak AR. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 2003; **1**: 94.
- 316 Becker S, Quay J, Koren HS, Haskill JS. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *The American Journal of Physiology* 1994; **266**(3/1): L278–286.

- 317 Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehler JE, Xue YY *et al.* The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *The Journal of Immunology* 2000; **165**(9): 5269–5277.
- 318 Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* 2007; **39**(1): 50–62.
- 319 Johansson S, Talloen W, Tuefferd M, Darling JM, Scholliers A, Fanning G *et al.* Plasma levels of growth-related oncogene (CXCL1-3) associated with fibrosis and platelet counts in HCV-infected patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2015; **42**(9): 1111–1121.
- 320 Nischalke HD, Berger C, Luda C, Müller T, Berg T, Coenen M *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. *Journal of Hepatology* 2012; **56**(4): 758–764.
- 321 Guitart A, Riezu-Boj J-I, Elizalde E, Larrea E, Berasain C, Aldabe R *et al.* Hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes leads to selection of quasispecies variants, induction of interferon-stimulated genes and NF-kappaB nuclear translocation. *The Journal of General Virology* 2005; **86**(11): 3065–3074.
- 322 Ohri CM, Shikotra A, Green RH, Waller DA, Bradding P. Chemokine receptor expression in tumour islets and stroma in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2010; **10**: 172.
- 323 Matsuo Y, Raimondo M, Woodward TA, Wallace MB, Gill KR, Tong Z *et al.* CXC-chemokine/CXCR2 biological axis promotes angiogenesis in vitro and in vivo in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer Journal International Du Cancer* 2009; **125**(5): 1027–1037.
- 324 Li L, Xu L, Yan J, Zhen Z-J, Ji Y, Liu C-Q *et al.* CXCR2-CXCL1 axis is correlated with neutrophil infiltration and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2015; **34**(1): 129.
- 325 Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; **72**(5): 847–855.

- 326 Kasahara T, Mukaida N, Yamashita K, Yagisawa H, Akahoshi T, Matsushima K. IL-1 and TNF- α induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology* 1991; **74**(1): 60–67.
- 327 DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; **268**(34): 25568–25576.
- 328 Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y *et al.* Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infection and Immunity* 1997; **65**(8): 3218–3224.
- 329 Mastronarde JG, Monick MM, Mukaida N, Matsushima K, Hunninghake GW. Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *The Journal of Infectious Diseases* 1998; **177**(5): 1275–1281.
- 330 Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters* 1992; **307**(1): 97–101.
- 331 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN *et al.* Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *Journal of Virology* 2001; **75**(13): 6095–6106.
- 332 Green J, Khabar KSA, Koo BCA, Williams BRG, Polyak SJ. Stability of CXCL-8 and related AU-rich mRNAs in the context of hepatitis C virus replication in vitro. *The Journal of Infectious Diseases* 2006; **193**(6): 802–811.
- 333 Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T *et al.* Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *Journal of Virology* 2013; **87**(14): 8169–8178.
- 334 Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; **46**(5): 705–716.
- 335 Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**(49): 6853–6866.
- 336 Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; **87**(1): 13–20.

- 337 Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *Journal of Molecular Medicine* 1996; **74(12)**: 749–769.
- 338 Hayden MS, Ghosh S. NF-κB in immunobiology. *Cell Research* 2011; **21(2)**: 223–244.
- 339 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology* 1998; **16**: 225–260.
- 340 Schmitz ML, dos Santos Silva MA, Baeuerle PA. Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF-kappa B. Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; **270(26)**: 15576–15584.
- 341 Ryseck RP, Novotny J, Bravo R. Characterization of elements determining the dimerization properties of RelB and p50. *Molecular and Cellular Biology* 1995; **15(6)**: 3100–3109.
- 342 Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; **25(51)**: 6680–6684.
- 343 Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009; **1(4)**: a000034.
- 344 Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; **276(48)**: 45225–45235.
- 345 Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 1999; **284(5412)**: 309–313.
- 346 Kanarek N, Ben-Neriah Y. Regulation of NF-κB by ubiquitination and degradation of the IκBs. *Immunological Reviews* 2012; **246(1)**: 77–94.
- 347 Shih VF-S, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NFκB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Research* 2011; **21(1)**: 86–102.

- 348 Simonin Y, Vegna S, Akkari L, Grégoire D, Antoine E, Piette J *et al.* Lymphotoxin signaling is initiated by the viral polymerase in HCV-linked tumorigenesis. *PLoS Pathogens* 2013; **9(3)**: e1003234.
- 349 Yu G-Y, He G, Li C-Y, Tang M, Grivennikov S, Tsai W-T *et al.* Hepatic expression of HCV RNA-dependent RNA polymerase triggers innate immune signaling and cytokine production. *Molecular Cell* 2012; **48(2)**: 313–321.
- 350 Lu L, Wei L, Peng G, Mu Y, Wu K, Kang L *et al.* NS3 protein of hepatitis C virus regulates cyclooxygenase-2 expression through multiple signaling pathways. *Virology* 2008; **371(1)**: 61–70.
- 351 Shrivastava S, Mukherjee A, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus induces interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *Journal of Virology* 2013; **87(22)**: 12284–12290.
- 352 Kwon JA, Rho HM. Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 2002; **80(4)**: 445–455.
- 353 Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S, Nabel GJ. Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B. *Nature* 1989; **339(6219)**: 70–73.
- 354 Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; **220(4599)**: 868–871.
- 355 Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; **220(4599)**: 865–867.
- 356 Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. Centers for Disease Control (CDC). *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 1981; **30(21)**: 250–2.
- 357 Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual

men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* *The New England Journal of Medicine* 1981; **305**(24): 1425–1431.

358 Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N *et al.* What to call the AIDS virus? *Nature* 1986; **321**(6065): 10.

359 UNAIDS. Report of the global AIDS epidemic: FACT SHEET 2014.
http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20150714_FS_MDG6_Report_en.pdf.

360 World Health Organization. HIV/AIDS-Fact Sheet N°360. Stand Juli 2015.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>.

361 Epidemiologisches Bulletin-Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health.HIV-Infektionen/AIDS. *Robert Koch Institut: Statistisches Bundesamt* 2015; **45**: 476–490.

362 Luciw P. Human immunodeficiency viruses and their replication. *In: Fields BN (ed), Virology 3rd ed, Lippincott-Raven, Philadelphia* 1996; : 1881–1952.

363 Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2011; **1**(1): a006841.

364 Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; **20**(16): W13–23.

365 Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF *et al.* Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985; **313**(6000): 277–284.

366 Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology* 1999; **285**(1): 1–32.

367 Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 1991; **5**(6): 617–637.

368 Broder CC, Collman RG. Chemokine receptors and HIV. *Journal of Leukocyte Biology* 1997; **62**(1): 20–29.

369 Knight SC, Macatonia SE, Patterson S. HIV I infection of dendritic cells. *International Reviews of Immunology* 1990; **6**(2/3): 163–175.

- 370 Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; **312(5996)**: 763–767.
- 371 Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T *et al.* T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; **312(5996)**: 767–768.
- 372 Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurre R, Haigwood N, Sekaly RP *et al.* Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* 1992; **176(4)**: 1099–1106.
- 373 Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA *et al.* HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; **381(6584)**: 667–673.
- 374 Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; **272(5263)**: 872–877.
- 375 Vandekerckhove L, Verhofstede C, Vogelaers D. Maraviroc: perspectives for use in antiretroviral-naïve HIV-1-infected patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; **63(6)**: 1087–1096.
- 376 Shang L, Yue L, Hunter E. Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *Journal of Virology* 2008; **82(11)**: 5417–5428.
- 377 Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 1997; **235(2)**: 179–190.
- 378 Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway, Immunologie. Aus dem Englischen übersetzt von Lothar Seidler und Ingrid Haußer-Siller. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2009. Teil I: Grundbegriffe der Immunologie: 3-12. .*
- 379 King KY, Goodell MA. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nature Reviews Immunology* 2011; **11(10)**: 685–692.

- 380 Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 2002; **20**: 197–216.
- 381 Beutler B. Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2003; **43**: 609–628.
- 382 Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* 2009; **30(8)**: 1482–1491.
- 383 Rutherford MS, Witsell A, Schook LB. Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *Journal of Leukocyte Biology* 1993; **53(5)**: 602–618.
- 384 Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical Reviews in Immunology* 2012; **32(6)**: 463–488.
- 385 Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993; **81(6)**: 1607–1613.
- 386 Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological Reviews* 2008; **222**: 155–161.
- 387 Lee MT, Kaushansky K, Ralph P, Ladner MB. Differential expression of M-CSF, G-CSF, and GM-CSF by human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 1990; **47(3)**: 275–282.
- 388 Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of Experimental Medicine* 2013; **210(7)**: 1283–1299.
- 389 Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology Today* 1995; **16(1)**: 21–26.
- 390 Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; **33(5)**: 657–670.
- 391 Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; **90(2)**: 271–284.

- 392 El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Experimental & Molecular Medicine* 2009; **41(4)**: 217–225.
- 393 Leto TL, Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006; **8(9-10)**: 1549–1561.
- 394 Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology* 2007; **28(8)**: 340–345.
- 395 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; **303(5663)**: 1532–1535.
- 396 De Buck M, Berghmans N, Pörtner N, Vanbrabant L, Cockx M, Struyf S *et al.* Serum amyloid A1 α induces paracrine IL-8/CXCL8 via TLR2 and directly synergizes with this chemokine via CXCR2 and formyl peptide receptor 2 to recruit neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 2015. doi:10.1189/jlb.3A0315-085R.
- 397 Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA *et al.* IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *The Journal of Immunology* 1995; **155(3)**: 1428–1433.
- 398 Das ST, Rajagopalan L, Guerrero-Plata A, Sai J, Richmond A, Garofalo RP *et al.* Monomeric and dimeric CXCL8 are both essential for in vivo neutrophil recruitment. *PLoS ONE* 2010; **5(7)**: e11754.
- 399 Frelin L, Brenndörfer ED, Ahlén G, Weiland M, Hultgren C, Alheim M *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)**: 1475–1483.
- 400 Brenndörfer ED, Weiland M, Frelin L, Derk E, Ahlén G, Jiao J *et al.* Anti-tumor necrosis factor α treatment promotes apoptosis and prevents liver regeneration in a transgenic mouse model of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; **52(5)**: 1553–1563.
- 401 Brenndörfer ED. *Modulation der intrahepatischen Signalvermittlung durch die NS3/4A Protease/Helikase des Hepatitis C Virus-Inaugural-Dissertation*. 2008.<http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-11785/Dissertation%20Brenndörfer.pdf>.

- 402 Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology* 2007; **96**: 41–101.
- 403 Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1951; **62(3)**: 293–300.
- 404 Sambrook, J., Russel, D. W. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed.. 1989; **Cold Spring Harbor Laboratory Press**.
- 405 Hanahan D. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* 1983; **166**: 557–580.
- 406 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227(5259)**: 680–685.
- 407 Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985; **33(1)**: 103–119.
- 408 Invitrogen, One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Product Information Sheet, Doc. Part No. C4040.pps, Pub. No. MAN0001491, Rev. A.0, page 1-4, Catalog Number: C4040-10, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Copyright 2015.
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshottop10_chemcomp_man.pdf.
- 409 Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; **282**: 615–7.
- 410 Nakabayashi H, Taketa T, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research* 1982; **42**: 3858–3863.
- 411 Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G *et al*. Persistent and Transient Replication of Full-Length Hepatitis C Virus Genomes in Cell Culture. *Journal of Virology* 2006; **76(8)**: 4008–4021.
- 412 Sutton DW, Chen PC, Schmid-Schönbein GW. Cell separation in the buffy coat. *Biorheology* 1988; **25(4)**: 663–673.

- 413 Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1968; **21(97)**: 77–89.
- 414 Böyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology* 1976; **5(5)**: 9–15.
- 415 Ferrante A, Thong YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *Journal of Immunological Methods* 1980; **36(2)**: 109–117.
- 416 Healthcare G. Ficoll-Paque PLUS: For in vitro isolation of lymphocytes. 2007; **71-7167-00 AG**: 1–16.
- 417 Skoog WA, Beck WS. Studies in the fibrinogen, dextran, and phyto- hemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 1956; **11**: 436–454.
- 418 Holter H, Moller KM. A substance for aqueous density gradients. *Experimental Cell Research* 1958; **15**: 631–632.
- 419 Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; **11(2)**: 231–238.
- 420 MACS Miltenyi Biotec, MACS Technology. The gold standard. Now and forever. Miltenyi Biotec GmbH, Copyright 2013.
<http://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Cell%20Separation/MACSTechnology%20Brochure.ashx>.
- 421 Berridge MV, Tan AS, McCoy K, Wang R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. Biochemica. *Biochemica* 1996; **4**: 14–19.
- 422 Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 2005; **11**: 127–152.
- 423 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1986; **51(1)**: 263–73.

- 424 Saiki R, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **239(4839)**: 487–91.
- 425 Lang R, Heeg K. Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR. *Inflammopharmacology* 1998; **6(4)**: 297–309.
- 426 Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics* 2001; **2**: 110–119.
- 427 Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBioChem* 2001; **2**: 239–245.
- 428 Baulcombe DC. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* 1999; **2**: 109–113.
- 429 Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RHA. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 1999; **99**: 133–141.
- 430 Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L *et al.* The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999; **99**: 123–132.
- 431 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**: 806–811.
- 432 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; **409**: 363–366.
- 433 Sledz CA, Williams BRG. RNA interference and double-stranded- RNA-activated pathways. *Biochemical Society Transactions* 2004; **32**: 952–956.
- 434 Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001; **107**: 309–321.
- 435 Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; **95**: 15502–15507.

- 436 Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; **95**: 14687–14692.
- 437 Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. In vivo activity of nuclease- resistant siRNAs. *RNA* 2004; **10**: 766–771.
- 438 Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 1991; **19(9)**: 2499.
- 439 Bradford M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; **72**: 248–254.
- 440 Bio-Rad, Protein Assay, 1-800-424-6723, page 1-24. http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf.
- 441 Rauhut MM. Chemiluminescence from Concerted Peroxide Decomposition Reactions. *Accounts of Chemical Research* 1969; **2**: 80–87.
- 442 Hadd AG, Seeber A, Birks JW. Kinetics of Two Pathways in Peroxyoxalate Chemiluminescence. *Journal of Organic Chemistry* 2000; **65**: 2675–2683.
- 443 Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Review of Scientific Instruments* 1972; **43**: 404–409.
- 444 Steen HB. Light scattering measurement in an arc lamp-based flow cytometer. *Cytometry* 1990; **11**: 223–230.
- 445 Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CB. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 2012; **64(2)**: 109–130.
- 446 BD Biosciences FACSCanto II. A proven research platform for maximum reliability and the highest quality results. 2012; **23-13638-00**: 1–14.
- 447 LSM 510 META Mikroskopie von Carl Zeiss. http://fcam.uni-frankfurt.de/files/documents/LSM510Confocor_d.pdf.

- 448 Grundlagen der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie von Carl Zeiss.
http://www.cai.hhu.de/fileadmin/redaktion/Fakultaeten/Mathematisch-Naturwissenschaftliche_Fakultaet/CAI/Literatur/Die_konfokale_Laser_Scanning_Mikroskopie.pdf.
- 449 Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; **8(9)**: 871–4.
- 450 Van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters* 1971; **15(3)**: 232–236.
- 451 Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 2005; **51(12)**: 2415–8.
- 452 Abcam, ab100504-EGF Human ELISA Kit, Instructions for Use, Version 4, Last Updated 05 August 2014, abcam, Copyright 2014.
[http://www.abcam.com/ps/products/100/ab100504/documents/ab100504%20EGF%20Human%20ELISA_Kit%20v4%20\(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/100/ab100504/documents/ab100504%20EGF%20Human%20ELISA_Kit%20v4%20(website).pdf).
- 453 eBioscience, Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!® (2nd Generation), Catalog Number: 88-8086, eBioscience, Inc. Affymetrix, Copyright 2000.
<http://www.ebioscience.com/media/pdf/tds/88/88-8086.pdf>.
- 454 R&D Systems, Proteome Profiler Array, Human Chemokine Array Kit, Catalog Number ARY017, R&D Systems, Copyright 2014.
<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/ary017.pdf>.
- 455 Mahy BWJ, Kangro HO, Hierholzer JC, Killington RA, Stokes A. *Virology Methods Manual*. Academic Press, 1996.
- 456 Bai F, Kong K-F, Dai J, Qian F, Zhang L, Brown CR *et al*. A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *The Journal of Infectious Diseases* 2010; **202(12)**: 1804–1812.
- 457 Khabar KS, Al-Zoghaibi F, Al-Ahdal MN, Murayama T, Dhalla M, Mukaida N *et al*. The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha. *The Journal of Experimental Medicine* 1997; **186(7)**: 1077–1085.

- 458 Solis M, Wilkinson P, Romieu R, Hernandez E, Wainberg MA, Hiscott J. Gene expression profiling of the host response to HIV-1 B, C, or A/E infection in monocyte-derived dendritic cells. *Virology* 2006; **352**(1): 86–99.
- 459 Spitzley S. *Mechanismus und funktionelle Relevanz der Hemmung der IL-1 -induzierten IkappBzeta -Expression durch das Hepatitis C Virus*. 2014.http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-35266/Dissertation_Sanaz%20Spitzley.pdf.
- 460 Eisenbürger S. *Interferenz des Hepatitis C Virus mit der EGF Rezeptor Familie unter besonderer Berücksichtigung der Neuregulin 1-vermittelten Herabregulation des ErbB3 Rezeptors*. 2014.http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-31949/Dissertation_Sabine%20Eisenbürger.pdf.
- 461 Stindt S, Cebula P, Albrecht U, Keitel V, Schulte Am Esch J, Knoefel WT *et al*. Hepatitis C Virus Activates a Neuregulin-Driven Circuit to Modify Surface Expression of Growth Factor Receptors of the ErbB Family. *PloS One* 2016; **11**(2): e0148711.
- 462 Burke SJ, Lu D, Sparer TE, Masi T, Goff MR, Karlstad MD *et al*. NF-κB and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2014; **306**(2): E131–149.
- 463 Joo JH, Jetten AM. NF-kappaB-dependent transcriptional activation in lung carcinoma cells by farnesol involves p65/RelA(Ser276) phosphorylation via the MEK-MSK1 signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2008; **283**(24): 16391–16399.
- 464 Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T, Casola A, Brasier A *et al*. Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* 2007; **81**(1): 309–318.
- 465 Van Bossuyt H, Wisse E. Cultured Kupffer cells, isolated from human and rat liver biopsies, ingest endotoxin. *Journal of Hepatology* 1988; **7**(1): 45–56.
- 466 Zhu W-W, Guo J-J, Guo L, Jia H-L, Zhu M, Zhang J-B *et al*. Evaluation of midkine as a diagnostic serum biomarker in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2013; **19**(14): 3944–3954.
- 467 García-Álvarez M, Berenguer J, Guzmán-Fulgencio M, Micheloud D, Catalán P, Muñoz-Fernandez MÁ *et al*. High plasma fractalkine (CX3CL1) levels are associated with severe

liver disease in HIV/HCV co-infected patients with HCV genotype 1. *Cytokine* 2011; **54**(3): 244–248.

468 Lee H-C, Sung S-SJ, Krueger PD, Jo Y-A, Rosen HR, Ziegler SF *et al.* Hepatitis C virus promotes T-helper (Th)17 responses through thymic stromal lymphopoietin production by infected hepatocytes. *Hepatology* 2013; **57**(4): 1314–1324.

469 Zekri A-RN, Bahnassy AA, Mohamed WS, Alam El-Din HM, Shousha HI, Zayed N *et al.* Dynamic interplay between CXCL levels in chronic hepatitis C patients treated by interferon. *Virology Journal* 2013; **10**: 218.

470 Craigen JL, Yong KL, Jordan NJ, MacCormac LP, Westwick J, Akbar AN *et al.* Human cytomegalovirus infection up-regulates interleukin-8 gene expression and stimulates neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 1997; **92**(1): 138–145.

471 Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB journal* 1990; **4**(2): 176–187.

472 Knievel J. *Einfluss Leberregenerations-relevanter Faktoren auf die Translation und Chemokinsynthese in murinen Hepatozyten*. 2014.<http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-33488/Dissertation%20Judith%20Knievel.pdf>.

473 White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA *et al.* Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; **273**(17): 10095–10098.

474 Li X, Yao W, Yuan Y, Chen P, Li B, Li J *et al.* Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut* 2015. doi:10.1136/gutjnl-2015-310514.

475 Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2011; **11**(8): 519–531.

476 Altstaedt J, Kirchner H, Rink L. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology* 1996; **89**(4): 563–568.

- 477 FitzGerald MJ, Webber EM, Donovan JR, Fausto N. Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth & Differentiation* 1995; **6(4)**: 417–427.
- 478 Murayama T, Kuno K, Jisaki F, Obuchi M, Sakamuro D, Furukawa T *et al.* Enhancement human cytomegalovirus replication in a human lung fibroblast cell line by interleukin-8. *Journal of Virology* 1994; **68(11)**: 7582–7585.
- 479 Lüttichau HR. The cytomegalovirus UL146 gene product vCXCL1 targets both CXCR1 and CXCR2 as an agonist. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; **285(12)**: 9137–9146.
- 480 Winnock M, Salmon-Céron D, Dabis F, Chêne G. Interaction between HIV-1 and HCV infections: towards a new entity? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; **53(6)**: 936–946.
- 481 Sherman KE, O'Brien J, Gutierrez AG, Harrison S, Urdea M, Neuwald P *et al.* Quantitative evaluation of hepatitis C virus RNA in patients with concurrent human immunodeficiency virus infections. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; **31(10)**: 2679–2682.
- 482 Bonacini M, Govindarajan S, Blatt LM, Schmid P, Conrad A, Lindsay KL. Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. *Journal of Viral Hepatitis* 1999; **6(3)**: 203–208.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Johannes Bode, unter dessen Betreuung diese Dissertation angefertigt wurde. Ich bedanke mich für seine Unterstützung, die Möglichkeit zur konstruktiven Diskussion, für seine hilfreichen Anregungen und für sein Vertrauen, dass er mir während meiner gesamten Dissertation zukommen ließ.

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

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Häussinger für die Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe sowie für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in seiner Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Ralf Bartenschlager danke ich für die Bereitstellung der unterschiedlichen HCV Zellkulturmodelle und für die Unterstützung bei der Etablierung des HCV Infektionssystems.

Ich danke allen Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie, insbesondere der AG Bode für die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt Nadja Triller für die gute Vorarbeit sowie Sabine Stindt und Maike Talajlo für die Unterstützung, die anregenden Diskussionen, die Hilfsbereitschaft und für die schöne und lustige Zeit im Labor.

Meinen größten Dank möchte ich meinen Eltern Marina und Klaus Gröpper aussprechen, die auch in schwierigen Zeiten immer an mich geglaubt haben, für mich da waren, mich in all den Jahren liebevoll und tatkräftig unterstützt und mich immer wieder motiviert haben. Ohne eure Fürsorge und Unterstützung, würde ich heute nicht da stehen, wo ich stehe. Von Herzen Danke.

Im Besonderen danke ich dem Mann meines Lebens Denis Döll, der in jeder Lebenssituation in seiner ganz besonderen herzlichen Weise für mich da ist, mir zur Seite steht, mir den nötigen Halt und die notwendige Unterstützung gibt. Danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hast. Ich bin so froh, dass ich einen so besonderen Menschen wie dich, an meiner Seite habe.

Ein herzlicher Dank gilt der besten Schwester der Welt Verena Hörsch sowie Simone, Jens und Roberto Döll, die mir immer liebevoll und moralisch zur Seite gestanden haben und mir mit lustigen Aktivitäten die notwendige Ablenkung ermöglichten.

Zum Schluss danke ich meiner besten Freundin Sophia Bode, die immer an meiner Seite ist und mich in allen meinen Schritten und Wegen unterstützt hat. Danke, dass du immer für mich da bist und mit mir durch dick und dünn gehst.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die hier vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 26. April 2016

Christina Gröpper