

Aus der
I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

ANALYSE VON PATHOMECHANISMEN IM RAHMEN DER
HEPATITIS C INFEKTION

Etablierung eines Modells der viralen Hepatitis C Infektion *in vitro* -
Vektorielle Expression von viralen Hepatitis C Proteinen in Zellkultur

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Torben Michael Kehl
aus Kassel

Mainz, 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturdiskussion	2
2.1	Hepatitis C	2
2.1.1	Epidemiologie und Klinik	2
2.1.2	Diagnostik und Therapie	4
2.2	Hepatitis C Viren	5
2.2.1	Struktur des Hepatitis C Virus	5
2.2.2	Gene und Genprodukte des Hepatitis C Virus	6
2.2.3	Lebenszyklus und Replikation des Hepatitis C Virus	8
2.2.4	Systeme zum Studium des Hepatitis C Virus	10
2.3	Apoptose und Hepatitis C	13
2.3.1	Apoptose im Überblick	13
2.3.2	MCL-1 und Apoptose	15
2.3.3	Apoptosemechanismen bei Hepatitis C Infektion	16
2.4	Das Adeno-Vektor-System	17
2.4.1	Adenoviren	18
2.4.2	Genstransfer mit Adenoviren	19
2.4.3	Vereinfachte Konstruktion adenoviraler Vektoren	20
3	Material und Methoden	22
3.1	Materialien	22
3.2	Bakterienkultur	22
3.2.1	Bakterien und Plasmide	22
3.2.2	Präparation der Bakterien-Starterkultur	22
3.2.3	Präparation kompetenter Bakterien	22
3.3	Zellkultur	24
3.3.1	Zelllinien	24
3.3.2	Kultivieren der Zellen	24
3.3.3	Splitten der Zelllinien	25
3.3.4	Zählen der Zellen	25
3.3.5	Präparation und Kultivierung der primären murinen Hepatozyten	26
3.4	Klonierungstechniken	26
3.4.1	Transformation in die kompetenten Bakterien	26
3.4.2	Plasmidpräparationen	27
3.4.3	Restriktionsverdau von Plasmiden	28
3.4.4	Analyse in Agarose-Gelen	29
3.4.5	Gelpräparation von DNA aus Agarose-Gelen	30
3.5	Produktion adenoviraler Konstrukte	31
3.5.1	Klonierung der Shuttle-Plasmide	31
3.5.2	Homologe Rekombination	35
3.5.3	Sequenzanalyse der klonierten Adenovektoren	35

3.5.4	Transfektion von rekombinanten Konstrukten in Zelllinien	37
3.6	Nachweis der viralen Replikationsprodukte	37
3.6.1	Transduktion von Zellen mit adenoviralen Konstrukten	37
3.6.2	Anfärbung adenoviral-transduzierter Zellen und Virus-Titration	38
3.6.3	Proteinisolation zur Analyse	39
3.6.4	Proteinanalyse mit Western Blot	39
3.7	Untersuchung adenoviral-transduzierter Zellen	42
3.7.1	Mikroskopische Analyse	42
3.7.2	Färbung von Zellkernen	42
3.7.3	Untersuchung der Zellviabilität mit MTT-Assay	42
3.7.4	Wachstumsassay adenoviral-transduzierter Zellen	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Rekombinante Adenoviren	44
4.1.1	Klonierungen der Shuttle-Plasmide	44
4.1.2	Generierung Insert-tragender Adenokonstrukte	44
4.1.3	Analyse Insert-tragender Adenokonstrukte	45
4.1.4	Amplifikation und Isolierung von Adenoviren	49
4.2	Nachweis und Effizienz des adenoviralen Vektortransfers	50
4.2.1	Färbung und Virustiterbestimmung	50
4.2.2	Transduktionseffizienz adenoviraler Vektoren	50
4.2.3	Expression viraler Proteine nach Transduktion	57
4.2.4	Nachweis viraler Proteine nach Transduktion in humanen Zellen	58
4.3	Beeinflussung der Apoptose nach adenoviraler Transduktion	60
4.3.1	Viabilitätsmessung nach Transduktion	60
4.3.2	Wachstum der Zellen nach Transduktion	61
4.3.3	MCL-1 Regulation nach viraler Infektion	63
5	Diskussion	66
5.1	Rekombinante Adenoviren	66
5.1.1	Analyse der klonierten Shuttle-Plasmide	66
5.1.2	Analyse Insert-tragender Adenokonstrukte	66
5.2	Effizienz des adenoviralen Vektortransfers	67
5.2.1	Adenoviral transduzierte Zellen	67
5.2.2	Proteinexpression nach Transduktion	68
5.2.3	Proteinexpression in humanen Zellen	69
5.3	Apoptoseregulation nach adenoviraler Transduktion	70
5.3.1	Viabilität nach Transduktion	70
5.3.2	Wachstum nach Transduktion	71
5.3.3	Regulation von MCL-1	71
5.4	Sind Adenovirale Vektoren ein geeignetes Transduktionssystem?	72
5.4.1	Überexpression und Steuerbarkeit des Vektorsystems	72
5.4.2	Selektivität des Vektortransfers	73
5.4.3	Vergleich mit HCV-Replikationssystemen <i>in vitro</i>	74
5.4.4	Bewertung und Ausblick	75
6	Zusammenfassung	77
	Literaturverzeichnis	78

Anhang	92
A Hersteller und Geräte	92
B Danksagung	95
C Tabellarischer Lebenslauf	96

Tabellenverzeichnis

3.1	Reagenzien und Lösungen	23
3.2	Bakterien	23
3.3	Nährmedien für Bakterien	23
3.4	Plasmide	24
3.5	Zellkulturmedium	25
3.6	PMH-Isolationspuffer	26
3.7	PMH-Zellkulturmedium	27
3.8	Kommerzielle Hilfsmittel	28
3.9	Restriktionsenzyme	29
3.10	Übersicht der eingesetzten Adeno-Konstrukte	35
3.11	Adeno-Rapid-Titer-Kit Materialien	39
3.12	Proteinlyse-Puffer	39
3.13	Western Blot Materialien	41
3.14	Antikörper für Western Blot	41
A.1	Technische Hilfsmittel	94

Abbildungsverzeichnis

2.1	Hepatitis C Prävalenz	3
2.2	Hepatitis C Struktur	6
2.3	Hepatitis C Genom	7
2.4	Hepatitis C Lebenszyklus / Replikation	9
2.5	HCV Genom im Vergleich zu den Replikonsystemen	11
2.6	Signaltransduktionspfade der Apoptose	14
2.7	Adenovirus	18
3.1	Bakterienwachstum	25
3.2	DNA-Marker VII	30
3.3	AdEasy-System	32
3.4	pAdShuttle-CMV	33
3.5	pShCMV-Core	34
3.6	pShCMV-NS5a	34
3.7	pAdEasy-1	36
3.8	Dual Color	40
4.1	Shuttle-Plasmide - Gel-Elektrophorese	45
4.2	Adenokonstrukte AdE-Core und AdE-NS5a	46
4.3	PacI-Analyse	47
4.4	EcoRV-Analyse	48
4.5	Sequenzanalyse von HCV-Core und HCV-NS5a	49
4.6	Adeno-Rapid-Titer-Kit	51
4.7	GFP-Expression in verschiedenen Zellen	52
4.8	Auswertung der GFP-Expression in verschiedenen Zellen	53
4.9	DAPI-Kernfärbung nach Transduktion	54
4.10	Auswertung der DAPI-Kernfärbung nach Transduktion	55
4.11	DAPI-Kernfärbung nach Transduktion mit AdE-Core u. AdE-NS5a	56
4.12	Auswertung der DAPI-Kernfärbung nach Transduktion mit AdE-Core u. AdE-NS5a	57
4.13	AdGFP Western Blot aus PMH	58
4.14	AdE-Core Western Blot aus PMH	59
4.15	AdE-NS5a Western Blot aus PMH	59
4.16	AdGFP Western Blot aus Huh7	60
4.17	AdE-NS5a Western Blot aus Huh7	61
4.18	MTT-Assay in Huh7 Zellen und PMH	62
4.19	Wachstumsassay in HepG2 und Huh7 Zellen	64
4.20	AdE-Core - MCL-1 Blot	65
4.21	AdE-NS5a - MCL-1 Blot	65

Abkürzungsverzeichnis

Abk. Abkürzung

Abx. Antibiotika

Adenokonstrukte Kurzform für: Adenovirale Vektorkonstrukte

AdE-Core Adenovirales Vektorkonstrukt mit einklonierten HCV-Core

AdE-NS5a Adenovirales Vektorkonstrukt mit einklonierten HCV-NS5a

Ak Antikörper

APS Ammoniumpersulfat

BCL-2 B-Zell-Lymphoma 2

BSA bovines Serumalbumin

bp Basenpaare

CBBG Coomassie-Brillant-Blau G-250

CD cluster of differentiation

cDNA komplementäre DNA

CIP Calf Intestine Phosphatase

Core Kernprotein des HCV

DAPI 4, 6-Diamidino-2-phenylindol

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

EDTA Ethylen-diamin-tetraessigsäure

ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FCS fetales Kälberserum

GFP grün fluoreszierendes Protein

gg. gegen

h Stunde

HBV humanes Hepatitis-B-Virus

HCV humanes Hepatitis-C-Virus

Hek-293 humane embryonale Nierenzelllinie

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HepG2 Humane Leberzellkarzinom-Zelllinie

HRP Meerrettichperoxidase (horseradish)

Huh7 Humane Hepatoma-Zelllinie

IE Internationale Einheit

IFM Immunfluoreszenzmikroskop

IFU infektiöse Einheit (infectious units)

IRES innere ribosomale Eintrittsstelle (internal ribosomal entry site)

ITR invertierte Wiederholungsstelle (inverted repeat)

JNK c-Jun N-terminale Kinasen

kb Kilobasenpaare

kD Kilodalton

MCL-1 myeloische Zelleukämie Sequenz 1 (myeloid cell leukemia sequence 1)

MCS multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)

Min Minute

MOI Vielfachheit der Infektion (multiplicity of infection)

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NS5a Nichtstrukturprotein 5a des HCV

ORF offener Leserahmen (open reading frame)

PAGE Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

PEG-IFN pegyliertes Interferon

PFA Paraformaldehyd

PMH primäre Maushepatozyten

PKM Phasenkontrastmikroskop

(r)ER (raues) endoplasmatisches Retikulum

RT Raumtemperatur

RNA Ribonukleinsäure

SDS Natriumdodecylsulfat

sec Sekunde

TGF transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)

TNF Tumornekrose-Faktor (tumor necrosis factor)

TRAIL Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)

Tris Tris-Hydroxymethylaminomethan

ÜN über Nacht

UPM Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

Die virale Hepatitis C ist eine bedeutende Infektionskrankheit des Menschen und weltweit eine der häufigsten Ursachen für chronische Hepatitiden, Leberzirrhose, hepatocelluläre Karzinome und Lebertransplantationen. Die Übertragung erfolgt meist parenteral. Protektive Vakzine zur Immunisierung stehen derzeit nicht zur Verfügung. Die modernen, antiviralen Kombinationstherapien sind trotz vieler Erfolge hinsichtlich ihrer Ansprechraten begrenzt und kostenintensiv.

Das Hepatitis C Virus (HCV) wurde 1989 identifiziert. In den vergangenen Jahren gelang es das Genom des Virus zu sequenzieren und zu analysieren. Der Virus-aufbau und die viralen Genprodukte des HCV konnten beschrieben werden. Trotzdem sind weite Teile der viralen Pathomechanismen nicht grundlegend verstanden. Heutzutage wird mit Hilfe verschiedener Systeme versucht das Hepatitis C Virus näher zu erforschen. Es existieren funktionelle cDNA-Klone für Infektionen im Tiermodell (Schimpansen), retrovirale Pseudopartikel, verschiedene Replikonsysteme und neuerdings komplett-genomische replikative Zellkultur-Systeme. Trotz dieser vielen verschiedenen Replikationsmodelle für das Hepatitis C Virus ist es bisher nicht gelungen, die Funktion aller viraler Proteine und die Replikation des Virus zu beschreiben.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden adenovirale Vektoren mit Hilfe eines von B. VOGELSTEIN, T.-C. HE ET AL. [1] entwickelten Vektorsystems über homologe Rekombination konstruiert. Diese adenoviralen Vektoren tragen als Transgene die Genomanteile des Hepatitis C Virus. So kann eine Überexpression der HCV Proteine Core und NS5a in Zellkultur und primären Zellen erzielt werden. So können folgende Ziele dieser Dissertation genannt werden:

- Ein adenovirales Vektor-Expressionssystem für HCV-Genomanteile zu etablieren.
- Die Effizienz des adenoviralen Vektortransfers zu beschreiben.
- Die Bildung viraler Proteine in Leberzellen *in vitro* nachzuweisen
- Rückschlüsse auf die Funktion der viralen Proteine im Apoptosemechanismus von Hepatomazellen aufzuzeigen:
- Wachstum und Viabilität von Zellen nach Transduktion mit Adenokonstrukten.
- Regulation des anti-apoptotischen Protein MCL-1 nach adenoviraler Transduktion.

2 Literaturdiskussion

2.1 Hepatitis C

2.1.1 Epidemiologie und Klinik

Weltweit hatten nach Angaben der WHO bisher mehr als 170 Millionen Menschen, ungefähr 3% der Weltbevölkerung, Kontakt mit dem Hepatitis C Virus. Von diesem können 100 bis 130 Millionen als chronisch infiziert gelten [2] [3]. Die meisten Fälle von Hepatitis C werden aus Afrika und Asien gemeldet. Die Prävalenzen einzelner Länder variieren mit 0,1 bis über 10% deutlich (vgl. Abb. 2.1 auf der nächsten Seite). In Deutschland leben derzeit ca. 400.000 bis 500.000 Virusträger. Obwohl Deutschland mit 0,4% eine vergleichsweise geringe Prävalenz besitzt, ist die Zahl der Infizierten dennoch beträchtlich [4]. Die Inzidenz ist in Deutschland regional sehr unterschiedlich, durchschnittlich wird mit 5-6 Erstdiagnosen pro 100.000 Einwohner pro Jahr gerechnet. Auffällig ist, dass die meisten Erstdiagnosen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren gestellt werden; in dieser Altersgruppe dominieren die männlichen Patienten deutlich [4].

Die Hepatitis C breitete sich zum Ende des 20. Jahrhunderts rasant aus. Die Übertragung erfolgt in der Regel parenteral, vor allem durch intravenös verabreichte Drogen in den Industrieländern und über den Gebrauch von unsterilen Injektionsutensilien in den Entwicklungsländern [5]. Vor der Entdeckung des Virus 1989 hat vor allem der Gebrauch von anderen kontaminierten Blutprodukten zur Verbreitung von HCV beigetragen. Auch heute spielen verunreinigte Injektionsbestecke in einigen Ländern noch immer eine wesentliche Rolle bei der Verbreitung der Infektion. Die sexuelle Übertragung ist zwar berichtet worden [6], spielt im Vergleich zur Hepatitis B eine wesentlich kleinere Rolle. Das Risiko der Übertragung von HCV scheint bei gleichzeitiger bestehender Infektion mit HIV vergleichsweise höher zu sein [7].

Derzeit sind 7 verschiedene Genotypen des HCV bekannt, sie unterscheiden sich in bis zu 25% ihrer Nukleotidsequenzen [8] [5]. Vereinbarungsgemäß muss das Genom von Viren des gleichen Genotyps in mindestens 72% der Nukleotidsequenz übereinstimmen. Die 6 Genotypen werden in ca. 30 weitere Subtypen untergliedert, sie werden mit Buchstaben hinter der Genotyp-Zahl (z.B. Genotyp 1a oder 2b) gekennzeichnet.

Die Hepatitis C verläuft in der Regel chronisch. Die Inkubationszeit des Virus beträgt 2 bis 6 Wochen in Einzelfällen bis zu 6 Monaten, dann kommt es zu Symptomen einer viralen Infektion. Die Diagnose einer akuten Hepatitis C wird selten gestellt, da ca. 80% der Patienten lediglich unspezifische Symptome wie Bauchschmer-

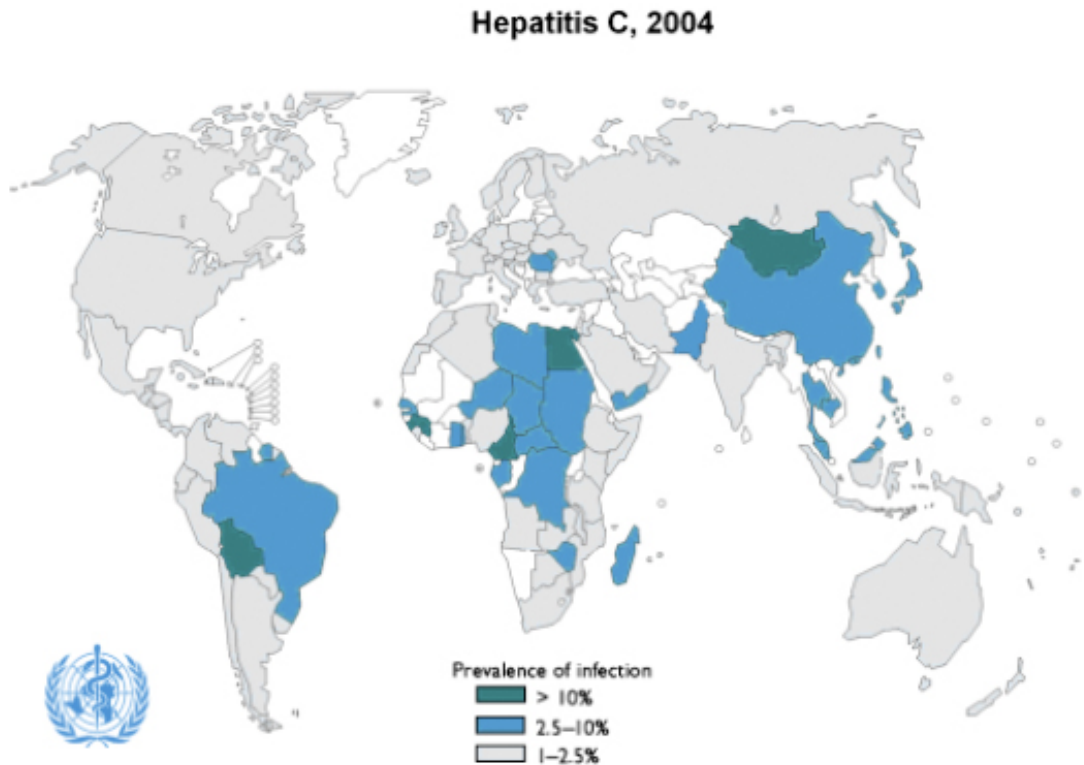


Abbildung 2.1: Weltweite Prävalenz der Hepatitis C im Jahre 2004. (Grafik und dargestellte Zahlen entstammen den Daten der WHO)

zen, Übelkeit, Erbrechen u.w. entwickeln. Eine chronische Hepatitis C ist definiert als chronisch-nekroinflammatorische Leberentzündung mit Virusnachweis über 6 Monate. Der Krankheitsverlauf von HCV -Infizierten unterscheidet sich somit im Hinblick auf die Chronifizierung der Infektion deutlich von anderen viralen Hepatitiden. 50-80% der HCV-Infektionen verlaufen chronisch. Im Vergleich andere virale Hepatitiden: Hepatitis A: 0% chronische Verläufe, Hepatitis B: 5-10%, Hepatitis D: bis 70% (Infektion nur möglich in Kombination mit HBV), Hepatitis E: 0%. Der Verlauf einer fulminanten Hepatitis C durch eine akute Leberzellnekrose verbunden mit den Zeichen des Lebererfalls wird selten (unter 1% der Patienten) beobachtet [9] [10].

Neben der Infektion der Leber wird das Hepatitis C Virus auch mit einigen extrahepatischen Manifestationen in Verbindung gebracht: Kryoglobulinämie-assoziierte Arthralgien / Vaskulitiden, Glomerulonephritis, Polyneuropathie, Raynaud-Syndrom, Lymphoproliferation (inkl. Gammopathien und Non-Hodgkin-Lymphom), Porphyria cutanea tarda, Lichen ruber planus, entzündliche Herzmuskelerkrankungen und einige weitere [11] [12].

27% aller Leberzirrhosen und in 25% aller hepatozellulären Karzinome weltweit liegt ätiologisch eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus zu Grunde [13]. Die Hepatitis C ist damit neben der Hepatitis B der größte Risikofaktor für die Entwicklung

einer Leberzirrhose und die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms und somit von grosser klinischer und gesundheitsökonomischer Relevanz [14].

2.1.2 Diagnostik und Therapie

Die Hepatitis C wird bei potentiellen Patienten über den Nachweis von Hepatitis C Antikörpern im Blut diagnostiziert. Desweiteren besteht die Möglichkeit die HCV-RNA im Serum mittels ELISA-Test (der 3. bzw. 4. Generation) nachzuweisen [15]. Einem positiven ELISA schließt sich eine molekularbiologische Diagnostik durch Nukleinsäuretests (NAT) an [16]. Dazu wird die virale RNA mit Hilfe der Real-time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zu amplifiziert. Eine Alternative ist die Target Mediated Amplification (TMA), welche die höchste Sensitivität (Nachweisgrenze von 5-10 IE/mL) besitzt [17]. Zur Komplettierung der viralen Diagnostik sollte eine Genotypisierung des HCV vorgenommen werden. Desweiteren sollten zur Überprüfung der Leberfunktion die Leberenzym-Werte (die Transaminasen ALT, AST sowie die γ -GT) eruiert werden. Neben Anamnese und klinischer Untersuchung ist auch der Ausschluss einer Ko-Infektion mit anderen Hepatitis Viren von grosser Bedeutung. Patienten mit fehlender Immunität gegenüber Hepatitis A und B sollten nach aktuellen Empfehlungen geimpft werden. (Siehe dazu auch die aktuellen Leitlinien¹ der AWMF)

Nach derzeitigem Stand der Forschung wird empfohlen, die Dauer und Art der Therapie von dem Genotyp der Hepatitis C Virus abhängig zu machen [15]. Der HCV-Genotyp 1, der die geringste Ansprechrate zeigt, soll nach Empfehlungen der AWMF mit einer Kombinationstherapie aus pegylierten Interferon α (an Polyethylenglykol (PEG) konjugiertes Interferon: PEG-IFN) und Ribavirin (ein Nukleosidanaloga) für 48 Wochen behandelt werden, wobei PEG-IFN einmal pro Woche sub cutan injiziert wird und Ribavirin zweimal täglich per os körpergewichtsbezogen 800-1200mg eingenommen werden sollte. Die Ansprechraten betragen 42-51% [18] [19]. Bei Patienten mit intolerablen Nebenwirkungen gegen Ribavirin wird eine Monotherapie aus PEG-IFN empfohlen [20].

Die Genotypen 2 und 3 sollten mit einer PEG-IFN Ribavirin Kombinationstherapie für 24 Wochen behandelt werden. Die Ansprechraten einer solchen Kombinationstherapie über 48 Wochen liegen bei 76-82% [18]. Die akute WIN-R-Studie [21] konnte zeigen, dass eine Therapieverkürzung von 48 auf 24 Wochen die Ansprechraten nicht beeinträchtigt, sodass derzeit eine 24-wöchige Kombinationstherapie für die Genotypen 2 und 3 diskutiert wird.

HCV infizierte Patienten mit den Genotypen 4, 5 und 6 können mit der Standardkombinationstherapie vergleichsweise effektiv behandelt werden. Ansprechraten bis zu

¹ Hepatitis C - Leitlinien der Arbeitsgemeinschaften der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften - AWMF:
<http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/ll/021-012.htm>

65% können bei den Genotypen 4 und 6 erwartet werden. Bei dem Genotyp 4 wird die Therapiedauer entsprechend dem virologischen Ansprechen individualisiert [22]. Die Ansprechraten von Genoytp 5 sind bei einer Therapiedauer von 48 Wochen ähnlich der Ergebnisse von Genotyp 3.

Als unabhängige positive Prädiktoren für einen dauerhaften Therapieerfolg können folgende Faktoren genannt werden: Vollständige Therapie (Dauer, Dosis, PEG-IFN und Ribavirin), Infektion mit HCV-Genotyp 2 oder 3, niedrige Viruslast, rascher Abfall der Viruslast, jüngeres Alter, niedrige γ -GT-Werte, keine fortgeschrittene Fibrose oder Zirrhose, fehlende Steatose [23].

Weitere, effektive Substanzen zur Therapie der HCV-Infektion und insbesondere die Entwicklung eines prophylaktischen Impfstoffes sind wünschenswert, derzeit aber noch nicht absehbar (vgl. Abs. 2.2.4). Aus diesen Gründen kommt neben der stetigen Weiterentwicklung der Therapien der Infektionsprophylaxe, gerade bei Risikogruppen, eine große Bedeutung zu, um die weltweite Verbreitung des Virus einzudämmen.

2.2 Hepatitis C Viren

Das Hepatitis C Virus wurde 1989 erstmals durch Isolierung der spezifischen Virus-DNA aus Patientenseren mit der damals bezeichneten Non-A, Non-B Virushepatitis [24] nachgewiesen. In den folgenden Jahren gelang es zahlreiche wissenschaftliche Erkenntnisse über das Virus zu sammeln. Die folgenden Abschnitte sollen die Struktur, das Genom, die Genprodukte, die Pathogenitätsfaktoren und die Replikationsmechanismen des Hepatitis C Virus beschreiben. Außerdem werden Systeme zur Erforschung des HCV vorgestellt.

2.2.1 Struktur des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist ein Hepacivirus, welches zur Familie der Flaviviridae gehört [25]. Zur Familie der Flaviviridae gehören außerdem die Gruppe der Flaviviren (das Dengue Virus u.a.) und die Gruppe der Pestiviren (das klassische Schweinepestvirus u.a.).

Das Hepatitis C Virus ist elektronenmikroskopisch äußerst schwierig darzustellen, wahrscheinlich wegen der strukturellen Instabilität und der Empfindlichkeit gegenüber Präparationsmethoden. Man nimmt an, dass die Gesamtgröße des Virus ungefähr 40-70 nm beträgt [26] [27].

Vermutet wird, dass es sich beim Hepatitis C Virus in Analogie zu anderen Flaviviren um ein sphärisches Viruspartikel handelt, das eine Lipidhülle besitzt, in die zwei virale Glykoproteine E1 und E2 in oligomeren Komplexen zusammen eingelagert sind [23]. Die strukturbildenden Proteine des Hepatitis C Virion sind demnach die Glykoproteine E1, E2 und das Core-Protein. E1 und E2 verankern das Nukleokapsid

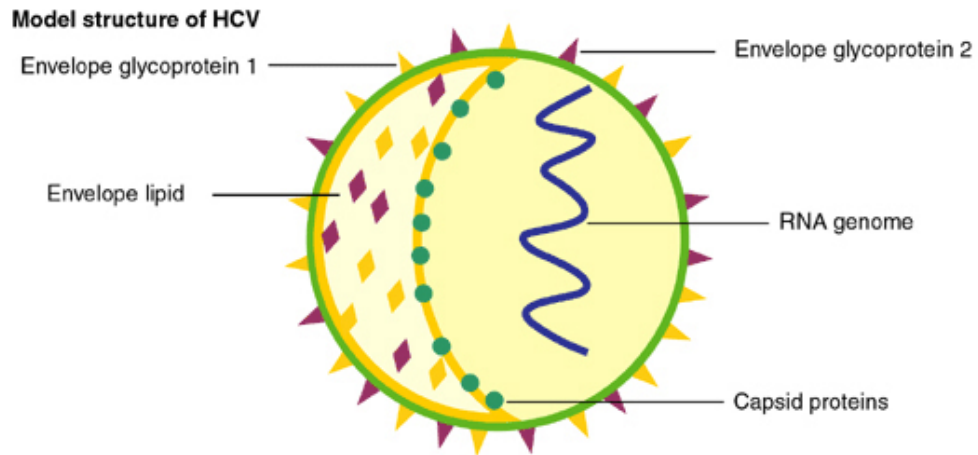


Abbildung 2.2: Modellstruktur des Hepatitis C Virus. Eine Lipidmembran bildet gemeinsam mit den verankerten Glykoproteinen E1 und E2 die Virushülle (Envelope). Das Core-Proteine (Capsid protein) bildet das Nukleokapsid, indem sich das RNA-Genom des HCV befindet. (Grafik entnommen aus Expert Reviews in Molecular Medicine 2003, ©Cambridge University Press)

des Virus in einer doppelschichtigen Lipidmembran, die sich von der Wirtszelle ableitet. Das Nukleokapsid wiederum wird von Kopien des Core-Proteins gebildet. Innerhalb des Nukleokapsid befindet sich die ultrakomprimierte Einzelstrang-RNA mit der Erbinformation des Virus [25] [26]. Eine Modellstruktur des Hepatitis C Virus ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Das HCV zirkuliert in verschiedenen Formen im infizierten Wirt. Oft ist es an wirtseigene Lipoproteine (LDL und VLDL) assoziiert, an Immunglobuline gebunden oder als freies Virion [28]. Dies erklärt auch die heterogene, aber geringe Dichte von ca. 1,10 g/ml.

2.2.2 Gene und Genprodukte des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist ein Einzelstrang-RNA-Virus mit positiver Polarität (ss(+)RNA). Das HCV besteht aus ungefähr 9600 Nukleotiden und hat damit das größte Genom aller bekannten Hepatitisviren [29].

Die Variabilität des Hepatitis C Genoms ist vergleichsweise hoch. Sie beruht auf der hohen Fehlerrate der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die keine Fehlerkorrekturfunktion besitzt.

Charakteristisch für die Familie der Flaviviridae ist ein Einzelstrang-RNA-Genom mit nur einem einzigen offenen Leserahmen (ORF), der ein sogenanntes encodiertes Vorläufer-Polyprotein kodiert [25] [23]. Der für Flaviviridae typische offene Leserahmen, die 5'-nichtkodierende Region, wird als interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) bezeichnet [26] [25].

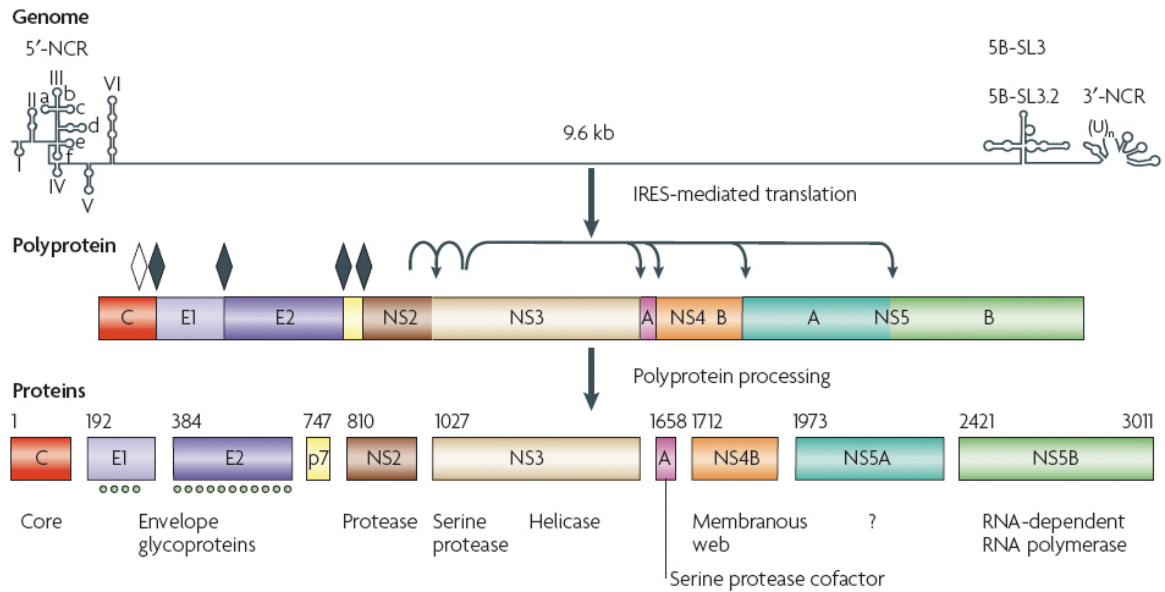


Abbildung 2.3: Genom des Hepatitis C Virus. Darunter das kodierte Vorläufer-Polyprotein mit Schnittstellenmarkierung für zelluläre (Rauten) und virale Proteasen (Pfeile) Darunter die viralen Proteine mit Informationen zur Größe (Aminosäurenlänge) und Funktion. (Abb. aus D. MORADPOUR ET AL. [26])

Das Polyprotein enthält am aminoterminalen Bereich die Strukturproteine, das Nucleokapsid bildende Core Protein und die beiden Envelope bildenden Glykoproteine E1 und E2. Für die Ausschleusung des gebildeten Viruspartikel aus der Wirtszelle sind das p7 und das Nichtstrukturprotein NS2 beteiligt. Die Prozessierung des Polyproteins in die einzelnen Proteine wird durch zelluläre Signalasen und virale Proteasen NS2 und NS3 vermittelt. Weitere Nichtstrukturproteine sind das NS4a Polypeptid, ein Kofaktor der NS3 Serinprotease, das NS4b für das membranöse Netz, das NS5a mit nicht eindeutig geklärter Funktion (s.u.) und schließlich das NS5b-Protein, eine RNA-abhängige RNA Polymerase für die virale Replikation. Die Abbildung 2.2 zeigt das Genom und die kodierte Proteine des HCV. Im Folgenden sollen die HCV-Proteine Core und NS5a, die Gegenstand der Untersuchungen für diese Arbeit waren, genauer beschrieben werden.

Das Core Protein ist das erste Strukturprotein, welches vom ORF des HCV kodiert wird. Es bildet das Nucleokapsid des Virus. HCV-Core ist 21 kD gross und enthält 173-179 Aminosäuren [30]. HCV-Core wird posttranslational von einer Signalpeptidase C-terminal gespalten. N-terminal besitzt es eine hydrophile Domäne D1, durch einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren. Diese Domäne ist sowohl an der RNA Bindung als auch an der Homo-Oligomerisation beteiligt. Core ist ein α -helikales Protein, welches während der Replikation am zellulären endoplasmatischen Retikulum und am membranösen Netz zu finden ist. Zudem ist Core an der Bindung an Lipoproteine beteiligt und somit an der Ausschleusung des Viruspartikels aus der

Zelle [26]. Es wird angenommen, dass Core mit dem Lipidstoffwechsel des Hepatozyten interagiert und so an der Ausbildung einer Steatosis hepatis beteiligt ist [31].

Das Nichtstrukturprotein NS5a ist ein Phosphoprotein, das basisphosphoryliert 56 kD und hyperphosphoryliert 58 kD schwer ist. Die zelluläre Proteinkinase CKI ist für den Phosphorylierungsprozess verantwortlich [32]. Das Protein besitzt eine N-terminale Membranankerdomäne, die aus einer amphiphilen α -Helix besteht. Die α -Helix hat eine hydrophobe, Tryptophan-reiche Region, die in die zytosolische Membranen eingebettet ist und wahrscheinlich an Proteininteraktionen, die wichtig für den viralen Replikationskomplex sind, beteiligt ist [33]. Es gibt verschiedene Theorien, in welcher Form NS5a am Replikationszyklus des HCV beteiligt ist, jedoch ist die Gesamtfunktion noch nicht eindeutig geklärt. Sicherheit besteht darin, dass NS5a für die Virusreplikation benötigt wird und dabei die RNA bindet. Darüberhinaus wird es auch bei der Virusmontage nach der Replikation benötigt. Man geht davon aus, dass NS5a eine entscheidende Rolle beim Umschalten von der RNA-Replikation auf die Virusmontage zukommt [23]. Im Rahmen der Pathogenese der Hepatitis C wird angenommen, dass NS5a die körpereigene Interferon-Antwort hemmt und so an der Chronifizierung der Virusinfektion beteiligt ist [34] [35].

Die Funktionen von HCV-Core und HCV-NS5a beim Apoptosemechanismus werden im Abschnitt 2.3.3 dargestellt.

2.2.3 Lebenszyklus und Replikation des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus befällt neben den eigentlichen Zielzellen, den Hepatozyten, auch B-Zellen, dendritische Zellen und andere Zellen des Immunsystems. Über verschiedene Rezeptoren dockt das Virus an die Zellmembran an. CD81, ein Oberflächenprotein auf vielen verschiedenen Zellen, der LDL-Rezeptor, der Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-B1) sowie der Claudin-Rezeptor sind Ziele des Hepatitis C Virus [26].

Nach dem Andocken des HCV an die Zellmembran über die oben genannten Oberflächenrezeptoren gelangt das Virus durch Clathrin-vermittelte Endozytose in Endosomen verpackt in die Zelle [36]. Ein niedriger pH in den Endosomen scheint bedeutend für die Freisetzung des Virus in das Zytosol der Zelle zu sein [37] [38]. Dort beginnt der Prozess des *uncoating*, das Virus wird von seiner Hülle befreit und das Genom gelangt in das Cytosol. Das als mRNA direkt translatierbare HCV-Genom gelangt an die Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER). Dort beginnt umgehend die virale Proteinsynthese. Um die Menge viraler RNA zu erhöhen, schreibt die RNA-abhängige RNA-Polymerase (NS5b) den RNA-Plus-Strang in einen RNA-Minus-Strang um. Diese synthetisierten Minus-Stränge werden dann zur Translation des viralen Genoms genutzt. Anschließend erfolgt die Synthese der viralen Proteine mit Hilfe des Proteinsynthese-Apparats der Wirtszelle am rER [26]. In HCV-replizierenden Zellkultursystemen konnten im Elektronenmikroskop auffällige Membranstrukturen detek-

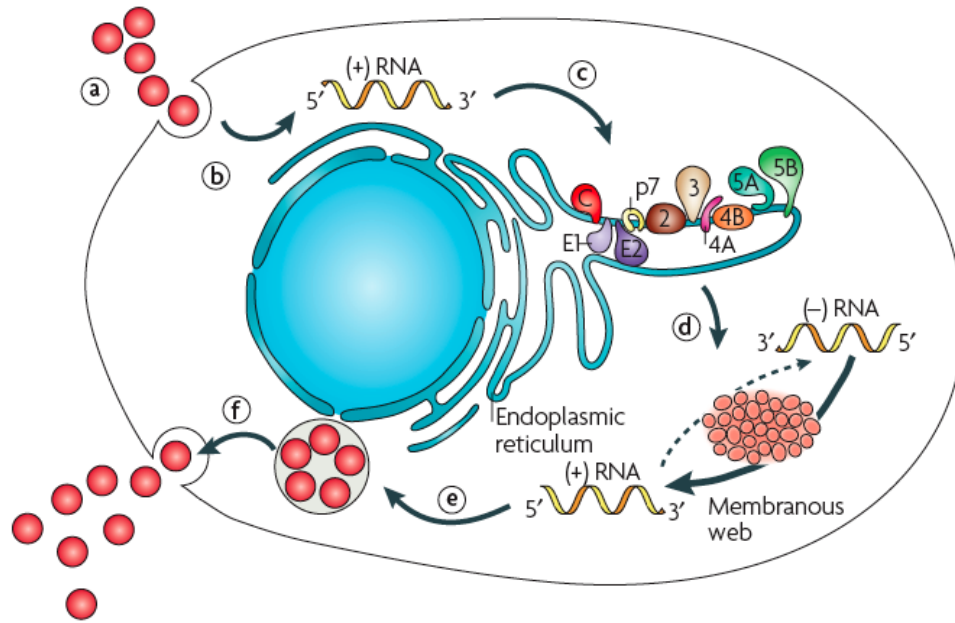


Abbildung 2.4: Lebenszyklus und Replikation des Hepatitis C Virus. a) Virus bindet an die Zelle, b) *uncoating* (s. Text), c) IRES (internal ribosome entry site) abh. Translation und Polyproteinprozessierung nach Bildung des *membranous web*, d) Verpacken u. Organisieren, e) Reifung, f) Freisetzung (Abb. aus D. MORADPOUR ET AL. [26])

tiert werden, die als HCV-Replikationskomplexe angesehen werden. Diese als *membranous web* (membranöses Netz) bezeichneten Strukturen werden durch das hydrophobe Membranprotein NS4B initialisiert [39] [40]. Es wird diskutiert, dass sich das *membranous web* von den Membranen des rER ableitet und daraus gebildet wird [26] [39]. Die Initiation der Translation wird durch die IRES am 5' Ende der RNA und weitere Translationsinitiationsfaktoren (eIF-2, eIF-3 u.w.) vermittelt.

Zuerst wird ein großes Polyprotein synthetisiert, das sofort danach in die 10 viralen Proteine prozessiert wird. Das amino-terminale Drittel des Polyproteins enkodiert die viralen Strukturproteine Core, E1 und E2. Nach der Strukturregion folgt ein integrales Membranprotein Ns1 (p7). Der Rest des Polyproteins enkodiert die Nichtstrukturproteine. Eine Signalpeptidase schneidet zwischen Core und E1, E1 und E2, E2 und NS1 sowie NS1 und NS2. Die restlichen Nichtstrukturproteine werden von der NS2/3 Peptidase prozessiert.

Nach erfolgter Prozessierung gelangen die Hüllproteine E1 und E2 in das Lumen des ER, lagern sich in die Membran ein und werden glykosyliert. Das Core-Protein lagert sich von außen in die ER-Membran und bindet die virale mRNA. Dann kommt es zum *budding*, der Verpackung des Core-RNA-Komplexes und zur Abschnürung des HCV-Partikels in das ER-Lumen. Die neugebildeten Hepatitis C Viren verlassen durch Sekretion über den Golgi-Apparat die Zelle und sind dann bereit weitere Zielzellen zu infizieren.

2.2.4 Systeme zum Studium des Hepatitis C Virus

Seit der Entdeckung des Hepatitis C Virus wurde in verschiedenen Ansätzen versucht das Genom, die Struktur, die Replikation und die Pathogenität des Virus zu erforschen. Dabei bildeten sich mehrere Forschungsmodelle heraus. Mehrere *in vitro* Zell-Replikationssysteme: subgenomisch durch BARTENSCHLAGER ET AL und komplett-genomisch durch KATO ET AL. Ein *in vitro* Pseudopartikelsystem nach BARTOSCH ET AL. Ein *in vivo* Infektionsmodell an Schimpansen erstmals beschrieben durch die Arbeitsgruppe von RICE ET AL. Zudem verschiedene Systeme mit transgenen Mäusen. Im Folgenden sollen die wesentlichen Charakteristika der HCV-Modelle aufgezeigt werden und die spezifischen Vor- und Nachteile erörtert werden.

Nach der Entdeckung des HCV konnten viele Arbeitsgruppen zeigen, dass sich humane Hepatozyten und Hepatozyten von Schimpansen *in vitro* mit dem HCV-positiven Patientenserum infizieren liessen [41]. Bei anderen Zelltypen, zum Beispiel Lymphozyten, war diese Infektion ungleich schwieriger [42]. Die Bestrebungen molekulare HCV-Klone *in vitro* zu replizieren, scheiterten an den zahlreichen Mutationen im Genom des Hepatitis C Virus. So entstand die Idee der Konstruktion von sogenannten Consensus-Genomen (abgekürzt: con1), welche auf einer Mastersequenz basieren, die einen grossen Teil der HCV-Genome weltweit repräsentieren [42]. BARTENSCHLAGER ET AL erkannten als erste die ineffektive Replikation der HCV-Klone [43]. Um dieses Problem zu umgehen, entwickelte die Arbeitsgruppe ein subgenomisches Replikonsystem auf Basis eines HCV con1 Genoms, bei dem die Sequenzen für die Strukturproteine (Core, E1, E2) und p7 durch eine Sequenz für eine Neomycin-Resistenz ersetzt wurden, vgl. dazu auch die Abbildung 2.5. Zusätzlich fügten sie eine Initiationsstelle für die Translation der replikationswirksamen HCV-Nichtstrukturproteine als zweite IRES (internal ribosome entry site) ein (vgl. dazu Abschnitt 2.2.3). Diese Replikons wurden dann in humanen Hepatoma-Zelllinien unter entsprechender antibiotischer Selektion propagiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich Replikons eigenständig amplifizierten und stabil replizieren lassen [43] [44]. Daneben wurden auch sogenannte Zellkultur-abhängige Mutationen beobachtet, die nach Klonierung in Wildtyp-Consensus-Sequenzen zu einer erhöhten Amplifikationsrate *in vitro* führten [45] [46]. Der Mechanismus dafür konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Darüber hinaus ist es möglich Reportergene, z.B. eine Luciferase-Gen, mit in das Replikon einzuklonieren. Mit Hilfe eines solchen Reporters ist es möglich, Replikationsraten unter verschiedenen Bedingungen (Induktion oder Inhibition durch unterschiedliche Stoffe) zu bestimmen [46] [47]. Insgesamt gesehen, ist das Replikonsystem ein sehr wertvolles Werkzeug, um die Genprodukte und die Replikation des HCV zu erforschen und neue antivirale Medikamente hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu testen. Beschränkt ist das Replikonsystem dadurch, dass es nicht das komplette HCV-Genom enthält und damit

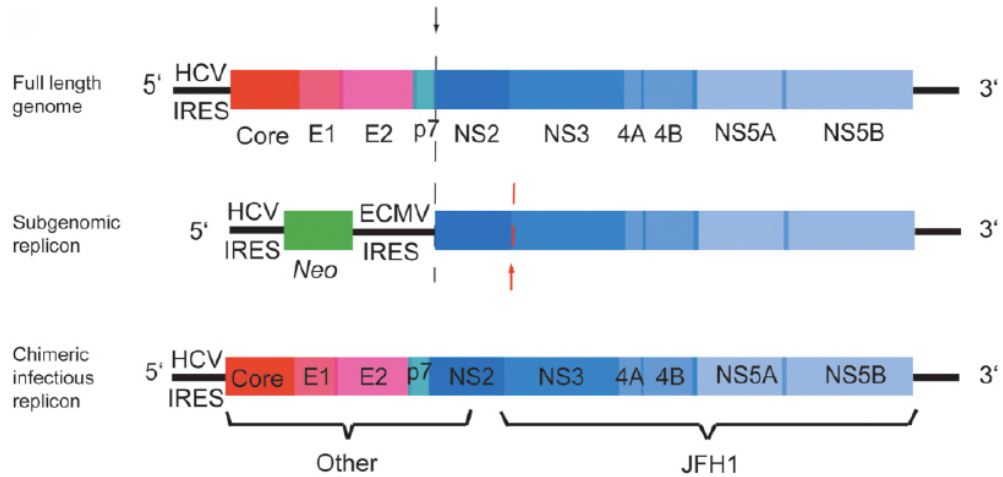


Abbildung 2.5: HCV Genom im Vergleich zu den Replikonsystemen. oben: Genom des HCV, mitte: Struktur des subgenomischen Replikonsystems, unten: Struktur des komplett-genomischen Replikonsystems abgeleitet vom JFH1-Genom (japanische fulminante Hepatitis) (Abb. aus BOONSTRA ET AL. [42])

Effekte der Strukturproteine nicht ermittelt werden können. Ausserdem sind Mutationen im Replikonsystem nötig, um hohe Replikationsraten zu erzielen. Diese Mutationen verändern das Genom nachhaltig. So sind selbstständig replizierende Replikons nicht in der Lage infektiöse virale Partikel freizusetzen, was als eine mögliche Konsequenz dieser Mutationen angesehen wird [42].

Die beschriebenen Nachteile des subgenomischen Replikonsystems führten zur Konstruktion von neuen Replikonsystemen. Die Arbeitsgruppe um KATO ET AL entwickelte ein subgenomisches Replikonsystem auf Basis des als JFH-1 bezeichneten Klons, ursprünglich isoliert aus dem Serum eines japanischen Patienten mit einer fulminanten Hepatitis C [48]. Dieses Replikon zeigte stabile, hohe Replikationsraten im Vergleich zu den früheren subgenomischen Replikons ohne die bisher notwendigen Mutationen. Das neue JFH-1-Replikonsystem wurde auf die komplette Genomsequenz erweitert und enthält nun die HCV-Strukturproteine [27]. Seit 2005 wurden chimäre Replikons, auf JFH-1-Genom basierend, für alle 7 bekannten Genotypen entwickelt [42]. Das komplett-genomische Replikonsystem hat die Anwendungsmöglichkeiten deutlich erweitert, da es stabile hohe Replikationszahlen zeigt und alle HCV-Genprodukte damit untersucht werden können. Gleichzeitig ist aber nicht verstanden wieso sich das JFH-1-Genom im Vergleich zu anderen Genomen wesentlich besser in den Zellen repliziert.

Ein weiteres zellbasiertes System ist das HCV-Pseudopartikel-System. Dabei handelt es sich um Retro- oder Lentivirale Virushüllen auf deren Oberfläche die HCV Glykoproteine E1 und E2 eingefügt wurden [49] [50]. Diese viralen Pseudopartikel sind hochinfektiös und können die virale Bindung und den Eintritt in die Wirtszelle imitieren. Das Pseudopartikelsystem hat sich als sehr effektiv in der Erforschung des Virus-

eintritts in die Zelle erwiesen. Viele, für den Virus-Eintritt wichtige, Rezeptoren und Zellmembranmoleküle konnten so identifiziert werden. Es sind die Glykosaminoglykane, LDL-Rezeptoren, DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 - grabbing non-integrin), L-SIGN (liver-specific intercellular adhesion molecule 3 - grabbing non-integrin) und Claudin-Rezeptor -1, -6 und -9 [51], außerdem das humane, membranständige Occludin als Virus-Eintrittsfaktor [52]. Nachteil dieser Systeme ist jedoch die Beschränkung auf Huh7-Hepatoma-Zelllinien. Einflüsse des Wirtsorganismus und dessen abwehrenden Immunsystems können damit kaum untersucht werden. Die *in vitro* Produktion infektiöser Hepatitis C Viren ist bisher nur mit dem JFH-1-Replikonsystem gelungen. Zukünftige *in vitro* Systeme werden versuchen die Probleme und Beschränkungen der aktuellen Systeme zu lösen.

Die Erforschung der Interaktionen von Hepatitis C Virus und dem Wirtsorganismus gelang bisher am erfolgreichsten im Tiermodell. Dabei sind Schimpansen (PAN TROGLODYTES) bis dato neben dem Menschen die einzige bekannte Spezies, die sich persistierend mit Hepatitis C Viren infizieren können. Seit Beginn der Forschung an der anfänglich Non-A, Non-B-, später HCV- bezeichneten Virushepatitis spielten Schimpansen daher eine wichtige Rolle. Die endgültige Identifikation des Hepatitis C Virus gelang 1989 im Plasma von Schimpansen mit hohen infektiösen Virustitern [24]. Die Hepatitis C beim Schimpansen verläuft in den Grundzügen sehr ähnlich wie beim Menschen. Es werden ebenfalls nekroinflammatorische Läsionen in der Leber und ein Anstieg der Serumtransaminasen beobachtet. Jedoch ist der Verlauf beim Schimpansen wesentlich milder, es kommt fast nie zur Leberfibrose oder Leberzirrhose in Folge der chronischen Leberinfektion [53]. Hepatozelluläre Karzinome sind bei Schimpansen mit chronischer Hepatitis C Infektion nicht eindeutig beschrieben worden [42]. Die Immunabwehr gegen das HCV ist im Schimpansen-Modell genau untersucht worden. Es konnte eine frühe, starke Immunantwort in der Leber mit Hochregulation von Interferon-stimulierenden Genen (ISGs) festgestellt werden [54] [55]. Ebenso fand sich eine Hochregulation von zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen nach 5-9 Wochen im peripheren Blut und nach 6-12 Wochen in der Leber [56] sowie das Auftreten von HCV-spezifischen T-Zellen zusammen mit der intrahepatischen Expression von Interferon- γ [54] [55] [56]. Wichtig ist das Schimpansen-Modell neben der Evaluierung von antiviralen Therapieformen, bei der Entwicklung von möglichen Vakzinen gegen das HCV. Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den vergangenen Jahren unterschiedliche Ansätze der Vakzinierung bei Schimpansen vorgestellt [57] [58]. Einige dieser Vakzine haben die Phase 1 bzw. Phase 2 der klinischen Studien erreicht, dennoch gibt es, wegen der starken genetischen Heterogenität des HCV und dessen Neigung zur Reinfektion nach erneuter Exposition, bisher nicht überwindbare Hürden bei der Entwicklung eines endgültigen Impfstoff gegen das Virus. Zudem bestehen (trotz der genannten, zahlreichen wissenschaftlichen Erkenntnisse zum Hepatitis C Virus und dessen Virus-Wirts-Interaktionen) in vielen

Ländern erhebliche ethische Vorbehalte an Menschenaffen zu forschen, zumal diese vom Aussterben bedroht sind.

Die ethischen Bedenken, aber auch der hohe Kostenaufwand bei einer vergleichsweise geringen Anzahl an Affen haben zu Überlegungen über andere Tiermodelle geführt. Kleinere Tiere, zum Beispiel klassische Labortiere wie Mäuse oder Ratten, lassen sich nicht chronisch mit Hepatitis C Viren infizieren. Jedoch wurden in den vergangenen Jahren einige transgene Mausmodelle entwickelt, die HCV-Proteine überexprimieren und somit Aspekte der Pathogenese des HCV nachahmen [59]. Daneben existieren chimäre Mausmodelle mit heterotropen, humanen Leber-Grafts [60] und Leber-Repopulation mit humanen Hepatozyten [61], zudem ein Modell mit immun-toleranten Ratten [62]. Nachteil dieser Systeme ist jedoch die Tatsache, dass diese Kleintiere kein natürlicher Wirt des HCV sind und daher die Replikationswege durch die verschiedenen Modelle nur simuliert werden können. Ausserdem bestehen strukturelle Unterschiede zwischen murinen und humanen Hepatozyten, sodass sich Ergebnisse hier nicht eins zu eins übertragen lassen.

2.3 Apoptose und Hepatitis C

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein zentraler Prozess in der Elimination von Viren und viral befallener Zellen aus dem Organismus. Auch bei der Infektion mit Hepatitis C Viren spielt diese Funktion eine wichtige Rolle. In den folgenden Abschnitten soll die Apoptose auf Basis aktueller Publikationen in ihren Grundzügen erläutert werden, dabei wird vor allem die Funktion des anti-apoptotischen Proteins MCL-1 näher beschrieben. MCL-1 wurde im Rahmen dieser Dissertation im Zusammenhang mit der adenoviralen Transduktion untersucht. Im Abschnitt 2.3.3 wird auf den Zusammenhang von Apoptose bei Hepatitis C Infektion eingegangen.

2.3.1 Apoptose im Überblick

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und spielt in der Entwicklung von Organismen eine wichtige Rolle. Die Apoptose ist oftmals auch ein wichtiger Bestandteil pathophysiologischer Prozesse, bei verschiedenen infektiösen und nicht-infektiösen Erkrankungen [64].

Die Apoptose wurde erstmals 1972 beschrieben [65]. Sie ist definiert als eine kontrollierte Selbstdestruktion einer Zelle, ausgelöst durch äußere und innere Reize auf die Zelle. Die Zelle ändert im Laufe des Apoptoseprozesses ihre äußere Erscheinung: Es kommt zur Vesikelbildung, zu Veränderungen der Chromatinstrukturen, zur Zellkernfragmentation, zum Lösen der Zelle aus dem adhaerenten Zellverband und schließlich zum Schrumpfen der Zelle mit einer abschließenden Phagozytose. Ursächlich für den programmierten Zelltod ist eine Enzymkaskade in der Zelle, die durch ex-

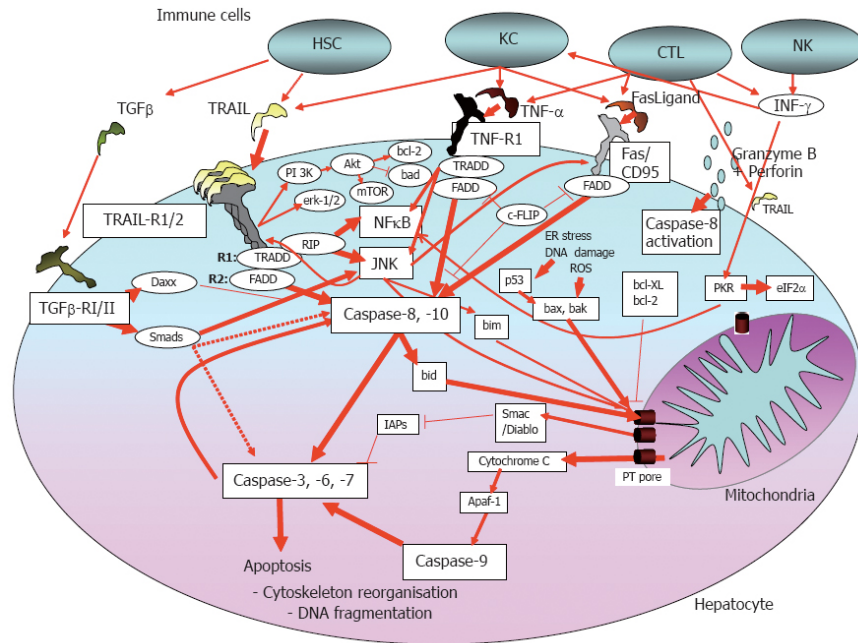


Abbildung 2.6: Signaltransduktionspfade der Apoptose in Hepatozyten. Dargestellt sind die wichtigsten Zytokine zur extrinsischen Apoptose-Induktion (TGF- β , TRAIL, TNF- α , CD95) und der intrinsische Apoptose-Weg über das Mitochondrium mittels Freisetzung von Cytochrom-c. Die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 werden über beide Wege aktiviert und führen letztlich zur Apoptose. (Abbildung aus R. FISCHER ET AL [63])

trinsische Faktoren (z.B. Tumornekrosefaktor (TNF) und andere Zytokine wie TRAIL oder FasL/CD95) oder intrinsische Faktoren (z.B. Cytochrom-c freigesetzt aus den Mitochondrien) ausgelöst werden kann [64]. Gerade bei dem extrinsischen Weg spielt das Immunsystem eine große Rolle, weil verschiedene Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Granulozyten, Kupfferzellen oder natürliche Killerzellen) und des erworbenen Immunsystems (B-Lymphozyten/Plasmazellen oder T-Lymphozyten) Zytokine freisetzen, welche die Apoptose der Zelle in Gang setzen können. Das Immunsystem kann auf diesem Wege Zellen, die beschädigt oder infiziert sind, eliminieren [66].

Die eigentliche Apoptose ist eine Enzymkaskade, bei der Caspasen eine zentrale Rolle spielen. Caspasen bezeichnen Cystein-abhängige Proteasen, welche nach Aktivierung eine Caspase-Kaskade in Gang setzen, die über eine signalverstärkende Rückkopplung weitere Caspasen aktiviert und dann schließlich die Effektor-Caspasen aktiviert [67]. Die Abbildung 2.6 zeigt einen schematischen Überblick über die Aktivierung und die Caspase-Kaskade der Apoptose in einem Hepatozyten. Der extrinsische Weg über extrazelluläre Ligandenaktivierung (gezeigt an TRAIL, TGF- β , TNF- α , CD95) führt auf verschiedenen Wegen zur Aktivierung der Caspasen-8 und -10. Der intrinsische Weg beginnt in den Mitochondrien mit der Freisetzung von Cytochrom-c und endet mit der Aktivierung von Caspase-9. Beide Wege der Apoptose sind zudem untereinander ver-

zahlt durch die Caspase-8, diese kann durch Aktivierung von Bid die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom-c triggern und so die Apoptose beschleunigen. Letztendlich wird der Start der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 bewirkt. Die Effektor-Caspasen katalysieren den Abbau des Zytoskeletts und der Zellmembranen und starten weitere Enzyme, welche die DNA der Zelle fragmentieren. Aus diesen Prozessen resultiert der Tod der Zelle. Die gebildeten Zellreste befinden sich in Vesikeln und werden als apoptotische Körper bezeichnet; sie werden abschließend phagozytiert. Es kommt, in Abgrenzung zur Nekrose, dabei zu weniger Entzündung, der umliegende Zellverband bleibt durch die Apoptose einer Zelle weniger angetastet.

2.3.2 MCL-1 und Apoptose

Das MCL-1 Molekül (myeloid cell leukaemia sequence 1) ist Bestandteil der BCL-2 Proteinfamilie, welche Schlüsselregulatoren im Apoptosemechanismus darstellen [68]. Die BCL-2 Proteinfamilie besteht aus Proteinen, die die Apoptose einleiten, also proapoptotisch wirken wie Bax, Bak, Bok, Bim u.w. und aus anti-apoptotisch wirkenden Proteinen wie Bcl-X_L, Bcl-w, A1 (Bfl-1), NR-13 und besonders MCL-1 [64]. Die antiapoptotischen Proteine bewirken vor allem mitochondriale Veränderungen, indem sie z.B. die Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien in das Cytosol der Zelle verhindern. Das MCL-1 Molekül spielt dabei eine wichtige Rolle.

Die genauen Mechanismen zur Suppression der Apoptose durch MCL-1 sind derzeit noch nicht hinreichend verstanden. Es wird vermutet, dass MCL-1 mittels Heterodimerisation die Cytochrom-c Freisetzung supprimiert [68] und außerdem proapoptotisch wirkende Proteine wie Bim und Bak neutralisiert [69]. MCL-1 wirkt dabei vor allem in der frühen Phase der Apoptose. Arbeiten zu diesem Thema konnten zeigen, dass eine rasche Herunterregulation von MCL-1 für die Initiation der Apoptose-Kaskade notwendig ist [70]. Im Gegensatz dazu kann MCL-1 auch proapoptotisch wirken. Es existiert von MCL-1 eine kurze Form, die durch Schneiden von Caspasen entsteht. Dieses Schneiden von MCL-1 in die kurze Form, durch Caspasen katalysiert, aktiviert wiederum eine Caspase-Kaskade und führt über eine positive Feedback-Schleife zur Aufrechterhaltung der Apoptose [71].

Maligne entartete Zellen haben häufig eine hohe Expressionsrate von MCL-1 wie z.B. bei den myeloischen Leukämien [72] [73]. Der natürliche Schutz des Körpers, entartete Zellen durch Apoptose aus dem Organismus zu entfernen, ist bei der MCL-1 vermittelte Apoptos suppression solcher Zellen nicht mehr gegeben. Transgene Mäuse, die MCL-1 überexprimieren, haben eine hohe Inzidenz Lymphome zu entwickeln [74]. Gleichzeitig gibt es aber auch Tumore, bei denen MCL-1 herunterreguliert ist und somit eine mögliche Apoptose durch MCL-1 nicht unterbunden werden kann [75].

In Hepatozyten kann die Induktion von MCL-1 eine CD95 vermittelte Apoptose unterbinden. Gleichzeitig konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass ein spezifischer

MCL-1-knockout in Hepatozyten Leberschädigung durch spontane Apoptose ermöglicht [76]. Ebenso kommt es zur einer erhöhten Proliferation von Hepatozyten bis hin zur Bildung von hepatozellulären Karzinomen [77] [78].

Die Funktion von MCL-1 bei viralen Infektionen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Zellen, die durch Adenoviren infiziert wurden, herunterregulieren MCL-1 und gehen in die Apoptose [69]. Für andere Viren gibt es nur wenige, widersprüchliche Daten.

2.3.3 Apoptosemechanismen bei Hepatitis C Infektion

Die Apoptose ist ein zentraler Prozess bei der Kontrolle und Elimination viraler Infektionen. Infektionen mit Hepatitis C Viren sind häufig mit chronischen Infektionen der Leber verbunden (vgl. Abs. 2.1.1), wobei die Viren in den Hepatozyten persistieren [63]. Eine chronische Infektion ist daher immer auch mit einem Versagen des Immunsystems bei der Viruselimination vergesellschaftet. Das Immunsystem schafft es nicht die infizierten Zellen komplett durch Zytokin-vermittelte Apoptoseaktivierung zu zerstören [63]. Daneben ist aber auch beschrieben, dass eine Hepatitis C Infektion die Apoptose von Hepatozyten initiieren kann. So wurde die Zahl der Hepatozyten der Leber, die apoptotische Prozesse zeigen, in verschiedenen Arbeiten gemessen und mit prozentualen Anteilen von 0,54% bis 20,0% an der Gesamtzahl der Hepatozyten beschrieben [79] [80]. Gleichzeitig liegt der Anteil jener Hepatozyten, die tatsächlich mit HCV infiziert sind bei 1% bis 10% [81]. Die typischen morphologischen Erscheinungen von apoptotischen Zellen wurden dabei nur bei einer Minderheit der Zellen beobachtet [63]. Außerdem zeigte sich, dass apoptotische Hepatozyten häufig in unmittelbarer Nähe von infiltrierenden Lymphozyten zu finden sind [82], was einen direkten Zusammenhang des Immunsystems mit der Apoptose virusinfizierter Zellen nahelegt.

Die Zytokine TGF- β , TNF- α , CD95 und TRAIL, die von verschiedenen Zellen des Immunsystems sezerniert werden und Apoptose über den extrinsischen Weg initiieren können, sind im Rahmen einer Hepatitis C Infektion allesamt hochreguliert [79] [83] [84] [85] [86]. Dabei zeigte sich, dass Hepatozyten vor allem durch Stimulation mit TNF- α und CD95 mit Apoptose antworten [85]. Dagegen induziert TRAIL Apoptose vor allem bei entarteten Zellen im Rahmen eines hepatozellulären Karzinoms [86]. Gleichzeitig scheint TRAIL für die Virusabwehr wichtig zu sein. Bei Patientin ist TRAIL während einer Therapie mit PEG-Interferon und Ribavirin rasch und anhaltend hochreguliert [87].

Für nahezu alle viralen Proteine des Hepatitis C Virus sind pro-apoptische Effekte, zum Teil auch anti-apoptische Effekte beschrieben worden. Im Folgenden soll auf das Hepatitis C Core- und NS5a-Protein näher eingegangen werden, da diese beiden Proteine Gegenstand dieser Dissertation sind.

Das Strukturprotein HCV-Core, näheres vgl. Abschnitt 2.2.1, zeigt verschiedene Effekte auf die zellulären Transduktionswege. Es aktiviert die Promotoren c-myc und c-fos [88]. Es hat pro- und anti-apoptotische Effekte. Core-abhängig wird TNF- α -vermittelte Apoptose [89] und CD95-vermittelte Apoptose [90] in Hepatoma-Zelllinien inhibiert. Andere Arbeiten konnten allerdings zeigen, dass eine HCV-Core Überexpression eine CD95-vermittelte Apoptose nicht verhindern konnte [91]. Nachgewiesen sind anti-apoptotische Effekte durch HCV-Core abhängige Phosphorylation und Aktivierung von STAT3 [92] und dadurch Induktion des anti-apoptotischen Bcl-X_L [93]. Ebenso zeigten sich dabei pro-apoptotische Effekte durch HCV-Core induzierte Cytochrome-c Freisetzung aus Mitochondrien und indirekte Aktivierung von Bax [94] [95]. Zusammenfassend lässt es sich nicht eindeutig sagen, ob das HCV-Core-Protein Apoptose verhindert oder induziert.

Die Funktion von HCV-NS5a ist ebenfalls nicht genau bekannt. HCV-NS5a zeigt Sequenzhomologien zu BCL-2, bindet an FKBP38, verstärkt dadurch den anti-apoptotischen Effekt von BCL-2 [96] und inhibiert zudem die pro-apoptotischen Effekte von Bax in Hepatoma-Zelllinien [97]. Weitere anti-apoptotische Effekte konnten durch die zytoplasmatische Sequestrierung und damit einhergehender Inhibition des Tumorsuppressor p53 [98] und die Aktivierung von STAT3 mit verstärkender Expression von Bcl-X_L, p21 [99] und NF- κ B [100] gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeiten eine direkte Apoptose-Induktion durch HCV-NS5a nachweisen [101] [35]. Auch für HCV-NS5a lässt sich zusammenfassend sagen, dass die genaue Funktion des Proteins im Apoptose-Mechanismus derzeit nicht hinreichend geklärt ist.

2.4 Das Adeno-Vektor-System

Die Idee fremde DNA in Zielzellen zu transduzieren, um beispielsweise Gendefekte bei hereditären Erkrankungen zu beheben, führte zu zahlreichen Entwicklungen von verschiedenen Gentransfersystemen. Besondere Beachtung wurde seit jeher dem System der viralen Vektoren geschenkt. Mit Hilfe von viralen Vektoren ist es möglich, Gene für bestimmte Proteine in Zielzellen zu transduzieren und die Genprodukte zu exprimieren. Neben retroviralen Vektoren sind adenovirale Vektoren bisher am weitesten in der Forschung verbreitet (vgl. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide²).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden adenovirale Vektoren konstruiert, die die HCV Proteine Core und NS5a in Zielzellen transduzieren können. Daher sollen Adenoviren, die Basis dieser Vektoren, im Folgenden diskutiert werden. Ebenfalls soll der Gentransfer mittels solcher Vektoren und schließlich die vereinfachte Konstruktion adenoviraler Vektorsystem mit Hilfe des AdEasy-Systems erörtert werden.

² The Journal of Gene Medicine - Gene Therapy Clinical Trials Worldwide
<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

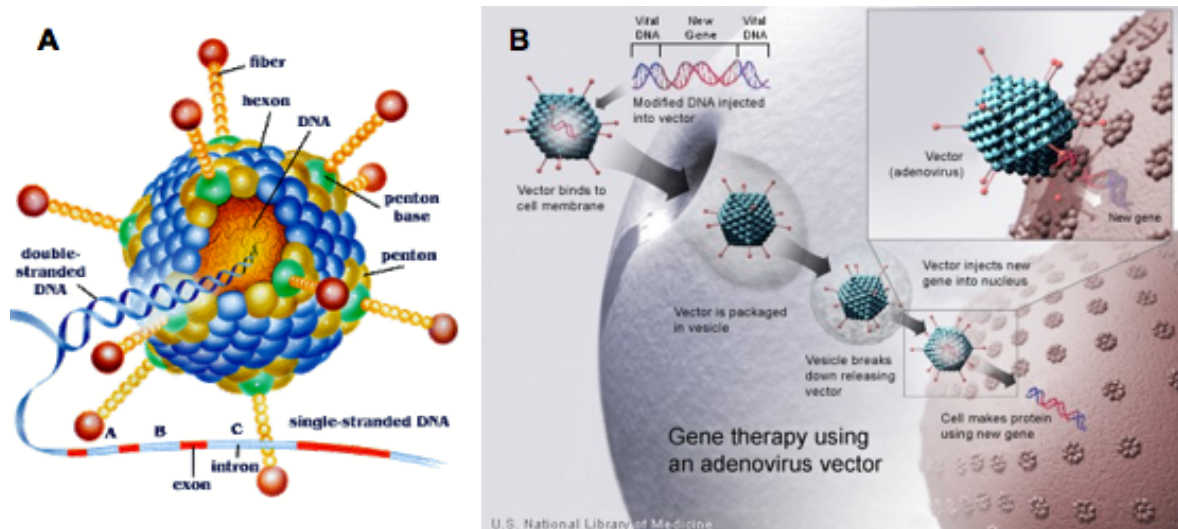


Abbildung 2.7: A) Schema eines Adenovirus: ikosaedrisches Kapsid aus Penton- und Hexonkapsomeren mit Fiberproteinenden. Die virale Doppelstrang-DNA ist ebenfalls gezeigt. (Quelle: The Nobel Foundation [103]) B) Schematische Zeichnung eines adenoviralen Gentransfers in Zellen des Menschen (Quelle: National Institutes of Health [104])

2.4.1 Adenoviren

Die Familie der Adenoviridae umfasst unbehüllte Viren mit einer Größe von etwa 80 - 110 nm. Das Viruskapsid hat eine charakteristische ikosaedrische Symmetrie und wird aus Penton- und Hexonkapsomeren zusammengesetzt. An den Pentonen sind Fiberproteine verankert. Das adenovirale Genom besteht aus einer doppelsträngigen linearen DNA mit einer Größe von 26 bis 45 kB. Die Gene sind in fünf funktionelle Gruppen unterteilt, von denen vier Gene (E: Early; E1 bis E4) zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion aktiviert werden, eine weitere Gruppe (L: Late; L1 bis L5) wird hingegen spät exprimiert. Humane Adenoviren besitzen eine weitgehend einheitliche Genomorganisation und kodieren ca. 40 Proteine und 1 bis 2 virus-assoziierte (VA)-RNAs [25] [23].

Derzeit sind aus der Familie der Adenoviridae 54 humanpathogenen Viruspezies bekannt. Die Adenoviren werden in 7 Spezies (A bis G) eingeteilt, welche sich auf Grund ihres Hämagglutinationsmusters weiter subklassifizieren lassen [23]. Die Abbildung 2.7 A zeigt das Schema eines solchen Virus. Adenoviren haben ein äußerst breites Infektionsspektrum. Beim Menschen verursachen die Adenoviren hauptsächlich Infektionskrankheiten der oberen und unteren Atemwege, aber auch des Magen-Darm-Trakts, des Urogenitaltrakts und des Auges [102]. Dabei sind nur wenige Adenovirenspezies obligat pathogen. Bei immunsupprimierten Patienten können adenovirale Infektionen auch systemisch verlaufen.

Der Eintritt der Adenoviren in die Zielzelle erfolgt in zwei Schritten: Im ersten Schritt bindet das Virus an die Zelle, es kommt zur Bindung des viralen Fiber-Proteins

mit dem zellulären Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR). Im zweiten Schritt interagieren die Penton-Proteine des Virus mit dem Integrin-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Das Virus wird dann in endosomalen Vesikeln in die Zelle aufgenommen, wobei es die Fiberproteine verliert [105]. Nach Ansäuerung der Endosomen werden die Viruskapside freigesetzt und gelangen entlang der Mikrotubuli durch Kernporen in den Zellkern der Wirtszelle. Anschließend wird die Expression der frühen viralen Proteine eingeleitet. Mit der Replikation der viralen DNA beginnt die späte Phase der Infektion, in der die späten viralen Proteine exprimiert werden. Im Zytosol assoziieren die viralen Strukturproteine zu Kapsomeren und werden in den Zellkern transportiert, dort werden abschließend die vollständigen Virionen gebildet. Der Replikationszyklus endet mit der Lyse der Wirtszelle [23] [106]. In Zellkultur dauert einer solcher Zyklus bis zur Zellyse ca. 24 Stunden. Neben der lytischen Infektion ist auch eine latente Infektion durch humane Adenoviren möglich. Durch geringe virale Proteinexpression und protektiv wirkende E3-Proteine können adenoviral befallene Zellen dem Immunsystem des Körpers entgehen [107].

2.4.2 Gentransfer mit Adenoviren

Aufgrund des breiten Zelltropismus, der einfachen Vermehrung in Zellkultur und der guten Manipulierbarkeit am viralen Genom haben sich Adenoviren als potentes Vektorsystem etablieren können [108] [109]. Mit diesen adenoviralen Vektoren besteht die Möglichkeit, Gene bzw. Genabschnitte in Zellen einzuschleusen, um die Expression bestimmter Proteine zu erreichen. Die Abbildung 2.7 B zeigt den Transfer eines Genträgers Virus in eine Zielzelle. Da Adenoviren über Integrine an der Wirtszelloberfläche in die Zellen gelangen und Integrine ubiquitär vorkommen, können Adenoviren eine Vielzahl menschlichen Gewebetypen infizieren, unabhängig von der Teilungsaktivität des Gewebes. Die Viren verursachen in der Regel keine schwerwiegenden Erkrankungen und haben nur ein äußerst geringes onkogenes Potential [25]. Adenoviren zeigen im Vergleich zu anderen Viren, die zum Gentransfer genutzt werden (Retroviren, Herpesviren u.w.), *in vivo* und *in vitro* sehr gute Gentransferraten. Das Genom der Adenoviren ist weitgehend entschlüsselt und daher für gentechnologische Manipulationen zugänglich.

Bei adenoviralen Vektoren unterscheidet man replikationsfähige und nicht replikative Vektorkonstrukte, die die Mehrheit bilden. Bei den nicht-replikativen Vektoren werden verschiedene Klassen unterschieden. In der 1. Generation wurde der, für die Virusreplikation essentielle, ca. 3 kB lange E1-Bereich (Early-Gen) durch eine Expressionskassette für das Transgen ersetzt. Teilweise wurde bei diesen Vektoren der nicht-essentielle E3-Bereich deletiert. In Vektoren der 2. Generation sind die E1-, E2/E4- und teilweise die E3-Region deletiert. Diese Vektoren werden in Verpackungszelllinien propagiert, welche die deletierten Genprodukte produzieren. Damit ist die 2. Generation insgesamt weniger toxisch und immunaktivierend. Die 3. Generation schließlich besitzt

vom ursprünglichen Adenovirusgenom lediglich die cis-aktiven Sequenzen für die Verpackung des viralen Vektors. Neben dem Transgen besitzen diese Vektoren Stuffer-DNA, um die optimale Verpackungsgröße von 27 bis 38 kB zu erreichen. Vektoren der 3. Generation zeichnen sich durch monatelange Expression des Transgens *in vivo* in ruhenden Zellen, eine geringe Toxizität und eine geringe Immunogenität aus. Für die Produktion wird ein Helfervirus benötigt, daher rührt die Bezeichnung gutless-Vektoren. Nachteil dieser Koinfektion ist die Kontamination mit den replikationsfähigen Helferviren, die eine klinische Anwendung bisher verhindern [110]. Bei den replikationsfähigen adenoviralen Vektoren unterscheidet man, Vektoren, die nur E3 deletiert sind und in geringen Dosen wirksam sein sollen. Hybridvektoren (Adenovirus + Lentivirus bzw. Adenovirus + Epstein-Barr-Virus) und konditional replikationskompetente Vektoren, die nur in spezifischen, transformierten Zellen replizieren [23] [108] [109].

2.4.3 Vereinfachte Konstruktion adenoviraler Vektoren

Die Konstruktion adenoviraler Vektoren mit inklonierten Inserts hat sich durch das Vorkommen zahlreicher Restriktionsschnittstellen im adenoviralen Genom als äußerst schwierig erwiesen. Auch die Transkriptionseinheit des Adenovirus ist sehr komplex.

Die Konstruktion Insert-tragender adenoviraler Vektoren zur Transduktion und spezifischen Proteinexpression in Zielzellen ist durch die Entwicklung des AdEasy-System von T.C. HE, B. VOGELSTEIN ET AL. 1998 [1], das auch im Rahmen dieser Dissertation genutzt wurde, vereinfacht worden.

Bei dem AdEasy-System werden im ersten Schritt Inserts in ein Shuttle-Plasmid eingefügt (siehe dazu Kapitel 3.5.1 auf Seite 31). Im zweiten Schritt werden in rekombinations-kompetenten Bakterien (BJ5183) homologe Sequenzanteile der klonierten Shuttle-Plasmide (z.B. pAdShuttle-CMV) und des Adeno-Backbone-Plasmids (z.B. pAdEasy-1) miteinander rekombiniert. Die Abbildung 3.3 auf Seite 32 zeigt die homologe Rekombination zur Generierung des Adenokonstrukts schematisch. AdEasy-1 enthält ein Resistenzgen für Ampicillin und das gesamte Adenovirusgenom mit Ausnahme der Nukleotide 1-3533 (E1/ITR/Verpackungssignal) und 28130 (E3). Somit beträgt die Gesamtlänge des pAdEasy 33414 bp. Das pAdShuttle-CMV enthält den linken inverted repeat (ITR) und das Verpackungssignal des adenoviralen Genoms, vor der MCS des Plasmids befindet sich zudem ein CMV-Promotor, der die regulierte Expression des Inserts ermöglicht. Das Plasmid besitzt an seiner einzigen Restriktionsschnittstelle für PacI adenovirale Sequenzabschnitte, eine linke und eine rechte homologe Region.

Durch die Rekombination der homologen Regionen rechts und links von pAdShuttle-CMV (mit den jeweiligen Inserts) und pAdEasy-1 wird das Ampicillinresistenzgen gegen das Kanamycinresistenzgen ausgetauscht. Bei homologer Rekombination unter Kanamycin-Selektionsdruck, wachsen nur jene Rekombinaten, bei denen ein Resistenzgen austausch stattgefunden hat. Bei korrekter homologer Rekombination werden

die Bestandteile von pAdShuttle-CMV samt Insert in pAdEasy-1 aufgenommen. Eine wichtige Funktion nimmt das adenovirale ITR und das adenovirale Verpackungssignal von pAdShuttle-CMV ein. Es vervollständigt das Genom des Adenoviruskonstrukts nach Rekombination. Dadurch werden rekombinante Adenovektoren generiert, welche in Verpackungszelllinien (Hek-293) amplifiziert werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Die, für diese Dissertation genutzten, Materialien und technischen Hilfsmittel sind in den Tabellen 3.1 - 3.14 zusammengefasst. Im Anhang A auf Seite 92 ist eine Hersteller- und Geräteübersicht aufgeführt, welche alle Produkte und deren Hersteller aufführt.

3.2 Bakterienkultur

3.2.1 Bakterien und Plasmide

Zur Transformation und Rekombination wurden die drei unten genannten Bakterienstämme genutzt. Die genutzten Plasmide entstammen zum Teil dem AdEasy System, welches von T.-C. HE, B. VOGELSTEIN ET AL. [1] etabliert wurde.

Bakterienstämme (siehe Tabelle 3.2 auf der nächsten Seite) wurden in entsprechenden Nährmedien (siehe Tabelle 3.3 auf der nächsten Seite) inkubiert, um Plasmidtragende Bakterien zu gewinnen und anschließend nach Amplifikation die Plasmid-DNA hochaufreinigen zu können. Die folgenden Abschnitte beschreiben Techniken der Bakterienkultur.

3.2.2 Präparation der Bakterien-Starterkultur

Zur Präparation der Starterkulturen und der kompetenten Bakterien (siehe dazu auch 3.2.3) wurden gängige Protokolle [111] [112] [113] genutzt, welche teilweise wie folgt modifiziert wurden.

Die Bakterienstämme DH5 α und BJ5183 wurden auf Antibiotika-negativen Agarplatten ausgestrichen und über die Nacht bei 37°C inkubiert. Morgens wurde eine Kolonie gepickt, mit 3ml LB Medium angeimpft und bei 37°C schüttelnd mit 200 UPM inkubiert. Abends wurden die Minikulturen in 250ml LB Medium in einem 1L Erlenmeyerkolben über die Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden große Kulturen bei 4000 UPM für 10 Min pelletiert und in 25ml LB Medium resuspendiert. Danach mit 25ml Glycerol-Lsg gemischt und in 1ml Aliquots bei -80°C gelagert.

3.2.3 Präparation kompetenter Bakterien

Abends wurde 1L SOB Medium mit je einer Starterkultur, DH5 α und BJ5183, beimpft, und bei Raumtemperatur schüttelnd mit 200 UPM inkubiert. Zur Wachstumskontrol-

Tabelle 3.1: Reagenzien und Lösungen

Name	Rezeptur
Glycerol-Lsg	Glycerol (65%), MgSO ₄ (0,1M), Tris/HCl (0,025M, pH 8.0)
Inoue-Lsg	10,9g MnCl ₂ , 2,2g Trypton, 18,65g KCL, 20ml PIPES (0,5M), ad 1l Aqua dest.
TENS Puffer	Tris (10mM, pH 7.5), EDTA (1 mM), NaOH (0,1 N), SDS (0.5%)
TE Puffer	Tris (10mM, pH 8.0), EDTA (1mM)
TBE Puffer	in wässriger Phase, Tris (89mM, pH 8.0), Borsäure (89mM), EDTA (2mM)
TBS Puffer	in wässriger Phase, TrisCl (25mM, pH 7,4), NaCl (140mM), EDTA (2mM)
PBS Puffer	in wässriger Phase, Na ₂ HPO ₄ (85mM), NaH ₂ HPO ₄ (15mM), NaCl (100mM), pH 7,4

Tabelle 3.2: Bakterien

Bakterium-Typ	Verwendung	Hersteller
DH5 α	E. Coli Bakterium zur Amplifikation von Plasmiden	Roche Applied Science
BJ5813	E. Coli Bakterium zur homologen Rekombination von Plasmiden	Roche Applied Science
XL10-Gold	E. Coli Bakterium zur Amplifikation von Plasmiden (hochkompetent zur Aufnahme großer Plasmide)	Stratagene

Tabelle 3.3: Nährmedien für Bakterien

Name	Rezeptur
LB Medium	10g NaCl, 10g Trypton, 5g Yeast-Extract, ad 1l H ₂ O (ggf. 50 μ g/ml Ampicillin bzw. Kanamycin zur Bakterienselektion)
SOB Medium	5g NaCl, 20g Trypton, 5g Yeast-Extract, 2,5ml 1M KCL, ad 1l H ₂ O
Agar-Platten	1L LB Medium, 16g Agar
Abx-Agar-Platten	1L LB-Medium, 50 μ g/ml Ampicillin bzw. Kanamycin

Tabelle 3.4: Plasmide

Plasmid-Typ	Verwendung	Quelle
pAdEasy-1	Adenovektor zur Virusproduktion (siehe Abbildung 3.7 auf Seite 36)	Johns Hopkins O. C. ¹
pAdShuttle	Shuttlevektor	Johns Hopkins O. C. ¹
pAdShuttle-CMV	Shuttlevektor mit CMV-Promotor (siehe Abbildung 3.4 auf Seite 33)	Johns Hopkins O. C. ¹
pcDNA3.1 (+)	Expressionsvektor mit CMV-Promotor	Invitrogen
pcDNA3.1-Core	Vektor beinhaltet das HCV Core	PD Dr. med. K. Herzer ²
pcDNA3.1-NS5a	Vektor beinhaltet das HCV NS5a	Dr. med. M. Sprinzl ³

¹John Hopkins Oncology Center, Baltimore, Maryland, U.S.A.

²Universität Duisburg-Essen, Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie

³Universitätsmedizin Mainz, I. Medizinische Klinik

le wurden regelmäßig photometrisch die Kulturdichten gemessen (vgl. Grafik 3.1 auf der nächsten Seite). Bei 0,55 wurde das Bakterienwachstum gestoppt, indem die Bakterienkulturen für 10 Min auf Eis gestellt wurden. Danach wurden die Kulturen bei 4°C mit 4000 UPM für 10 Min pelletiert und in je 80 ml Inoue-Lösung resuspendiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C Umgebungstemperatur durchgeführt: Bei 4000 UPM wurde für 10 Min pelletiert und in je 20ml Inoue-Lsg resuspendiert. Danach wurden 6ml DMSO hinzugegeben und für 10 Min inkubiert. Dann wurde die Gesamtmenge in 200µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Transformation klonierter Adenokonstrukte wurde die chemisch hochkompetenten E.Coli-Bakterien XL10-Gold eingesetzt (vgl. Tabelle 3.2).

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zelllinien

Zur Propagierung der Adenoviren wurde die humane Nierenkarzinom-Zelllinie (*Hek-293*) [114], welche mit dem adenoviralen Genom-DNA (Serotyps 5) transformiert wurde, genutzt.

Die Transduktion mit den adenoviralen Konstrukten erfolgte in die humanen Hepatom-Zelllinien *HepG2* [115] [116] und *Huh7* [117].

3.3.2 Kultivieren der Zellen

Zelllinien und primäre murine Hepatozyten wurden in kleinen (25cm²), mittleren (75cm²) und grossen (175cm²) Zellkulturflaschen bzw. 6-Well- (10cm²), 12-Well (6cm²) oder 24-Well-Platten (2cm²) ausplattiert und in einem Zellinkubator bei feuchter Atmo-

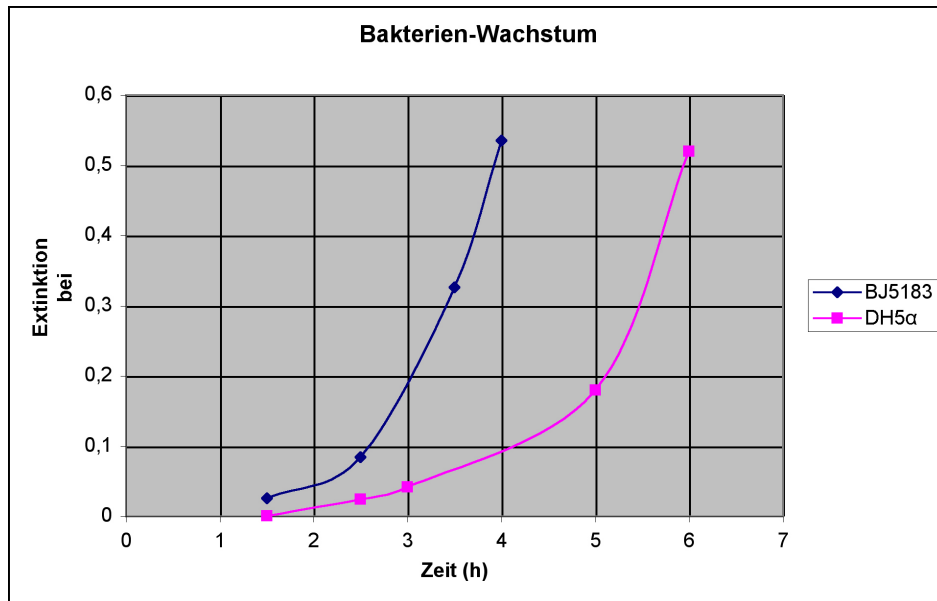


Abbildung 3.1: Exponentielles Wachstum der E.Coli-Bakterienkultur in Abhängigkeit zur Zeit. Bakteriumwachstum wurde in der log-Phase des exponentiellen Wachstums durch Inkubation auf Eis abgebrochen. Anschließend erfolgte die Präparation und Aliquotierung.

Tabelle 3.5: Zellkulturmedium

Name	Rezeptur
Zellkulturmedium	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% HEPES

sphäre (Luftfeuchte 96%), einem CO₂-Anteil von 5% und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Als Zellkulturmedien wurde DMEM (Tab. 3.5) genutzt [115] [116].

3.3.3 Splitten der Zelllinien

In regelmäßigen Abständen wurden die konfluenten Zellen aufgeteilt. Für dieses Prozedere wurden das Zellmedium der Zellen aus den Kulturflaschen entnommen und die Zellen mit PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und bei 37°C mindestens 1 Min inkubiert. Das Abrunden und Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Länge der Inkubation wurde vom mikroskopischen Bild abhängig gemacht. Dann wurden die Zellen im Zellkulturmedium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Zellzahl neu verteilt.

3.3.4 Zählen der Zellen

Die mittels Trypsin/EDTA-Lösung abgelösten Zellen wurden in Zellmedium resuspendiert und 50µl des Resuspendats entnommen und mit 50µl Tryphan-Blau-Lösung 1:1

Tabelle 3.6: PMH-Isolationspuffer

Name	Rezeptur
Waschpuffer I	NaCl (8,3g), KCL (0,5g), HEPES (2,4g) ad 1l H ₂ O, pH 7,4
Kollagenase-Puffer	NaCl (3,9g), KCL (0,5g), CaCl ₂ *2 H ₂ O (0,7g), HEPES (24g) Collagenase (0,05%) ad 1l H ₂ O, pH 7,6
Waschpuffer II	NaCl (8,3g), KCL (0,5g), CaCl ₂ *2 H ₂ O (0,18g), HEPES (2,4g) ad 1l H ₂ O, pH 7,4

gemischt. 10 μ l der Mischung wurde in eine Neubauer Zählkammer aufgetragen und die Zellen in den Quadraten unter dem Mikroskop gezählt. Anschließend wurde mittels unten dargestellter Formel die Zellzahl des Resuspendats ermittelt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Quadrate}} * \text{Resuspendatvolumen} * 2 * 10^4 \quad (3.1)$$

3.3.5 Präparation und Kultivierung der primären murinen Hepatozyten

Die Präparation primärer muriner Hepatozyten beruhte auf einer zweistufigen, portalvenösen Perfusion der murinen Leber in situ [118]. Die Versuchstiere wurden im Vorfeld heparinisiert und betäubt. Im ersten Schritt wurde die Leber mit einem Waschpuffer I (siehe Tabelle 3.6) durchgespült. Die murine Leber wurde anschließend mit einem kollagenase-haltigen Puffer gefüllt und explantiert. In Anwesenheit eines weiteren kalzium-haltigen Waschpuffers II wurde die Leber zerkleinert, filtriert und pelletiert (Zentrifugation: 4 Min, 400 UPM ohne Bremse). Das Pellet wurde danach mit FCS-haltigem DMEM-Medium (siehe Tabelle 3.7 auf der nächsten Seite) resuspendiert, gezählt (siehe Kapitel 3.3.4 auf der vorherigen Seite) und entsprechende Zellzahlen auf Zellkulturschalen ausplattiert:

- 6-Well-Platte: 3 x 10⁶ PMH-Zellen pro gesamter Platte
- 24-Well-Platte: 2 x 10⁶ PMH-Zellen pro gesamter Platte

Die Adhäsion der Hepatozyten in den Zellkulturschalen, die zuvor kollagenisiert worden waren, erfolgte innerhalb von 3 h. Danach erfolgte ein Wechsel zu einem FCS-freiem Medium zur endgültigen Kultivierung der Zellen.

3.4 Klonierungstechniken

3.4.1 Transformation in die kompetenten Bakterien

Kompetente, gefrorene Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 0,25ng Plasmid wurde in ein Eppendorf Tube vorgelegt und ebenfalls auf Eis gekühlt. Zu dem Plasmid wurde

Tabelle 3.7: PMH-Zellkulturmedium

Name	Rezeptur
Grundmedium	DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Glutamin (1%), Penicillin/Streptomycin (1%), Na-Pyruvat (1%), HEPES (20mM), Insulin (0,05%), Lithocolsäure (10^{-6} M)
Medium nach Isolation	Grundmedium + FCS (10%) + Dexamethason (10^{-6} M)
Medium ab Tag 1	Grundmedium + BSA (0,2%)

50 μ l Bakterien hinzugegeben und 30 Min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 90 sec in einen 42°C Hitzeschock versetzt und sofort danach für 2 Min auf Eis gekühlt. 1ml LB Medium wurde hinzugegeben und für 45 Min bei 37°C inkubiert. 100 μ l wurden auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.4.2 Plasmidpräparationen

3.4.2.1 Minipräparation der Plasmide

Eine Bakterienkolonie wurde von der Agarplatte gepickt und damit 5ml LB Medium mit 50 μ g/ml Antibiotikum beimpft und über Nacht bei 37°C rüttelnd mit 200 UPM inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1,5ml der Kultur jeweils über 30 Min mit 13.000 UPM abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Vortexen resuspendiert. Dann wurde 300 μ l TENS Puffer hinzugegeben 3 sec gevortext und auf Eis gestellt. Anschließend wurde 150 μ l 3M Natrium-Acetat, pH 5.2, hinzugegeben, 3 sec aufgeschüttelt und 10 Min bei 4°C mit 13.000 UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Tube überführt und 900 μ l -20°C kalter, konzentrierter Ethanol hinzugegeben. Das Gemisch wurde nun 10 Min bei -80°C gekühlt und danach bei 4°C mit 13.000 UPM abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal hintereinander mit 70%igen Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet und danach in 50 μ l TE Puffer und 1 μ l RNase 10mg/ml resuspendiert. Die so präparierten Plasmide wurde bei -20°C gelagert.

3.4.2.2 Midipräparation der Plasmide

Größere Mengen Plasmide wurden mit Hilfe von Silika-Säulen nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel) aufgereinigt:

100ml einer über Nacht bei 37°C und 200 UPM angewachsenen Bakterienkultur wurden 15 Min bei 4000 UPM abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 8ml Puffer S1 resuspendiert. Dem Gemisch wurden nun 8ml Puffer S2 hinzuge-

Tabelle 3.8: Kommerzielle Hilfsmittel

Name	Verwendung	Hersteller
Plasmid DNA Purification Kit	Plasmid Midipräparation	Macherey-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Plasmid Extraktion aus Gelen	Qiagen
Adeno Rapid Titer Kit	Anfärbung und Titration von adenoviral-infizierten Zellen (Abschnitt 3.6.2 auf Seite 38)	Clontech

geben, gründlich vermischt und bei Raumtemperatur 3 Min inkubiert. Danach wurde vorgekühlter Puffer S3 hinzugegeben, wiederum gemischt und 5 Min auf Eis inkubiert. Das so gewonnene Bakterienlysat wurde über einen mitgelieferten Filter aufgereinigt, anschliessend abzentrifugiert und nur der Überstand zur weiteren Verarbeitung verwendet. Die AX 100 Midisäule wurde mit 2,5ml Puffer N2 äquilibriert. Dann wurde das gereinigte Bakterienlysat auf die Midisäule gegeben und so die Plasmid-DNA an die Midisäule gebunden. Die Midisäule wurde dann mit 12ml Puffer N3 gewaschen und dann die gebundene Plasmid DNA mit 5ml Puffer N5 gelöst und in einem neuen Gefäss aufgenommen. Mit Zugabe von 3,5ml Isopropanol und anschliessender Zentrifugation, 13.00 UPM, 4°C und 30 Min, wurde die gelöste Plasmid DNA präzipitiert. Dann wurde das Pellet, bestehend aus Plasmid DNA, mit 70%igen Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (13.000 UPM, RT, 10 Min). Vorsichtig wurde der Überstand verworfen und das Pellet 10 Minuten getrocknet und in TE Puffer resuspendiert. Die Konzentration der Plasmidpräparation liess sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm kontrollieren. Die Plasmidlösungen wurden auf eine endgültige Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt.

3.4.3 Restriktionsverdau von Plasmiden

Der Restriktionsverdau wurde nach einem Standardprozedere angewandt. In einem Eppendorf Tube wurden die benötigten Bestandteile für einen Restriktionsverdau zusammenpipettiert:

- Plasmid-DNA (je nach Verwendung 3 μg)
- Restriktionsenzym (je nach Gesamtvolumen: 0,1 μl bzw. 1 μl)
(Tabelle [3.9](#) auf der nächsten Seite zeigt eine Übersicht über die genutzten Restriktionsenzyme.)
- ggf. ein zweites Restriktionsenzym (je nach Gesamtvolumen: 0,1 μl bzw. 1 μl)
- eine passende Pufferlösung für das Restriktionsenzym (1/10 des Gesamtvolumen, bei 10fach konzentrierten Puffern. Bei der Verwendung von zwei oder mehr Re-

Tabelle 3.9: Restriktionsenzyme

Enzym-Name	Schnittart	Zusatz	Hersteller
EcoRI	überhängende Enden	BSA benötigt	New England Biolabs
EcoRV	glatte Enden	BSA benötigt	Roche Applied Science
HindIII	überhängende Enden	BSA benötigt	New England Biolabs
KpnI	überhängende Enden	BSA nicht benötigt	Roche Applied Science
XbaI	überhängende Enden	BSA benötigt	New England Biolabs
PacI	überhängende Enden	BSA benötigt	New England Biolabs
PmeI	glatte Enden	BSA benötigt	New England Biolabs

Restriktionsenzymen wurde sichergestellt, dass beide Enzyme in der gewählten Pufferlösung 100% bzw. mind. 75% Aktivität hatten.)

- ggf. benötigt das gewählte Restriktionsenzym BSA, um optimal zu arbeiten. BSA ist ebenfalls 10fach konzentriert und wurde daher entsprechend 1/10 des Gesamtvolumens hinzugegeben.
- destilliertes H₂O (abhängig von der Plasmid-DNA-Menge, um 20mL bzw. 30mL Gesamtvolumen zu erreichen.)

Der Restriktionsverdau wurde bei 37°C in einem handelsüblichen Heizblock durchgeführt. Die Dauer des Verdaus variierte je nach anschließender Verwendung des Restriktionsprodukts zwischen 2 und 12 Stunden.

3.4.4 Analyse in Agarose-Gelen

Die Methode zur Detektion und Analyse von DNA auf Agarose-Gelen geht auf Arbeiten von A. TISELIUS [119] zurück.

Zur Analyse von geschnittenen und ungeschnittenen Plasmiden wurden diese auf Agarose-Gelen aufgetragen. Das Agarose-Gel wurde standardmässig immer kurz vor der Analyse gegossen und besteht aus 0,8% bzw. 1% Agarose in 100mL TBE Puffer. Zur Bandenmarkierung wurde Ethidiumbromid hinzupipettiert. Das benötigte elektrische Feld hatte eine Spannung von 110mV. Die Auftrennung durch die Elektrophorese wurde mit Hilfe eines Ladepuffers, Bromphenolblau, kontrolliert, der in die einzelnen Taschen zusammen mit den zu analysierenden DNA-Fragmenten bzw. -Plasmiden gegeben wurde. Desweiteren wurde in eine separate Geltasche ein DNA-Marker pipettiert, welcher aus mehrfach geschnittener λ -Phagen-DNA besteht und bekannte Banden zur Markierung erzeugt.

Abbildung 3.2 zeigt die einzelnen Banden des DNA Marker VII (Roche Applied Science). Zur weiteren Analyse des Ergebnisses der Elektrophorese wurde nach deren

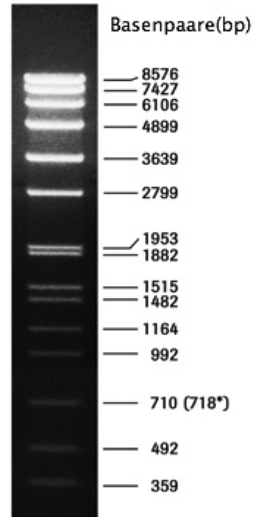


Abbildung 3.2: DNA Marker VII; Hersteller: Roche Applied Science

Beendigung ein Photo im UV Licht von dem Gel und den darin befindlichen, Ethidiumbromid markierten Banden gemacht und digital gespeichert. Mit Hilfe der bekannten Banden des DNA-Leiters konnten so die jeweiligen Größen der DNA-Fragmente bestimmt werden.

3.4.5 Gelpräparation von DNA aus Agarose-Gelen

Mit Hilfe des Präparationskits Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) wurde DNA aus den Agarose-Gelen präpariert:

Die gewünschten DNA Fragmente wurden mittels UV-Licht auf dem Agarose-Gel bestimmt, durch Anschnitt markiert und präzise herausgeschnitten. Das herausgeschnittene Gelstück wurde in ein Eppendorf Tube überführt und auf einer handelsüblichen Waage gewogen. Zu dem Gel wurde dem Gewicht des Gels entsprechend 3 Volumen Pufferlösung QG hinzugefügt. Die Lösung wurde dann 10 Minuten bei 50°C inkubiert und alle 2-3 Min aufgeschüttelt, um das Lösen des Gels zu beschleunigen. Nachdem das Gel komplett gelöst war, wurde kontrolliert, ob die Farbe der Lösung Gelb ist. Falls die Mixtur nicht gelb war, wurde 10µl 3 M Natrium Acetat hinzugefügt. Danach wurde entsprechend dem Gewicht des Gels 1 Volumen-Einheit Isopropanol zur Mixtur hinzugegeben. Maximal 800µl der gesamten Mixtur wurden danach auf eine Qiagen Zentrifugationsssäule gegeben und in einem Sammel tube während einer Zentrifugation, 1 Min bei 13.000 UPM, gesammelt. Durch die Zentrifugation wurde die DNA an die Säule gebunden; die im Tube gesammelte Flüssigkeit wurde verworfen. Nun wurde der Rest der Ausgangsmixtur an die Säule gebunden und die Durchflussmenge wiederum verworfen. Danach wurde 0,5ml des Puffers QG auf die Säule gegeben, anschließend 1 Min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen der Säule

wurde danach 0,75ml Puffer PE auf die Säule gegeben, 1 Min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurde die Säule in ein neues 1,5ml Sammeltube überführt. Die DNA wurde mit 50 μ l destillierten H₂O nach 1 Min Inkubation aus der Säule gelöst und danach mittels erneuter Zentrifugation (1 Min 13.000 UPM) gefällt und erneut in Wasser gelöst.

3.5 Produktion adenoviraler Konstrukte

Das AdEasy System wurde im Abschnitt 2.4.3 auf Seite 20 bereits beschrieben. Es diente der vereinfachten Konstruktion adenoviraler Vektoren, die zum Gentransfer befähigt sind. Die Konstruktion der adenoviralen Konstrukte verläuft prinzipiell in drei Schritten. 1) Einklonierung des gewünschten Gens in Shuttle-Plasmide (siehe dazu Abschnitt 3.5.1) 2) Homologe Rekombination in kompetenten Bakterien (siehe dazu Abschnitt 3.5.2) und schließlich 3) Adenovirale Vektorproduktion in kompetenten Zellen (siehe dazu Abschnitt 3.5.4). Abbildung 3.3 zeigt diese Arbeitsschritte in einem schematischen Ablauf.

3.5.1 Klonierung der Shuttle-Plasmide

Die Hepatitis C Genomabschnitte HCV-Core und HCV-NS5a wurden im Vorfeld dieser Arbeit jeweils einzeln als Inserts in das Konstruktplasmid pcDNA3.1 (Hersteller: Invitrogen) kloniert. Die daraus gewonnenen Konstrukte werden als pcDNA3.1-Core und pcDNA3.1-NS5a bezeichnet und sind in Tabelle 3.4 genauer beschrieben. Die MCS des pcDNA3.1 bietet die Möglichkeit diese Inserts mit Hilfe von Restriktionsenzymen wieder heraus zu schneiden, um die Inserts in andere Plasmide zu klonieren. Die folgenden Unterkapitel beschreiben die Klonierung von HCV-Core und HCV-NS5a in das Shuttle-Plasmid pShuttle-CMV.

3.5.1.1 pShuttle-CMV-Core

pcDNA3.1-Core wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI aufgeschlossen (Restriktionsansatz: DNA, HindIII, XbaI Puffer B, Roche Applied Science; Inkubation: 4h, 37°C). Das gewünschte Fragment wurde danach über eine 0,8%ige Gelelektrophorese abgetrennt und anhand des DNA Markers auf dem Gel detektiert. Mittels Gelpräparation wurde das Core-Fragment aus dem Gel gewonnen (zur Methodik siehe Abschnitt 3.4 auf Seite 26). Das Core-Fragment stand so zur weiteren Klonierung zur Verfügung. Das Shuttle-Plasmid pShuttle-CMV (Abbildung 3.4 auf Seite 33) wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI in seiner MCS geschnitten (Restriktionsansatz: HindIII, XbaI, Puffer B, Roche Applied Science; Inkubation: 4h, 37°C). Nach dem Restriktionsverdau wurden die Enzyme bei 37°C für 10 Min hitze-

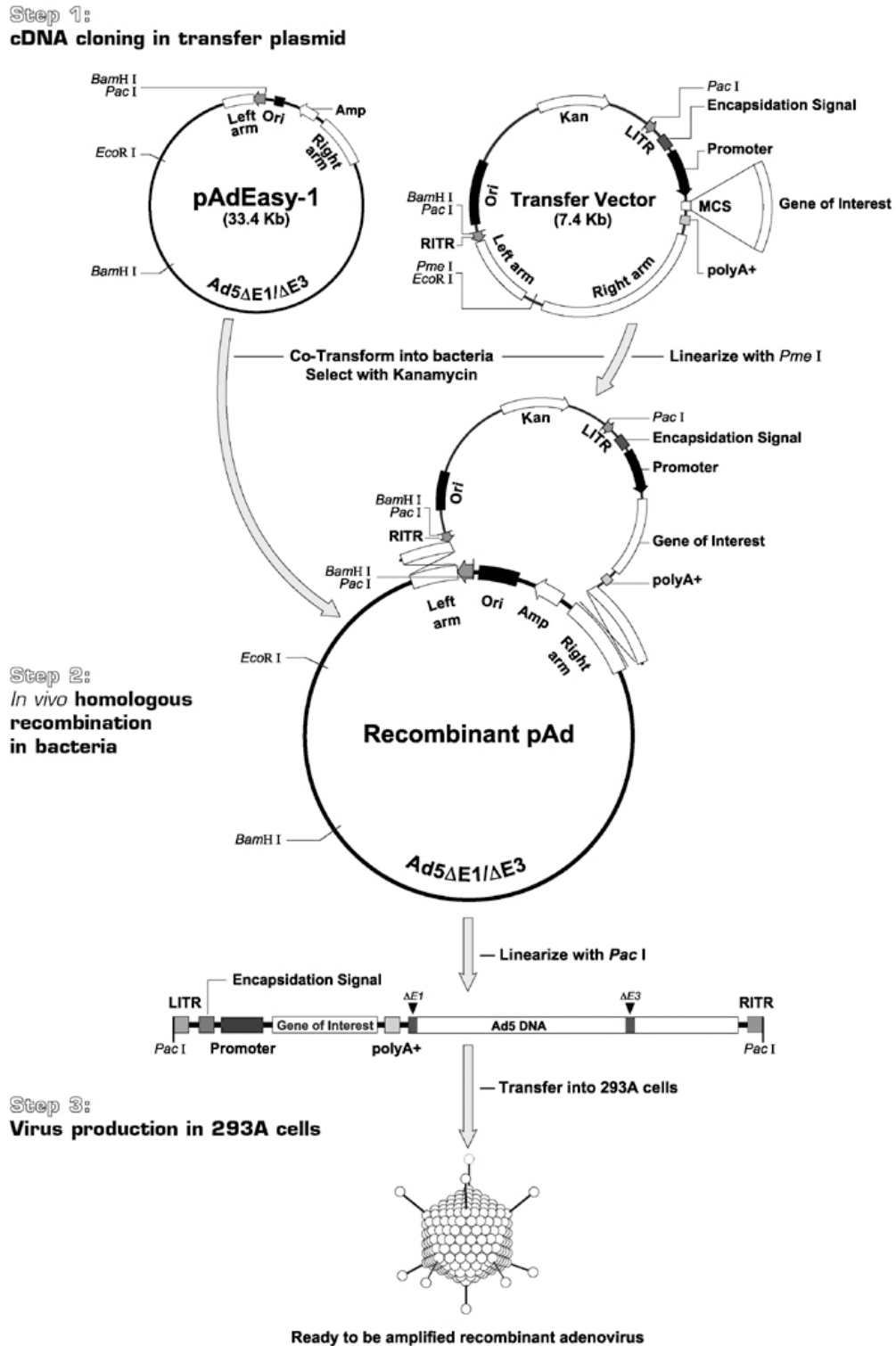


Abbildung 3.3: AdEasy-System. 1) Klonierung des gewünschten Gens (gene of interest) in das Shuttle-Plasmid (hier als Transfer Vector bezeichnet, rechts oben abgebildet). Links oben: das adenovirale Background-Plasmid AdEasy-1. 2) Homologe Rekombination des Insert-tragenden Shuttle-Plasmids (zuvor mit PmeI linearisiert) am linken und rechten Arm (left/right homology region) des pAdEasy-1 Adeno-backbone Plasmids. Durch korrekte Rekombination verliert das Konstrukt die Ampicillin-Resistenz (Amp) des pAdEasy-1 und gewinnt eine Kanamycin-Resistenz (Kan) des Shuttlevektors (Details: 3.5.1 und 3.5.2). 3) Produktion von Insert-tragender Adenoviren nach PacI Restriktionsverdau und Transfektion in 293-Zellen (Abbildungsnachweis: ©Q-BIOgene)

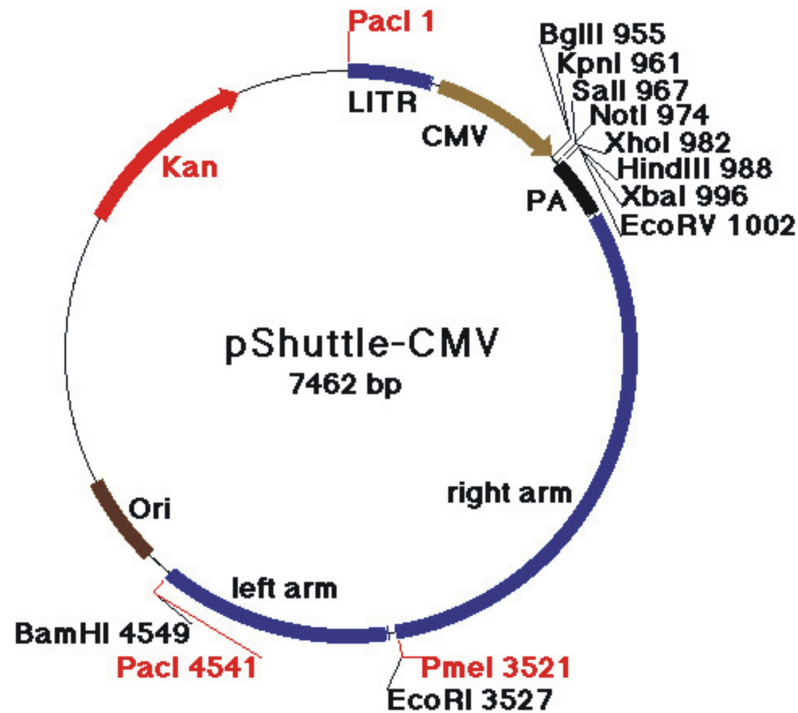


Abbildung 3.4: Graphische Darstellung des pShuttle-CMV-Plasmid mit MCS zur Klonierung der Inserts (Details siehe Abschnitt 3.5.1). [120]

inaktiviert, um einen Überverdau der klebrigen Enden zu vermeiden. Außerdem wurde das Shuttle-Plasmid mit CIP ($1,5\mu\text{l}$, 1 h, 37°C) behandelt und danach ebenfalls hitzeinaktiviert (s.o.) Das aufgereinigte Core-Fragment wurde anschließend mit Hilfe einer T4-Ligase mit dem aufgeschlossenen pShuttle-CMV-Plasmid (Ligationsansatz: Insert ($0,8\mu\text{g}$), Shuttle-Plasmid ($0,4\mu\text{g}$), T4-Ligase ($1\mu\text{l}$), Ligase-Puffer ($1\mu\text{l}$), Roche Applied Science; Inkubation: 16°C , ÜN) ligiert.

DH5 α wurden mit dem Ligationsprodukt aus Insert und pShuttle-CMV transformiert. Die transformierten Klone wurden anschließend in einer Kanamycin-Minikultur amplifiziert. Die aus der Minikultur gewonnenen Plasmide wurden mit einem HindIII-Restriktionsverdau (Restriktionsansatz: HindIII ($1\text{U}/\mu\text{l}$), Puffer B, Roche Applied Science; Inkubation: 1,5h, 37°C) und einer Gel-Elektrophorese (1% Agarose) analysiert. Das ligierte Plasmid wurde amplifiziert und hochaufgereinigt.

Abbildung 3.5 auf der nächsten Seite zeigt die Plasmidkarte des klonierten Inserttragenden Shuttle-Plasmids. Zur Erstellung der Plasmidkarte wurde die Software *ApE* - *A Plasmid Editor* von M. Wayne Davis⁴ genutzt.

⁴ <http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>

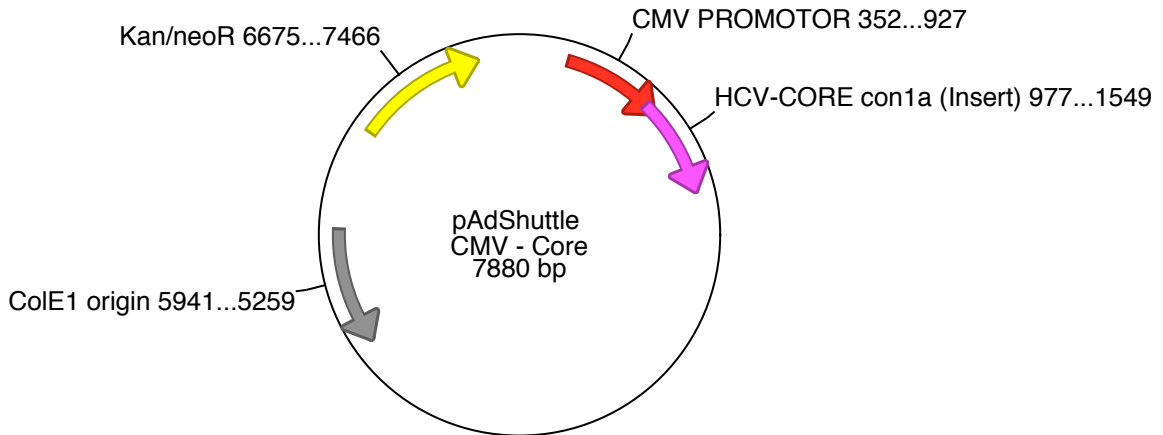


Abbildung 3.5: pShuttle-CMV-Core, Schematische Darstellung des Shuttle-Plasmids mit HCV-Core als Insert, direkt nach der MCS. (Plasmidkarte erstellt mit *ApE* (von M. Wayne Davis)); komplette Darstellung von pShuttle-CMV siehe Abb. 3.4)

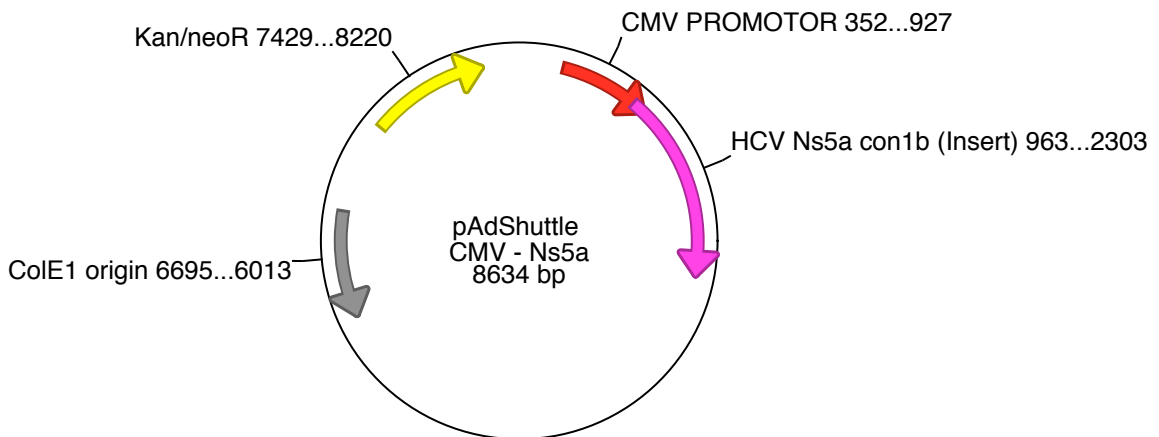


Abbildung 3.6: pShuttle-CMV-NS5a, Schematische Darstellung des Shuttle-Plasmids mit HCV-NS5a als Insert, direkt nach der MCS. (Plasmidkarte erstellt mit *ApE* (von M. Wayne Davis)); komplette Darstellung von pShuttle-CMV siehe Abb. 3.4)

3.5.1.2 pShuttle-CMV-NS5a

Die Klonierung von HCV-NS5a in das Shuttle-Plasmid lief analog zu der oben beschriebenen Klonierung von HCV-Core. Allerdings wurde pcDNA3.1-NS5a mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen NotI und XbaI geschnitten (Restriktionsansatz: DNA, NotI, XbaI Puffer B, Roche Applied Science; Inkubation: 4h, 37°C). Entsprechend wurde ebenso das Shuttle-Plasmid in seiner MCS mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI aufgeschnitten (Restriktionsansatz: NotI, XbaI, Puffer B, Roche Applied Science; Inkubation: 4h, 37°C).

Die weiteren Einzelschritte entsprechen der oben dargestellten Klonierungsschritten. Die Plasmidkarte von pShuttle-CMV-NS5a, die mit *ApE* - *A Plasmid Editor* erstellt wurde, ist auf der Abbildung 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.10: Übersicht der eingesetzten Adeno-Konstrukte

Insert	Shuttle-Plasmid	Rekombinationsprodukt	Kurzbeschreibung
- -	AdTrack	AdGFP	CMV/GFP-Reporterkonstrukt
HCV-Core	pShuttle-CMV	AdE-Core	HCV-Core-Reporterkonstrukt
HCV-NS5a	pShuttle-CMV	AdE-NS5a	HCV-NS5a-Reporterkonstrukt

3.5.2 Homologe Rekombination

Zur homologen Rekombination von Insert-tragenden Shuttle-Plasmiden mit dem Adeno-Backbone-Plasmid (Abbildung 3.7 auf der nächsten Seite dargestellt) wurden die rekombinationsfähigen BJ5183 genutzt.

Das Shuttle-Plasmide mit einkloniertem Inserts wurde zu diesem Zwecke mit dem Restriktionsenzym PmeI (Restriktionsansatz: PmeI (0,1 U/ μ l), Puffer Neb-4, New England Biolabs; Inkubation: 4h, 37°C) linearisiert. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde anschließend auf einem 0,8%igen Agarose-Gel überprüft. Die linearisierten Shuttle-Plasmide (1 μ g) wurden dann jeweils mit pAdEasy-1 (0,1 μ g) zusammen in BJ5183 kotransfiziert (siehe Kapitel 3.4.1 auf Seite 26). Zur Verbesserung der Kolonieausbeute wurde der Kotransformationsansatz 15 Min vorinkubiert. Die transformierten Zellen wurden nach erfolgter Transformation durch Zentrifugation (1 Min, 13.000 UPM) pelletiert und vollständig auf einer Kanamycin-haltigen Kulturplatte zur Selektion ausgestrichen. Nach Bebrütung (8 h, 37°C) wurden Einzelkolonien gepickt und in Minikulturen amplifiziert und Plasmide präpariert. Die Plasmide wurden mit einem Restriktionsverdau durch EcoRV und HindIII und anschließender Gelelektrophorese kontrolliert. Die richtigen Rekombinanten wurden amplifiziert und hochaufgereinigt.

Die Arbeit von ZENG ET AL [121] zeigt, dass die Ausbeute richtig homolog rekombinierter Vektoren durch den Einsatz eines Elektroporators zur bakteriellen Transformation stark gesteigert werden kann. Dies konnte bei den eigenen Versuchsreihen zur Transformation mit dem Elektroporator (Hersteller Eppendorf) nicht bestätigt werden. Die Zahl der angewachsenen BJ5183-Kulturen war um ein Vielfaches im Vergleich zur chemischen Transformation (siehe Kapitel 3.4.1 auf Seite 26) höher. Allerdings war der Anteil der Klone, welche korrekt homolog rekombinierten nicht erhöht, sodass weiterhin die chemische Transformation zur Herstellung der Rekombinanten genutzt wurde.

3.5.3 Sequenzanalyse der klonierten Adenovektoren

Um sicherzustellen, dass die klonierten Inserts tatsächlich in das Adenovektorkonstrukt integriert wurden, wurden die Inserts einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Analyse

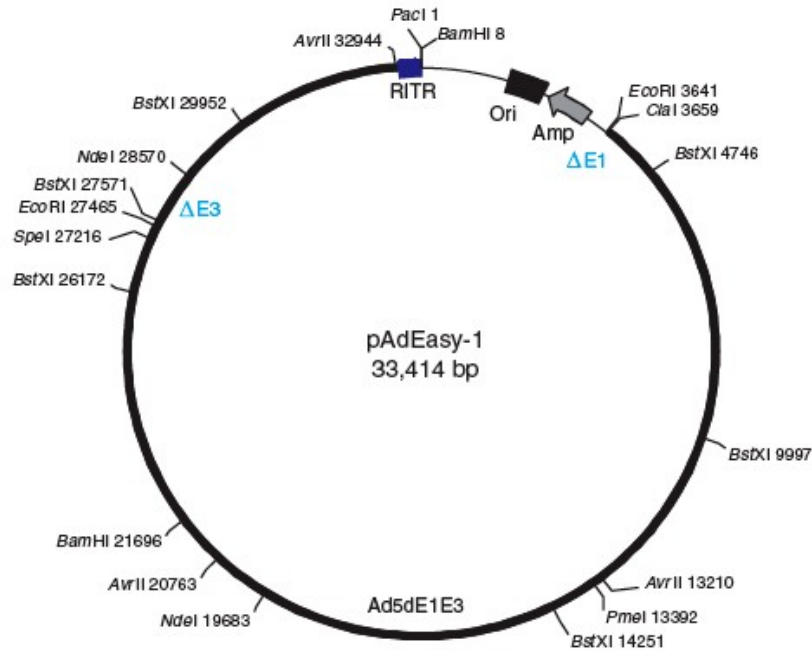


Abbildung 3.7: pAdEasy-1, Adeno-Backbone-Plasmid zur adenoviralen Produktion. [122]

der Sequenzen wurde von der Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH *GENterprise*⁵ vorgenommen

Zu diesem Zwecke wurde die zu untersuchende DNA der Konstrukte mit Ethanol (99%) und NaAcetat gefällt und abzentrifugiert, zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen und schließlich in Aqua dest. gelöst. Dieses Präzipitat wurde gereinigt und anschließend analysiert.

Für die Sequenzanalyse wurde in 5'-3'-Richtung eine Oligonukleotidsequenz mit Homologie zum CMV-Promoter (diese befindet sich vor der MCS des Plasmids) genutzt. Als Reverse-Primer in 3'-5'-Richtung wurde eine Plasmid-spezifische Sequenz hinter MCS liegend genutzt. Die beiden Basenabfolgen sind im Folgenden dargestellt:

- **CMV-Promotor-Primer:**
CGC-AAA-TGG-GCG-GTA-GGC-GTG
- **Reverse-Primer:**
TCA-GGT-TCA-GGG-GGA-GGT

⁵ Johann-Joachim-Becher-Weg 3a
D-55099 Mainz

Das Ergebnis der Sequenzanalyse wurde mit der Analysesoftware *4Peaks*⁶ ausgewertet und mit Hilfe des BLAST-Algorithmus [123] mit den Sequenzdatenbanken der *NCBI*⁷ und der *HCV sequenz database*⁸ abgeglichen.

3.5.4 Transfektion von rekombinaten Konstrukten in Zelllinien

Die Rekombinaten, deren Integrität durch Restriktions- und Sequenzanalyse überprüft wurde, wurden in einem Restriktionsverdau mit *PacI* linearisiert (Restriktionsansatz: *PacI* (0,1 U/ μ l), Puffer *Neb-1*, New England Biolabs; Inkubation: 4h, 37°C). Die Vollständigkeit des Verdau wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese (0,9% Agarose) kontrolliert. Die Plasmid-DNA des Konstrukts wurde mit *NaAcetat* in *Ethanol* gefällt, um Restriktionsenzym und Pufferlösung aus dem Ansatz zu befreien. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

Zur Transfektion der rekombinierten Konstrukte in die Packzelllinie *Hek-293*, um Adenoviren herzustellen und zu amplifizieren, wurden *293-Zellen* in 6-Well-Platten bzw. kleinen Kulturflaschen ausplattiert. Zur Transfektion wurden 4-8 μ g DNA in 50 μ l *Opti-MEM* (reduziertes Zellmedium; Hersteller *Invitrogen*) gelöst. Ebenso wurden 10-20 μ l *Lipofectamin 2000* (Transfektionssubstanz; Hersteller *Invitrogen*) in 50 μ l *Opti-MEM* gelöst und für 5-10 Min inkubiert. Danach wurden die beiden Ansätze gepoolt, vorsichtig vermischt und für 20 Min bei RT inkubiert. 100 μ l des Ansatzes wurden dann auf die Zellen gegeben und diese 4-6 h im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden das Zellmedium gewechselt und die Zellen für ca. 48h inkubiert. Zum Abschluss wurde mit Hilfe der GFP exprimierenden Zellen die Transfektionseffizienz ermittelt.

3.6 Nachweis der viralen Replikationsprodukte

3.6.1 Transduktion von Zellen mit adenoviralen Konstrukten

Die Transduktion mit Adenoviren erfolgte mit definierten Mengen der adenoviralen Konstrukte (Virus-Titer-Bestimmung siehe Kapitel 3.6.2). Das Zellmedium wurde vor Transduktion abgenommen und durch Verdünnung von Virus in Zellmedium, entsprechender errechneter MOI, ersetzt. Zur Transduktion wurden die Zellen für 4-6h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig gewaschen und frisches Zellkulturmedium hinzugegeben, die Zellen wurden nach der Transduktion 2-3 Tage im Zellinkubator inkubiert und anschließend weiterverarbeitet (siehe Kapitel 3.6.3) oder mikro-

⁶ <http://mekentosj.com>

⁷ National Center for Biotechnology Information
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁸ Los Alamos National Laboratory
<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html>

skopisch analysiert. GFP-exprimierende Zellen dienen zur Abschätzung der Transduktionseffizienz. Bereits einen Tag nach adenoviraler Transduktion waren transduzierte Zellen durch GFP-Expression unter dem Immunfluoreszenzmikroskop zu erkennen.

3.6.2 Anfärbung adenoviral-transduzierter Zellen und Virus-Titration

Das hier dargestellte Protokoll beschreibt die Arbeitsschritte des Adeno-Rapid-Titer-Kit der Firma Clontech. Die Färbung adenoviral-transduzierter Zellen geschieht mittels einer Antikörper-Reaktion mit anschließender Farbreaktion, ebenso lässt sich der Titer des Adenovirus-Konstrukts mit dem Kit bestimmen. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte erklärt, Tabelle 3.11 auf der nächsten Seite zeigt die zusätzlich benötigten Materialien.

5*10² Hek-293 Zellen mit 1mL Zellmedium pro Well wurden in einer 12-Well-Platte ausplattiert. Die Virus-Transduktion mit adenoviralen Konstrukten erfolgte in einer Verdünnungsreihe von 10⁻² - 10⁻⁷. Jedes Well wurde mit 100µl der jeweiligen Verdünnung transduziert und die Zellen anschliessend bei 37°C unter 5% CO₂ für 48h inkubiert. Danach wurde das Zellmedium entfernt und die Zellen unter der Hood angetrocknet. In einem nächsten Schritt wurden die Zellen mit 100% Methanol für 10 Min bei -20°C fixiert, anschliessend wurde das Methanol rasch wieder entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS + BSA gewaschen, danach mit dem Anti-Hexon-Ak in einer Verdünnung von 1:1000 für 1h bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wurde die Ak-Lösung wieder entfernt und die Zellen dreimal mit PBS + BSA gewaschen. Darauf folgte die 2.Ak-Reaktion mit dem Anti-Maus-Ak (1:500) für 1h bei 37°C. Nach Inkubation mit dem 2.Ak wurde wiederum mit PBS + BSA dreimal gewaschen. Im letzten Schritt wurde jeweils 1mL der DAB-Lösung(1%) auf die Zellen gegeben und die Zellen nach 10 Min Inkubation unter einem Phasenkontrastmikroskop analysiert.

Der Anti-Hexon-Ak bindet an Adenoviral-transduzierte Zellen, diese werden dann über die 2.-Ak-Reaktion mit anschließender Farbreaktion durch die DAB-Lösung sichtbar gemacht, in dem Zellen dunkel eingefärbt werden. Durch Auszählen gefärbter Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop und mit Hilfe der unten dargestellten Formel lässt sich der Titer des Virus-Stocks ermitteln.

$$\text{IFU/mL} = \frac{\text{infizierte Zellen/ausgezähltes Gesichtsfeld} * \text{ausgezählte Gesichtsfelder/Well}}{\text{Volumen des Virus (mL)} * \text{Verdünnungsfaktor}} \quad (3.2)$$

Durch die genaue Bestimmung der einzelnen Virus-Titer mit dem Adeno-Rapid-Titer-Kit konnten definierte Infektionsversuche geplant und durchgeführt werden. Näheres dazu wird im folgenden Kapitel beschrieben.

Tabelle 3.11: Adeno-Rapid-Titer-Kit Materialien

Name	Rezeptur
PBS Puffer + BSA	in wässriger Phase, Na ₂ HPO ₄ (85mM), NaH ₂ HPO ₄ (15mM), NaCl (100mM), pH 7,4, BSA (1%)
DAB-Lösung	metallhaltiges Substrat zur Färbung; vom Hersteller nicht näher bezeichnet
Anti-Hexon-Ak	auf Maus-Basis; vom Hersteller nicht näher bezeichnet
Anti-Maus-Ak	auf Ratten-Basis; vom Hersteller nicht näher bezeichnet

Tabelle 3.12: Proteinlyse-Puffer

Name	Rezeptur
Proteinlyse-Puffer	in wässriger Phase, Tris (1M, pH 8), EDTA (1M), Triton x-100 (0,005%)

3.6.3 Proteinisolation zur Analyse

Zur Isolation von Proteinen wurden Zelllinien bzw. PMH in 6-Well-Platten ausplattiert und am folgenden Tag mit adenoviralen Konstrukten transduziert. Pro MOI wurden 2 Wells transduziert, um genügend Proteine isolieren zu können. Nach Beendigung der Inkubationszeit nach Transduktion wurde das Zellmedium von den Zellen entfernt und diese kurz mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für mindestens 1h auf -80°C bzw. ÜN gefroren. Anschließend wurden die Zellen mit Proteinlysepuffer (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 3.12) benetzt. Pro Well wurden 50-60µl Proteinlysepuffer gegeben und die Zellen im Puffer aufgetaut und resuspendiert. Die Wells mit gleicher MOI wurden gepoolt, so dass sich ein Gesamtresuspendat von ca. 100µl ergab. Anschließend wurde das Resuspendat für 30 Min auf Eis inkubiert und danach bei 13.000 UPM für 10 Min abzentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Tube überführt und die Proteine entweder sofort im Western Blot (siehe Kapitel 3.6.4) analysiert oder bei -20°C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit Hilfe der Bradford-Methode [124] bestimmt.

3.6.4 Proteinanalyse mit Western Blot

Die Auftrennung von Proteinen aus Zell- und Leberlysaten erfolgte in einer zweiphasigen SDS-PAGE nach einer Methode von LAEMMLI ET AL. [125]. Die SDS-PAGE bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel (10- bzw. 12% Polyacrylamid; genaue Rezeptur siehe Tabelle 3.13). Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem konstanten elektrischem Feld. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei

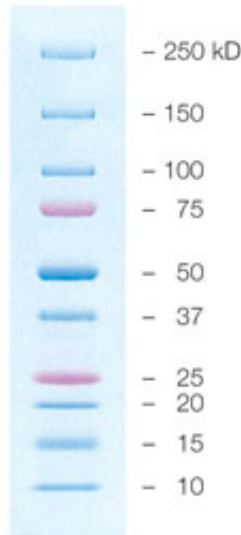


Abbildung 3.8: Dual Color Proteinstandard (Hersteller Bio-Rad)

50mA, die Auftrennung der Proteine im Trenngel bei 100mA. Die Auftrennung wurde gestoppt, nachdem die Farbfront das Gel-Ende erreicht hatte. Als Größenmarker wurde der Dual Color (Bio-Rad) genutzt (vgl. Abbildung 3.8).

Die aufgetrennten Proteine wurden mit einer Blotvorrichtung bei konstantem elektrischen Feld (120 mA, 1 h, zusätzliche Kühlung) auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran in jeweiligen Blockmedium für 1 h bei RT schüttelnd geblockt, um Hintergrundsignale zu reduzieren.

Die Detektion der gesuchten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 3.14 auf der nächsten Seite) in Pufferlösungen (PBS-Tween bzw. 5% Milchpulver in PBS-Tween; teilweise erfolgte der Zusatz von 5% BSA). Die Inkubation des 1.Ak erfolgte in der Regel ÜN bei 4°C, alternativ für 1h bei RT. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBS-Tween gewaschen und mit einem 2.Ak inkubiert. Als 2.Ak dienten IgG-Fc-Region spezifische Peroxidase / Phosphatase gebundene Antikörper. Die Proteinbanden wurden mittels einer Chemolumineszenz visualisiert und auf Amersham Hyperfilm (GE Healthcare) entwickelt.

Die Filme wurden anschließend mit einem Flachblattscanner der Firma Hewlett Packard eingescannt und mit der frei verfügbaren Analysesoftware *ImageJ*⁹ des National Institutes of Health densitometrisch erfasst. Danach wurden die densitometrisch erfassten Werte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Excel* (Microsoft) ausgewertet.

⁹ ImageJ - National Institutes of Health (NIH)
<http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Tabelle 3.13: Western Blot Materialien

Name	Rezeptur
Proteinproben-Puffer	in wässriger Phase, TrisCl (200mM, pH 8,8), EDTA (5mM), SDS (3%), Bromphenolblau (0,1%), Saccharose (10%), β -Mercaptoethanol (1,7%)
Transfer-Puffer	in wässriger Phase, TrisCl (48mM, pH 9,2), Glycin (39mM), SDS (0,0375%), Metahnlol (20%)
Lauf-Puffer	in wässriger Phase, TrisCl (25mM, pH 8,3), Glycin (250mM), SDS (0,1%)
Trenn-Gel	in wässriger Phase, Polyacrylamid (4,5%), TrisCl (0,12mM, pH 6,8), SDS (0,1%)
Sammel-Gel	in wässriger Phase, Polyacrylamid (10/12,5%), TrisCl (0,37mM, pH 8,8), SDS (0,1%)
Rotiblock-Medium	PBS (1%), Rotiblock (10%)
Milchblock-Medium	PBS (1%), Tween (0,1%), Milchpulver (5%)
BSA-Block-Medium	PBS (1%), Tween (0,1%), BSA(5%)
Milchblock-Medium (2.Ak)	PBS (1%), Tween (0,1%), Milchpulver (0,5%)

Tabelle 3.14: Antikörper für Western Blot

Name	optimales Blockmedium	Eigenschaft	Hersteller
Anti-HCV-Core	Rotiblock-Medium	Ak gg. HCV-Core (22kD)	ABR
Anti-HCV-NS5a	Milchblock-Medium	Ak gg. HCV-NS5a (58kD)	Santa Cruz
Anti-GFP	Milchblock-Medium	Ak gg. GFP (26,9kD)	Cell Signaling
Anti-MCL-1	Milchblock-Medium	Ak gg. MCL-1 (36kD)	Rockland
Anti-P-JNK	Milchblock-Medium	Ak gg. phosphoryliertes JNK (36kD)	Cell Signaling
Anti-JNK	Milchblock-Medium	Ak gg. JNK (36kD)	Cell Signaling
Anti-Aktin	Rotiblock-Medium	Ak gg. Aktin zur Ladekontrolle (43kD)	ABR
Anti-Aktin-HRP	Rotiblock-Medium	Ak gg. Aktin zur Ladekontrolle (43kD) an HRP zu direkten Farbmakierung gekoppelt	ABR

3.7 Untersuchung adenoviral-transduzierter Zellen

3.7.1 Mikroskopische Analyse

Die Darstellung von adenoviral-transduzierter Zellen erfolgte mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops bzw. eines Phasenkontrastmikroskops (Hersteller: Olympus).

Die Zellen wurden für diese Zwecke in einer 24-Well-Platte ausplattiert und nach Anwachsen im Well mit Viren in abnehmender MOI transduziert. Eine Kontrolle, nicht-transduziert, wurde jeweils mitgeführt. 72 h nach Transduktion wurden die Zellen mit Methanol-NaAcetat (10 Min bei -20°C) bzw. mit PBS (5% PFA) (20 Min bei RT) in den Wells fixiert und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen.

Unter dem IFM bzw. PKM wurden Zellen und Zellstrukturen mit Hilfe der Microscopy Imaging Software *cell^r* von Olympus fotografiert, bearbeitet und analysiert.

3.7.2 Färbung von Zellkernen

Zur Detektion von transduzierten Zellen und zur Beschreibung toxischer Effekte durch die adenovirale Infektion wurden Zellkernfärbungen mit DAPI [126] genutzt. DAPI bindet an Adenin- bzw. Thymin-reiche Regionen der DNA im Zellkern der Zellen und kann so lebende und fixierte Zellen unter IFM sichtbar machen.

Die Zellen wurden dazu, wie in Abschnitt 3.7.1 beschrieben, zur Analyse transduziert. Nach Fixierung im Well (mit PBS (5% PFA) für 20 Min bei RT) wurde eine DAPI-Lösung (DAPI 1:5000 in PBS) auf die Zellen gegeben und für 5 Min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und lichtgeschützt bis zur Mikroskopie gelagert. Mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskopes war es so möglich in einer Doppelfluoreszenz sowohl das grüne Zytoplasma der GFP exprimierenden Zellen, als auch die, durch DAPI blau gefärbten, Zellkerne darzustellen.

Die Transduktion von Zellen mit nicht-GFP-Gen tragenden Viren AdE-Core und AdE-NS5a wurde durch die optische Veränderung der Zellkerne nach DAPI-Färbung unter IFM und durch die Veränderung der Zellen unter PKM (z.B. hinsichtlich der Bildung von viralen Plaques) analysiert.

3.7.3 Untersuchung der Zellviabilität mit MTT-Assay

Die Viabilität der Zellen nach Transduktion mit Adenoviren wurde mit Hilfe eines MTT-Assay beschrieben. Diese Methode beruht auf der Reduktion des Farbstoffs MTT in wasserunlösliches Formazan, welche sich photometrisch bestimmen lässt [127].

PMH-, HepG2- bzw. Huh7-Zellen wurden am Tag vor der Transduktion ausplattiert ($2 \cdot 10^6$ pro 24-Well-Platte PMH-Zellen bzw. $3 \cdot 10^6$ pro 24-Well-Platte HepG2-/Huh7-Zellen) und am folgenden Tag mit Adenoviren entsprechender MOI infiziert. 72 h nach Transduktion wurde MTT (5 mg/ml in das Zellmedium) auf die Zellen

gegeben und die Zellen für weitere 3 h im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Zellmedium und MTT von den Zellen abgenommen und die Zellen für mindestens 30 Min bei -80°C inkubiert und danach durch Zugabe von 1-Propanol (100%) lysiert. Die Lysate wurden anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Die Messungsergebnisse wurde mit der Software *SkanIt* (Hersteller Thermo Co.) generiert und ausgewertet. Die Viabilität der Zellen wurde anhand einer Negativkontrolle von nicht infizierten Zellen mit folgender Formel errechnet:

$$V = \frac{E_{Probe}}{E_{Negativkontrolle}} * 100 \quad (3.3)$$

V = Viabilität

E = Extinktion

Für die statistische Auswertung der Frage, ob signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zellviabilität zwischen adenoviral-transduzierten bzw. nicht-transduzierten Zellen bestanden, wurden jeweils mehrere Transduktionen gleicher MOI ausgewertet, Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet und ein *students t-test* für unverbundene Stichproben durchgeführt.

3.7.4 Wachstumsassay adenoviral-transduzierter Zellen

Für die Beschreibung, wie die Transduktion mit adenoviralen Konstrukten die Wachstumskinetik der Zellen verändert, wurden HepG2- bzw. Huh7-Zellen in einer Konzentration von $4 \cdot 10^4$ /Well auf 24-Well-Platten ausplattiert. Nach Anwachsen der Zellen im Well wurden diese mit Adenoviren festgelegter MOI 50 transduziert. Nicht-transduzierte Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Pro Transduktion bzw. Negativkontrolle wurden je vier Well-Löcher für jeden Tag der Messung angelegt. Die Zellen wurden über 7 Tage im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. An jedem Tag der Wachstumsanalyse wurden Zellen aus je 4 Well-Löchern pro Infektion bzw. Negativkontrolle durch Trypsinisierung gelöst und nach Tryphan-Blau-Färbung unter dem Mikroskop gezählt (jeweils vier Quadrate pro Neubauer-Zählkammer).

Zur besseren statistischen Beschreibung wurden danach für jeden Tag die Mittelwerte bestimmt. Anschließend wurden die Wachstumskurven der infizierten Zellen in Abhängigkeit nach Infektion mit den einzelnen adenoviralen Konstrukte unter Berücksichtigung der Negativkontrolle mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Excel* (Microsoft) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Rekombinante Adenoviren

Ein wesentlicher Teil der hier vorgelegten Arbeit bestand in der Konstruktion adenoviraler Vektoren, die HCV-Genomanteile tragen und virale Proteinexpression in Zielzellen erzielen können. Die Entwicklung der erforderlichen Methode wurde im Abschnitt 3.5 auf Seite 31 dargestellt. Die folgenden Abschnitte beschreiben Ergebnisse dieser Teilschritte, die zur Konstruktion der Vektoren nötig waren.

4.1.1 Klonierungen der Shuttle-Plasmide

Die HCV Genom-Anteile HCV-Core und HCV-NS5a wurden jeweils in das Shuttle-Plasmid pShuttle-CMV kloniert (siehe die Abbildungen 3.6 auf Seite 34 und 3.6 auf Seite 34). Zur Überprüfung der Integrität der klonierten Plasmide wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII/XbaI für pShuttle-CMV-Core bzw. NotI/XbaI für pShuttle-CMV-NS5a, die zuvor zum Einklonieren der Inserts genutzt wurden, wurden die Inserts zur Analyse wieder herausgeschnitten. Bei erfolgreicher Klonierung muss daher das Plasmid Schnittstellen für beide Restriktionsenzyme besitzen und das Insert muss als separate Bande spezifischer Größe HCV-Core (573 bp) und HCV-NS5a (1343 bp) bei einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.4.4 auf Seite 29) erscheinen. Die Abbildung 4.1 auf der nächsten Seite zeigt das Resultat der analytischen Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der Integrität der klonierten Shuttle-Plasmide. Die erfolgreiche Klonierung ist anhand der spezifischen Banden nach Einsatz beider Restriktionsenzyme erkennbar.

4.1.2 Generierung Insert-tragender Adenokonstrukte

Die Generierung der Insert-tragenden Adenokonstrukte gelang mit der Entwicklung der Methode, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben. Die Shuttle-Plasmide pShuttleCMV-Core und pShuttleCMV-NS5a konnten jeweils mit PacI linearisiert und mit dem ungeschnittenen AdEasy-1 Adeno-backbone-Plasmid in zwei Ansätzen in Rekombinase-fähigen BJ5183 Bakterien kotransfiziert werden. Nach der Transfektion wurden die Kulturen unter Kanamycin-Selektionsdruck in LB-Medium zur Amplifikation inkubiert. Durch Minipräparation wurde Plasmid-DNA der homolog rekombinierten Adenokonstrukte gewonnen, die zur Analyse der Integrität genutzt wurde. Die durch die homologe Rekombination gewonnenen Adenokonstrukte wurden als AdE-Core und AdE-NS5a be-

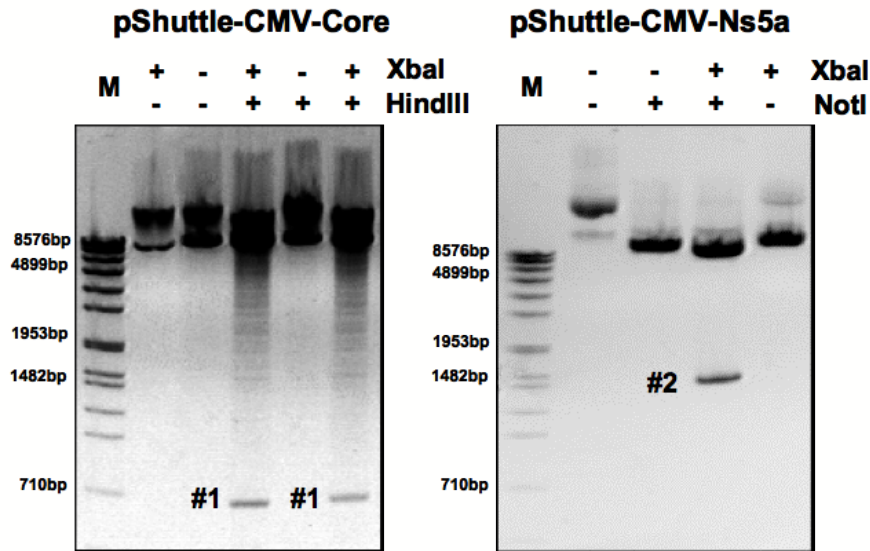


Abbildung 4.1: Analytische Gel-Elektrophorese. Das Shuttle-Plasmid pShuttle-CMV-Core (linke Seite) wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII u./o. XbaI analytisch geschnitten. Das Shuttle-Plasmid pShuttle-CMV-NS5a (rechte Seite) entsprechend mit den Restriktionsenzymen NotI u./o. XbaI. Der Restriktionsverdau zeigt charakteristische Banden für die Inserts HCV-Core (#1) und HCV-NS5a (#2) nur nach Einsatz beider Restriktionsenzyme. Agarose-Gel 0,8%. M: DNA-Marker VII von Roche Applied Science (vgl. Abb. 3.2 auf Seite 30)

zeichnet. Abbildung 4.2 zeigt die Adenokonstrukte AdE-Core und AdE-NS5a. Das Shuttle-Plasmid pAdTrack (enthält eine GFP-Reporterkassette) wurde mit AdEasy-1 auf gleiche Weise rekombiniert, das hierdurch entstandene Konstrukt wurde als AdGFP [128] bezeichnet und diente im Folgenden durch die GFP-Expression als Kontrolle für Transduktionsversuche. Die Tabelle 3.10 auf Seite 35 gibt eine Übersicht über die Adenokonstrukte dieser Arbeit.

4.1.3 Analyse Insert-tragender Adenokonstrukte

4.1.3.1 Restriktionsanalyse Insert-tragender Adenokonstrukte

Für die Überprüfung der Integrität der hier vorgestellten rekombinanten Adenokonstrukte wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Als ersten Schritt der Analyse wurden die Adenokonstrukte, die klonierten Shuttle-Plasmide und die Ausgangsplasmide (pShuttle-CMV u. AdEasy-1) mit dem Restriktionsenzym PacI geschnitten und die Größe der entstandenen Banden auf dem Agarose-Gel verglichen. Die Abbildung 4.3 zeigt das Ergebnis des PacI-Verdau. Die rekombinanten Adenokonstrukte AdE-NS5a und AdE-Core zeigen beide eine 4,5 kb große Bande nach PacI-Verdau, welches vom pShuttle-CMV-Plasmid stammt. Im Gegensatz dazu wird das nicht rekombinierte AdEasy-Plasmid durch den Verdau lediglich linearisiert. Die rekombinanten Gesamtkonstrukte sind insgesamt größer. Dies ist an den nicht verdauten Banden (-) zu erkennen.

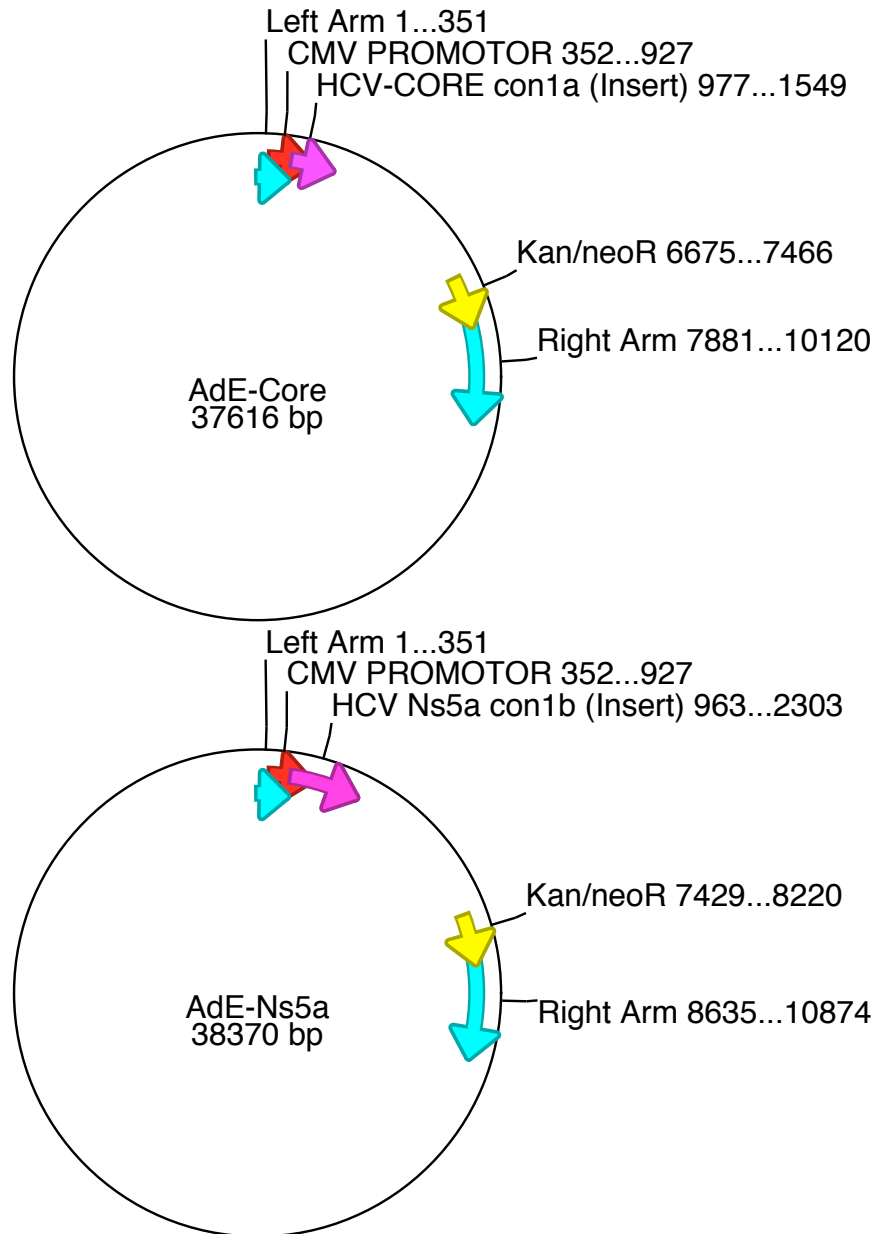


Abbildung 4.2: Karten der konstruierten Adenokonstruktes AdE-Core und AdE-NS5a. Die einklonierten HCV-Genomabschnitte HCV-Core und HCV-NS5a sind farblich markiert. Right Arm und Left Arm bezeichnen die Orte der homologen Rekombination des Adeno-Backbone-Plasmids AdEasy-1 (siehe Abb. 3.7) mit dem Shuttle-Plasmid pShuttle-CMV-Core (Abb. 3.5) bzw. pShuttle-CMV-NS5a (Abb. 3.6). (Karte wurde erstellt mit *ApE* (von M. Wayne Davis))

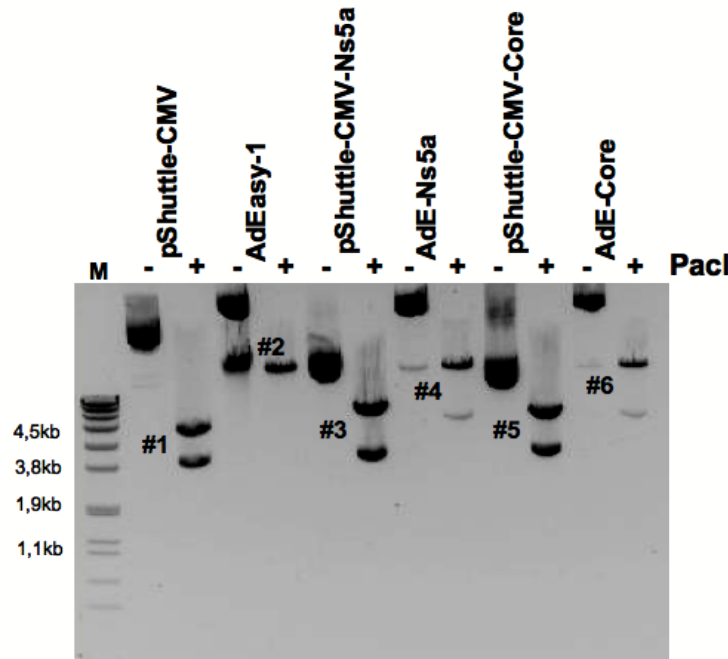


Abbildung 4.3: Analytische Gel-Elektrophorese. Die Ausgangsplasmide (pShuttle-CMV: #1 u. AdEasy-1: #2), die Shuttle-Plasmide (pShuttle-CMV-NS5a: #3 u. pShuttle-CMV-Core: #5) und die Adenokonstrukte (AdE-NS5a: #4 u. AdE-Core: #6) wurden mit PacI (+) analytisch verdaut. Zur Größenkontrolle wurde jeweils auch das nichtverdaute Plasmid (-) mit aufgetragen. Die homolog rekombinierte Adenokonstrukte zeigen die charakteristische 4,5kb-Bande. M: DNA-Marker VII von Roche Applied Science (vgl. Abb. 3.2 auf Seite 30)

Im zweiten Schritt der Analyse wurden die drei Adenokonstrukte (AdGFP, AdE-Core u. AdE-NS5a) mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten, um einen weiteren Beweis für die exakte Größe der rekombinanten Adenokonstrukte zu erhalten. AdGFP wurde als Kontrolle genutzt. Die rekombinierten Adenokonstrukte sollten anhand Schnittstellen mit AdGFP vergleichbar sein. Allerdings müssen aufgrund der Inserts (HCV-Core bzw. HCV-NS5a) weitere Bande erkennbar sein. Bei AdE-Core liegt diese Bande bei 4234 kb und bei AdE-NS5a ist die Bande bei 4546 kb (vgl. Abb. 4.4).

4.1.3.2 Sequenzanalyse Insert-tragender Adenokonstrukte

Die Integrität der rekombinierten HCV-Expressionskassette wurde durch Sequenzierung (*GENterprise*) kontrolliert. Zur Sequenzierung in 5'-3'-Orientierung wurde eine Oligonukleotid-Folge in Analogie zum CMV-Promotor genutzt. In reverser Orientierung kam eine Sequenzfolge zum Einsatz, die nach der MCS des Plasmids liegt (siehe Abschnitt 3.5.3 auf Seite 35).

In Abbildung 4.5 sind die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung für HCV-Core und HCV-NS5a als Chromatogramme gezeigt.

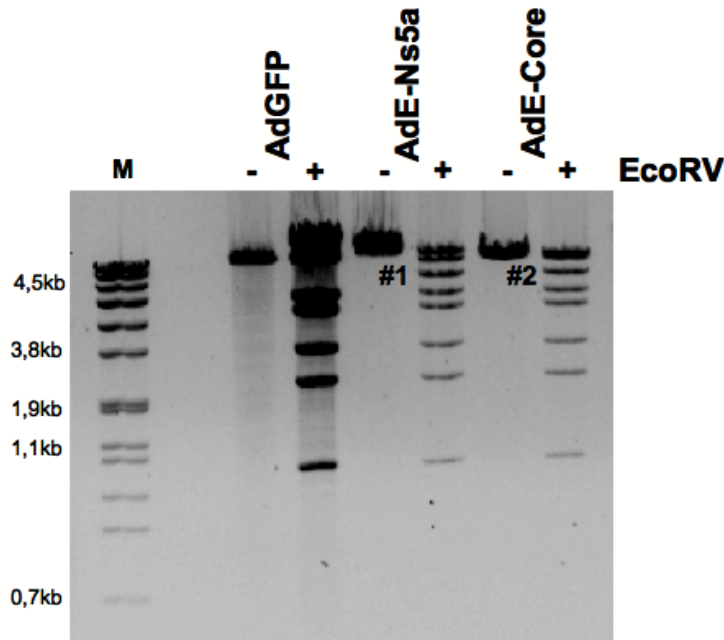


Abbildung 4.4: Analytische Gel-Elektrophorese. AdGFP, AdE-Core und AdE-NS5a wurden mit EcoRV (+) analytisch verdaut. Die neu generierten Adenokonstrukte zeigen im Vergleich zur AdGFP-Kontrolle eine weitere charakteristische Bande (AdE-NS5a: #1, AdE-Core: #2) als Zeichen den inklonierten Inserts. Zur Kontrolle sind die nicht verdauten Plasmide (-) mit aufgetragen. M: DNA-Marker VII von Roche Applied Science (vgl. Abb. 3.2 auf Seite 30)

Die Sequenzen sind in beiden Fällen frei von Frameshifts und die Signale der Basen sind deutlich abgrenzbar. Zur Übersicht wurden hier nur jeweils die ersten 100 Basen-Signale abgebildet.

Nach Auswertung des Sequenzanalysemodells folgte ein Genomabgleich mit Hilfe des BLAST-Algorithmus [129; 123]. Die Basenabfolge, die durch die Sequenzanalyse ermittelt wurde, wurde über die Sequenzdatenbank des *Los Alamos National Laboratory*¹ abgeglichen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Sequenzabgleichung mit Übereinstimmigkeiten des Sequenzvergleichs (totale und Prozentangaben) und Fehlern der Sequenzen (Lücken (totale und Prozentangaben)) dargestellt:

- **für HCV-Core:**

NC 004102 HCV H77 (seid 904) 1a
 Hepatitis C Virus (Complete Genom)
 Länge = 9646
 Übereinstimmungen = 577/578 (99%)
 Lücken = 0/578 (0%)

- **für HCV-NS5a:**

BD409971 HCV BD409971 (seid 5169421) 1b

¹ <http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html>

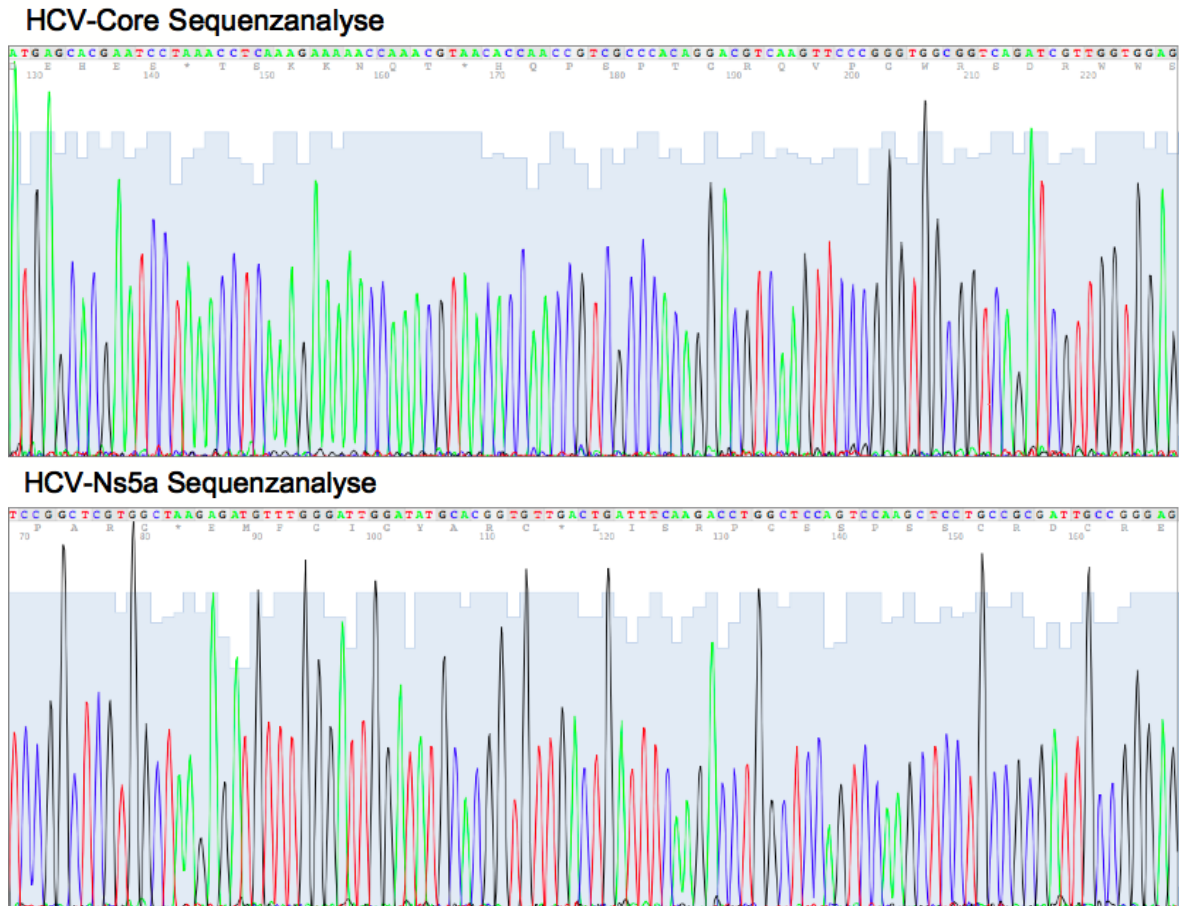


Abbildung 4.5: Sequenzanalyse von HCV-Core und HCV-NS5a. Aus Gründen der Übersicht sind jeweils nur die ersten 100 Basen der Genomabschnitte von HCV-Core und HCV-NS5a aus der Sequenzanalyse dargestellt. Der Datensatz wurde generiert durch *GENterprise*. Das Ergebnis der BLAST-Analyse ist auf der vorherigen Seite für HCV-Core und HCV-NS5a gezeigt. (Abbildung erstellt mit *4Peaks* (<http://mekentosj.com/science/>))

Hepatitis C Virus (Variants)

Länge = 9605

Übereinstimmungen = 642/651 (98%)

Lücken = 8/651 (1%)

4.1.4 Amplifikation und Isolierung von Adenoviren

Nach erfolgreicher Transfektion (Details siehe Kapitel 3.5.4) der adenoviralen Konstrukte in Hek-293-Zellen wurden nach ca. 1 Woche die ersten viralen Plaques beobachtet. Nach weiterer Inkubation wurden die Zellen mechanisch mit Zellmedium aus der Kulturflasche gelöst und mit einem dreifachen Zyklus aus Erwärmen (im Wasserbad bei 37°C) und Schockfrieren (in Flüssigstickstoff -196°C) aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellbestandteile (10 Min, 13.000 UPM) wurden die Zellysate in Stock-Tubes überführt und bei -80°C gelagert.

4.2 Nachweis und Effizienz des adenoviralen Vektortransfers

4.2.1 Färbung und Virustiterbestimmung

Mittels einer spezifischen Zellfärbung für Adenovirus-transduzierte Zellen durch eine Hexon-Antikörper-Reaktionen (vgl. Abs. 3.6.2) wurden die Titer der infektiösen adenoviralen Vektoren aus den Zelllysaten (siehe Abs. 4.1.4) bestimmt. Wie BEWIG UND SCHMIDT [130] zeigen konnten, ist diese Methode spezifisch für den Nachweis von adenoviral infizierten Zellen. Der Vorteil dieser Methode ist eine Virustiter-Bestimmung ohne Zuhilfenahme von Reportergenen (z.B. GFP).

Die Abbildung 4.6 auf der nächsten Seite zeigt das Ergebnis der Färbereaktion von 293 Zellen nach Infektion mit AdGFP, AdE-Core und AdeE-NS5a inklusive einer Negativkontrolle. Im Vorfeld des Versuchs wurde kontrolliert, ob AdGFP transduzierte Zellen das GFP Protein exprimieren. Das Bild zeigt, dass Zellen, welche Adenovirus replizieren, schwarz eingefärbt sind. Je mehr Viren bei der Transduktion eingesetzt wurden, desto mehr Zellen sind schwarz gefärbt. Die Negativkontrolle zeigt wie erwartet, keine schwarz gefärbten Zellen und somit keine adenovirale Infektion.

Mit Hilfe des Adeno-Rapid-Titer-Kits und der in Abschnitt 3.6.2 gezeigten Formel ist es möglich nach Bestätigung der Adenovirusinfektion die Titer der amplifizierten Viren zu errechnen. Dazu werden Zellen unter dem Mikroskop mit einer festgelegten Vergrößerung gezählt und die gemittelten Werte in die Formel eingesetzt. Somit wurden folgende Titer für die HCV-Insert tragenden Adenokonstrukte errechnet:

- für HCV-Core: $8,45 * 10^8$ IFU/ml

$$\text{IFU/mL} = \frac{28 \text{ (inf. Zellen/Gesichtsfeld)} * 313 \text{ (Gesichtsfelder/Well)}}{0,1 \text{ mL} * 10^{-4} \text{ (Verdünnungsfaktor)}} \quad (4.1)$$

- für HCV-NS5a: $2,5 * 10^9$ IFU/ml

$$\text{IFU/mL} = \frac{81 \text{ (inf. Zellen/Gesichtsfeld)} * 313 \text{ (Gesichtsfelder/Well)}}{0,1 \text{ mL} * 10^{-4} \text{ (Verdünnungsfaktor)}} \quad (4.2)$$

4.2.2 Transduktionseffizienz adenoviraler Vektoren

Im ersten Schritt wurden Zellen mit AdGFP transduziert. Die Expression des GFP-Proteins konnte unter dem IFM dargestellt werden. Um die GFP Expression in verschiedenen Zelllinien beurteilen zu können, wurden alle beschriebenen Zelllinien mit gleichen MOIs transduziert und 72 h nach Transduktion unter dem IFM analysiert. Abbildung 4.7 auf Seite 52 zeigt die transduzierten Zellen im Vergleich, eine tabellarische Auswertung ist in Abb. 4.8 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Expression des

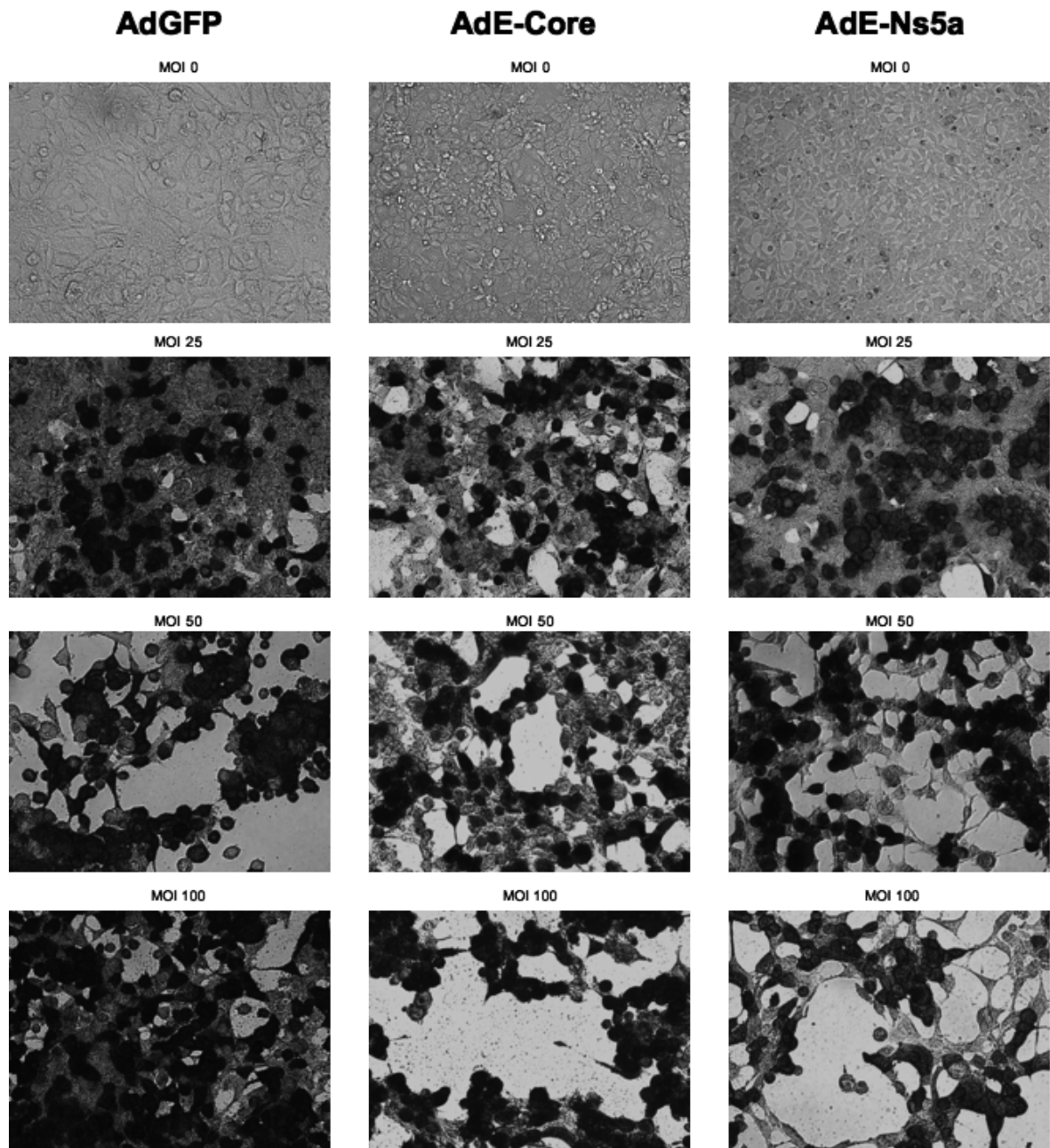


Abbildung 4.6: Hek-293-Zellen wurden mit AdGFP, AdE-Core und AdE-NS5a infiziert und 72h nach Infektion mit dem Adeno-Rapid-Titer-Kit (Hersteller: Clontech) analysiert. Virusinfizierte Zellen werden durch die Antikörper-Reaktion des ARTK schwarz gefärbt; nicht infizierte Zellen bleiben hell. AdGFP infizierte Zellen dienten als Kontrolle, die GFP Expression unter dem IFM wurde vor Versuchsbeginn bestätigt. Negativkontrollen (MOI 0) ebenfalls dargestellt.

Deutlich erkennbare Zell-Plaques als Zeichen für die Toxizität der Viren bei hohen MOIs. Insgesamt zeigt AdGFP bei hohen MOIs (vgl. MOI 100) die meisten positiven Zellen.

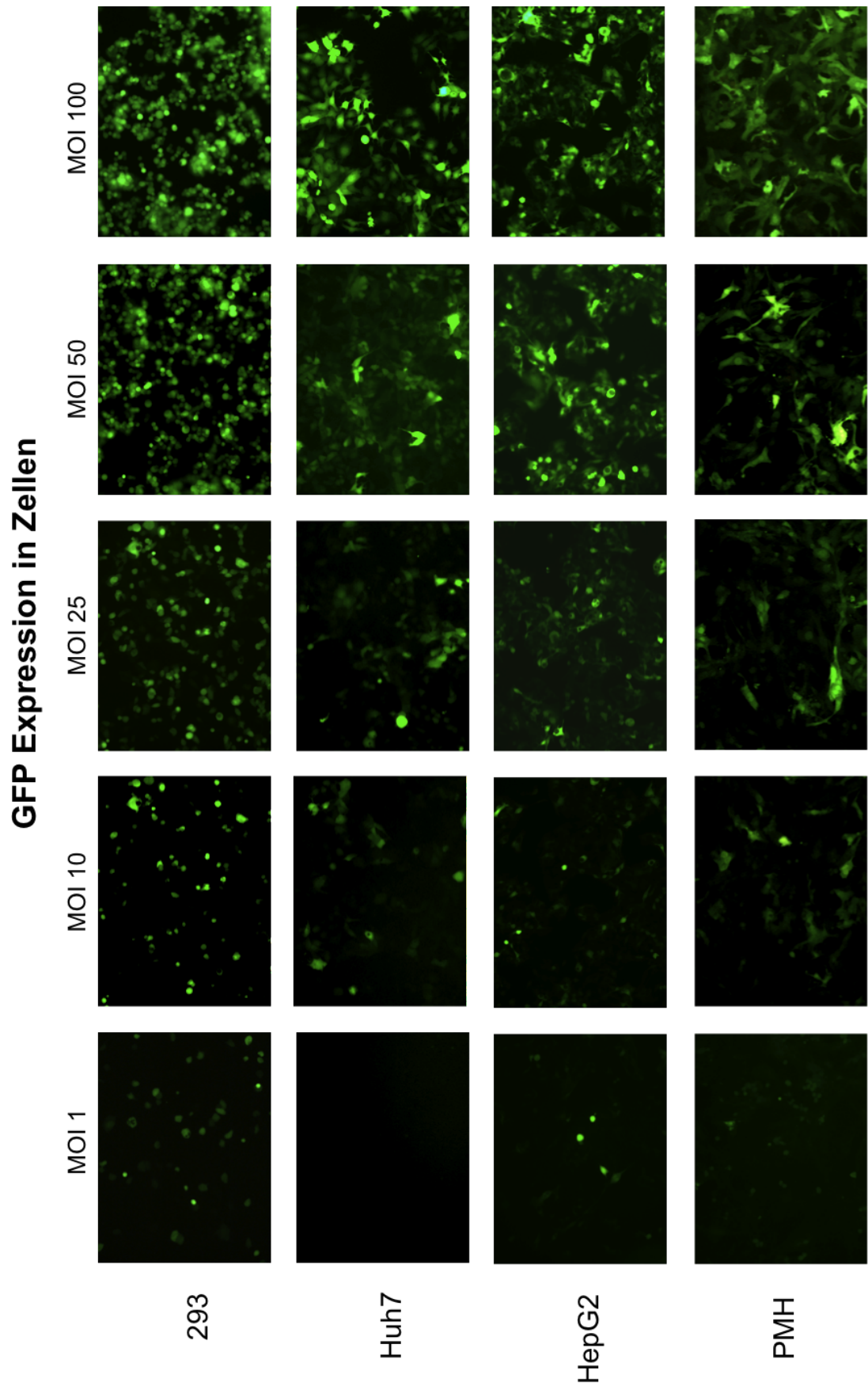


Abbildung 4.7: Exemplarische Darstellung der GFP-Expression nach Transduktion mit AdGFP in 293-, HepG2-, Huh7-Zellen und PMH. Zur Transduktion wurden ansteigende MOIs verwendet. 72 h nach Transduktion wurden die Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (Olympus) analysiert und fotografiert.

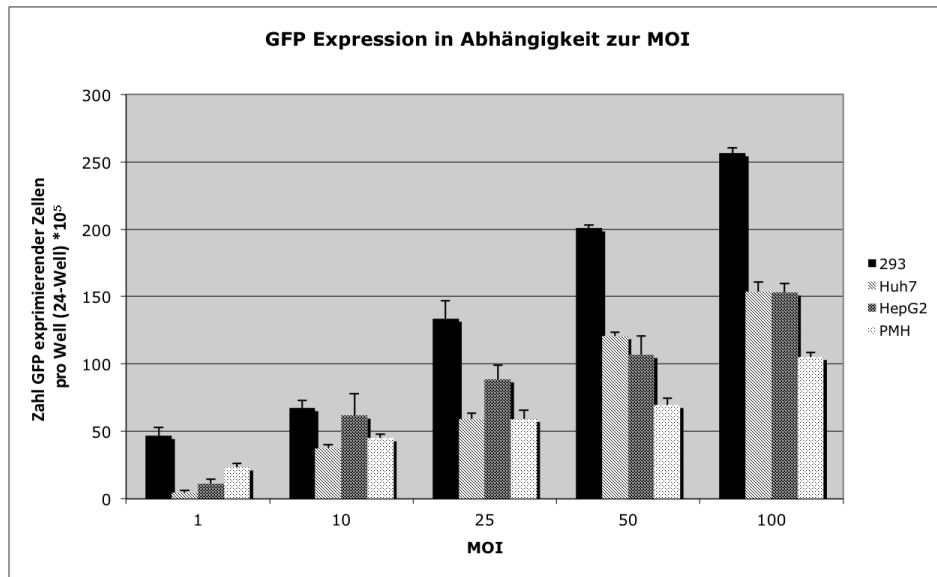


Abbildung 4.8: Auswertung der GFP-Expression in verschiedenen Zellen (vgl. Abb. 4.7). 293-, HepG2-, Huh7-Zellen und PMH mit AdGFP ansteigender MOI infiziert. 72 h nach Transduktion wurden die Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (Olympus) ausgezählt, Mittelwerte und Standardabweichung errechnet.

GFP mit steigender MOI deutlich zunimmt (vgl. Abb. 4.8). Gleichzeitig ist zu erkennen, dass sich die Zelllinien in der Stärke der GFP-Expression unterscheiden. Es zeigt sich, dass die Verpackungszelllinie 293 besonders gut zu transduzieren ist. Huh7-Zellen lassen sich im Vergleich dazu schlechter mit AdGFP transduzieren. Bei kleiner MOI sind nur wenige Huh7-Zellen grün fluoreszierend (MOI 1: $4,3 \pm 2,1 \cdot 10^5$). Die Transduktionszahlen steigen vergleichsweise langsam, trotzdem sind bei hohen MOIs viele Zellen transduziert (MOI 50: $120,7 \pm 3,1 \cdot 10^5$). HepG2-Zellen sind mit Huh7 vergleichbar hinsichtlich der Transduktionszahlen und der GFP Expression. PMH sind wesentlich größere Zellen, die ebenfalls GFP exprimieren, die Fluoreszenz ist im Vergleich nicht so intensiv.

In einem zweiten Schritt wurde die Viabilität der Zellen nach Transduktion mit Hilfe der DAPI-Färbung, die spezifisch DNA in Zellkernen färbt, verglichen. Wiederum wurden die verschiedenen Zelltypen (Huh7, HepG2 und PMH) mit gleichen MOIs transduziert und 72 h nach Transduktion analysiert. Zellen die sowohl einen blauen als auch einen grünen Farbstoff zeigten, konnten so als transduzierte, lebende Zellen dargestellt werden. Mit steigenden MOI nahm die Intensität des grünen Farbstoffes zu, die Viabilität der untersuchten Zelltypen nahm teilweise ab. Hohe MOI (z.B. MOI 100) waren oftmals toxisch, Zellplaques waren vermehrt sichtbar. Diese Beobachtungen wurden für alle Zelllinien gemacht. Es zeigte sich, dass bei Transduktion unter gleichen Bedingungen mit gleicher MOI die Huh7-Zellen das GFP-Protein stärker exprimierten als die HepG2 Zellen. Die Toxizität des Virus war in HepG2- höher als in Huh7-Zellen. Die Abbildung 4.9 auf der nächsten Seite zeigt den direkten Vergleich der Infektion in

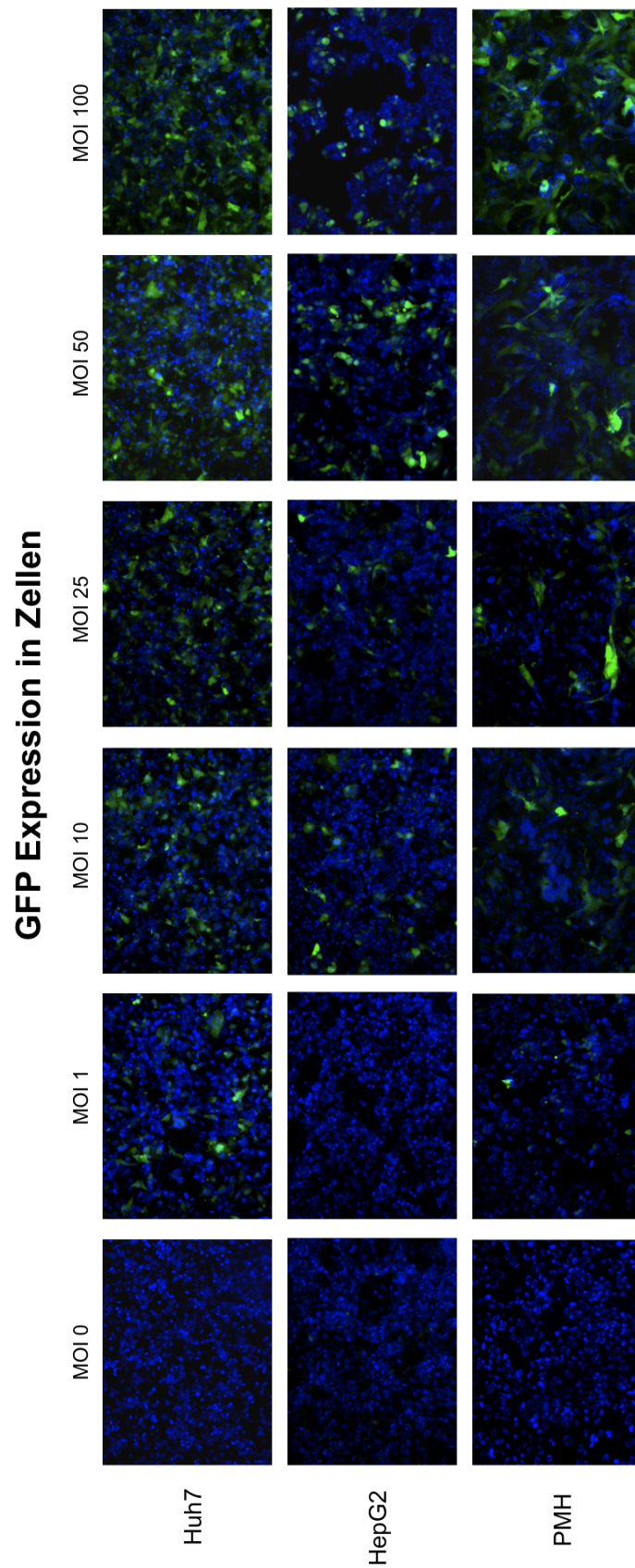


Abbildung 4.9: Exemplarische Darstellung der GFP-Expression in Huh7-, HepG2- und PMH-Zellen nach Transduktion mit AdGFP. Insgesamt deutlich stärkere GFP Expression in Huh7 Zellen als in HepG2 Zellen. Die mit DAPI blau angefärbten Zellkerne zeigen die Viabilität der Zelle. Bei steigender MOI ist die Kernstruktur schlechter abzugrenzen. 48 bzw. 72 h nach Transduktion. Doppelfluoreszenz mit Hilfe der Software *cellr* (Olympus) generiert.

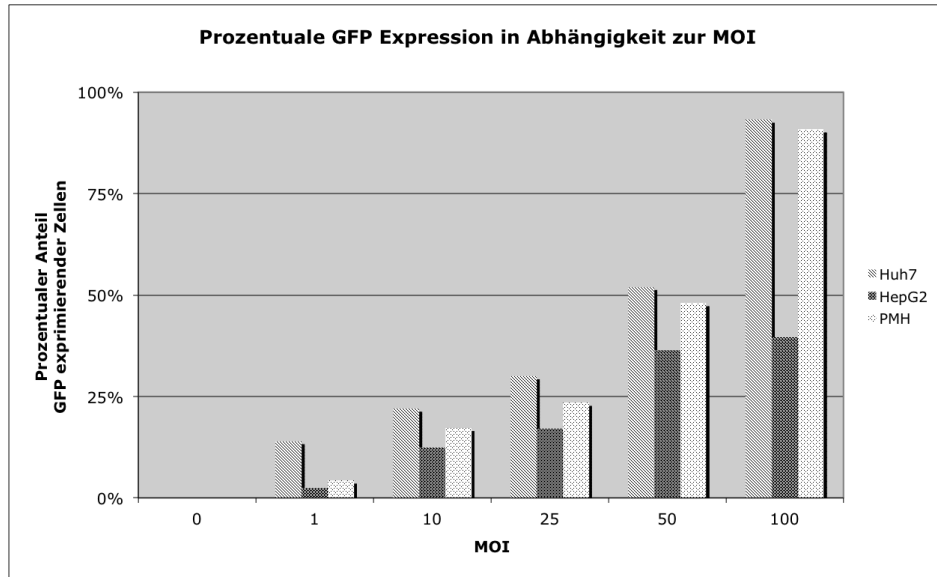


Abbildung 4.10: Auswertung der Transduktion mit AdGFP in Huh7-, HepG2- und PMH-Zellen (vgl. Abb. 4.9). 48h nach Transduktion wurden die Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (Olympus) ausgezählt und prozentuale Anteile der GFP exprimierenden Zellen errechnet.

den drei genannten Zelllinien. Eine graphische Auswertung mit prozentualen Transduktionszahlen ist in 4.12 dargestellt. Wie bereits in Abbildung 4.7 auf Seite 52 ersichtlich, ist die GFP Expression in PMH nicht so ausgeprägt hinsichtlich der Fluoreszenzstärke, jedoch ist der Anteil transduzierter Zellen vergleichsweise hoch.

Im dritten Schritt wurden die HCV-Adenokonstrukte AdE-Core und AdE-NS5a fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Bei diesen Konstrukten fehlt, wie schon erwähnt, die Möglichkeit die GFP-Expression als Zeichen für stattgefundene Transduktion darzustellen, weil beide Konstrukte keine GFP-Reporterkassette in ihrer Nukleotidsequenz besitzen. Dennoch war es möglich die Viabilität der Zellen nach Transduktion durch die DAPI Kernfärbung zu beurteilen. Mit DAPI können gesunde Zellkerne homogen eingefärbt werden, wo hingegen destruierte Zellkerne inhomogen erscheinen. Abbildung 4.11 zeigt den Vergleich der Kernfärbungen gesunder Zellen (PMH) mit adenoviral-transduzierten Zellen mit steigender MOI (MOI 25 und MOI 50 jeweils für AdE-Core und AdE-NS5a). Es wird ersichtlich, dass Zellen bei Transduktion mit hoher MOI eine geringere Viabilität haben. Die Zellkerne lassen sich nicht mehr homogen färben, die Grenze zwischen Zellkern und Zytoplasma ist nicht mehr gut erkennbar. Außerdem werden zwischen den Zellen große Löcher sichtbar. Dies ist auch in der Graphik 4.12 zu sehen. Mit Zunahme der MOI sinkt die Zahl der Zellen (z.B. AdE-Core: bei MOI 0: $234,3 \pm 6,7 \cdot 10^5$ - bei MOI 50: $52 \pm 2,6 \cdot 10^5$).

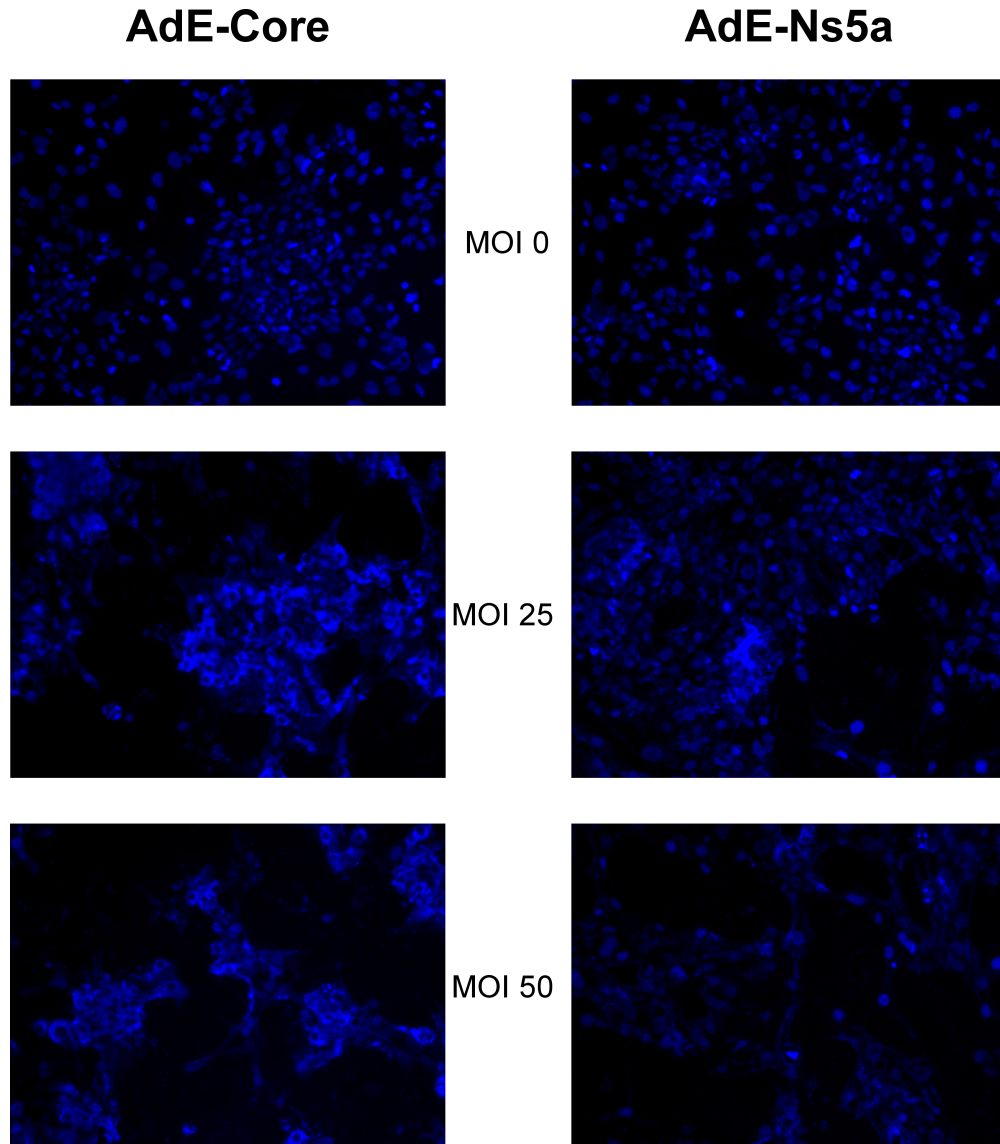


Abbildung 4.11: Primäre murine Hepatozyten (PMH) mit AdE-Core und AdNS5a mit steigender MOI transduziert. Dargestellt ist je die MOI 25 und MOI 50. Als Kontrollen werden nicht-transduzierte Zellen gezeigt (erste Spalte, MOI 0). Zellkerne sind nach Transduktion mit HCV-Insert-tragenden Adenokonstrukten deutlich inhomogener durch DAPI eingefärbt. Zellplaques deutlich erkennbar. (Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit der Software *cell* (Olympus) 72 h nach Transduktion.)

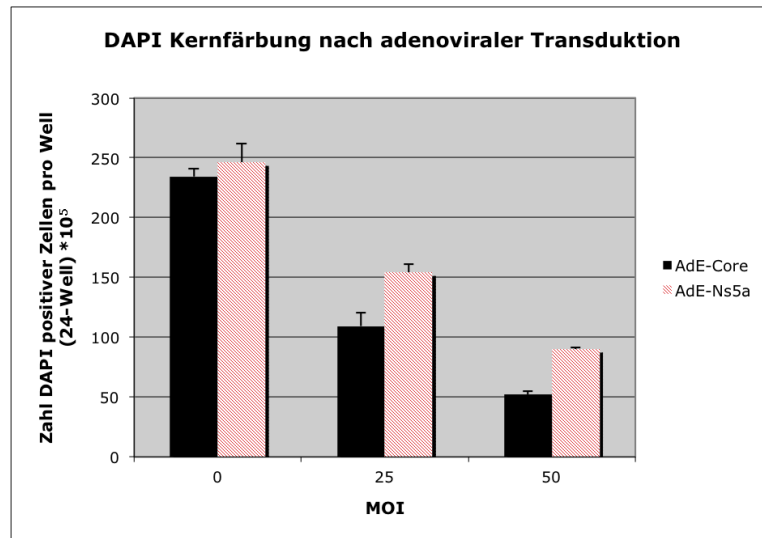


Abbildung 4.12: Primäre murine Hepatozyten (PMH) mit AdE-Core und AdNS5a mit steigender MOI transduziert. Die durch DAPI gefärbten Zellkerne wurden gezählt, Mittelwerte und Standardabweichung errechnet.

4.2.3 Expression viraler Proteine nach Transduktion

Zur Klärung der Frage, ob nach Transduktion der konstruierten Adenovektoren mit einklonierten Inserts, entsprechende Proteine exprimiert werden, wurden Western Blots von Zelllysaten angefertigt.

In einem ersten Schritt wurden dazu PMH-Zellen mit den drei adenoviralen Konstrukten AdGFP, AdE-Core und AdE-NS5a transduziert. Nach Zellyse und Proteinisolation wurden Western Blots mit den spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen exprimierten Proteine (GFP, HCV-Core und HCV-NS5a) angefertigt. Für alle drei Konstrukte konnte nachgewiesen werden, dass die kodierenden Proteine der adenoviralen Vektoren auch exprimiert werden! Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass bei steigender MOI die Menge der Expression von transduzierten Proteinen zunimmt. Am Beispiel von AdGFP gezeigt: Eine geringe MOI von 1 zeigt nur eine geringe Proteinexpression des grün fluoreszierenden Proteins (relative Intensität: 0,1), hohe MOIs von 50 oder 100 zeigen dagegen eine starke Proteinexpression (relative Intensität: 1,0). Für AdGFP lässt sich bis zu einer MOI 50 ein linearer Bereich der Transduktionseffizienz beschreiben. Eine Verdopplung der MOI (100) zeigt densitometrisch keinen weiteren Anstieg. Die Versuchsergebnisse der Transduktionen mit AdE-Core und AdE-NS5a, in den Abbildungen 4.14 und 4.15, zeigen ein ähnliche Relation von MOI zur nachgewiesenen Proteinexpression. Auch hier ist eine Dosis-abhängige Transduktionseffizienz der adenoviralen Konstrukte ersichtlich.

Im selben Versuch konnte nachgewiesen werden, dass die eingesetzten Antikörper keine Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen eingehen. Lysate AdGFP-transduzierter Zellen wurden dazu mit anti-HCV-Core bzw. anti-HCV-NS5a inkubiert.

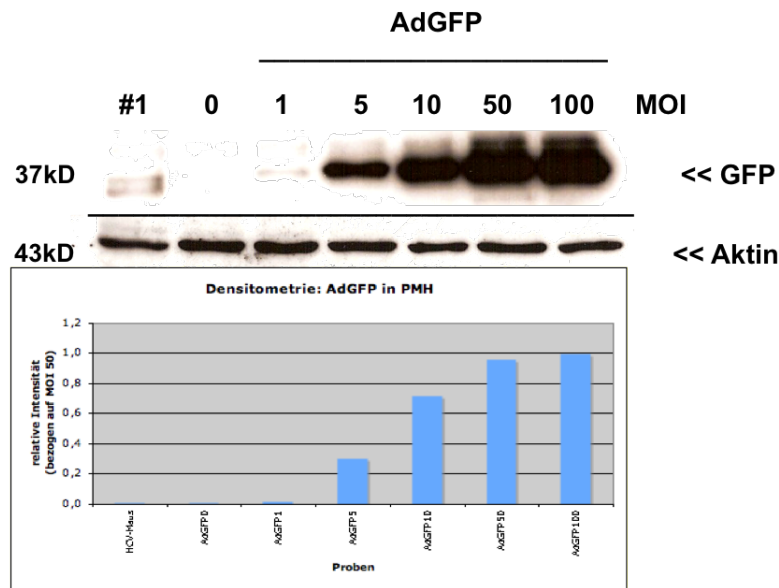


Abbildung 4.13: AdGFP Western Blot I. Nach Transduktion mit AdGFP in PMH wurde die Expression des GFP-Proteins mittels Western Blot detektiert. Vor Proteinisolierung wurde die GFP Expression im Fluoreszenzmikroskop überprüft (ähnliche Abb.: s. 4.7 auf Seite 52) Kontrollen: #1: Leberlysat einer HCV-positiven Maus, 0: Zelllysat nicht infizierter PMH; Aktin zur Proteinladekontrolle. Die untere Grafik zeigt die densitometrische Auswertung des Blots.

Es zeigten sich wie erwartet, keine Banden auf der spezifischen Höhe der Proteine HCV-Core (22 kD) und HCV-NS5a (58 kD). Zur Positivkontrolle wurden für HCV-Core ein Leberlysat einer HCV-transgenen Maus genutzt, für HCV-NS5a ein Zelllysat einer HCV-Replikon-Zelllinie exprimierenden Huh7-Zelllinie. Die Negativkontrollen waren nichtinfizierte PMH-Zellen.

Zur Klärung der Frage, ob jeweils die gleiche Menge Lysat in allen Geltaschen eingesetzt wurde, ist eine Aktin-Ladekontrolle angefertigt worden. Es zeigte sich für alle Versuche eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen mit Lysaten. Auffällig war lediglich, dass Leberlysate der HCV-transgenen Maus teilweise nicht erwartungsgemäß interagiert haben, die Bande war teilweise schwach ausgeprägt (vgl. Abb. 4.14).

4.2.4 Nachweis viraler Proteine nach Transduktion in humanen Zellen

Die Expression viraler Proteine wurden nach Detektion in murinen Hepatozyten auch in humanen Zelllinien untersucht. Die Zellreihe Huh7 wurde zur Proteinexpression *in vitro* benutzt.

Analog zu den oben gezeigten Versuchsreihen (siehe Abschnitt 4.2.3) wurden die Huh7 Zellen mit den adenoviralen Konstrukten AdGFP, AdE-Core und AdE-NS5a transduziert. Alle viralen Konstrukte wurden jeweils in steigender MOI transduziert.

In den Abbildungen 4.16 und 4.17 lässt sich jeweils eine Dosis-abhängige Transduktionseffizienz beschreiben. AdGFP ist bis zu einer MOI von 100 aufgetragen, AdE-

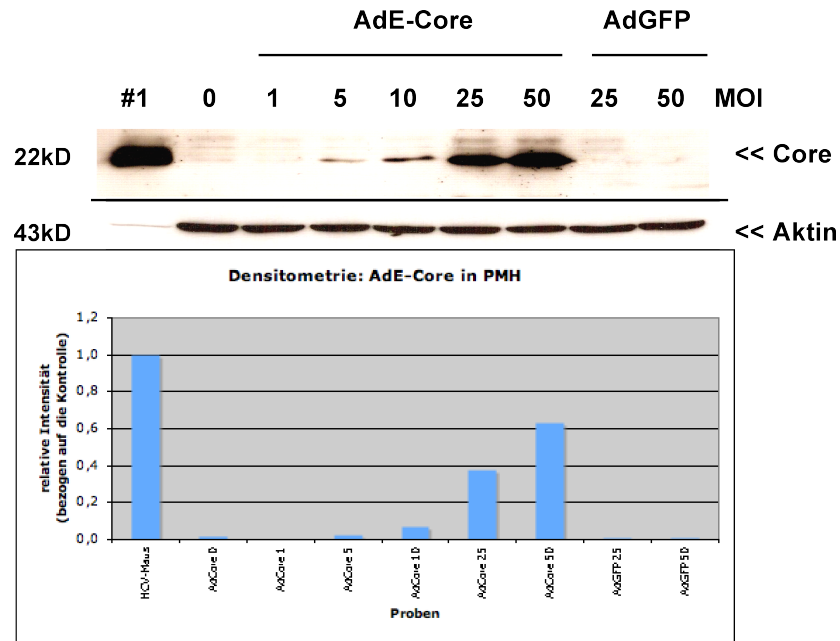


Abbildung 4.14: AdE-Core Western Blot I. Nach Transduktion mit AdE-Core in PMH wurde die Expression des HCV-Core mittels Western Blot detektiert. Kontrollen: #1: Leberlysat einer HCV-positiven Maus, 0: Zelllysat nicht infizierter PMH; AdGFP (MOI 10, MOI 100); Aktin zur Proteinladekontrolle. Die untere Grafik zeigt die densitometrische Auswertung des Blots.

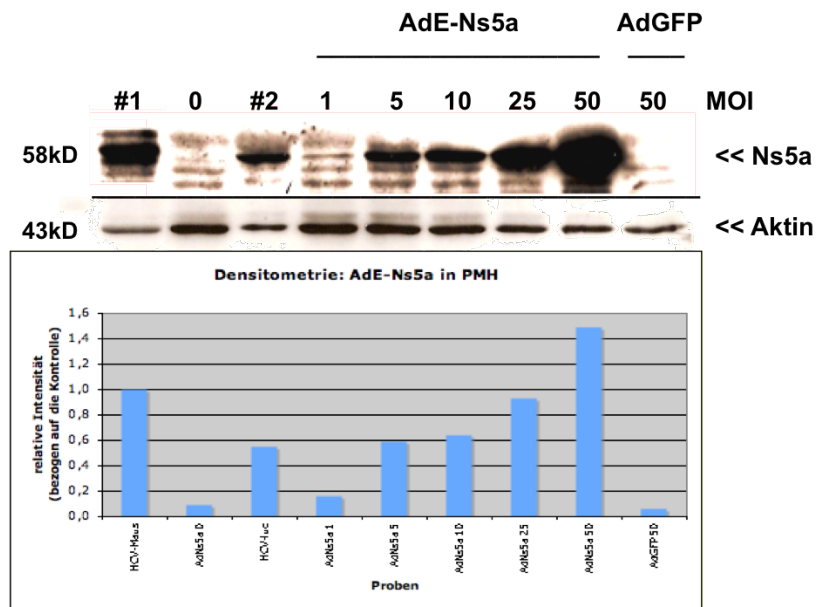


Abbildung 4.15: AdE-NS5a Western Blot I. Nach Transduktion mit AdE-NS5a in PMH wurde die Expression des HCV-NS5a mittels Western Blot detektiert. Kontrollen: #1: Leberlysat einer HCV-positiven Maus, #2: Zelllysat einer HCV-Replikon-Zelllinie, AdGFP (MOI 50); Aktin zur Proteinladekontrolle. Die untere Grafik zeigt die densitometrische Auswertung des Blots.

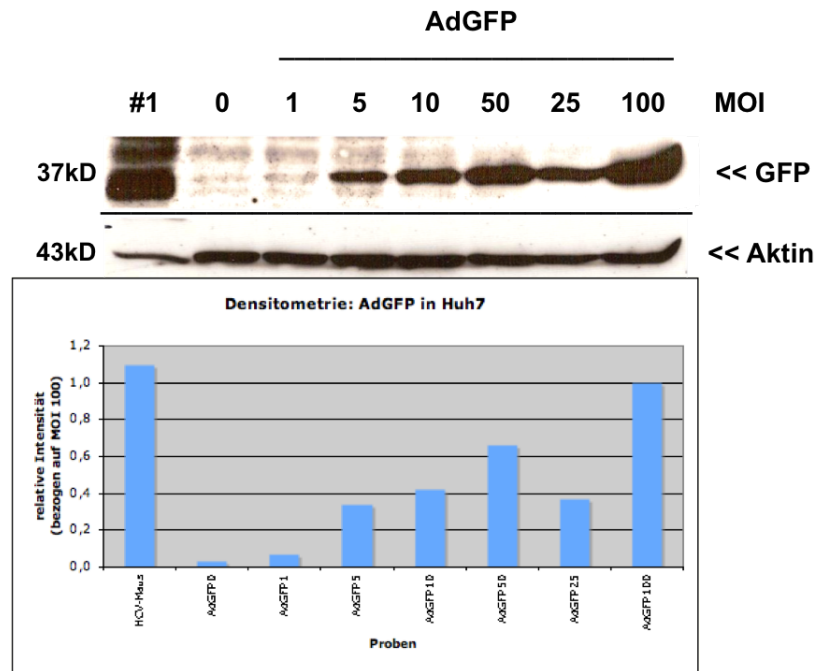


Abbildung 4.16: AdGFP Western Blot II. Nach Transduktion mit AdGFP in Huh7-Zellen wurde die Expression des GFP-Proteins mittels Western Blot detektiert. Vor Proteinisolation wurde die GFP Expression im Fluoreszenzmikroskop überprüft (ähnliche Abb.: s. 4.7 auf Seite 52) Kontrollen: #1: Zellysat einer GFP-positiven Zelllinie, 0: Zellysat nicht infizierter Huh7; Aktin zur Proteinsladekontrolle. Die MOI 25 und MOI 50 wurden beim Auftragen vertauscht. Die untere Grafik zeigt die densitometrische Auswertung des Blots.

NS5a ist bis zu einer MOI von 50 aufgetragen, AdGFP ist zur Kontrolle von Kreuzreaktionen des anti-NS5a-Antikörpers in der letzten Linie aufgetragen. Eine solche Kreuzreaktion war nicht ersichtlich und bestätigt damit die Versuchsreihen in den PMH (vgl. Abb. 4.15). Aktin wurde zur Ladekontrolle der Lysate in den Geltaschen ebenfalls aufgetragen.

4.3 Beeinflussung der Apoptose nach adenoviraler Transduktion

4.3.1 Viabilitätsmessung nach Transduktion

Die Viabilität der Zellen nach Transduktion mit adenoviralen Konstrukten wurde mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt (siehe Abschnitt 3.7.3 auf Seite 42). Die Messungen wurden 48 h bzw. 72 h nach Transduktion vorgenommen. Abweichend vom Standardprocedere wurden die Zellen vor der Zugabe des 1-Propanol für mindestens 30 Min bei -90°C vorinkubiert, um eine effektivere Lyse zu erreichen. Die Messungen, aus denen die Mittelwerte bestimmt wurden, wurden mehrfach wiederholt. Die Formel zur Berechnung der Viabilität ist in 3.7.3 dargestellt. Die Abbildung 4.18 auf Seite 62 zeigt Ergebnisse von MTT-Assays in PMH und Huh7-Zellen. Die drei adenoviralen Konstrukte (AdGFP, AdE-Core und AdE-NS5a) wurden hinsichtlich der Viabilität in

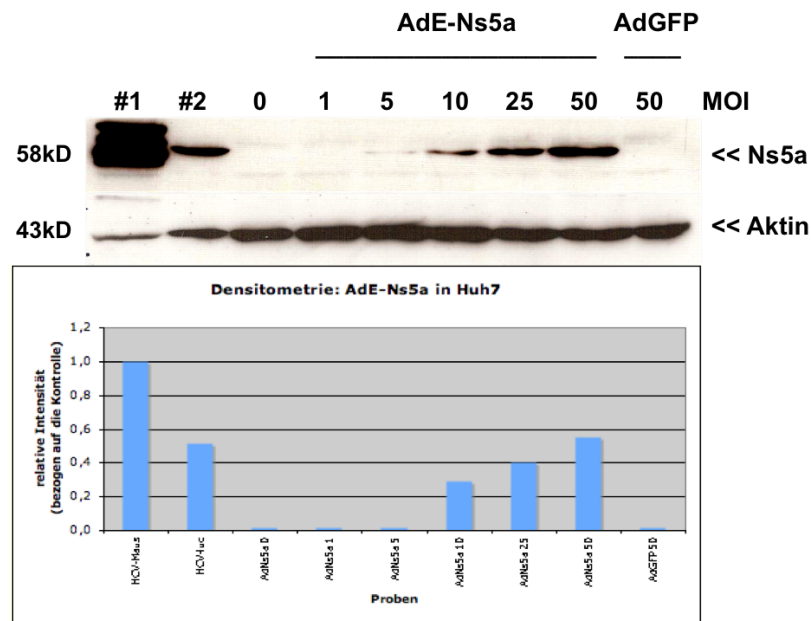


Abbildung 4.17: AdE-NS5a Western Blot II. Nach Transduktion mit AdE-NS5a in Huh7 wurde die Expression des HCV-NS5a mittels Western Blot detektiert. Kontrollen: #1: Leberlysat einer HCV-positiven Maus, #2: Zellysate einer HCV-Replikon-Zelllinie, 0: Zellysate nicht infizierter Huh7, AdGFP (MOI 50); Aktin zur Proteinladekontrolle. Die untere Grafik zeigt die densitometrische Auswertung des Blots.

Abhängigkeit zur transduzierten MOI (infektiösen Partikeln pro Zelle) untersucht. Mit steigenden MOIs nimmt die Viabilität der Zellen ab. Das Überleben der Huh7-Zellen 72 h nach Transduktion bei MOI 100 reduziert sich auf 67% der Ausgangszellzahl bei AdE-Core-Transduktion bzw. auf 66,7% bei AdE-NS5a-Transduktion auf 84,4% des Ausgangswert bei einer AdGFP-Transduktion ($p < 0,05$). AdGFP-transduzierte Zellen haben somit eine statistisch fassbar höhere Viabilität als Zellen, die mit AdE-Core bzw. AdE-NS5a transduziert wurden. Auch für PMH-Zellen zeigte sich eine Abnahme der Viabilität. Das Überleben der PMH-Zellen 72 h nach Transduktion bei MOI 100 reduziert sich auf 59,6% der Ausgangszellen bei der Transduktion mit AdE-Core bzw. auf 57,2% bei der Transduktion mit AdE-NS5a ($p < 0,05$). Jedoch geht auch bei einer Transduktion mit AdGFP die Zellzahl auf 68,8% der Ausgangszellen zurück (hier: $p > 0,05!!$).

4.3.2 Wachstum der Zellen nach Transduktion

Das Wachstum der Zelllinien Huh7 und HepG2 wurde nach Transduktion mit adenoviralen Konstrukten in einem Wachstumsassay, (vgl. Kapitel 3.7.4 auf Seite 43) analysiert. Die Zellen wurden dazu nach Transduktion mit einer MOI 50 eine Woche lang in Kultur gehalten, täglich gezählt und statistisch ausgewertet. Die Mittelwerte der ausgezählten Zellen wurden jeweils mit der nicht transduzierten Negativkontrolle über den gesamten Versuchszeitraum verglichen.

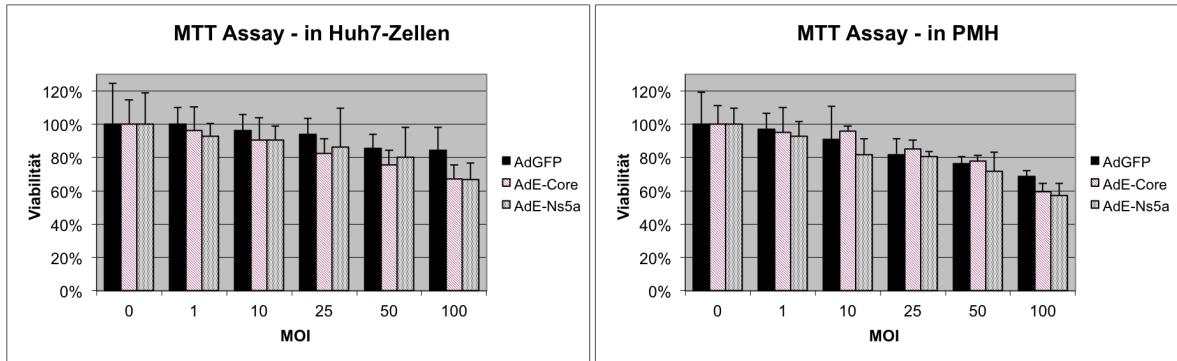


Abbildung 4.18: Huh7-Zellen und PMH mit AdGFP, AdE-Core und AdE-NS5a stabil transduziert. Bei steigender MOI zeigt sich eine Abnahme der Viabilität in den Zellen. Die Viren AdE-Core und AdE-NS5a (schraffierte Banden) sind dabei für die Zellen toxischer als AdGFP (schwarze Banden). Ergebnisse für Huh7: Überleben der Zellen 72 h nach Infektion bei MOI 100 reduziert auf 67% bei AdE-Core-Transduktion bzw. 66,7% bei AdE-NS5a-Transduktion im Gegensatz zu 84,4% bei einer AdGFP-Transduktion ($p < 0,05$ (students t-test)). Ergebnisse für PMH: Überleben der Zellen 72 h nach Infektion bei MOI 100 reduziert auf 59,6% bei AdE-Core-Transduktion bzw. 57,2% bei AdE-NS5a-Transduktion ($p < 0,05$ (students t-test)), jedoch auch 68,8% bei einer AdGFP-Transduktion ($p > 0,05!!$ (students t-test)). (Grafik mit *Excel* (Microsoft) erstellt)

Die Grafiken 4.19 auf Seite 64 zeigen die Ergebnisse des Wachstumsassays in den Hepatomzelllinien HepG2 und Huh7. PMH wurde nicht untersucht, da PMH sich *in vitro* nicht mehr vermehren und somit für solche Versuche ungeeignet sind. Das Wachstum der Zellen ist über den Zeitraum von 7 Tagen aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, dass die Wachstumskinetik durch die Transduktion gehemmt wird. Die Zellen wachsen nach Transduktion mit adenoviralen Konstrukten deutlich langsamer als die nicht-transduzierte Zellen. Gut zu erkennen ist ebenso, dass die Transduktion mit AdGFP, dem Adenovektor der kein HCV-Insert aber eine GFP-Reporterkassette enthält, von den Hepatomzellen besser toleriert wird, als die Transduktion mit den HCV-Adenokonstrukten. Das Wachstum der AdGFP-transduzierten Zellen ist deutlich besser als das der AdE-Core- bzw. AdE-NS5a-transduzierten Zellen (1,2 mal schneller bei HepG2-Zellen, 1,3 mal schneller bei Huh7-Zellen). Die GFP-Expression wurde über den Zeitraum hinweg unter IFM kontrolliert. Gegenüber nicht-transduzierten Zellen ist das Wachstum gehemmt. Nicht-transduzierte HepG2-Zellen wuchsen 1,3 mal schneller als AdGFP-transduzierte Zellen. Nicht-transduzierte Huh7-Zellen wuchsen 1,4 mal schneller als die AdGFP-transduzierten Zellen des gleichen Typs. Insgesamt zeigte der direkte Vergleich, dass Huh7-Zellen schneller wachsen als HepG2-Zellen (etwa 1,2 fach).

Zellen die mit Adenovektoren ohne Insert transduziert werden, wachsen langsamer als die nicht-transduzierte Zellen. Werden jedoch die Zellen mit Adenovektoren, die HCV-Genomanteile als Insert enthalten, transduziert, ist das Wachstum stärker gehemmt: auf etwa 61% im Vergleich zu den nicht-transduzierten Zellen in HepG2-Zellen nach Transduktion mit AdE-Core bzw. AdE-NS5a ($p < 0,05$) und auf ca. 55%

im Vergleich zu nicht-transduzierten Huh7-Zellen nach Transduktion mit AdE-Core bzw. AdE-NS5a ($p < 0,05$); siehe die Grafiken 4.19. Das Zellwachstum nach Transduktion mit dem nicht-Insert-tragenden Konstrukt AdGFP ist weniger stark gehemmt. Um 74% in HepG2-Zellen ($p < 0,05$) und ca. 70% in Huh7-Zellen ($p > 0,05$; $p = 0,08$).

4.3.3 MCL-1 Regulation nach viraler Infektion

Um die Wirkung der HCV Proteine Core und NS5a auf die Apoptose-Mechanismen der Zellen zu ermitteln, wurde die Expression des anti-apoptotischen Proteins MCL-1 in den Zellen untersucht. In den dargestellten Versuchsreihen wurde untersucht, ob sich die Expression von MCL-1 durch die Expression von HCV-Core und HCV-NS5a verändert.

In den Versuchsreihen zeigte sich, dass Zellen, die mit AdE-Core oder AdE-NS5a transduziert wurden, weniger MCL-1 exprimieren als die Kontrollen. Die Relationen sind in den Abbildungen 4.20 und 4.21 ersichtlich. Die densitometrische Auswertung der Western Blots zeigen, dass ab einer MOI von 10 das MCL-1 Protein signifikant ($p < 0,05$, students t-test) geringer exprimiert wird als bei einer geringen MOI (1, 5) bzw. bei der Negativkontrolle (MOI 0). Der Grad der Proteinexpression ist in den Balkendiagrammen als relative Intensität im Verhältnis zur Negativkontrolle dargestellt.

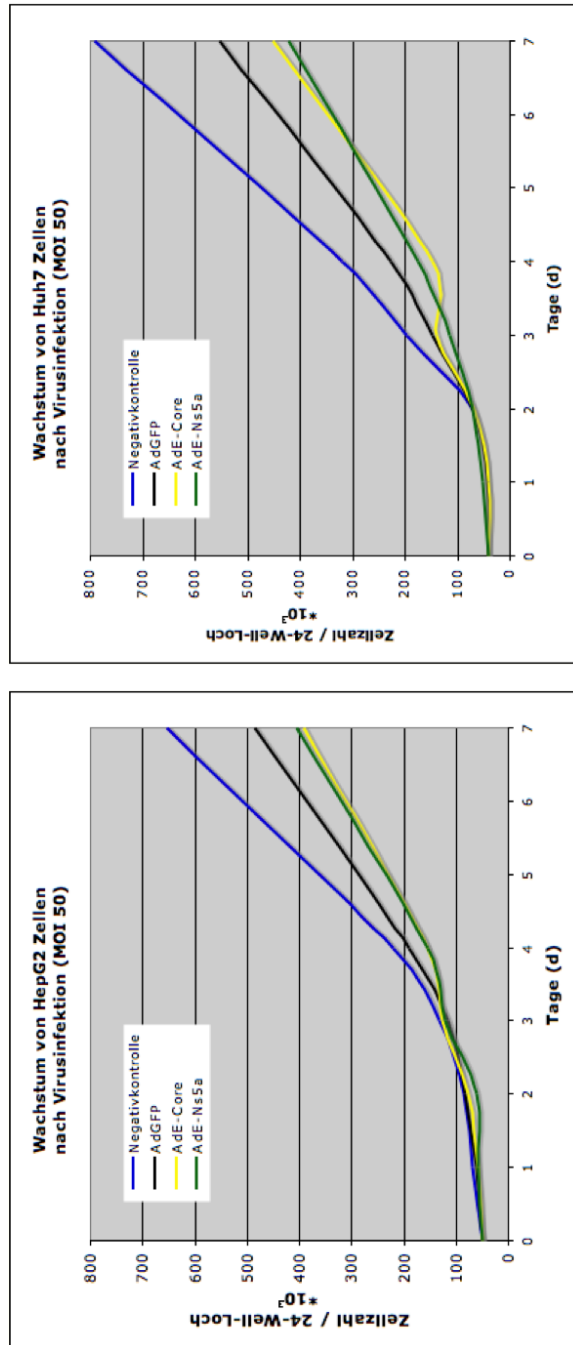


Abbildung 4.19: HepG2 und Huh7-Zellen mit AdGFP, AdE-Core und AdE-NS5a mit jeweils einer MOI 50 transduziert. Als Negativkontrolle wurden nichtinfizierte Zellen analysiert. Das Wachstum von infizierten Zellen und der Negativkontrollen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen in 24-Well-Platten analysiert. Zellen wurden täglich gezählt und Mittelwerte errechnet.

Das Zellwachstum ist nach Transduktion mit adenoviralen Konstrukten eingeschränkt: im Mittel auf 61% im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe Text) nach Transduktion mit AdE-Core / AdE-NS5a in HepG2 (AdGFP: 74%) und im Mittel auf 55% im Vgl. zur Negativkontrolle nach Transduktion mit AdE-Core / AdE-NS5a in Huh7 (AdGFP: 70%). Signifikant stärker gehemmtes Zellwachstum nach Transduktion mit HCV-Inserts tragenden Adenokonstrukten im Vergleich zur AdGFP-Transduktion: $p < 0,05$ (students t-test). (Grafik mit *Excel* (Microsoft) erstellt)

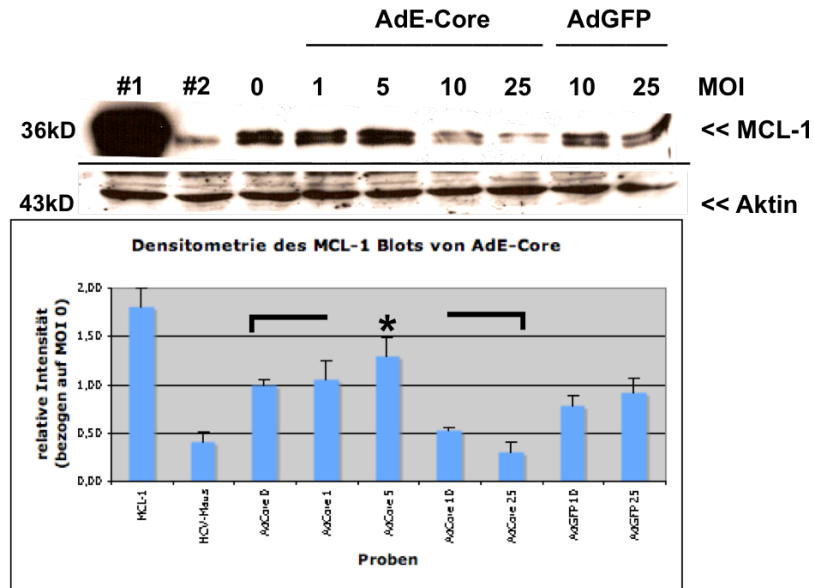


Abbildung 4.20: AdE-Core Western Blot II. Nach Infektion mit AdE-Core in PMH wurde die Expression des MCL-1 Proteins mittels Western Blot detektiert. Aufgetragen: Kontrollen: #1: Zellysat von Zellen, die MCL-1 überexprimieren, #2: Leberlysat einer HCV-positiven Maus, 0: Zellysat nicht infizierter PMH; AdE-Core (MOI 1, 5, 10, 25) AdGFP (MOI 10, 25). *: Signifikante Herunterregulierung von MCL-1 ($p < 0,05$, students t-test). Aktin zur Proteinladekontrolle. Die untere Grafik zeigt die densitometrische Auswertung des MCL-1 Blots.

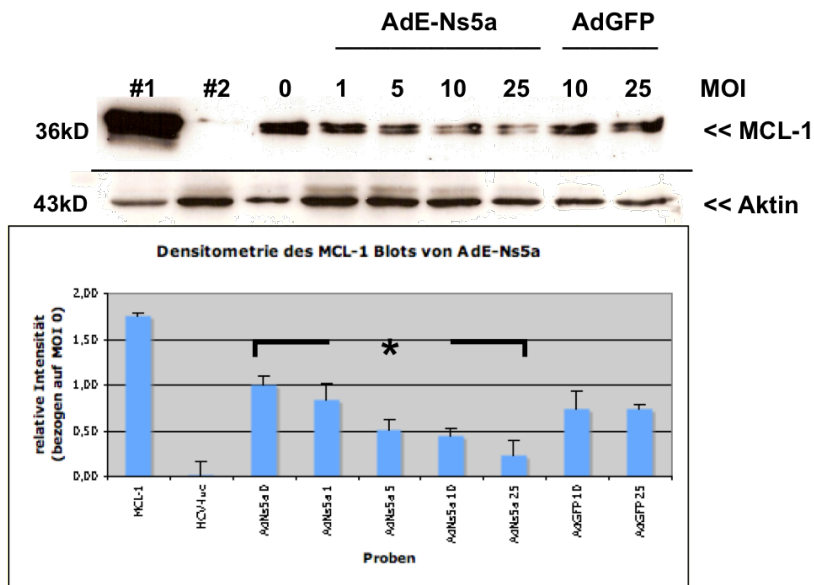


Abbildung 4.21: AdE-NS5a Western Blot III. Nach Infektion mit AdE-NS5a in PMH wurde die Expression des MCL-1 Proteins mittels Western Blot detektiert. Aufgetragen: Kontrollen: #1: Zellysat von Zellen, die MCL-1 überexprimieren, #2: Leberlysat einer HCV-positiven Maus, 0: Zellysat nicht infizierter PMH; AdE-NS5a (MOI 1, 5, 10, 25) AdGFP (MOI 10, 25). *: Signifikante Herunterregulierung von MCL-1 ($p < 0,05$, students t-test). Aktin zur Proteinladekontrolle. Die untere Grafik zeigt die densitometrische Auswertung des MCL-1 Blots.

5 Diskussion

Mit der hier gezeigten Methode zur Konstruktion von Insert-tragenden adenoviralen Vektoren war es möglich Hepatitis-C-Genomanteile in Zielzellen zu transduzieren. Mit diesen Adenovektoren stehen nun effektive Werkzeuge zur Verfügung, um die Wirkung der viralen Proteine in Zellen zu erforschen. Im Folgenden sollen die Teilschritte der Vektorkonstruktion, die Anwendung des Systems *in vitro* und die Wertigkeit des Vektorsystems diskutiert werden.

5.1 Rekombinante Adenoviren

Zur endgültigen Konstruktion Insert-tragender Adenokonstrukte waren die zuvor beschriebenen Teilschritte notwendig. Im vorherigen Kapitel "*Ergebnisse*" wurden Restriktionsanalysen und Sequenzanalysen gezeigt, die die Konstruktionsschritte kontrollierten. Im Folgenden soll die Wertigkeit dieser Analysen diskutiert werden.

5.1.1 Analyse der klonierten Shuttle-Plasmide

Im ersten Schritt der Konstruktion wurden die HCV-Genomabschnitte HCV-Core und HCV-NS5a in Shuttle-Plasmide kloniert. Abbildung 4.1 aus dem Abschnitt 4.1.1 zeigt das Ergebnis des analytischen Restriktionsverdau dieser konstruierten Shuttleplasmide pShuttle-CMV-Core und pShuttle-CMV-NS5a. In den Versuchen gelang es mit genau den Restriktionsenzymen, die zuvor zur Klonierung genutzt wurden, die Inserts wieder hinauszuschneiden. Die Inserts werden demnach korrekterweise von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme flankiert. Die, durch den Restriktionsverdau herausgeschnittenen Inserts, laufen auf der jeweils erwarteten Höhe des DNA-Markers. Die Sequenzlänge der beiden Inserts entspricht demnach der Sequenzlänge der HCV-Gene Core und NS5a, die als Inserts inkloniert worden waren. Ein solcher Restriktionsverdau ist kein eindeutiger Beleg für die Korrektheit der Inserts, er gibt lediglich Hinweise darauf, dass Sequenzlängen übereinstimmen und dass die Plasmide bzw. deren MCS integer sind.

5.1.2 Analyse Insert-tragender Adenokonstrukte

Insert-tragende Shuttleplasmide wurden zusammen mit dem Adenobackbone-Plasmid AdEasy, wie beschrieben, homolog rekombiniert, um die Adenokonstrukte zu etablieren. Die gebildeten Konstrukte wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung hinsichtlich ihrer Integrität überprüft (vgl. 5.1.2).

5.1.2.1 Restriktionsanalyse Insert-tragender Adenokonstrukte

In der ersten Restriktionsanalyse wurde die korrekte homologe Rekombination durch einen analytischen PacI-Verdau kontrolliert (vergleiche die Abbildung 4.3 auf Seite 47). Bei korrekter homologer Rekombination ist bei einem PacI-Verdau eine 4,5 kb große Bande zu erwarten [1] [131]. Bei beiden Vektorkonstrukten AdE-NS5a und AdE-Core gelang es eine solche 4,5 kb große Bande zu zeigen. In einem zweiten Schritt wurde die Integrität der Adenokonstrukte mittels EcoRV Verdau kontrolliert. Dabei gelang es im Vergleich zum nicht-inserttragenden AdGFP-Konstrukt eine weitere Bande herauszuschneiden. Da beide HCV-Sequenzen Core und NS5a Schnittstellen für das Restriktionsenzym EcoRV haben, ist dies ein Hinweis für das korrekte Vorliegen der Inserts in den Konstrukten. Damit sind die Forderungen an ein korrekt homolog rekombiniertes Adenokonstrukt aus oben genannten Arbeiten erfüllt. Dennoch besteht, wie auch schon in Abschnitt 5.1.1 angesprochen, die Problematik, dass ein Restriktionsverdau generell keine Information über die genaue Basenfolge der Konstrukte liefern kann.

5.1.2.2 Sequenzanalyse Insert-tragender Adenokonstrukte

Um zu kontrollieren, ob die Inserts ohne Basenaustausch oder andere Sequenzfehler inkloniert wurden, wurde eine Sequenzanalyse nach F. SANGER ET AL. [132] durchgeführt (Details dazu im Abs. 3.5.3).

Die Chromatogramme der Sequenzanalyse sind in 4.5 dargestellt. Sie zeigen gute Ergebnisse mit klar abgrenzbaren Basen-Signalen. Die Sequenzen der inklonierten Inserts HCV-Core und HCV-NS5a können als integer betrachtet werden.

Im zweiten Schritt wurden die Sequenzen mit der HCV-Genomdatenbank des *Los Alamos National Laboratory* abgeglichen. Die Ergebnisse aus Abs. 5.1.2.2 zeigen sehr hohe Übereinstimmungsraten mit dem jeweils spezifischen HCV-Genom von 99% für Core (bei 0% Lücken) und 98% für NS5a (bei 1% Lücken). Komplette Übereinstimmung wurde nicht erreicht, so dass sich vermuten lässt, dass vereinzelter Baseaustausch stattgefunden hat bzw. dass andere technische Mängel die DNA-Integrität beeinflussen. Die Protein-kodierende Sequenz scheint jedoch nicht zu sehr beeinflusst zu sein, da die HCV-Proteine nach Transduktion mit den Adenokonstrukten regelrecht exprimiert wurden, wie die Ergebnisse der Western Blots in 4.2.3 zeigen.

5.2 Effizienz des adenoviralen Vektortransfers

5.2.1 Adenoviral transduzierte Zellen

Das Adeno-Rapid-Titer-Kits (vgl. Abs. 3.6 auf Seite 37) wurde zum Nachweis der Transduktion mit adenoviralen Konstrukten in Zellen verwendet. Diese Methode ist spezifisch für den Nachweis von adenoviral infizierten Zellen [130]. Adenoviren sind un-

ter anderem aus Hexonkapsomeren zusammengesetzt, an die die Hexon-Antikörper des Kits spezifisch binden. Das Verfahren ist damit hinreichend sensitiv und spezifisch, um Adenoviren in Zellen nachzuweisen. Die Ergebnisse in 4.2.1 auf Seite 50, zeigen dass sich die Zellen, die mit den Konstrukten transduziert wurden, spezifisch anfärben lassen. Damit kann das Adeno-Rapid-Titer-Kit aufzeigen, dass die Konstrukte integriere Adenoviren bilden. Darüber hinaus wird auch eine Bestimmung der Transduktionseffizienz möglich. Je höher die MOI bei Transduktion ist, desto mehr Zellen werden transduziert und somit angefärbt. Ist jedoch die MOI sehr hoch, zeigen sich toxische Effekte, Zellen sterben ab und sind dann nicht mehr anfärbbar. Diese toxischen Effekte zeigen sich vor allem bei Infektion mit den Insert-tragenden Konstrukten AdE-Core und AdE-NS5a, weniger deutlich bei nicht Insert-tragendne AdGFP. Die inklonierten HCV-Transgene scheinen demnach Effekte auf die Zellen zu haben.

Die Zellen wurden nach Transduktion immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie erwartet nimmt die Expression von GFP zu, wenn die MOI bei der Transduktion erhöht wird. Diese Kinetik lässt sich in allen untersuchten Zelltypen (293, Huh7, HepG2 und PMH) nachvollziehen. 293 Zellen lassen sich am einfachsten transduzieren. Die drei anderen Zelltypen benötigen höhere MOIs für eine phänotypisch gute Transduktion im Immunfluoreszenzmikroskop.

Gleichzeitig wurden DAPI Zellkernfärbungen angefertigt, um die Viabilität der Zellen zu untersuchen. Die Abbildung 4.9 auf Seite 54 zeigt die Kernfärbungen nach Transduktion mit dem Kontrollkonstrukt AdGFP in Huh7, HepG2 und PMH, ebenso die Expression von GFP durch eine Doppelfluoreszenz. Hierbei wird ersichtlich, dass Zellen, die mit hohen MOIs transduziert wurden, zunehmend weniger homogene Zellkerne aufweisen. Jedoch ist diese Toxizität gering, denn Zellen transduziert mit einer MOI 50 haben ein vergleichsweise homogenes Zellkernmuster bei starker GFP Expression. DAPI Zellkernfärbungen wurden auch nach Transduktion mit HCV-Inserttragenden Adenokonstrukten AdE-Core und AdE-NS5a angefertigt, die Abbildung 4.11 auf Seite 56 zeigt die entsprechenden Versuchsergebnisse. Es zeigt sich eine deutlich sichtbare Inhomogenität des Zellkernmusters mit scholligem Chromatin nach der Transduktion mit steigender MOI.

Zusammenfassend ist die Transduktion mit adenoviralen Vektorkonstrukten effektiv und zeigt morphologische Veränderungen der transduzierten Zellen.

5.2.2 Proteinexpression nach Transduktion

Die Proteinexpression wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die HCV-Proteine Core und NS5a sowie das GFP-Protein kontrolliert (Tabelle 3.14 auf Seite 41 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper). Eine stabile Proteinexpression konnte durch Transduktion mit der adenoviralen Konstrukten in primären Zellen (primäre Maushepatozyten - PMH) erreicht werden. Dabei zeigte sich eine MOI-abhängige Zunah-

me der Proteinexpression in den Transduktionsversuchen. Je mehr Viren zur Transduktion eingesetzt wurden, desto stärker war die Proteinexpression im Western Blot. Diese Dosis-abhängige Expressionskinetik bestätigt damit die Beobachtungen aus den vorangegangenen Versuchsreihen. Zellen, die mit hoher MOI transduziert wurden, zeigten eine höhere Expression von GFP, sie scheinen unter dem IFM grüner; dieser Eindruck wird durch den Western Blot bestätigt. Für die Konstrukte AdE-Core und AdE-NS5a gilt ebenfalls diese dosisabhängige Expressionseffizienz.

Die adenoviralen Vektoren AdE-Core und AdE-NS5a sind demnach solide Werkzeuge, um HCV-Gene in Zellen zu transduzieren und dort eine hohe Proteinexpressionsrate zu erzeugen.

5.2.3 Proteinexpression in humanen Zellen

Die Proteinexpression wurde in einem weiteren Schritt auch in humanen Zellen untersucht (vgl. Abs. 4.2.4 auf Seite 58).

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse aus den Versuchen in den primären murinen Hepatozyten auch auf die humane Hepatomzelllinie Huh7 übertragbar sind. Für AdGFP und AdE-NS5a konnte eine Aktin-kontrollierte Transduktionseffizienz beschrieben werden. Auch hier ist zu erkennen, dass sich mit einer Erhöhung der MOI bei Transduktion die Expressionsraten der Proteine, die die Konstrukte kodieren, erhöhen lassen.

Zu diskutieren ist die schwache Aktin-Bande der Positivkontrolle in einigen Versuchen, dargestellt in 4.14, 4.15, 4.16 und 4.17. Als Positivkontrolle wurde dort jeweils ein Leberlysate von einer HCV-transgenen Maus eingesetzt. Da die anderen Banden dieser Positivkontrolle, bei Inkubation mit den Antikörpern gegen HCV-Core und HCV-NS5a jedoch immer stark positiv ausfielen, spricht dies dafür, dass nicht die eingesetzte Menge an Protein der Positivkontrolle das Problem darstellt, sondern vielmehr die relativ schwache Reaktion der murinen Hepatozyten-Proteine gegen den Antikörper anti-Aktin. Es wurde auch versucht andere Antikörper zur Ladekontrolle zu verwenden, z.B. anti-Tubulin. Hierbei zeigte sich jedoch, dass diese mit den eigentlich zu untersuchenden Proteinen (HCV-Core, MCL-1) interagieren und daher in diesem Falle nicht zur Protein-Ladekontrolle sinnvoll sind.

Bemerkenswert ist, dass es in mehreren Versuchsreihen nicht gelang die Expression des HCV-Core Proteins in humanen Zelllinien Huh7 zu zeigen, im Gegensatz zur adäquaten Expression in den PMH. Hier muss geklärt werden, ob die verwendeten Antikörper gegen HCV-Core nicht in humanen Zellen verwendbar sind, oder ob andere Interaktionen eine Detektion des viralen Proteins in humanen Zellen im Western Blot verhindern.

5.3 Apoptoseregulation nach adenoviraler Transduktion

Neben der Konstruktion der HCV-Insert-tragenden adenoviralen Vektoren und der Überprüfung der Funktionabilität dieses Vektorsystems war es das Ziel dieser Dissertation Pathomechanismen im Rahmen einer HCV-Infektion zu erforschen. Dazu wurde untersucht, ob die Viabilität der Zellen durch Expression der HCV-Proteine Core und NS5a verändert wird und in wieweit diese Proteine in die Apoptoseregulation der Zelle eingreifen.

5.3.1 Viabilität nach Transduktion

Das Überleben der Zellen nach Transduktion mit HCV-Inserts tragenden adenoviralen Konstrukten wurde mittels MTT-Assays untersucht (vgl. Abs. 4.3.1 auf Seite 60).

Die Viabilität der Zelltypen Huh7 und PMH nimmt nach Transduktion mit adenoviralen Vektoren dosisabhängig ab. Die Hypothese, dass Zellen, die mit HCV-Inserts tragenden Konstrukten transduziert werden, eine geringere Viabilität haben als transduzierte Zellen mit dem Kontrollkonstrukt AdGFP, konnte in den Huh7-Zellen eindeutig belegt werden. Bei einer Transduktion mit einer MOI 100 leben nach 72 Stunden nur noch 67% bzw. 66,7% der AdE-Core bzw. der AdE-NS5a-transduzierten Zellen, im Gegensatz zu 84,4% nach Transduktion mit AdGFP (students t-test: $p < 0,05$). Dass vor allem die HCV-Proteine Core und NS5a die Viabilität herabsetzen, kann somit bestätigt werden. HCV-Core und HCV-NS5a senken das Überleben der Zellen nach Transduktion. Andere Arbeiten mit Insert tragenden adenoviralen Vektoren konnten ähnliche Ergebnisse bei MTT-Assays zeigen [133].

Die Versuche wurden ebenso in PMH durchgeführt. Dort lassen sich ähnliche Ergebnisse zeigen. Allerdings lässt sich ein signifikanter P-Wert für die Viabilitätsabnahme nach Transduktion mit AdGFP nicht ermitteln. Die gemessenen Werte variieren zu stark, weshalb keine signifikanten Werte ermittelt werden können. HCV-Core und HCV-NS5a senken wie schon in den Huh7 die Viabilität herab, die Viabilität der AdGFP-transduzierten PMH ist auf 68,8% (student t-test: $p > 0,05$) herabgesenkt.

Insgesamt betrachtet, zeigten sich bei den Viabilitätsassays Probleme bei der Lyse von Zellen vor der Farbstoffinkubation zur Vorbereitung auf die photometrische Messung. Statistisch einwandfreie Ergebnisse ergaben sich daher nur für die Versuche in den Huh7-Zellen. Hier konnte ein signifikanter P-Wert im students t-test beim Vergleich der Viabilitätsabnahme zwischen Insert-freien AdGFP-transduzierten Zellen und den HCV-Insert tragenden Konstrukten AdE-Core und AdE-NS5a festgestellt werden. Für die primären Maushepatozyten (PMH) lässt sich ein solcher signifikanter P-Wert nicht ermitteln. Diese Tatsache könnte damit begründet werden, dass PMH aus murinen Lebern gewonnen werden und dann kultiviert werden (siehe Abs. 3.3.5 auf Seite 26);

eventuell haben diese Zellen eine andere Viabilitätskinetik und sind für einen solchen Versuch nur eingeschränkt sinnvoll zu verwenden.

Zusammenfassend kann ein deutlicher Trend aus diesen Versuchreihen gezeigt werden. Die Viabilität von Zellen nimmt nach Transduktion mit adenoviralen Konstrukten ab. Die Einklonierung von HCV-Inserts und die damit verbundene HCV-Proteinexpression bei AdE-Core und AdE-NS5a schränkt die Viabilität der Zellen deutlicher ein, als bei Transduktion mit dem Kontrollkonstrukt AdGFP. HCV-Proteine Core und NS5a scheinen Apoptosemechanismen zu aktivieren, so dass Zellen, die diese Proteine exprimieren, degradieren und damit früher sterben als die Kontrollen.

5.3.2 Wachstum nach Transduktion

Das Überleben der Zellen wurde in einem Wachstumsassay weiter untersucht. Als Ergebnis dieser Versuche lässt sich postulieren, dass Hepatomzelllinien stabil über einen längeren Zeitraum die Transduktion mit adenoviralen Konstrukten tolerieren. Es ändert sich allerdings die Wachstumskinetik der Zellen. Zellen die mit adenoviralen Konstrukten transduziert wurden, wachsen auch bei optimalen Kulturbedingungen eingeschränkt im Vergleich zu nicht-transduzierten Kontrollen. Jene Zellen, die nach Transduktion mit AdE-Core und AdE-NS5a die entsprechenden HCV-Proteine exprimieren, wachsen signifikant schwächer als Zellen, die mit dem Insert-freien Kontrollkonstrukt AdGFP transduziert wurden. Auch hier zeigen andere Arbeiten, die Adenovektoren beschreiben, ähnliche Wachstumskurven der Zellen entsprechend einer Transduktion mit Insert-tragenden Adenovektoren, GFP-exprimierenden Kontrollvektoren und nicht-transduzierten Zellen [133] [134].

Es ist zu vermuten, dass die Transduktion mit HCV-Genomanteil-tragenden Adenokonstrukten die Zellen schädigt, so dass diese nicht mehr uneingeschränkt wachsen können. Die Transduktion mit HCV-Inserts tragenden adenoviralen Konstrukten hat demnach für Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität und Wachstumskinetik signifikante Nachteile. Zellen, die HCV-Proteine Core und NS5a exprimieren, wachsen langsamer und sterben schneller als die Kontrollen.

5.3.3 Regulation von MCL-1

Um die Apoptose-Mechanismen im Rahmen einer HCV-Infektion näher zu erforschen, wurde die Regulation des anti-apoptischen Proteins MCL-1 (Näheres dazu in 2.3.2 auf Seite 15) in den Zellen untersucht. Die Hypothese dazu lautete: Zellen, die nach Transduktion mit den adenoviralen Konstrukten Hepatitis C Proteine exprimieren, verändern Signaltransduktionswege im Apoptose-Mechanismus. Es sollte geklärt werden, ob die Hepatitis Proteine HCV-Core bzw. HCV-NS5a den programmierten Zelltod initiieren oder auf diesen einwirken und dadurch das Überleben der Zellen verringern.

Die Ergebnisse aus den Versuchen im Abschnitt 4.3.3 auf Seite 63 zeigen, dass die Expression des Apoptose-inhibitorischen Proteins MCL-1 Dosis-abhängig von der eingesetzten MOI des HCV-Insert-tragenden Adenokonstrukte AdE-Core und AdE-NS5a abnimmt. Adenovirale Transduktion mit hohen MOIs führt zu einer Herunterregulation von MCL-1. Diese Expressionsabnahme ist Aktin-kontrolliert und densitometrisch erfassbar (vgl. Abb. 4.20 und 4.21). Bei Transduktion des Kontrollkonstrukts AdGFP wurde eine verminderte Expression von MCL-1 nicht beobachtet.

Auf Proteinebene bestätigen die Ergebnisse der Western Blots die Beobachtungen aus den vorangegangenen Versuchsreihen. Zellen, die wegen der Expression von den HCV-Proteinen Core und NS5a weniger MCL-1 synthetisieren, gehen leichter in den programmierten Zelltod, da die Apoptose-Inhibition durch MCL-1 wegfällt. Es zeigte sich somit ein deutlicher Effekt auf die Zellen nach Transduktion mit den HCV-Inserts tragenden adenoviralen Konstrukten hinsichtlich der Apoptose. Dosisabhängig wird das anti-apoptotische Protein MCL-1 herunterreguliert. Die Beobachtung, dass HCV-Core MCL-1 herunterregulieren kann, ist auch in anderen Arbeiten gezeigt worden [135].

Zukünftige Untersuchungen sollen diese Effekte weiter untersuchen und weitere Einflüsse auf den Apoptosemechanismus der Hepatozyten beschreiben.

5.4 Sind Adenovirale Vektoren ein geeignetes Transduktionssystem?

Abschliessend soll diskutiert werden, ob das verwendete adenovirale Transduktionssystem eine sinnvolle Alternative darstellt, um die Expression bestimmter Proteine zu erzielen, in wieweit die adenoviralen Konstrukte durch die Transduktion die Zielzellen schädigen, welche anderen Effekte die Transduktion in den Zielzellen hat und ob das adenovirale Vektorsystem steuerbar ist.

5.4.1 Überexpression und Steuerbarkeit des Vektorsystems

Die Überexpression von Proteinen in Zielzellen ist mit Hilfe von adenoviralen Vektoren wesentlich effektiver als beispielsweise mit verschiedenen Transfektionsmethoden [136]. Die chemischen Transfektionsmaßnahmen mittels konventionellen Kalziumchlorid Präzipitation oder Liposomen bzw. die physikalischen Maßnahmen z.B. durch Elektroporation führen zum Transfer von nicht kalkulierbaren DNA-Mengen, zudem ist dieser Genomtransfer im Vergleich zum adenoviralen Vektortransfer stärker toxisch für die Zielzellen, vor allem bei physikalischen Methoden wie der Elektroporation [137].

Bei der Transduktion mit adenoviralen Vektoren binden diese an Coxsackie- und Adeno-Rezeptoren an der Zelloberfläche [23] [25]. Die Anzahl dieser Rezeptoren

ist begrenzt, so dass die Aufnahme von Vektoren in die Zelle limitiert ist. Die Proteinüberexpression ist daher auch von der Zahl der Zellrezeptoren abhängig.

Die Transduktion mit adenoviralen Vektoren ist über Titration der Viren und anschließender Transduktion mit einer genau festgelegten MOI möglich. Die Menge der transduzierten DNA lässt sich so im Vorfeld festlegen und die Überexpression damit bestimmen. Die sinnvoll verwendeten MOIs liegen dabei weit unter den zelltoxischen Konzentrationen. Jedoch lässt sich in den, hier gezeigten Daten, erkennen, dass Transduktionen mit hohen MOIs toxisch für die Zielzellen sind. Bei einer MOI größer 50 zeigen sich phänotypische Veränderungen der Zellen und des Chromatins in den Zellkernen. Diese Veränderungen sind vorallem bei Transduktion mit den HCV-Insert tragenden Adenokonstrukten AdE-Core AdE-Ns5a ersichtlich, jedoch sind auch bei den Transduktionen mit dem Kontrollkonstrukt AdGFP unspezifische, zelltoxische Veränderungen erkennbar. Transduktionen mit höheren MOIs bei AdGFP werden jedoch besser toleriert als bei AdE-Core bzw. AdE-NS5a, wie auch der Wachstumsversuch in Abschnitt 4.3.2 zeigt. Vermutlich sind hohe MOIs (>50) deshalb toxisch für die transduzierten Zellen, da durch die hohe Viruslast die physiologische Proteinbiosynthese der Zelle gestört ist. Zudem könnten durch dauerhaftes Ein- und Ausschleusen von Viren die Signalkaskaden in der Zelle verändert sein.

Die Durchführung von Transduktionsversuchen ist *in vitro* mit amplifizierten adenoviralen Vektorkonstrukten jederzeit reproduzierbar [1]. Zudem sind solche Versuche ohne großen technischen Aufwand durchführbar. Es entfällt beispielsweise die Aufreinigung und Ausfällung, nach der transduzierenden DNA, die für Transfektionsversuche unabdingbar ist.

5.4.2 Selektivität des Vektortransfers

In zahlreichen *in vivo* Analysen konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem auf eine Transduktion mit adenoviralen Vektoren reagiert und diese Reaktionen die Verwendung solcher Vektoren einschränkt [138]. *In vitro* sind diese Aspekte von untergeordneter Bedeutung, da dort die Zielzellen singlär betrachtet werden. Zudem sind die hier dargestellten adenoviralen Konstrukte replikationsdefizient, so dass wenig zytotoxische Reaktionen aufgrund der adenoviralen Replikation zu erwarten sind. Erst bei Transduktionen mit sehr hohen MOIs konnten zytotoxische Effekte beobachtet werden (vgl. dazu die phänotypischen Beobachtungen der mikroskopischen Analysen im Abs. 4.2.2). Bei niedrigeren MOIs gelingen Transduktionen bei denen, die Zielzellen vital bleiben und stabil das Transgen (GFP, HCV-Core, HCV-NS5a) exprimieren, vgl. Abs. 4.2.2 und Abs. 4.2.3. Das adenovirale Genom verbleibt im Zellkern als extrachromosomale Struktur, die Integrität des zellulären Genoms und das Expressionsniveau zellulärer Gene bleibt so erhalten [23].

5.4.3 Vergleich mit HCV-Replikationssystemen *in vitro*

Der adenovirale Vektortransfer ist den direkten Transfektionsmethoden überlegen. Es lassen sich rezeptorvermittelt vorhersagbare Mengen des Transgens in die Zielzellen einschleusen, die Effizienz ist dabei in Vergleich sehr hoch, die Zellen behalten ihre Integrität und es werden verhältnismäßig geringe, dosisabhängige, toxische Effekte beobachtet.

Pseudopartikel-Systeme, bei denen es sich um Retro- oder Lentivirenhüllen handelt, die HCV-Glykoproteine E1 und E2 eingefügt haben [49] [50], sind mit den hier vorgestellten adenoviralen Konstrukten nicht zu vergleichen. Die Pseudopartikel erreichen keine Proteinexpression in den Zielzellen und dienen andererseits dazu den Eintritt des Hepatitis C Virus in die Zellen näher zu erforschen (Details dazu im Abschnitt 2.2.4 auf Seite 10).

Die, ebenfalls im Abschnitt 2.2.4 vorgestellten, subgenomischen [43] und komplett-genomischen [48] Replikonsysteme verfolgen einen anderen Ansatz. Mit den Replikonsystemen gelingt es die Virusreplikation in Zellen *in vitro* dauerhaft zu ermöglichen, die Replikons sind dabei in das Genom der Zielzelle integriert. Zumindest bei den subgenomischen Replikationssystemen sind jedoch Mutationen notwendig, um eine dauerhaft hohe Replikationsrate mit Expression viraler Proteine zu erzielen [45] [46]. Die komplett-genomischen Replikons beinhalten das komplette, ungefähr 9600 Nucleotid lange Genom des Hepatitis C Virus, diese Replikons sind daher in der Lage, alle viralen Proteine *in vitro* zu produzieren [27]. Damit sind die Replikonsysteme in ihren Möglichkeiten HCV-Proteine zu exprimieren, den hier vorgestellten adenoviralen Vektoren überlegen. In den Replikonsystemen lässt sich das Zusammenwirken der verschiedenen Proteine, der Einfluss auf die Replikation des Virus und die Pathogenität der einzelnen Proteine gut untersuchen. Die hier gezeigten adenoviralen Vektoren können lediglich zwei HCV-Gene exprimieren für die Expression beider Gene ist zudem eine Kotransduktion mit beiden Vektoren notwendig. Eine solche Kotransduktion hat zusätzliche toxische Effekte auf die Zielzellen. Trotz dieser Einschränkungen haben die Vektoren den Vorteil die singuläre Wirkung des entsprechenden HCV-Proteins auf den Zellstoffwechsel zu untersuchen. Es besteht die Möglichkeit in zukünftigen Versuchsreihen weitere spezifische Effekte der viralen Proteine aufzuzeigen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten regulatorische Effekte auf den Apoptose-Mechanismus der Zelle am Beispiel von MCL-1 gezeigt werden.

Durch die Etablierung dieses Vektorsystems stehen zukünftig Werkzeuge bereit, um weitere Pathomechanismen im Rahmen der Hepatitis C Infektion, spezifisch hervorgerufen durch HCV-Core bzw. HCV-NS5a, zu erforschen.

5.4.4 Bewertung und Ausblick

Hinsichtlich der Steuerbarkeit und der Möglichkeit einklonierte Gene zu überexprimieren, erfüllt das hier vorgestellte adenovirale Vektorsystem alle Voraussetzungen. Transduktionen mit Adenovektoren können mittels definierter MOIs reproduzierbar und kalkulierbar vollzogen werden. Das Vektorsystem ist damit steuerbar. Mit den Vektoren gelingt es eine stabile Expression der gewünschten Gene in Zellen zu erzielen. In Western Blot Versuchen sind die Proteine, für die die einklonierten Gene kodieren, nachweisbar. Darüber hinaus kann eine dosisabhängige Transduktionseffizienz beschrieben werden. Je höher die eingesetzte MOI bei Transduktion, desto höher das Expressionsniveau der Proteine. Auch die Frage der Selektivität (vgl. 5.4.2) kann positiv beurteilt werden, da die Vektoren die Integrität der Zielzellen nur geringfügig beeinflussen und spezifisch das einklonierte Gen exprimieren.

Somit bieten die vorgestellten adenoviralen Konstrukte die Möglichkeit, die Hepatitis C Virus Proteine HCV-Core und HCV-NS5a zu überexprimieren und damit Effekte dieser Proteine auf den Zellstoffwechsel zu erforschen.

Zukünftige Versuche mit den hier vorgestellten Adenokonstrukten AdE-Core und AdE-NS5a sollen weitere Hinweise für die Apoptoseregulation durch HCV-Proteine geben. Mit einer Nicoletti-Färbung könnte die Degradation der hepatozellulären DNA nach Transduktion mit den Adenokonstrukten nachgewiesen werden, da so mittels Durchflusszytometrie der Anteil apoptotischer Zellen genau bestimmt werden kann. Darüber hinaus könnte die Aktivität der Caspasen in den transduzierten Zellen bestimmt werden, um genauere Hinweise auf den Apoptosemechanismus zu erhalten. Gleichzeitig muss geprüft werden, ob die adenoviralen Konstrukte alleine durch die Transduktion in die Zielzellen Apoptosemechanismen in Gang setzen und ob diese Effekte unabhängig vom einklonierten Inserts sind. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass adenovirale Konstrukte ohne Insert (AdGFP) vergleichsweise geringere negative Effekte auf die Zielzellen im Bezug auf Viabilität und Wachstum haben. Jedoch sind auch hier, vor allem bei hohen MOIs, negative Effekte in den Zielzellen zu erkennen. Desweiteren wäre eine Aktivitätsmessung der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) für die Erforschung von Pathomechanismen im Rahmen der Hepatitis C Infektion interessant. Diese Kinasen, welche auch als Stresskinasen bezeichnet werden, spielen bei der Initiation der Apoptose eine wichtige Rolle und könnten durch die Expression der HCV-Proteine verändert sein. Darüber hinaus könnte das Expressionsniveau von Annexinen nach Transduktion gemessen werden. Da Annexine (A-I) pro-apoptotisch wirken wäre hierbei eine Hochregulation zu erwarten. Ein weiterer Schritt wäre die Aktivitätsmessung von c-Flip, das den TNF- α induzierten, extrinsischen Apoptose-Weg inhibiert [67]. c-Flip könnte ebenfalls durch Expression von HCV-Proteinen in seiner Aktivität verändert sein.

Zusammenfassend zeigt sich, dass das hier vorgestellte adenovirale Vektorsystem, ein elegantes Werkzeug zur Erforschung der Funktionen einzelner HCV-Proteine ist. Die vorgestellte Arbeit konnte zahlreiche Hinweise auf die Apoptoseregulation durch HCV-Proteine zeigen. Zukünftige Versuche sollen diese Hinweise weiter untermauern.

6 Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus stellt mit weltweit 170 Millionen infizierten Menschen ein großes gesundheitliches Problem dar. Zwar sind in den letzten Jahren deutliche Fortschritte in der Behandlung der Hepatitis C gemacht worden, gleichwohl ist die Hepatitis C durch das Fehlen eines potenten Impfstoffes weiterhin ein relevantes gesundheitliches Risiko, da sich Infektionsraten auf diesem Wege nicht eindämmen lassen.

Die Pathomechanismen im Rahmen einer Hepatitis C Infektion sind bis dato nicht umfassend bekannt und Gegenstand weiterer intensiver Forschung. Diese Forschung an den Hepatitisviren, vor allem am kompletten HCV-Genom ist aufgrund der hohen Infektiosität nur unter sehr strengen Sicherheitsbeschränkungen möglich. Bei den Forschungssystemen existieren bisher *in vivo* ein sehr kostspieliges, ethisch fragwürdiges Infektionsmodell am Schimpansen und limitierte, transgene Kleinnager-Modelle; *in vitro* existieren verschiedene Replikonsysteme (mittlerweile sogar komplett-genomische Replikons) und Pseudopartikelsysteme.

Der Ansatz dieser Dissertation bestand in der Konstruktion adenoviraler Vektoren, die Anteile des HCV-Genoms beinhalten. Mit Hilfe dieser Vektoren sollten verschiedene Zelltypen transduziert werden, eine Überexpression viraler Proteine initiiert werden und Effekte der HCV Proteine HCV-Core und HCV-NS5a ermittelt werden.

Diese Dissertationsschrift beschreibt die Konstruktion der adenoviralen Vektoren, die die Hepatitis Gene Core bzw. NS5a tragen. Die Klonierungsschritte werden umfassend aufgezeigt. Darauf aufbauend werden Versuche gezeigt, die die erfolgreiche adenovirale Transduktion in Zielzellen bestätigen. Es werden phänotypische Veränderungen der verschiedenen Zielzellen anhand mikroskopischer Aufnahmen demonstriert. Zusätzlich wird die erfolgreiche Konstruktion der Vektoren durch Detektion der viralen Proteine im Western Blot bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene Zielzellen mit den Vektoren transduzieren lassen und die Proteinexpression der HCV-Proteine einer dosisabhängigen Expressionskinetik folgt.

In weiteren Untersuchungen konnten Veränderungen der Viabilität der Zellen durch die Expression der viralen Proteine HCV-Core und HCV-NS5a gezeigt werden. Durch eine dosisabhängige Herunterregulation des anti-apoptischen Proteins MCL-1 ist das Gesamtüberleben der Zellen vermindert. Die Wachstumskinetik der transduzierten Zellen ist signifikant herabgesetzt.

Literaturverzeichnis

- [1] HE TC, ZHOU S, DA COSTA LT, YU J, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 (5): 2509–2514.
- [2] LAVANCHY D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009; 29 Suppl 1: 74–81.
- [3] CHISARI FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature*. 2005; 436 (7053): 930–932.
- [4] ROBERT KOCH INSTITUT. Epidemiologisches Bulletin Nr.20/2009. 2009.
- [5] ARMSTRONG G. Commentary: Modelling the epidemiology of hepatitis C and its complications. *Int J Epidemiol*. 2003; 32 (5): 725–726.
- [6] NG SC, GAZZARD B. Advances in sexually transmitted infections of the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009; .
- [7] GIRAUDON I, RUF M, MAGUIRE H, CHARLETT A, NCUBE F, TURNER J, GILSON R, FISHER M, BHAGANI S, JOHNSON M, BARTON S. Increase in diagnosed newly acquired hepatitis C in HIV-positive men who have sex with men across London and Brighton, 2002-2006: is this an outbreak? *Sex Transm Infect*. 2008; 84 (2): 111–115.
- [8] THIEL HJ, COLLETT M, GOULD E, HEINZ R, HOUGHTON M, MEYERS G, PURCELL R, RICE C. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Kapitel Genus Hepacivirus., 739 ff. Burlington (USA): Academic Press. 2005; .
- [9] RENZ-POLSTER H, KRAUTZIG S, BRAUN J. Basislehrbuch Innere Medizin, 3. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer. 2004.
- [10] FAUCI AS, BRAUNWALD E, KASPER DL, HAUSER SL, LONGO DL, JAMESON JL, LOSCALZO J, Hers. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17. Auflage.. New York City (USA): McGraw-Hill Professional. 2008.
- [11] ZIGNEGO AL, CRAXI A. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis*. 2008; 12 (3): 611–36, ix.

- [12] ZIGNEGO AL, FERRI C, PILERI SA, CAINI P, BIANCHI FB, FOR THE ITALIAN ASSOCIATION OF THE STUDY OF LIVER COMMISSION ON EXTRAHEPATIC MANIFESTATIONS OF HCV INFECTION. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis.* 2007; 39 (1): 2–17.
- [13] PERZ J, ARMSTRONG G, FARRINGTON L, HUTIN Y, BELL B. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol.* 2006; 45 (4): 529–538.
- [14] TABOR E, Hers. Viruses and Liver Cancer, Volume 6 (Perspectives in Medical Virology). 1. Auflage. Amsterdam (NE): Elsevier Science. 2002.
- [15] GHANY MG, STRADER DB, THOMAS DL, SEEFF LB, FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES AA. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.* 2009; 49 (4): 1335–1374.
- [16] ZEUZEM S. Standard treatment of acute and chronic hepatitis C. *Z Gastroenterol.* 2004; 42 (8): 714–719.
- [17] KRAJDEN M, ZIERMANN R, KHAN A, MAK A, LEUNG K, HENDRICKS D, COMANOR L. Qualitative detection of hepatitis C virus RNA: comparison of analytical sensitivity, clinical performance, and workflow of the Cobas Amplicor HCV test version 2.0 and the HCV RNA transcription-mediated amplification qualitative assay. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (8): 2903–2907.
- [18] FRIED MW, SHIFFMAN ML, REDDY KR, SMITH C, MARINOS G, GONÇALES FL, HÄUSSINGER D, DIAGO M, CAROSI G, DHUMEAUX D, CRAXI A, LIN A, HOFFMAN J, YU J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002; 347 (13): 975–982.
- [19] MCHUTCHISON JG, LAWITZ EJ, SHIFFMAN ML, MUIR AJ, GALLER GW, MCCONE J, NYBERG LM, LEE WM, GHALIB RH, SCHIFF ER, GALATI JS, BACON BR, DAVIS MN, MUKHOPADHYAY P, KOURY K, NOVIELLO S, PEDICONE LD, BRASS CA, ALBRECHT JK, SULKOWSKI MS, TEAM IDEALS. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2009; 361 (6): 580–593.
- [20] WIEGANG J, MÖSSNER J, TILLMANN H. Diagnostik und Therapie der chronischen Hepatitis B und C. *Der Internist.* 2008; 49: 817–832.
- [21] JACOBSON IM, BROWN RS, MCCONE J, BLACK M, ALBERT C, DRAGUTSKY MS, SIDDIQUI FA, HARGRAVE T, KWO PY, LAMBIASE L, GALLER GW, ARAYA V, FREILICH B, HARVEY J, GRIFFEL LH, BRASS CA, GROUP WINRS.

- Impact of weight-based ribavirin with peginterferon alfa-2b in African Americans with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatology*. 2007; 46 (4): 982–990.
- [22] KAMAL SM, TAWIL AAE, NAKANO T, HE Q, RASENACK J, HAKAM SA, SALEH WA, ISMAIL A, AZIZ AA, MADWAR MA. Peginterferon alpha-2b and ribavirin therapy in chronic hepatitis C genotype 4: impact of treatment duration and viral kinetics on sustained virological response. *Gut*. 2005; 54 (6): 858–866.
- [23] DOERR HW, GERLICH WH, Hers. Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme. 2009.
- [24] 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): 359–362.
- [25] STRAUSS JH, STRAUSS EG. Viruses and Human Disease, 2nd Edition. 2. Auflage. Burlington (USA): Academic Press. 2007.
- [26] MORADPOUR D, PENIN F, RICE CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5 (6): 453–463.
- [27] WAKITA T, PIETSCHMANN T, KATO T, DATE T, MIYAMOTO M, ZHAO Z, MURTHY K, HABERMANN A, KRÄUSSLICH HG, MIZOKAMI M, BARTENSCHLAGER R, LIANG TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005; 11 (7): 791–796.
- [28] ANDRÈ P, PERLEMUTER G, BUDKOWSKA A, BRÈCHOT C, LOTTEAU V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis*. 2005; 25 (1): 93–104.
- [29] PENIN F, DUBUISSON J, REY FA, MORADPOUR D, PAWLOTSKY JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004; 39 (1): 5–19.
- [30] McLAUHLAN J, LEMBERG MK, HOPE G, MARTOGLIO B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*. 2002; 21 (15): 3980–3988.
- [31] ASSELAH T, RUBBIA-BRANDT L, MARCELLIN P, NEGRO F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut*. 2006; 55 (1): 123–130.
- [32] QUINTAVALLE M, SAMBUCINI S, PIETRO CD, FRANCESCO RD, NEDDERMANN P. The alpha isoform of protein kinase CKI is responsible for hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation. *J Virol*. 2006; 80 (22): 11305–11312.

- [33] PENIN F, BRASS V, APPEL N, RAMBOARINA S, MONTSERRET R, FICHEUX D, BLUM HE, BARTENSCHLAGER R, MORADPOUR D. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 2004; 279 (39): 40835–40843.
- [34] TAN SL, NAKAO H, HE Y, VIJAYSRI S, NEDDERMANN P, JACOBS BL, MAYER BJ, KATZE MG. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96 (10): 5533–5538.
- [35] MACDONALD A, HARRIS M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol.* 2004; 85 (Pt 9): 2485–2502.
- [36] BLANCHARD E, BELOUZARD S, GOUESLAIN L, WAKITA T, DUBUISSON J, WYCHOWSKI C, ROUILLÈ Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 2006; 80 (14): 6964–6972.
- [37] KOUTSOUDAKIS G, KAUL A, STEINMANN E, KALLIS S, LOHMANN V, PIETSCHMANN T, BARTENSCHLAGER R. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol.* 2006; 80 (11): 5308–5320.
- [38] 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.
- [39] MORADPOUR D, GOSERT R, EGGER D, PENIN F, BLUM HE, BIENZ K. Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res.* 2003; 60 (2): 103–109.
- [40] GOSERT R, EGGER D, LOHMANN V, BARTENSCHLAGER R, BLUM HE, BIENZ K, MORADPOUR D. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol.* 2003; 77 (9): 5487–5492.
- [41] BARTENSCHLAGER R, LOHMANN V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2000; 81 (Pt 7): 1631–1648.
- [42] BOONSTRA A, VAN DER LAAN LJW, VANWOLLEGHEM T, JANSSEN HLA. Experimental models for hepatitis C viral infection. *Hepatology.* 2009; 50 (5): 1646–1655.

- [43] 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): 110–113.
- [44] PIETSCHMANN T, LOHMANN V, RUTTER G, KURPANER K, BARTENSCHLAGER R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol*. 2001; 75 (3): 1252–1264.
- [45] LOHMANN V, KÖRNER F, DOBIERZEWSKA A, BARTENSCHLAGER R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol*. 2001; 75 (3): 1437–1449.
- [46] LOHMANN V, HOFFMANN S, HERIAN U, PENIN F, BARTENSCHLAGER R. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol*. 2003; 77 (5): 3007–3019.
- [47] SCHALLER T, APPEL N, KOUTSOUDAKIS G, KALLIS S, LOHMANN V, PIETSCHMANN T, BARTENSCHLAGER R. Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J Virol*. 2007; 81 (9): 4591–4603.
- [48] KATO T, DATE T, MIYAMOTO M, FURUSAKA A, TOKUSHIGE K, MIZOKAMI M, WAKITA T. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. 2003; 125 (6): 1808–1817.
- [49] BARTOSCH B, DUBUISSON J, COSSET FL. Infectious hepatitis C virus pseudoparticles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*. 2003; 197 (5): 633–642.
- [50] RUSSELL RS, KAWAGUCHI K, MEUNIER JC, TAKIKAWA S, FAULK K, BUKH J, PURCELL RH, EMERSON SU. Mutational analysis of the hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles. *J Viral Hepat*. 2009; 16 (9): 621–632.
- [51] VON HAHN T, RICE CM. Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem*. 2008; 283 (7): 3689–3693.
- [52] PLOSS A, EVANS MJ, GAYSINSKAYA VA, PANIS M, YOU H, DE JONG YP, RICE CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 2009; 457 (7231): 882–886.
- [53] WALKER CM. Comparative features of hepatitis C virus infection in humans and chimpanzees. *Springer Semin Immunopathol*. 1997; 19 (1): 85–98.

- [54] MAJOR ME, DAHARI H, MIHALIK K, PUIG M, RICE CM, NEUMANN AU, FEINSTONE SM. Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology*. 2004; 39 (6): 1709–1720.
- [55] BIGGER CB, GUERRA B, BRASKY KM, HUBBARD G, BEARD MR, LUXON BA, LEMON SM, LANFORD RE. Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J Virol*. 2004; 78 (24): 13779–13792.
- [56] THIMME R, BUKH J, SPANGENBERG HC, WIELAND S, PEMBERTON J, STEIGER C, GOVINDARAJAN S, PURCELL RH, CHISARI FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99 (24): 15661–15668.
- [57] HOUGHTON M, ABRIGNANI S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*. 2005; 436 (7053): 961–966.
- [58] STOLL-KELLER F, BARTH H, FAFI-KREMER S, ZEISEL MB, BAUMERT TF. Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress. *Expert Rev Vaccines*. 2009; 8 (3): 333–345.
- [59] BARTH H, ROBINET E, LIANG TJ, BAUMERT TF. Mouse models for the study of HCV infection and virus-host interactions. *J Hepatol*. 2008; 49 (1): 134–142.
- [60] MAEDA N, WATANABE M, OKAMOTO S, KANAI T, YAMADA T, HATA JI, HOZUMI N, KATSUME A, NURIYA H, SANDHU J, ISHII H, KOHARA M, HIBI T. Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone. *Liver Int*. 2004; 24 (3): 259–267.
- [61] MEULEMAN P, LIBBRECHT L, VOS RD, DE HEMPTINNE B, GEVAERT K, VANDEKERCKHOVE J, ROSKAMS T, LEROUX-ROELS G. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology*. 2005; 41 (4): 847–856.
- [62] WU GY, KONISHI M, WALTON CM, OLIVE D, HAYASHI K, WU CH. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology*. 2005; 128 (5): 1416–1423.
- [63] FISCHER R, BAUMERT T, BLUM HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol*. 2007; 13 (36): 4865–4872.
- [64] ZIMMERMANN KC, BONZON C, GREEN DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*. 2001; 92 (1): 57–70.

- [65] KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26 (4): 239–257.
- [66] MURPHY KM, TRAVERS P, WALPORT M. Janeway's Immunobiology, Seventh Edition (Immunobiology: The Immune System (Janeway)). 7. Auflage. Abingdon (UK): Garland Science. 2007.
- [67] SCHATTENBERG JM, GALLE PR, SCHUCHMANN M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int*. 2006; 26 (8): 904–911.
- [68] MICHELS J, JOHNSON PWM, PACKHAM G. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37 (2): 267–271.
- [69] CUCONATI A, MUKHERJEE C, PEREZ D, WHITE E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev*. 2003; 17 (23): 2922–2932.
- [70] NIJHAWAN D, FANG M, TRAER E, ZHONG Q, GAO W, DU F, WANG X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev*. 2003; 17 (12): 1475–1486.
- [71] MICHELS J, O'NEILL JW, DALLMAN CL, MOUZAKITI A, HABENS F, BRIMMELL M, ZHANG KYJ, CRAIG RW, MARCUSSEON EG, JOHNSON PWM, PACKHAM G. Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene*. 2004; 23 (28): 4818–4827.
- [72] AICHBERGER KJ, MAYERHOFER M, KRAUTH MT, SKVARA H, FLORIAN S, SONNECK K, AKGUL C, DERDAK S, PICKL WF, WACHECK V, SELZER E, MONIA BP, MORIGGL R, VALENT P, SILLABER C. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood*. 2005; 105 (8): 3303–3311.
- [73] FUKUCHI Y, KIZAKI M, YAMATO K, KAWAMURA C, UMEZAWA A, JI H, NISHIHARA T, IKEDA Y. Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells. *Oncogene*. 2001; 20 (6): 704–713.
- [74] ZHOU P, LEVY NB, XIE H, QIAN L, LEE CY, GASCOYNE RD, CRAIG RW. MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood*. 2001; 97 (12): 3902–3909.

- [75] NISHIOKA C, IKEZOE T, YANG J, YOKOYAMA A. Inhibition of MEK/ERK signaling induces apoptosis of acute myelogenous leukemia cells via inhibition of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and down-regulation of Mcl-1. *Apoptosis*. 2010; 15 (7): 795–804.
- [76] VICK B, WEBER A, URBANIK T, MAASS T, TEUFEL A, KRAMMER PH, OPFERMAN JT, SCHUCHMANN M, GALLE PR, SCHULZE-BERGMANN H. Knock-out of myeloid cell leukemia-1 induces liver damage and increases apoptosis susceptibility of murine hepatocytes. *Hepatology*. 2009; 49 (2): 627–636.
- [77] WEBER A, BOGER R, VICK B, URBANIK T, HAYBAECK J, ZOLLER S, TEUFEL A, KRAMMER PH, OPFERMAN JT, GALLE PR, SCHUCHMANN M, HEIKENWALDER M, SCHULZE-BERGMANN H. Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*. 2010; 51 (4): 1226–1236.
- [78] KOEHLER BC, URBANIK T, VICK B, BOGER RJ, HEEGER S, GALLE PR, SCHUCHMANN M, SCHULZE-BERGMANN H. TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells is augmented by targeted therapies. *World J Gastroenterol*. 2009; 15 (47): 5924–5935.
- [79] CALABRESE F, PONTISSO P, PETTENAZZO E, BENVENÚ L, VARIO A, CHEMELLO L, ALBERTI A, VALENTE M. Liver cell apoptosis in chronic hepatitis C correlates with histological but not biochemical activity or serum HCV-RNA levels. *Hepatology*. 2000; 31 (5): 1153–1159.
- [80] BANTEL H, LÜGERING A, POREMBA C, LÜGERING N, HELD J, DOMSCHKE W, SCHULZE-OSTHOFF K. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2001; 34 (4 Pt 1): 758–767.
- [81] HIRAMATSU N, HAYASHI N, HARUNA Y, KASAHARA A, FUSAMOTO H, MORI C, FUKU I, OKAYAMA H, KAMADA T. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome. *Hepatology*. 1992; 16 (2): 306–311.
- [82] LAU JY, XIE X, LAI MM, WU PC. Apoptosis and viral hepatitis. *Semin Liver Dis*. 1998; 18 (2): 169–176.
- [83] GHAVAMI S, HASHEMI M, KADKHODA K, ALAVIAN SM, BAY GH, LOS M. Apoptosis in liver diseases—detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit*. 2005; 11 (11): RA337–RA345.

- [84] MITA E, HAYASHI N, IIO S, TAKEHARA T, HIJIOKA T, KASAHARA A, FUSAMOTO H, KAMADA T. Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 204 (2): 468–474.
- [85] ZYLBERBERG H, RIMANIOL AC, POL S, MASSON A, GROOTE DD, BERTHELOT P, BACH JF, BRÉACHOT C, ZAVALA F. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol.* 1999; 30 (2): 185–191.
- [86] MUNDT B, KÜHNEL F, ZENDER L, PAUL Y, TILLMANN H, TRAUTWEIN C, MANNS MP, KUBICKA S. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J.* 2003; 17 (1): 94–96.
- [87] PELLI N, TORRE F, DELFINO A, BASSO M, PICCIOTTO A. Soluble tumor necrosis factor-related ligand (sTRAIL) levels and kinetics during antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res.* 2006; 26 (2): 119–123.
- [88] RAY RB, LAGGING LM, MEYER K, STEELE R, RAY R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res.* 1995; 37 (3): 209–220.
- [89] RAY RB, MEYER K, STEELE R, SHRIVASTAVA A, AGGARWAL BB, RAY R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem.* 1998; 273 (4): 2256–2259.
- [90] RUGGIERI A, HARADA T, MATSUURA Y, MIYAMURA T. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology.* 1997; 229 (1): 68–76.
- [91] DUMOULIN FL, VON DEM BUSSCHE A, SÖHNE J, SAUERBRUCH T, SPENGLER U. Hepatitis C virus core protein does not inhibit apoptosis in human hepatoma cells. *Eur J Clin Invest.* 1999; 29 (11): 940–946.
- [92] YOSHIDA T, HANADA T, TOKUHISA T, ICHIRO KOSAI K, SATA M, KOHARA M, YOSHIMURA A. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med.* 2002; 196 (5): 641–653.
- [93] OTSUKA M, KATO N, TANIGUCHI H, YOSHIDA H, GOTO T, SHIRATORI Y, OMATA M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology.* 2002; 296 (1): 84–93.
- [94] CHOU AH, TSAI HF, WU YY, HU CY, HWANG LH, HSU PI, HSU PN. Hepatitis C virus core protein modulates TRAIL-mediated apoptosis by enhancing Bid

- cleavage and activation of mitochondria apoptosis signaling pathway. *J Immunol.* 2005; 174 (4): 2160–2166.
- [95] LEE SH, KIM YK, KIM CS, SEOL SK, KIM J, CHO S, SONG YL, BARTENSCHLAGER R, JANG SK. E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis. *J Immunol.* 2005; 175 (12): 8226–8235.
- [96] WANG J, TONG W, ZHANG X, CHEN L, YI Z, PAN T, HU Y, XIANG L, YUAN Z. Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells. *FEBS Lett.* 2006; 580 (18): 4392–4400.
- [97] CHUNG YL, SHEU ML, YEN SH. Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2003; 107 (1): 65–73.
- [98] LAN KH, SHEU ML, HWANG SJ, YEN SH, CHEN SY, WU JC, WANG YJ, KATO N, OMATA M, CHANG FY, LEE SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2002; 21 (31): 4801–4811.
- [99] SARCAR B, GHOSH AK, STEELE R, RAY R, RAY RB. Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology.* 2004; 322 (1): 51–60.
- [100] 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98 (17): 9599–9604.
- [101] SIAVOSHIAN S, ABRAHAM JD, THUMANN C, KIENY MP, SCHUSTER C. Hepatitis C virus core, NS3, NS5A, NS5B proteins induce apoptosis in mature dendritic cells. *J Med Virol.* 2005; 75 (3): 402–411.
- [102] ACKERMANN G, MIMS C, DOCKRELL HM, GOERING RV, ROITT I, WAKELIN D, ZUCKERMAN M. *Medizinische Mikrobiologie - Infektiologie.* 2. Auflage. München: Urban & Fischer, Elsevier. 2006.
- [103] THE NOBEL FOUNDATION. Nobelprize for Physiology and Medicine 1993. zitiert am 21.09.2009, URL: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1993/illpres/genes-in-pieces.html.
- [104] NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Gene therapy using an adenovirus vector. zitiert am 21.09.2009, URL: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/therapyvector>.

- [105] McDONALD D, STOCKWIN L, MATZOW T, ZAJDEL MEB, BLAIR GE. Cox-sackie and adenovirus receptor (CAR)-dependent and major histocompatibility complex (MHC) class I-independent uptake of recombinant adenoviruses into human tumour cells. *Gene Ther.* 1999; 6 (9): 1512–1519.
- [106] KNIPE DM. *Field's Virology (Fundamental Virology)*. 5. Auflage. Philadelphia (USA): Williams & Wilkins. 2007.
- [107] DAVISON AJ, BENKO M, HARRACH B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol.* 2003; 84 (Pt 11): 2895–2908.
- [108] BANGARI DS, MITTAL SK. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr Gene Ther.* 2006; 6 (2): 215–226.
- [109] IMPERIALE MJ, KOCHANEK S. Adenovirus vectors: biology, design, and production. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004; 273: 335–357.
- [110] OKA K, CHAN L. Construction and characterization of helper-dependent adenoviral vectors for sustained in vivo gene therapy. *Methods Mol Med.* 2005; 108: 329–350.
- [111] UNTERGASSER A. Competent Cells - Starter Glycerol Stocks. Untergasser's Lab. zitiert am 02.08.2009, URL: http://www.untergasser.de/lab/protocols/competent_cells_starter_cultures_v1_0.htm.
- [112] UNTERGASSER A. Preparation of Chemical Competent Cells. Untergasser's Lab. zitiert am 02.08.2009, URL: http://www.untergasser.de/lab/protocols/competent_cells_chemical_v1_0.htm.
- [113] SAMBROOK J, FRITSCH E, MANEATIS T, Hers. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. Auflage. York (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- [114] GRAHAM FL, SMILEY J, RUSSELL WC, NAIRN R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977; 36 (1): 59–74.
- [115] 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 (5739): 615–616.
- [116] KNOWLES BB, HOWE CC, ADEN DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* 1980; 209 (4455): 497–499.

- [117] NAKABAYASHI H, TAKETA K, MIYANO K, YAMANE T, SATO J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 1982; 42 (9): 3858–3863.
- [118] KLAUNIG JE, GOLDBLATT PJ, HINTON DE, LIPSKY MM, CHACKO J, TRUMP BF. Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation. *In Vitro.* 1981; 17 (10): 913–925.
- [119] TISELIUS A, KABAT E. Electrophoresis of immune serum. *Science.* 1938; 87 (2262): 416–417.
- [120] AD-EASY. Ad-Easy System. pShuttle-CMV. vectormap. zitiert am 19.11.2010, URL: <http://www.coloncancer.org/adeasy/pShuttle%20CMV%20vector%20map.htm>.
- [121] ZENG M, SMITH SK, SIEGEL F, SHI Z, KAMPEN KRV, ELMETS CA, TANG DC. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination. *Biotechniques.* 2001; 31 (2): 260–262.
- [122] AD-EASY. Ad-Easy System. pAd-Easy-1. vectormap. zitiert am 19.11.2010, URL: <http://www.coloncancer.org/adeasy/pAdEasy-1%20vector%20map.htm>.
- [123] KARLIN S, ALTSCHUL SF. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87 (6): 2264–2268.
- [124] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248–254.
- [125] LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680–685.
- [126] WILSON WD, TANIOUS FA, BARTON HJ, JONES RL, FOX K, WYDRA RL, STREKOWSKI L. DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry.* 1990; 29 (36): 8452–8461.
- [127] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65 (1-2): 55–63.
- [128] SPRINZL M. Der adenovirale Genomtransfer überwindet die Speziesbarriere der Hepatitis-B-Viren. [Dissertation], Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät. 2000.

- [129] KARLIN S, ALTSCHUL SF. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90 (12): 5873–5877.
- [130] BEWIG B, SCHMIDT WE. Accelerated titering of adenoviruses. *Biotechniques*. 2000; 28 (5): 870–873.
- [131] LUO J, Z-LDENG, LUO X, TANG N, SONG WX, CHEN J, SHARFF K, LUU H, HAYDON R, KINZLER K, VOGELSTEIN B, HE TC. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc*. 2007; 2 (5): 1236–1247.
- [132] SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74 (12): 5463–5467.
- [133] XIA D, YAN LN, XIE JG, TONG Y, YAN ML, WANG XP, ZHANG MM, ZHAO LY. Overexpression of TIMP-1 mediated by recombinant adenovirus in hepatocellular carcinoma cells inhibits proliferation and invasion in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006; 5 (3): 409–415.
- [134] FU Y, QING WANG S, PENG LIU Y, PENG WANG G, TING WANG J, SHENG GONG S. Gene transfer into primary cultures of fetal neural stem cells by a recombinant adenovirus carrying the gene for green fluorescent protein. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008; 9 (4): 299–305.
- [135] MOHD-ISMAIL NK, DENG L, SUKUMARAN SK, YU VC, HOTTA H, TAN YJ. The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human Mcl-1. *J Virol*. 2009; 83 (19): 9993–10006.
- [136] GHOSH SS, GOPINATH P, RAMESH A. Adenoviral vectors: a promising tool for gene therapy. *Appl Biochem Biotechnol*. 2006; 133 (1): 9–29.
- [137] LI GB, LU GX. Gene delivery efficiency in bone marrow-derived dendritic cells: comparison of four methods and optimization for lentivirus transduction. *Mol Biotechnol*. 2009; 43 (3): 250–256.
- [138] NAYAK S, HERZOG RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther*. 2010; 17 (3): 295–304.

Anhang

A Hersteller und Geräte

Agfa Mortsel, Belgien

Apple Inc. Cupertino, CA, U.S.A.

Affinity BioReagents, ABR Rockford, IL, U.S.A

Benda Wiesloch, Deutschland

Bio-Rad Hercules, CA, U.S.A.

B.Braun Melsungen, Deutschland

Cell Signaling Danvers, MA, U.S.A.

Clontech Mountain View, CA, U.S.A

Costar Corning, U.S.A.

Desaga Heidelberg, Deutschland

Eppendorf Hamburg, Deutschland

GE Healthcare Buckinghamshire, U.K.

Gibco BRL Karlsruhe, Deutschland

Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland

Heidolph Kelheim, Deutschland

Heraeus Hanau, Deutschland

Hewlett Packard Palo Alto, CA, U.S.A.

Invitrogen Carlsbad, CA, U.S.A.

Janke & Kunkel Staufen, Deutschland

Kottermann Uetze, Deutschland

Laborhandel Labotec Wiesbaden, Deutschland

Liebherr Bulle, Schweiz

Macherey Nagel Düren, Deutschland
Microsoft Co. Redmond, WA, U.S.A.
New England Biolabs Ipswich, MA, U.S.A.
New Brunswick Scientific New Jersey, U.S.A.
Nunc Wiesbaden, Deutschland
Qiagen Hilden, Deutschland
Olympus Tokio, Japan
Roche Applied Science Indianapolis, IN, U.S.A
Rockland Immunochemicals Gilbertsville, PA, U.S.A.
Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, U.S.A.
Sartorius Göttingen, Deutschland
Schleicher und Schuell Dassel, Deutschland
Serva Electrophoresis Heidelberg, Deutschland
Sigma München, Deutschland
Stratagene La Jolla, CA, U.S.A.
Thermo Scientific Wilmington, DE, U.S.A.
Whatman Maidstone, England
Zeiss Oberkochen, Deutschland

Tabelle A.1: Technische Hilfsmittel

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Thermo Co.
Cell Scraper	Costar
Chromatographiepapier für Western Blots	Whatman
Computer	Apple
Elektroporator	Eppendorf
Elektrophoresekammer	Biorad
Filmentwickler für Western Blots	Agfa
Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Gefrierschrank (-80°C)	Nunc
Kühlgefrierschrank	Liebherr
Magnetheizplatte	Janke & Kunkel
Mikrozentrifuge	Sigma
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss
Photometer	Eppendorf
Photometer - Appliskan	Thermo Co.
Pipetten	Eppendorf
Präzisionswaage	sartorius
Reagenzgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf
Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One
Schüttler für Western Blots	Heidolph
Spannungsgerät	Desaga
Spritzenfilter	Schleicher und Schuell
Sterilfilter	Nunc
Sterilwerkbank	Nunc
Thermomixer	Eppendorf
Thermo-Schüttler	New Hunswick Scientific
UV Lampe	Benda
Vortexer	Janke & Kunkel
Wasserbad	Kottermann
Western Blot Kammern	Greiner Bio-One
Zählkammer (nach Neubauer)	Labotec
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One
Zentrifuge	Heraeus

B Danksagung

C Tabellarischer Lebenslauf