

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,  
Abteilung Virologie  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg**

# **Interferon-gamma hemmt die Replikation des Hepatitis-C-Virus**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2001 von

**Verena Schulte, geb. Schwärzle**

aus Ulm



Dekan:	Prof. Dr. med. J. Zentner
Erstgutachter:	Prof. Dr. O. Haller
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Dr. h. c. H. E. Blum
Jahr der Promotion:	2005

„Ihrer wahren Wesensbestimmung nach ist die  
Wissenschaft das Studium der Schönheit der Welt.“

*Simone Weil*

## Danksagung

Prof. Dr. Otto Haller danke ich für die Möglichkeit, dieses interessante Thema wissenschaftlich zu erarbeiten, sowie für wertvolle Anregungen. Mit der Teilnahme bei verschiedenen Arbeitstreffen bot sich mir die Gelegenheit zu hilfreichen Diskussionen, die meine Arbeit in lebendiger Dynamik hielten.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Dr. Michael Frese für die präzise Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und sein Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit. Nach einer umfassenden Einarbeitung konnte ich sowohl selbständig arbeiten als auch jederzeit mit Fragen mich an ihn wenden.

Dr. Darius Moradpour, Abteilung Innere Medizin, Universitätsklinik Freiburg, danke ich für die engagierte Hilfsbereitschaft bei Problemen und Informationsbedarf.

Für Materialien und technische Tipps danke ich Dr. Moradpour und Elke Bieck, Abteilung Innere Medizin, Universitätsklinik Freiburg, Prof. Modulell und Verena Weber, Max-Planck-Institut Freiburg, Dr. F. Weber, Dr. G. Kochs, Dr. M. Schwemmle, Prof. Dr. Bauer, Abteilung Virologie Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Freiburg, Prof. Dr. Peter, Abteilung Rheumatologie und Immunologie, Universitätsklinik Freiburg, J. A. Hellings, C. Weissmann und M. Fontulakis.

Für die angenehme offene Arbeitsatmosphäre und die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danke ich dem gesamten Laborteam mit Michael Frese, Friedemann Weber, Hein Streitenfeld, Niklas Pieling, Stephanie Veil, Simone Gruber, Christel Hässler, Georg Kochs, Othmar Engelhardt, Martin Schwemmle, Christian Janzen, Gjon Blakquori, Till Geib und Kerstin Barth.



# Inhaltsverzeichnis

## Einleitung

Das Hepatitis-C-Virus .....	9
Hepatitis-C .....	10
Krankheitsbild und Diagnostik .....	10
Therapie der Hepatitis-C .....	12
Antiviral aktive Cytokine .....	13
Die Effektorproteine der Cytokine .....	15
HCV-Replikonsysteme .....	17

## Material

Zellen .....	19
Primärantikörper .....	19
Sekundärantikörper .....	20
Cytokine .....	20
Plasmide .....	20
Reagenzien .....	20
Chemikalien .....	20
Behandlung von Materialien .....	20

## Methoden

Zellkultur .....	21
Cytokinbehandlung .....	21
Mykoplasmentests .....	22
Einfrieren von Zellen .....	22
Immunfluoreszenz-Analyse .....	22
Western-Blot-Analyse .....	24
Proteingewinnung .....	24
Gelelektrophorese von Proteinen .....	24
Westernblot-Verfahren .....	26
Analyse der Proteine mit spezifischen Antikörpern .....	26
Northern-Blot-Analyse .....	27
RNA-Isolierung mit PeqGOLD TriFast reagent (peqLab) .....	27
Gelelektrophorese von RNA .....	27
Northern-Blot-Analyse .....	27

Dual-Luciferase-Reporter-Assay .....	28
Transfektion mit DAC-30: .....	29
Messung im Lumineszenz-Meßgerät .....	29
Griess-Analyse .....	30
Ergebnisse	
Effekt von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ auf die Replikation von HCV .....	31
IFN- $\gamma$ hemmt die Expression von HCV-Proteinen .....	31
Die Hemmung der HCV-Replikation durch IFN- $\gamma$ ist dosisabhängig .....	33
TNF- $\alpha$ hemmt die HCV-Proteinsynthese nicht .....	35
NF $\kappa$ B-Promotoraktivität nach TNF- $\alpha$ -Stimulation .....	36
Expression spezifischer Proteine nach IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ -Stimulation .....	37
Expression von IFN-induzierten Proteinen .....	37
IFN- $\gamma$ und endogen produziert IFN- $\alpha$ .....	40
Die hemmende Wirkung von IFN- $\gamma$ auf die HCV-Expression ist IFN- $\alpha$ -unabhängig .....	40
Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in HuH-7 .....	41
HuH-7 produzieren kein NO nach Behandlung mit IFN- $\gamma$ oder TNF- $\alpha$ ...	41
Diskussion	
Die Rolle von IFN- $\gamma$ im Immunsystem des HCV-infizierten Patienten .....	43
Die inhibitorische Rolle von IFN- $\gamma$ in HCV-Replikons .....	44
TNF- $\alpha$ spielt keine Rolle für die HCV-Replikons .....	44
Die Rolle des bicistronischen Charakters der HCV-Replikons .....	44
Die Rolle der Strukturproteine für die Cytokinwirkung in HCV-Replikons .....	44
Die Rolle der Cytokin-induzierten Effektoren .....	45
Zusammenfassung .....	49
Literaturverzeichnis .....	50
Publikationsliste .....	62
Curriculum vitae .....	63
Abkürzungen .....	65

## Einleitung

### Das Hepatitis-C-Virus

Das *Hepatitis-C-Virus* (HCV) ist ein RNA-Virus mit einem einzelsträngigen Genom positiver Polarität (Abb. 1). HCV ist einziges Mitglied des Genus *Hepacivirus* und zählt wie auch die Mitglieder des Genus *Flavivirus* und des Genus *Pestivirus* zur Familie der *Flaviviridae* (Abb. 2). Namensgebend für diese Familie war das *Gelbfiebertvirus*, das 1902 als Erreger des epidemischen Gelbfiebers identifiziert wurde (*flavus*, lateinisch: gelb).

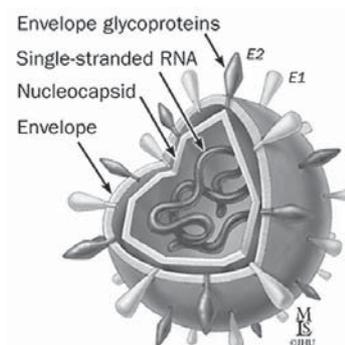


Abb. 1 Hypothetisches Modell eines Hepatitis-C Virus (Johns Hopkins University, Baltimore)

Daniel W. Bradley gelang es 1989 HCV als das infektiöse Agens der NonA-/NonB-Hepatitis genetisch zu charakterisieren [7]. Derzeit sind 6 verschiedene Genotypen und mehrere Subtypen bekannt, von denen der Genotyp 1b mit 50-80% in Deutschland am häufigsten zu finden ist.

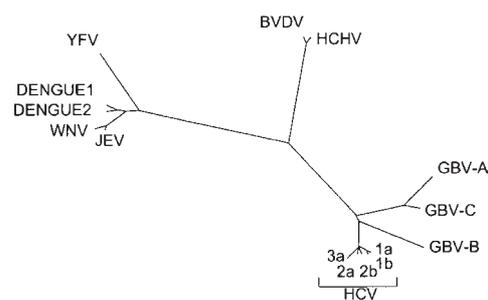


Abb. 2 Stammbaum Flaviviridae (J.N. Simons)

Das 9,6 kb große HCV-Genom (Abb. 3) besteht aus einer nichttranslatierten Region (NTR) mit der IRES (internal ribosomal entry site) am 5'-Ende, einem offenen Leseraster mit der Sequenz für ein Polyprotein, das von wirtseigenen und viralen

Proteasen in die Strukturproteine und die Nichtstrukturproteine gespalten wird, und einer NTR am 3'-Ende. Die NTR (Abb. 4) am 5'-Ende besteht aus ca. 341 Nucleotiden. Etwa 220 Nucleotide am 5'-Ende vom Translationsinitiationskodon stromaufwärts scheinen in ihrer Sekundärstruktur zwischen HCV, GBV-B und Pestiviren hochkonserviert zu sein. Das Polyprotein wird gespalten in die Strukturproteine Capsidprotein C (engl. core) und Hüllproteine E1 und E2 (engl. envelope), das Protein p7, und in die Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Das 21 kD schwere C-Prote-

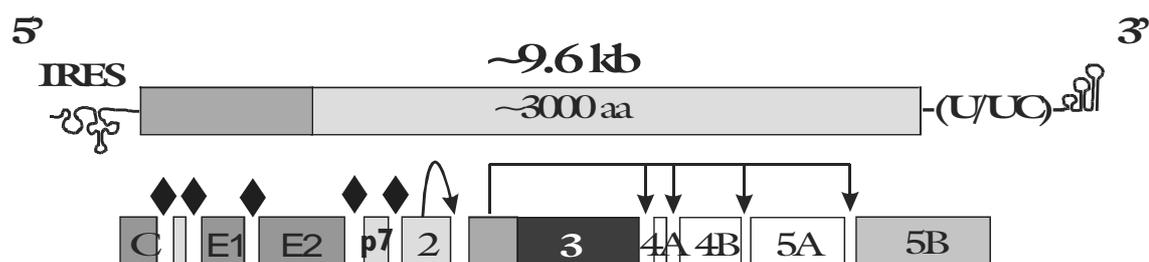


Abb. 3 HCV-Genom, *The Hepatitis C Viruses*, [72]

in bildet mit dem RNA-Genom das Nucleocapsid. Das C-Protein induziert die Spaltung des Polyproteins durch zelluläre Proteasen [47]. Die beiden glykosylierten Membranproteine E1 und E2 vermitteln die Adsorption des Virus an die Hepatozyten und führen

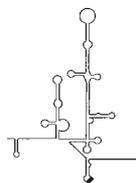


Abb. 4 HCV-NTR,  
The Hepatitis C  
Viruses [72]

zu Hämagglutination. Das bei den anderen Flaviviren vorhandene NS1-Protein fehlt bei HCV. Es wird vermutet, dass NS1 im Laufe der Evolution mit einem Membranprotein fusionierte und sich zu dem schon erwähnten E2-Protein entwickelte. Das NS2-Protein ist ein hydrophobes, 23 kDa schweres Protein und fungiert als  $Zn^{2+}$ -abhängige Metalloprotease, die zwischen NS2 und NS3 spaltet. NS3 ist ein hydrophiles Protein und mit 70 kDa das Nichtstrukturprotein mit dem größten Molekulargewicht. Es bildet mit dem NS4A-

Protein ein Heterodimer und erfüllt zwei Funktionen: Die aminoternale Region ist als Protease für die Spaltungen in den Regionen des Polyproteins zuständig, während sich in der carboxyterminalen Region Nucleotidtriphosphat-Bindungsstellen und eine Helikasedomäne befinden. Diese ist vermutlich bei der Replikation für die Entwindung der stark strukturierten HCV-RNA, insbesondere der NTRs notwendig. Dem 54 Aminosäuren kleinen hydrophoben NS4A wird neben der Interaktion mit NS3 auch die Regulation der NS5A-Phosphorylierung als Aufgabe zugeschrieben. Die Funktion des etwa 30 kDa schweren NS4B ist unbekannt. NS5A ist ein hydrophiles Protein, das in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustandes als 56 kDa oder 58 kDa schweres Protein vorliegen kann. Für NS5A ist eine Kinaseaktivität beschrieben worden, und die Fähigkeit die durch IFN induzierte doppelsträngige RNA-abhängige Kinase PKR zu inhibieren. Die aktive PKR hemmt die Translation, indem sie die  $\alpha$ -Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF2 phosphoryliert [20]. Das letzte Nichtstrukturprotein NS5B hat ein Molekulargewicht von 68 kDa und fungiert als RNA-abhängige RNA-Polymerase [72].

## Hepatitis-C

### Krankheitsbild und Diagnostik

Die Hepatitis-C ist eine durch das HCV hervorgerufene Erkrankung der Leber. Mit kontaminiertem Blut oder anderen Körperflüssigkeiten tritt das Virus in den Organismus ein, gelangt in den Blutkreislauf und damit in die Leber, wo es die Hepatozyten infiziert. Seit 1990 das anti-HCV-Screening von Blut und Blutprodukten eingeführt wurde, ist der häufigste Übertragungsweg nicht mehr die Bluttransfusion, sondern der intravenöse Drogenabusus [59]. Nach einer Inkubationsperiode von etwa 8 Wochen kommt es durch die Reaktion des Immunsystems zu einer meist leicht verlaufenden Leberentzündung.

Gelegentlich klagen die infizierten Personen während dieser Zeit über allgemeine Krankheitssymptome wie Müdigkeit und schlechte Befindlichkeit, der Großteil jedoch weist zunächst keinerlei Symptome auf. Bei bis zu 80 % der Infizierten widersteht das Virus dem Immunsystem und persistiert im Leberparenchym. Die Frage, weshalb HCV imstande ist der Immunabwehr zu entgehen, ist noch nicht vollständig geklärt. Mitverantwortlich ist möglicherweise die Variabilität des Virus, die insbesondere durch die hypervariablen Regionen der Hüllproteine dem Immunsystem nicht erlauben, produzierte Antikörper zur Neutralisation einzusetzen. Zur Persistenz kommt es vermutlich auch durch die Unterdrückung der spezifischen Cytotoxischen T-Zell-Antwort (CTL-Antwort) und dem „stunned phenotype“ der T-Zellen (vor allem der NS5B 2594-spezifischen T-Zellen) [45]. Diese T-Zellen sind sozusagen „verduzt“ (engl. stunned) und produzieren nach einer HCV-Infektion anfangs keines oder nur wenig Interferon(IFN)- $\gamma$  und Interleukin(IL)-2. Beide „Manipulationen“ der normalen T-Zell-Antwort werden dem C-Protein zugeschrieben [44]. Im Blut von Individuen, die das Virus eliminieren, lassen sich im Gegensatz zu den chronisch Infizierten große Mengen an CD4(+)T-Zellen nachweisen [6]. Dies weist darauf hin, dass die Folgen einer HCV-Infektion abhängig von der Konstellation verschiedener T-Zellen dennoch begrenzt werden können [73].

Die Frage, ob das Virus persistiert oder eliminiert wird, kann mit folgenden diagnostischen Vorgehensweisen geklärt werden: Im Vordergrund stehen der Nachweis von Virusgenom im Serum und in Biopsiematerial und von HCV-spezifischen Antikörpern. Der direkte Nachweis von viralen Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe der RT-PCR, bei der in einem ersten Schritt die RNA in DNA umgeschrieben wird oder der bDNA (branched DNA signal amplification) [34]. Mit einer Nachweisgrenze von etwa  $10^2$  Kopien pro ml stellt die RT-PCR allerdings die sensitivere Methode dar [89]. HCV-RNA ist von Beginn der Infektion bis zur Eliminierung des Virus im Serum zu finden. IgM-Antikörper gegen das NS4 und das Kernprotein lassen sich bei der akuten Infektion nachweisen und persistieren bei einer chronischen Hepatitis C. IgG-Antikörper gegen das Kernprotein und gegen die Nichtstrukturproteine NS3, NS4 und NS5 sind erst nach einigen Wochen im ELISA-Test oder im Western-Blot nachweisbar [58].

Das Ausmaß der Leberschädigung kann in der Histologie und anhand der Transaminasenkonzentrationen im Serum annähernd erfasst werden. Es werden die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und die Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT) bestimmt und daraus der De Ritis-Quotient (GOT/GPT) gebildet. GPT ist ein leberspezifisches, zytoplasmatisches Enzym, während hingegen GOT auch in Muskelzellen sowohl zytoplasmatisch als auch mitochondrial zu finden ist. Je gravierender der Leberzellschaden, um

so größer ist der Anstieg der mitochondrialen GOT und damit des Quotienten [90]. Entwickelt der Patient eine chronische Hepatitis C, kommt es durch eine vermehrte Kollagenproduktion, insbesondere der Sternzellen, zunächst zu einer Fibrosierung der Leber. Bei bis zu 20 % der Patienten mit einer chronischen Hepatitis C schreitet die Leberfibrose fort und es entsteht eine Leberzirrhose. Die Patienten leiden dann meist an den folgenden Symptomen: Ikterus (worauf auch der Volksname der Hepatitis: „Gelbsucht“ zurückzuführen ist), Aszites, Ösophagusvarizen und Enzephalopathie. Komplikationen sind Polyarteriitis nodosa, membranproliferative Glomerulonephritis und das Sjögren-Syndrom, bei welchem Tränen- und Speicheldrüsen durch eine chronische Entzündung in ihrer Sekretproduktion gestört sind. Die HCV-Infektion ist auch eine der Hauptursachen für das hepatozelluläre Karzinom (HCC). Von Bedeutung ist die Zahl der Lebertransplantationen, die zu etwa 40 % auf eine Infektion mit diesem Virus zurückgehen. WHO-Schätzungen zur Folge sind mit ca. 3 % der Weltbevölkerung etwa 170 Mio Menschen mit HCV infiziert, wobei sich die höchste Prävalenz mit 5,3 % in Afrika zeigt. In Europa sind etwa 9 Millionen Menschen mit HCV infiziert [91].

### Therapie der Hepatitis-C

Die Standardtherapie für Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C besteht derzeit aus einer Kombination von IFN- $\alpha$  und Ribavirin. Ziel der antiviralen Therapie ist die Elimination des Virus, die mit dem Nachweis HCV-spezifischer RNA im Serum beurteilt wird. Erreicht wird diese Elimination allerdings nur bei einem Bruchteil der Patienten (etwa 30-40 %). Die Kombinationstherapie sieht eine Dosierung von 3 Mio. IU IFN- $\alpha$  dreimal pro Woche und 1000 mg (bis 75 kg Körpergewicht) Ribavirin täglich vor und zwar über eine Dauer von 12 Monaten bei Infektionen mit dem Genotyp 1, und 6 Monate bei einer Infektion mit den Genotypen 2 oder 3. In klinischen Studien befindet sich das neu entwickelte „pegylated“ IFN- $\alpha$ , (erstmalig zugelassen in der Schweiz, *Handelsblatt* 8.8.2001), das bei einer längeren Halbwertszeit nur einmal pro Woche verabreicht werden muss [95]. Ebenfalls in klinischer Erprobung steht IFN- $\beta$ , für das, bei Gabe zu Beginn einer Standardtherapie, eine Beschleunigung der HCV-Elimination beschrieben wurde [35]. Nebenwirkungen der Standardtherapie sind vor allem auf die IFN- $\alpha$ -Wirkung zurückzuführen. Sie umfassen grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen. Des weiteren können Übelkeit und Durchfall

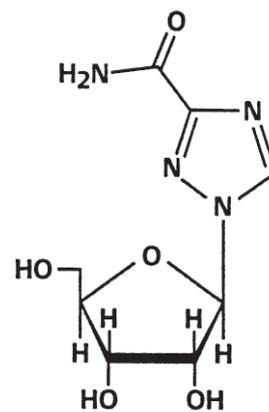


Abb. 5 Strukturformel des Ribavirins, Zeuzem, S., [64]

auftreten, Gewichtsabnahme, Alopezie, Hautausschlag, Entwicklung von Depressionen, Angst und Schlafstörungen. Ribavirin ist relativ gut verträglich und hat eine geringe Nebenwirkungsrate. Neben Dyspnoe, Husten und Pruritus kommt es laborchemisch zu einer osmotischen Hämolyse mit anschließendem Anstieg des Bilirubins und der Harnsäure. Allerdings besteht ein hohes teratogenes Risiko, weshalb Ribavirin bei Schwangeren kontraindiziert ist. Ribavirin ist ein Guanosinanalogen (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamid, Abb. 5), das von eukaryotischen Zellen aufgenommen und intrazellulär phosphoryliert wird. Der Wirkmechanismus ist derzeit noch nicht geklärt. Diskutiert wird eine Hemmung der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase oder des für die Proteinsynthese erforderlichen Cappings der mRNA. Zur Diskussion steht auch die Inhibition der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, die eine konsekutive Abnahme der intrazellulären GTP-Konzentration zur Folge hat. Weitere mögliche Wirkungen des Ribavirins sind immunmodulatorischer Art, insbesondere die Hemmung der TNF- $\alpha$ -Produktion in Makrophagen und die präferentielle Differenzierung der Th-Zellen zu IFN- $\gamma$  produzierenden Th1-Zellen [64] [96]. Außerdem ist für die antivirale Aktivität gegenüber dem Poliovirus beschrieben worden, dass Ribavirin von der viralen RNA-Polymerase als Substrat benützt wird. Da im folgenden Replikationsschritt sowohl Cytidin als auch Uridin als Ribavirin-„template“ in Frage kommen, entsteht für das Virus damit eine sogenannte „error catastrophe“ auf Transkriptionsebene [9] [8].

Um mit einer antiviralen Therapie dem Großteil der Patienten zu ermöglichen das Virus zu eliminieren, bedarf es eines besseren Verständnisses der Interaktionen zwischen Virus, Wirtszelle und Immunsystem.

## Antiviral aktive Cytokine

**Interferone** sind wichtige Faktoren eines „Schutzreflexes“ unseres Körpers, die mit der Vermehrung von eingedrungenen Viren „interferieren“. Erstmals beschrieben wurden diese antiviral wirkenden Proteine 1957 von Isaacs und Lindenmann [36]. In verschiedenen Studien mit sogenannten „knock-out“-Mäusen, denen der IFN- $\alpha$ / $\beta$ -Rezeptor fehlt, wurde ihre weitreichende Bedeutung im Kampf des Abwehrsystems gegen Virusinfektionen nachgewiesen [62] [14] [11]. Eingeteilt werden die bislang bekannten Interferone in zwei Typen, die sich sowohl in ihrer Struktur unterscheiden als auch in ihren Signaltransduktionswegen sowie in ihrer Genexpression.

Zu den Interferonen vom **Typ I** gehören fünf Subtypen mit IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\omega$  und IFN- $\tau$ , wovon Primaten allerdings nur drei besitzen. Menschen besitzen etwa 13 verschiedene IFN- $\alpha$ -Gene, das IFN- $\beta$ -Gen und das Gen für IFN- $\omega$  [76]. IFN- $\alpha$  wird hauptsächlich von Leukozyten produziert. Insbesondere die Vorläufer der plasmazytoiden

dendritischen Zellen (pDCs) synthetisieren durch Virus-Induktion große Mengen an IFN- $\alpha/\beta$  [82] [13]. Wird eine Zelle von einem Virus infiziert, so entsteht häufig doppelsträngige Virus RNA (dsRNA). Diese aktiviert eine Vielzahl von Enzymen, darunter auch die dsRNA-abhängige Proteinkinase PKR, welche die Untereinheit der I $\kappa$ B-Kinase aktiviert. I $\kappa$ B phosphoryliert das Inhibitor-molekül I $\kappa$ B des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und macht damit NF- $\kappa$ B für den Eintritt in den Zellkern frei. Hier bindet NF $\kappa$ B an die IFN- $\beta$ -Promotorregion und initiiert die Transkription von IFN- $\beta$ . In Fibroblasten ist IFN- $\beta$  notwendig für die Induktion der IFN- $\alpha$ -Transkription [12]. IFN- $\beta$  induziert die Synthese von IRF-7 (interferon regulated factor), welcher, aktiviert durch die Virusinfektion, zur Transkription der IFN- $\alpha$ -Gene führt. IFN- $\alpha/\beta$  besitzen in ihrem Genom keine Introns. Sie sind 166 Aminosäuren lang und bilden Monomere mit einem Molekulargewicht von 20 kDa. Nachdem sie freigesetzt wurden, binden IFN- $\alpha/\beta$  an zelluläre Rezeptoren, die sich auf den meisten Körperzellen befinden. Dies aktiviert über eine anschließende Signalkaskade mit Jak1, Tyk2 den Transkriptionsfaktorenkomplex ISGF-3 (bestehend aus STAT1, STAT2 und p48) aktiviert. Dessen Bindung an das Promotorelement ISRE führt zur Transkription von Effektorproteinen, die schließlich für die antivirale Schutzreflexfunktion der Interferone verantwortlich sind. Zu den bekanntesten unter den ca. 200 Typ I-IFN induzierten Proteinen gehören PKR, das 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase/RnaseL-System und die Mx-Proteine. Neben immunmodulatorischen Effekten wie der Induktion von MHC-Expression der Klassen I und II (major histocompatibility cell antigens), der Immunglobulinsynthese in B-Zellen und der Hemmung der Zellteilung, üben IFN- $\alpha/\beta$  auch eine direkte nichtzytotoxische antivirale Wirkung auf das Virus aus, wie bei HBV [28] [23] [33].

Zur Klasse der **Typ II - IFN** zählt das IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  wird hauptsächlich von Th1 CD4(+)-Helfer-Zellen, CD8(+)-Zellen und in erheblichem Maße von natürlichen Killerzellen (NKs) synthetisiert. Die Synthese erfolgt sowohl nach Stimulation durch Antigen präsentierende Zellen (APCs), als auch Antigen-unabhängig durch IL-12 und IL-18 [94] [65] [88]. Der IFN- $\gamma$ -Promotor steht unter der Kontrolle von zwei verschiedenen Regulatoren, in deren Aktivierungsweg p38 und die mitogen activated protein kinase (MAP kinase) eine entscheidende Rolle spielen [75]. IFN- $\gamma$  ist im Gegensatz zu IFN- $\alpha/\beta$  nicht Intron-frei und bildet aus zwei glykosylierten Proteinuntereinheiten von je 146 Aminosäurenlängen und einem Molekulargewicht von je 22 kDa ein Homodimer. IFN- $\gamma$  bindet als Dimer an einen membranständigen IFN- $\gamma$ -Rezeptor [81]. Über die anschließende Kaskade mit den Signaltransduktionselementen JAK1 und JAK2 bildet sich aus zwei STAT1 der als GAF bezeichnete Transkriptionsfaktor. Dieses Homodimer bindet an das Promotorelement GAS und initiiert damit im folgenden die Expression von MHC I und MHC II - Protei-

nen, von GTP bindenden Proteinen (GBPs), von Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) und von der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) und weiteren Genprodukten (Abb. 6).

Bislang wurde IFN- $\gamma$  vor allem ein immunmodulatorischer Effekt zugeschrieben, wozu die Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen und die Syntheseinduktion der MHC-Proteine der Klasse II zählen. Zusammen mit TNF- $\alpha$  spielt IFN- $\gamma$  auch eine entscheidende Rolle für die antivirale nichtzytopathische Aktivität der NK-Zellen [26]. Die Kontrolle von Infektionen mit sowohl DNA- als auch RNA-Viren, wie beispielsweise dem Influenzavirus [84] oder dem Coxsackievirus [22] zeigte sich in verschiedenen Studien entscheidend von der Produktion der Cytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  abhängig.

TNF- $\alpha$  hat ein Molekulargewicht von 17 kDa, gehört in die Familie der Tumornekrosefaktoren und wird von Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten produziert. Tumornekrosefaktoren sind sowohl an der Abwehr von viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen beteiligt, als auch bei der Kontrolle von Tumoren. Unabhängig von der cytolytischen Wirkung vermittelt TNF- $\alpha$  zusammen mit IFN- $\gamma$  auch einen noncytolytischen antiviralen Effekt, wie gegenüber HBV [53]. Über die Signaltransduktionskaskade der TNF-Rezeptoren induziert TNF- $\alpha$  eine Vielzahl von Effektorproteinen, wie beispielsweise in der Leber das Enzym iNOS und die Akutphaseproteine.

## Die Effektorproteine der Cytokine

**MxA.** Die Expression von MxA wird durch IFN- $\alpha$  induziert. MxA ist ein cytoplasmatisches 76 kDa schweres Protein mit Sequenzähnlichkeiten zu Dynamin und anderen großen GTPasen. Es besitzt antivirale Aktivität gegenüber einer Vielzahl von RNA-Viren, aus den Familien *Orthomyxoviridae* [67] [18], *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bunyaviridae* und *Togaviridae* [31]. MxA kann *in vivo* als sensibler Marker für endogene IFN- $\alpha$ -Aktivität eingesetzt werden [78]. Bei Patienten mit Hepatitis C wurde im Vergleich zu Patienten mit Hepatitis A eine geringere MxA-Expression festgestellt [38]. Auch die Aktivität

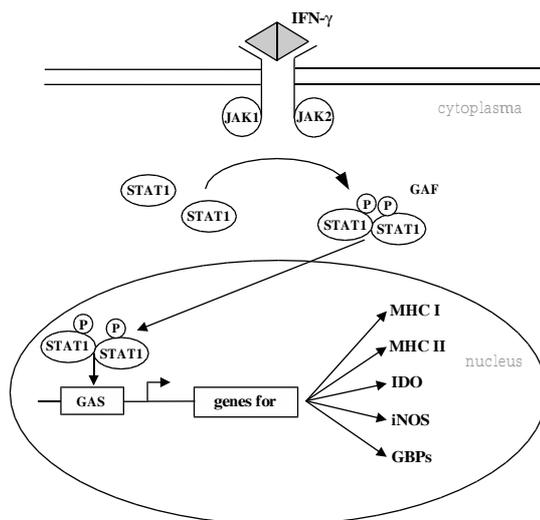


Abb. 6 IFN-g-Signaltransduktionskaskade, nach Goodbourn [13]

von exogen appliziertem IFN- $\alpha$ , wie es bei der Tumorthherapie eingesetzt wird, kann mit MxA-Bestimmungen abgeschätzt werden [37].

**PKR** ist eine Serin/Threoninkinase mit zwei unterschiedlichen Domänen. Die regulatorische Domäne am N-Terminus bindet dsRNA und die katalytische Domäne am C-Terminus besitzt die Kinase-Aktivität. PKR führt nicht nur über die Aktivierung von NF $\kappa$ B (siehe oben) zur Synthese von IFN, sondern ist selbst auch Effektor von IFN- $\alpha$ . Mit der Phosphorylierung von eIF2 (eukaryotic translation initiation factor) verhindert PKR das Recycling des Initiationsfaktors und damit die Translation. Eine weitere Strategie der PKR ist die Induktion von Apoptose [85]. Es gibt Berichte, dass möglicherweise die HCV-Proteine NS5A und E2 die Aktivität der PKR inhibieren und damit eine ausreichend antivirale Immunantwort verhindern [20] [87].

Die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetasen (**OAS**) sind IFN-induzierte Enzyme, die die Reaktion von ATP zu 2'-5'-Oligoadenylaten katalysieren. Die 2'-5'-A-Moleküle binden mit hoher Affinität an die Endoribonuclease L (RNase L). Dadurch aktiviert, katalysiert die RNase L die Spaltung von Einzelstrang-RNA und hemmt die Proteinsynthese. Auch dem OAS-System wird ein proapoptotischer Effekt zugeschrieben.

**iNOS** oder NOS2 ist die induzierbare Form der NO-Synthetasen, die mit der Katalyse von zwei Monooxygenasereaktionen für die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin

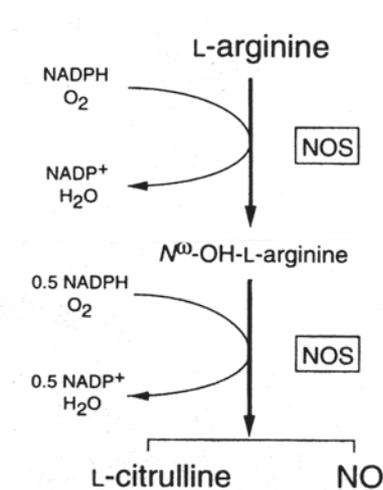


Abb. 7 Reaktion von L-Arginin mit NO-Synthetase MacMicking, J., et. al. [52]

und Stickstoffoxid (NO) verantwortlich ist (Abb. 7).

iNOS ist im Gegensatz zu NOS1 und NOS3 nicht abhängig von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> [5]. Das iNOS-Gen enthält ein IFN-spezifisches „response element“, das mit IRF-1(interferon responsive factor) interagiert und in der Promotorregion befinden sich zwei Bindungsstellen für NF $\kappa$ B [39] [93]. Die Expression von iNOS in Makrophagen und Hepatozyten wird von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und möglicherweise auch direkt von HCV induziert [24]. Es sind 17 Bindungsreaktionen, unter anderem mit Häm, Calmodulin und den Flavinen notwendig, um das 300-kDa schwere

Homodimer aufzubauen, das daraufhin bis zu 5 Tage lang mit Stickstoffmonoxid (NO) eines der kleinsten Moleküle produziert, das von Zellen exportiert wird [51]. Wie NO einen antiviralen Effekt vermittelt ist noch nicht verstanden. Denkbar ist, dass NO mit der Bildung von Nitrosyl-Eisen-Sulfur-Komplexen Enzyme inaktiviert, die für ihre katalytische Aktivität prosthetische Gruppen mit Eisen und Sulfur benötigen [56].

**GBP** gehört zur Gruppe der GTP bindenden Proteine. Es werden zwei Klassen mit Molekulargewichten von 47 kDa und 65 kDa unterschieden. Es handelt sich um GTPasen, die möglicherweise antivirale Aktivität besitzen [1]. Mit der Bindung von sowohl GMP, GDP als auch GTP unterscheiden sich die GBPs von anderen GTPasen wie Ras und  $G_{\alpha}$  [71]. **IDO** ist ein hämhaltiges Enzym und katalysiert die Spaltung des Indolringes der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan. Die Expression von IDO wird neben IFN- $\gamma$  in geringeren Maßen auch durch IFN- $\beta$  induziert. IDO begrenzt die Verfügbarkeit von Tryptophan, wodurch Pathogene wie *Chlamydia trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* und *Toxoplasma gondii* in ihrer Proteinsynthese gehemmt werden [68]. Beschrieben wurde auch eine antivirale Aktivität gegenüber dem *Cytomegalievirus* [4]. IDO wird in IFN- $\gamma$ -behandelten Makrophagen von TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und LPS in seiner Aktivität verstärkt.

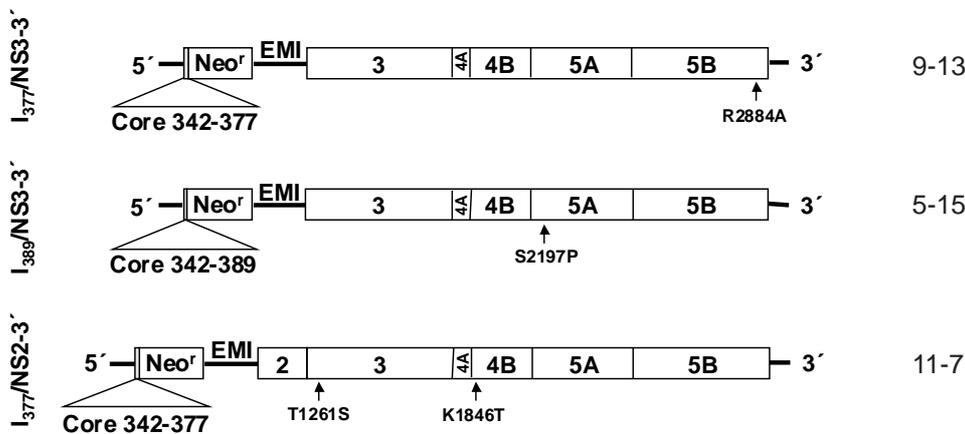
## HCV-Replikonsysteme

Mit der Charakterisierung des HCV-Genoms konnten zwar infektiöse Genome kloniert werden [41], der Effekt von antiviralen Wirkstoffen auf die Virusreplikation konnte jedoch mangels eines geeigneten Zellsystems oder Tiermodells lange Zeit nicht erforscht werden. Mit humanen primären Hepatozyten, in denen eine HCV-Replikation stattfinden konnte, war eine Kultivierung nicht möglich und das einzige Tiermodell war bis vor kurzem [55] der Schimpanse. Mit der Etablierung eines Replikonsystems gelang es Lohmann *et al.* 1999 [48] [70], die HCV-Forschung im Zellkultursystem möglich zu machen. Ausgehend von der HCV-RNA aus Leberparenchym eines mit HCV (genotyp 1b) chronisch Infizierten, wurden mit Hilfe von RT-PCR HCV-Sequenzen amplifiziert und eine Konsensussequenz bestimmt. Aus dieser Konsensussequenz wurden subgenomische und genomische HCV-RNAs konstruiert. Die bicistronischen Replikons besitzen anstelle der Strukturproteine des HCV-Genoms nur einen Teil der Core-Sequenz mit der HCV-IRES (internal ribosomal entry site), das Gen für die Neomycinphosphotransferase und die IRES des *Encephalomyocarditisvirus* (EMCV). Mit Huh-7-Zellen, die mit diesen Replikons transfiziert und mit G418 (Neomycin) selektiert wurden, konnten Zelllinien etabliert werden, die selbstreplizierende HCV-RNAs enthielten. Die Sequenzierung der DNA selektierter Zellklone zeigte eine Reihe von adaptiven Mutationen in den Sequenzen der Nichtstrukturproteine. Weiterführende Studien ergaben, dass diese Mutationen die Replikation der HCV-RNA fördern und damit eine effektivere Selektion ermöglichen. Es wird vermutet, dass die Aminosäureänderungen eine Interaktionsdomäne für virale oder zelleigene Proteinen betreffen, die für die RNA-Replikation entscheidend ist [42]. Um die Effektivität weiterer Selektionen zu steigern, wurden Replikons der nächsten Generationen mit den identifizierten synergistischen Mutationen versehen.

## Unterschiede der Replikons

Die bicistronischen subgenomischen Replikons unterscheiden sich in ihrer Core-Sequenz, im Vorhandensein der Sequenz für das NS2-Proteins und in den adaptiven Mutationen (Abb. 8A). Das bicistronische genomische Replikon besitzt zusätzlich die Sequenzen für die Strukturproteine (Abb. 8B). In einem weiteren subgenomischen, aber monocistronischen Replikon wurde statt der Neomycinresistenz-Sequenz und der EMCV-IRES eine Sequenz der Hygromycinkinase und eine Teilsequenz des Ubiquitins eingesetzt (Abb. 8C) [49]

### A Bicistronic subgenomic HCV replicons



### B Bicistronic genomic HCV replicon (I<sub>389</sub>/Core-3')



### C Monocistronic subgenomic HCV replicon (I<sub>389</sub>/NS3-3'/Hygubi)



Abb. 8 HCV-Replikons

**A. und B.** Die bicistronischen HCV-Replikons  $I_{377}/NS3-3'$ ,  $I_{389}/NS3-3'$  und  $I_{377}/NS2-3'$  (**A**), bestehen aus (I) der nichttranslatierten Region (NTR) vom 5'-Ende des HCV-Genoms, (II) den Nucleotiden 342-377 bzw. 342-389 der Core-Sequenz, (III) der Sequenz der Neomycinphosphotransferase (NeoR), (IV) der IRES des EMCV (EMI), (V) der Sequenz für die HCV-Proteine NS3 bis NS5B (Replikons  $I_{377}/NS3-3'$  und  $I_{389}/NS3-3'$ ), der Sequenz für die HCV-Proteine NS2 bis NS5B (Replikon  $I_{377}/NS2-3'$ ) oder der Sequenz für die HCV-Proteine Core bis NS5B (Replikon  $I_{389}/Core-3'$ ; **B**) und schliesslich (VI) der NTR vom 3'-Ende des HCV-Genoms.

**C.** Das monocistronische HCV-Replikon  $I_{389}/NS3-3'/Hygubi$  (**C**) besteht aus (I) der NTR vom 5'-Ende des HCV-Genoms, (II) den Nucleotiden 342-389 der Core-Sequenz, (III) der Sequenz der Hygromycinkinase (HygR), (IV) der Sequenz für Ubiquitin (Ubi), (V) der Sequenz für die HCV-Proteine NS3 bis NS5B und schliesslich (VI) der NTR vom 3'-Ende des HCV-Genoms.

## Material

### Zellen

Name	Beschreibung	Referenz
HuH-7 H3TA 6	humane Hepatomzellen humane Hepatomzellen Hep 3B, transfiziert mit tet-Transaktivator	Nakabayashi H et al (1982) [63] ATCC-HB 8064, Moradpour, un- published.
Sk-Hep1	humane Adenocarcinomzellen, Leber	Fogh J et al. (1977) [16] [15]
HepT1	humane Hepatoblastomazellen	Pietsch T et al. (1996) [69]
Vero	Nierenzellen/Fibroblasten aus Grünen Meerkatzen	
UTHCNS3-2	U-2 OS human osteosarcoma-derived founder cell line UTA-6, cotransfected with pUHDHCV(H) and pBabepuro	Moradpour et al.(1998) [61]
293T	transformierte humane embryonale Nieren- zelllinie	ATCC-Nr. CRL-1573.1

### Primärantikörper

Bezeichnung Spezifität	Beschreibung	Verdünnung	Firma
11H / NS5A	monoklonaler Maus- Antikörper (IgG)	IF: 1:10 WB: 1:100	Geschenk von J. A. Hellings, Organon Teknika, Boxtel, Nieder- lande
1B6.14.2 / NS3	monoklonaler Maus- Antikörper (IgG)	WB: 1:250	Wölk B. et al. (2000) [92]
5B-3B1.5.3 / NS5B	monoklonaler Maus- Antikörper (IgG)	WB: 1:500	Moradpour et al., unpublished
166 / MxA	polyklonaler Kaninchen- Antikörper (IgG) gegen re- kombinantes histidin- tagged MxA	IF: 1:200 WB: 1:1000	Staehele P and Haller O. (1985)[83]
anti-GBP	polyklonales Maus-Serum	IF: 1:300 WB: 1:1000	Geschenk von M. Schwemmler, Inst. für Medizin. Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg
B-10 / PKR	monoklonaler Maus- Antikörper (IgG)	WB: 1:200	Santa Cruz Biotechnology
C7-50 / Core	monoklonaler Maus- Antikörper (IgG)	IF: 1:100 WB: 1:100	Moradpour et al. (1996) [60]
AC-40 / Aktin	monoklonaler Maus- Antikörper (IgG)	WB: 1:500	Boehringer Mannheim Biochemica
anti-huIFN- $\beta$	polyclonaler Kaninchen- Antikörper		PBL Biomedical Laboratories
anti-huIFN- $\alpha$	polyclonaler Kaninchen- Antikörper		PBL Biomedical Laboratories

## Sekundärantikörper

#1021 Cy 3	aus Ziege anti-Maus	IF: 1:75	Dianova, Hamburg
#1015 Alexa 488	aus Ziege anti-Kaninchen	IF: 1:75	Dianova, Hamburg
#1016 Cy 2	aus Ziege anti-Kaninchen	IF: 1:75	Dianova, Hamburg
anti-mouse IgG	aus Ziege anti-Maus, an alkalische Phosphatase gekoppelt	WB: 1:2000	Promega
anti-rabbit IgG	aus Ziege anti-Kaninchen, an alkalische Phosphatase gekoppelt	WB: 1:1000	Promega

## Cytokine

IFN- $\gamma$	a. ZH Code 85, Geschenk von C. Weissmann und Mike Fontulakis, b. Bioferon, Laupheim, Geschenk von Prof. Peters, c. Human Interferon- $\gamma$ , Roche, Mannheim, Cat.No. 1040592 und 1050494 IFN- $\alpha$ Interferon- $\alpha$ B/D, Geschenk von Ciba Geigy Ltd., Basel, Schweiz		
TNF- $\alpha$	Tumornecrosisfactor- $\alpha$ , Sigma (Prod No. T6674)		

## Plasmide

pNF $\kappa$ B-Luc	Cis-Reporter Backbone (5674 bp) mit enhancer element pNF $\kappa$ B-Luc	Stratagene
pRL-SV 40	Renilla-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven SV-40-Promotors Amp <sup>®</sup>	Promega

## Reagenzien

DAC-30	Eurogentec
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Cat.No. 1910
peqGOLD TriFast	peqLab Biotechnologie, Best-Nr. 302020

## Chemikalien

Sulfanilamid (p-Aminobenzenesulfonamide)	Sigma
N-(1-Naphtyl)ethylenediamine	Sigma
NaNO <sub>2</sub>	Merck, Geschenk vom Max-Planck-Institut Freiburg
DETA NONOate (C <sub>4</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> )	Alexis

## Behandlung von Materialien

Wo nötig wurde mit sterilen Materialien und Medien gearbeitet. Geräte, die thermische Belastung gut überstehen, wurden mit trockener Heißluft bei 180°C 1,5 h lang sterilisiert. Lösungen wurden bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert oder sterilfiltriert.

## Methoden

### Zellkultur

#### Behandlung der Zellen

Alle Zellen wurden in Kulturmedium bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C in Zellkulturflaschen gehalten. Zweimal pro Woche wurde der konfluente Zellrasen in Abhängigkeit der Zelldichte im Verhältnis 1:3 bis 1:10 gesplittet. Hierfür wurden die Zellen mit „Phosphate buffered Saline“ (PBS) ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> zweimal gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und verdünnt in neue Flaschen ausgesät.

Dem Kulturmedium wurden je nach Zelllinie unterschiedliche Antibiotika zugesetzt:

HuH-7-Zellen mit bicistronischen HCV-Replikons:

1000 mg/ml G418 (Geneticin™, Life Technologies, Karlsruhe)

HuH-7-Zellen mit monocistronischen HCV-Replikons:

25 ng/ml Hygromycin B (Sigma Steinheim)

#### Kulturmedium:

Verwendet wurde 1xDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, high glucose), das folgendermaßen angesetzt wurde:

100 ml DMEM 10x konzentriertes Medium ohne Glutamin, Natriumpyruvat und Natriumbicarbonat mit 4,5 g/L D-Glucose von Biochrom KG

37 ml 10 % NaHCO<sub>3</sub>

10 ml Natriumpyruvat (100 mM)

835 ml H<sub>2</sub>O

450 ml 1xDMEM wurden zugesetzt:

45 ml Fötale Kälberserum (FCS) von Biochrom KG

5 ml Glutamin (262,8 mg/5 ml)

2 ml Penicillin (10000 E/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)

#### Cytokinbehandlung

Zellen wurden gelöst, in Medium aufgenommen und auf 24-well-Platten ausgesät, über Nacht kultiviert und anschließend für 72 h mit neuem Kulturmedium, dem das jeweilige Cytokin zugegeben wurde, inkubiert.

## **Mykoplasmentests**

*Prinzip: Gefärbt mit Bisbenzimidin, läßt sich DNA unter UV-Licht sichtbar machen. Sowohl die zelleigene DNA im Zellkern als auch mögliche Mykoplasmen-DNA wird mit Bisbenzimidin angefärbt.*

Um sicherzustellen, dass die Zellen frei von Kontamination durch Mykoplasmen sind, wurde in regelmäßigen Abständen (ca. alle 8 Wochen) ein Test auf Mykoplasmen durchgeführt:

Zellen wurden auf 7 cm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen ausgesät, und über Nacht kultiviert. Nach 12h wurde der zu ca. 60% dichte Zellrasen 2x mit PBS gewaschen und pro Schale mit 1ml Bisbenzimidin (1:1000 in Methanol) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit aqua bidest gewaschen, zwei Tropfen Elvanol auf den Zellrasen gegeben und ein Deckgläschen darübergelegt. Im Mikroskop wurden die Zellen bei UV-Licht auf Mykoplasmen-DNA beurteilt.

## **Einfrieren von Zellen**

Um Zellen für längere Zeit in flüssigem Stickstoff zu lagern, wurden der konfluente Zellrasen in Kulturmedium aufgenommen und bei 800 U/min und 4°C 6 min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Einfriertubes aliquotiert. Um die Zellen möglichst schonend abzukühlen, erfolgte das Einfrieren schrittweise: zunächst kurz auf Eis, dann für 24 h bei -80°C in einem isolierten Behälter und schließlich im flüssigen Stickstoff.

### Einfriermedium

- 60 % MEM-EARLE ( Biochrom KG, Berlin)
- 30 % FKS
- 10 % Dimethylsulfoxid

## **Immunfluoreszenz-Analyse**

*Prinzip: Antigene werden mit spezifischen Primärantikörpern markiert, die wiederum von speziespezifischen (entsprechend der Primärantikörperquelle) Sekundärantikörpern erkannt werden. Diese Sekundärantikörper sind kovalent an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden, der eine indirekte Detektion der gesuchten Proteine ermöglicht.*

Die zu untersuchenden Zellen wurden einmal mit PBS (mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen, 10 bis 15 min lang mit einer 3%igen Paraformaldehydlösung fixiert und dreimal mit PBS

gewaschen. Die fixierten Zellen konnten mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden. Die Markierung mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte folgendermaßen: Die Zellen wurden mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Waschlösung wurde abgesaugt und das mit Zellen bedeckte Deckgläschen mit einer sterilen Kanüle in die Mitte des Wells geschoben. Jedes Deckgläschen wurde mit 40 µl einer mit PBS und 5% Ziegennormalserum verdünnten Erstantikörperlösung bedeckt und bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. Nach dreimaligem PBS-Waschen im 10 min-Takt erfolgte die Inkubation mit der Zweitantikörperlösung in gleicher Weise, allerdings für 30 min und lichtgeschützt. Wiederum wurden die nichtgebundenen Antikörper mit PBS im 10 min-Takt abgewaschen und anschließend die Deckgläschen wie folgt auf einen Objektträger aufgebracht: Die Waschlösung wurde abgesaugt und 1 ml aqua bidest auf die Wells gegeben. Mit einer Kanüle und einer Pinzette wurden die Deckgläschen aus dem Well herausgenommen und mit der mit Zellen bedeckten Seite nach unten in einem Tropfen Elvanol auf einem Objektträger eingebettet. An einem Reichert Polyvar 2-Fluoreszenzmikroskop wurden die gefärbten Objekte begutachtet und mit einer Kamera repräsentative Bildausschnitte fotografiert.

#### Vorbehandlung der Deckgläschen

Die Deckgläschen mit einer Dicke von 12 mm wurden vor ihrer Verwendung in aqua bidest zweimal aufgekocht, mit Ethanol gewaschen und anschließend sterilisiert.

#### Einbettmedium Elvanol

0,5 Tris pH 8,2 mit

0,055 g/ml DTT (1,4-Dithiothreit)

0,03 g/ml Elvanol (Polyvinylalkohol 25140 SERVA)

0,28 % Glycerin

## Western-Blot-Analyse

### Proteingewinnung

Zellen wurden auf Zellkulturschalen ausgesät, mit Cytokinen behandelt und nach 72 h langer Inkubation mit PBS gewaschen und bei -80°C eingefroren. Auf Eis wurden die Zellen mit Lysepuffer lysiert und nicht lösliche Bestandteile abzentrifugiert. Die gelösten Proteine im Überstand wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

### Lysepuffer

aus RIPA-Puffer:

50 mM Tris / HCl pH 8

150 mM NaCl

1 % NP-40

0,25 % Na<sup>+</sup>-Desoxychelate

0,1 % SDS

aqua bidest.

mit folgenden Zusätzen:

1 mM DTT (1,4-Dithiothreitol)

1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl  
fluorid)

1 mM Benzonuclease (Benzonase®,  
Merck, Darmstadt)

### Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt wurde mit der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt:

Zunächst wurde mit 0-10 mg Rinderserumalbumin (BSA) eine Eichkurve erstellt. Das BSA wurde mit Lysepuffer auf ein Volumen von 10 ml gebracht. Sowohl die Eichkurvenproben als auch die Proteinproben wurden zu jeweils 10 ml mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt und nach 10 min wurde bei 595 nm die Absorption gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Eichkurve bestimmt.

### Bradfordreagenz

90 mg/L Coomassie Brilliant Blue G 250

4 % Ethanol

7,7 % ortho-Phosphorsäure

aqua bidest, Lagerung lichtgeschützt

### Gelelektrophorese von Proteinen

*Prinzip: Die 1970 von Laemmli modifizierte SDS-Elektrophorese (Laemmli UK (1970) [43] trennt Proteine nach unterschiedlichen Molekülgrößen auf, wobei mit Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) eine konstante Nettoladung pro Masseneinheit erreicht wird.*

### Gießen der Gele

Zwischen zwei Glasplatten einer Gelapparatur wurde zunächst das Trenngel gegossen, wobei mit Isopropanol ein glatter horizontaler Trennrand erzeugt wurde. Nach einer 25 minütigen Polymerisationszeit wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, in das zur Bildung von Taschen noch vor der Polymerisation ein Gelkamm eingesetzt wurde.

#### Trenngel 10%:

25 % 4x Trenngelpuffer	4x Trenngelpuffer:
30 % Acrylamid	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
0,5 % 10% Ammoniumpersulfat (APS)	0,4 % (w/v) SDS
0,05 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)	in aqua dest
in aqua dest	

#### Sammelgel 5%:

25 % 4x Sammelgelpuffer	4x Sammelgelpuffer:
30 % Acrylamid	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
0,5 % 10% APS	0,4 % (w/v) SDS
0,1 % TEMED	in aqua dest
in aqua dest	

### Probenauftragung

Die polymerisierten Gele wurden in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und mit Proteingemisch beladen. Die eingefrorenen Proteinproben wurden aufgetaut, mit RIPA-Puffer auf ein Volumen mit 20 µg Protein verdünnt, mit Laemmlipuffer gemischt, bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend mit einer Hamiltonpipette in die Taschen des Gels aufgetragen.

#### Laufpuffer

250 mM Tris-HCl (pH 8,3)
2,5 M Glycin
1% (w/v) SDS
in aqua dest

#### Laemmlipuffer

0,06 M Tris-HCl (pH 6,8)
15 % Glycerin
2 % (w/v) SDS
2 % (w/v) Bromphenolblau
10 % β-Mercaptoethanol
in aqua dest

## **Westernblot-Verfahren**

*Prinzip: Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden durch elektrophoretischen Transfer vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Immobilon™-P von Millipore, Eschborn) übertragen, um sie frei zugänglich für Antikörper zu machen.*

Der Westernblot wurde durchgeführt mit der Nassblotkammer von BIORAD.

### Transferpuffer

25 mM Tris

186 mM Glycin

20 % Methanol

Die Membran mit den transferierten Proteinen wurde in PBS mit 5 % Magermilchpulver und 0,1 % Tween20 inkubiert, um eine unspezifische Bindung von Immunglobulinen an die Membran zu verhindern. Eine Lagerung bei 4 °C war für zwei Tage möglich.

## **Analyse der Proteine mit spezifischen Antikörpern**

Die Membran wurde für 2 h mit der Primärantikörpermischung aus entsprechendem Primärantikörper und 0,1% Tween-PBS mit 5% Magermilchpulver inkubiert.

Anschließend wurde mit 0,1% Tween-PBS 3x im 10 min-Takt gewaschen. Die Primärantikörper wurden mit einem speziesspezifischen und an das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Ihre Inkubation erfolgte in einer Verdünnung mit 0,1% Tween-PBS für 1 h mit einem anschließenden Waschvorgang im 10 min-Takt.

Die Phosphatase-Aktivität wurde mit Hilfe von 5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat (BCIP) als Substrat und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) als Farbverstärker nachgewiesen. Die dadurch entstehenden Banden aus den unlöslichen Reaktionsprodukten Indigo und Diformazan (zusammen violett) markierten die gesuchten Immunkomplexe und damit die gesuchten Proteine auf der Membran. Die Farbreaktion wurde mit 20 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure-Natriumsalz) abgestoppt. Die gefärbte Membran wurde getrocknet und fotografiert.

## Northern-Blot-Analyse

*Prinzip: RNA wird in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Mit UV-Licht wird die RNA kovalent an die Membran gebunden und damit zugänglich gemacht für radioaktiv markierte RNA-Sonden.*

### RNA-Isolierung mit PeqGOLD TriFast reagent (peqLab)

Die behandelten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml Trizol (Phenol und Guanidinisothiocyanat) pro 6-well für 5 min lysiert. Die lysierte Zellsuspension wurde in ein Eppendorfhütchen überführt und 300 µl Chloroform hinzugegeben, für 15 Sekunden kräftig durchmischt und anschließend für die Phasentrennung 4 min lang zentrifugiert. Für die RNA-Präzipitation wurde die im Überstand befindliche RNA-Lösung abgenommen, in ein Eppendorfhütchen transferiert und mit 500 µl Isopropanol gemischt und für mindestens 24 h bei -20°C aufbewahrt.

Nach weiterer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das RNA-Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen und in 50 µl aqua bidest resuspendiert. Die RNA-Lösung konnte bei -80°C aufbewahrt werden.

Zur RNA-Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl der RNA-Lösung zu 495 µl aqua bidest gegeben und das RNA-Gemisch photometrisch auf die RNA-Konzentration analysiert.

### Gelelektrophorese von RNA

Auf ein denaturierendes Agarose-Gel wurde pro Tasche 10 µg RNA aufgetragen. Zuvor wurde die RNA im Speedvac unter Vakuum getrocknet, mit 15 µl Ladepuffer versetzt und bei 65°C ca. 5 min denaturiert.

Der Lauf erfolgte in 1x Laufpuffer mit gleichen Mengen an MOPS und Formaldehyd bei 180 Volt bis zum Auslaufen der Bromphenolblau-Bande.

### Northern-Blot-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im Formaldehydgel wird die mit Ethidiumbromid gefärbte RNA mittels Kapillarblottechnik auf eine Nylonmembran transferiert (Nytran NY 13N, Schleicher & Schuell), wobei 10x SSC als Blot-Puffer diente. Der genaue Aufbau eines Northernblots ist beschrieben bei Ausubel et al. (1997) [2].

Ladepuffer:

40 % Formamide  
 8 % Formaldehyd  
 8 % MOPS (10x)  
 4 % SampleBuffer  
 0,4 % Ethidiumbromid

Formaldehyd-Gel:

1,2 % Agarose  
 1x MOPS-Puffer  
 3,7 % Formaldehyd

## SampleBuffer:

0,8 % Bromphenolblau  
 0,8 % Xylencyanol  
 50 % Glyzerin

Die Membran wurde 1 cm unterhalb der 28S rRNA-Bande geschnitten und anschließend mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten RNA-Sonde hybridisiert. Die sondenspezifischen Signale wurden unter Verwendung eines BAS 1000 (Fuji) mit einem Phosphoimager quantifiziert.

**Dual-Luciferase-Reporter-Assay**

Prinzip: Luciferase ist ein Enzym von Leuchtkäfern (*Pyrophorus plagiophtalamus*) und Glühwürmchen (*Photinus pyralis*), das bei der Katalyse einer Oxidationsreaktion Licht emittiert. Wird ein Luciferase-Plasmid, das mit einem bestimmten Promotorelement fusioniert wurde transfiziert, so kann die Promotor-Aktivität mittels der gleichzeitig freigesetzten Luciferase-Lumineszenz gemessen werden.

Im in dieser Arbeit verwendeten Dual-Reporter-Assay wurde der *cis*-Reporter Backbone mit dem Promotor für NFκB eingesetzt (Abb.9). Bei der Luciferase handelt es sich um das *firefly*-Luciferase-System (Adenin-Nucleotid-System). Als Kontrolle wurde das Plasmid pRL-SV 40 kotransfiziert. Dieses Kontrollplasmid enthält das Gen für die *Renilla*-Luciferase, das aus der biolumineszierenden Koralle *Renilla reniformis* isoliert wurde, die an der Küste Nordamerikas beheimatet ist.

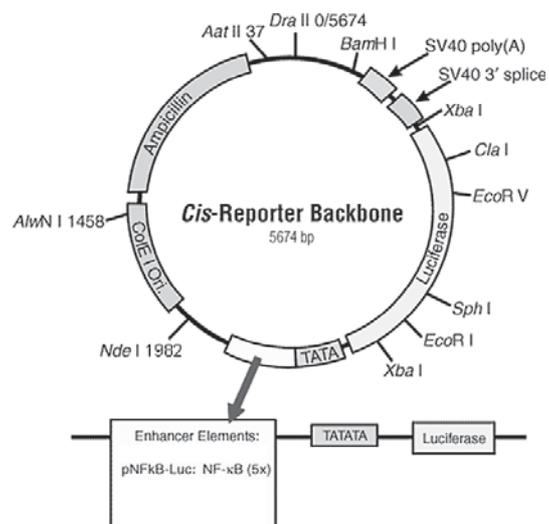
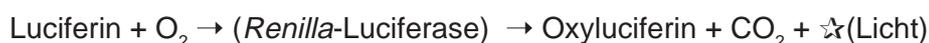


Abb. 9 *cis*-Reporter Backbone mit dem Promotor für NFκB [Stratagene]

Die mit den Luciferase-Konstrukten transfizierten (DAC-30) Zellen wurden nach 16 h mit Cytokinen stimuliert und 8 h später gemäß dem Promega-Protokoll lysiert. Die Zelllysate wurden mit Hilfe der zugehörigen Reagenzien im Lumineszenzapparat auf die Luciferase-Aktivität analysiert: In einem ersten Messschritt wurde die Aktivität der *firefly*-Luciferase und damit die NFκB-Promotor-Aktivität bestimmt. Gleich darauf wurde die *firefly*-Reaktion auf weniger als 0,00001 % der Lichtemission gedrückt und die *Renilla*-Luciferase aktiviert. Das Verhältnis von *firefly*-Aktivität zur *Renilla*-Aktivität war damit direkt proportional zur Aktivität des NFκB-Promotors [52] [50].



### Transfektion mit DAC-30

Bei DAC-30 handelt es sich um die positiv geladenen Liposomen DC-Chol (3β(N-(N',N')-Dimethylaminoethan)-carbamoyl)-cholesterol), welche die negativ geladene DNA komplexieren. Diese stabilen Komplexe können in Zellen transfiziert werden. Die in 6-well ausgesäten Zellen wurden 5 h vor Transfektion mit 2 ml neuem Medium bedeckt.

Lösung A: 100 µl Optimem pro well + 0,3 µg pNFκB-Luc-DNA + 0,1 µg pRL-CMV

Lösung B: 100 µl Optimem pro well + 5 µl DAC-30

Lösung B wurde zu Lösung A gegeben, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden pro well 200 µl Gemisch auf die Zellen getropft und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### Messung im Lumineszenz-Meßgerät

Zu 100 µl Luciferase-Assay-Reagent im Styrolröhrchen wurden 10 µl Lyse-Probe gegeben und gemessen (*firefly*-Aktivität), gleich darauf wurden 100 µl Stop&Glo-Reagent hinzugegeben und ein zweites Mal gemessen (*Renilla*-Aktivität).

## Griess-Analyse

Prinzip: Das Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert die Oxidationsreaktion von L-Arginin in L-Citrullin. Das dabei ebenfalls entstehende NO reagiert sofort weiter zu Nitrit und Nitrat. Die Akkumulation der  $\text{NO}_2^-$ -Ionen im Medium werden im Griess-Assay mit Hilfe einer chemischen Reaktion zu Azofarbstoffen gemessen. Nitrit reagiert dabei mit Sulfanilamide (SULF) und N-(1-naphthyl)-ethylenediamine (NEDD) zu einem Diazonium-Produkt, welches photometrisch nachgewiesen wird (Griess, 1879) [25].

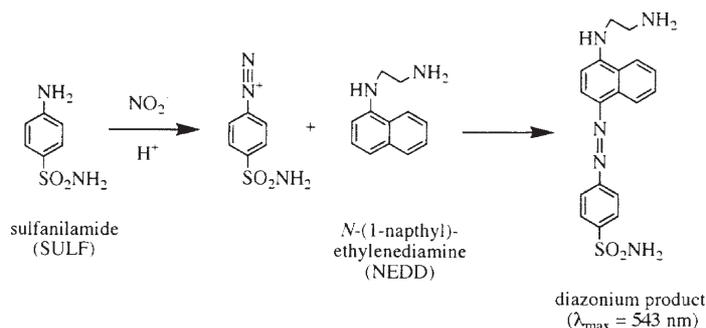


Abb. 10 Azofarbstoffreaktion, Miranda et. al. [57]

Zellen wurden auf 96-well-Platten ausgesät und nach 16 h mit verschiedenen Konzentrationen  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$  für 3 bis 72 h inkubiert. Nach den Inkubationszeiten wurden 100  $\mu\text{l}$  Zellüberstand abgenommen und auf eine neue 96-well-Platte transfe-

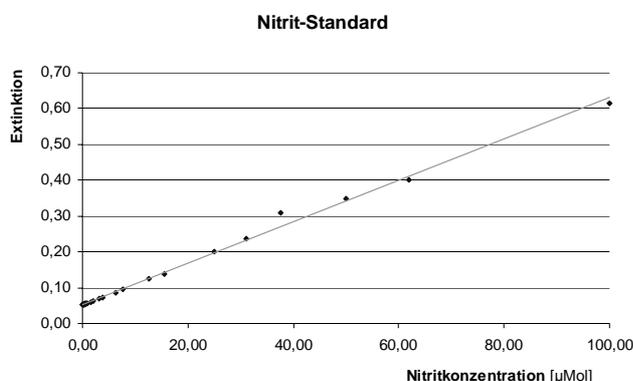
riert. Zu jeden 100  $\mu\text{l}$  Überstand wurden 100  $\mu\text{l}$  der Lösung C hinzugegeben. Die well-Platte wurde nach 15 min unter Lichtschutz zum ELISA-Reader (Labsystems Multiskan Multisoft MCC/340) transportiert und die Extinktion bei 540 nm gemessen.

Lösung C: Lösg A + Lösg B

Lösung A: 1 g/100 ml Sulfanilamide in 2,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$

Lösung B: 0,3 g/100 ml Naphthylethylenediamine in 2,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$

Zur Kontrolle wurde in einem Parallelexperiment der NO-Donator DETA NONOate ( $\text{C}_4\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2 = \text{NOC-18}$ , DETA/NO, (z)-1-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonio-ethyl)-amino)-diazen-1-ium-1,2-diolate) von der Firma Alexis (ProdNr 430-014-M025) zugegeben und ebenfalls die  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration nach 3 bis 72 h gemessen. Als Nitrit-Standard diente eine 100  $\mu\text{Mol}$  Lösung aus  $\text{NaNO}_2$ . Die Standardkurve wurde aus der Griess-Messung einer Verdünnungsreihe des Standards mit Medium erstellt. Hierbei entsprachen 50  $\mu\text{Mol}$   $\text{NO}_2^-$  einer Extinktion bei 540 nm von 0,35.



## Ergebnisse

### Effekt von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ auf die Replikation von HCV

#### IFN- $\gamma$ hemmt die Expression von HCV-Proteinen

Mit der Etablierung von HCV-Replikon-haltigen Zellkulturen [48] wurde es möglich, den Effekt von Cytokinen auf die HCV-Expression und Replikation zu untersuchen.

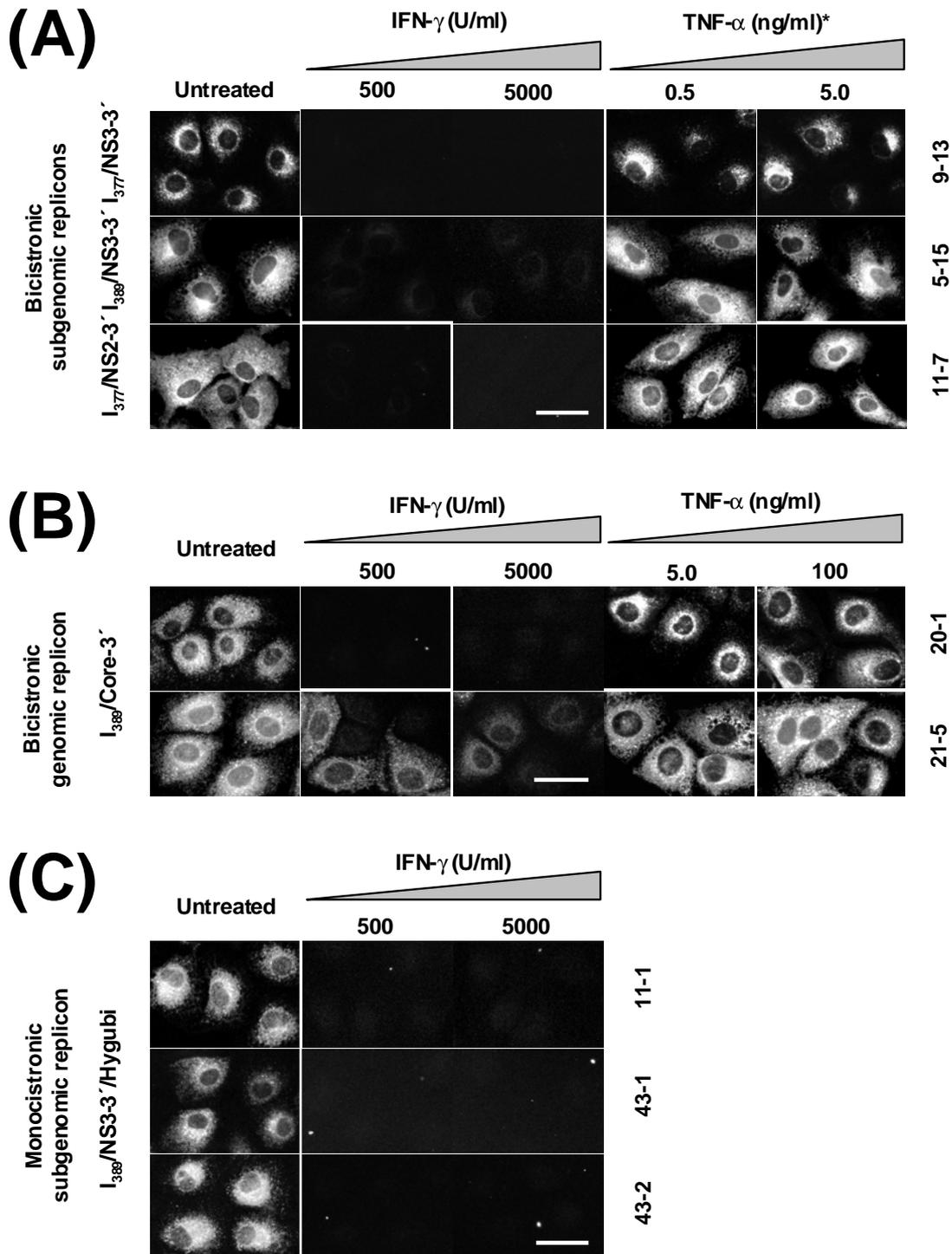
Um die Wirkung von IFN- $\gamma$  auf die Expression von HCV-Proteinen zu testen, wurden HuH-7-Zellen mit bicistronischen HCV-Replikons, sowohl subgenomischen (Klone 9-13, 15-5 und 11-7) als auch genomischen (Klon 20-1 und 21-5), mit IFN- $\gamma$  in unterschiedlichen Konzentrationen (500 U/ml und 5000 U/ml) inkubiert. In der Immunfluoreszenzanalyse wurde das HCV-Protein NS5A mit Antikörpern markiert. Die Figuren **1A** und **1B** zeigen die hohe zytoplasmatische Expression von NS5A in den unbehandelten Kontrollzellen, während hingegen in den mit IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen die NS5A-Expression fast vollständig aufgehoben ist. Die in Fig. 1B bei Klon 21-5 verbleibende Expression von NS5A, auch nach IFN- $\gamma$ -Behandlung, ist vermutlich Folge der klon-spezifischen extrem hohen Expression des Proteins.

Um auszuschließen, dass dieser hemmende Effekt durch die artifiziell eingeführte EMCV-IRES verursacht ist, wurden die gleichen Experimente mit HuH-7 mit monocistronischen Replikonsystemen durchgeführt, die diese zusätzliche IRES nicht besitzen. Figur **1C** zeigt, dass IFN- $\gamma$  auch in Zellen mit dem monocistronischen Konstrukt einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von NS5A ausübt.

Die Wirkung von IFN- $\gamma$  auf weitere HCV-Proteine wurde in Westernblotanalysen untersucht (**Fig. 2**). Zellysate von den Klonen 9-13, 43-1 und 21-5, die entweder mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  oder 5000 U/ml IFN- $\gamma$  behandelt wurden oder unstimuliert blieben, wurden nach der Auftrennung durch Proteingelelektrophorese mit Antikörpern gegen die HCV-Proteine NS5A, NS5B und NS3 und das C-Protein markiert.

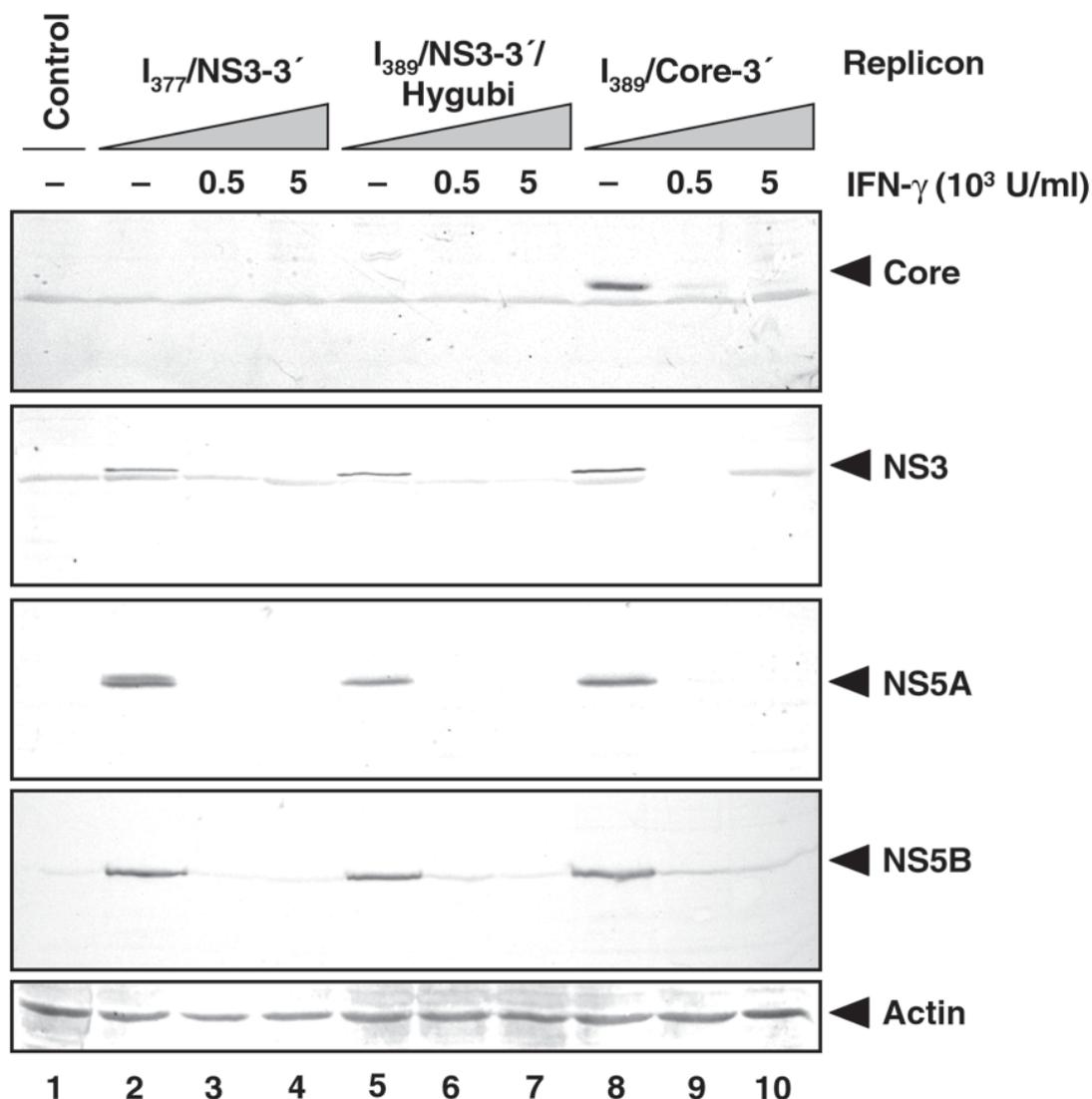
Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression aller getesteten HCV-Proteine durch IFN- $\gamma$  gehemmt wird.

Um eine produktspezifische Wirkung ausschließen zu können, wurden die gleichen Experimente auch mit IFN- $\gamma$  anderer Hersteller durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten produktunabhängig einen hemmenden Effekt durch IFN- $\gamma$  (Immunfluoreszenzanalyse hier nicht dargestellt).



**Fig. 1: IFN- $\gamma$ , jedoch nicht TNF- $\alpha$  hemmt die Synthese von NS5A.**

Immunfluoreszenzanalyse der Expression von NS5A nach der Behandlung mit 500 U/ml bzw. 5000 U/ml IFN- $\gamma$  oder 0,5 bzw. 5 bzw. 100 ng/ml TNF- $\alpha$ . Zellen mit (A.) den bicistronischen subgenomischen HCV-Replikons  $I_{377}/NS3-3'$ ,  $I_{389}/NS3-3'$  und  $I_{377}/NS2-3'$ , mit (B.) den bicistronischen genomischen HCV-Replikons  $I_{389}/Core-3'$  und (C.) den monocistronischen HCV-Replikons  $I_{389}/NS3-3'/Hygubi$  wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 16 h kultiviert und dann 72 h lang mit IFN- $\gamma$  bzw. TNF- $\alpha$  inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit dem NS5A-spezifischen monoklonalen Antikörper 11H markiert.



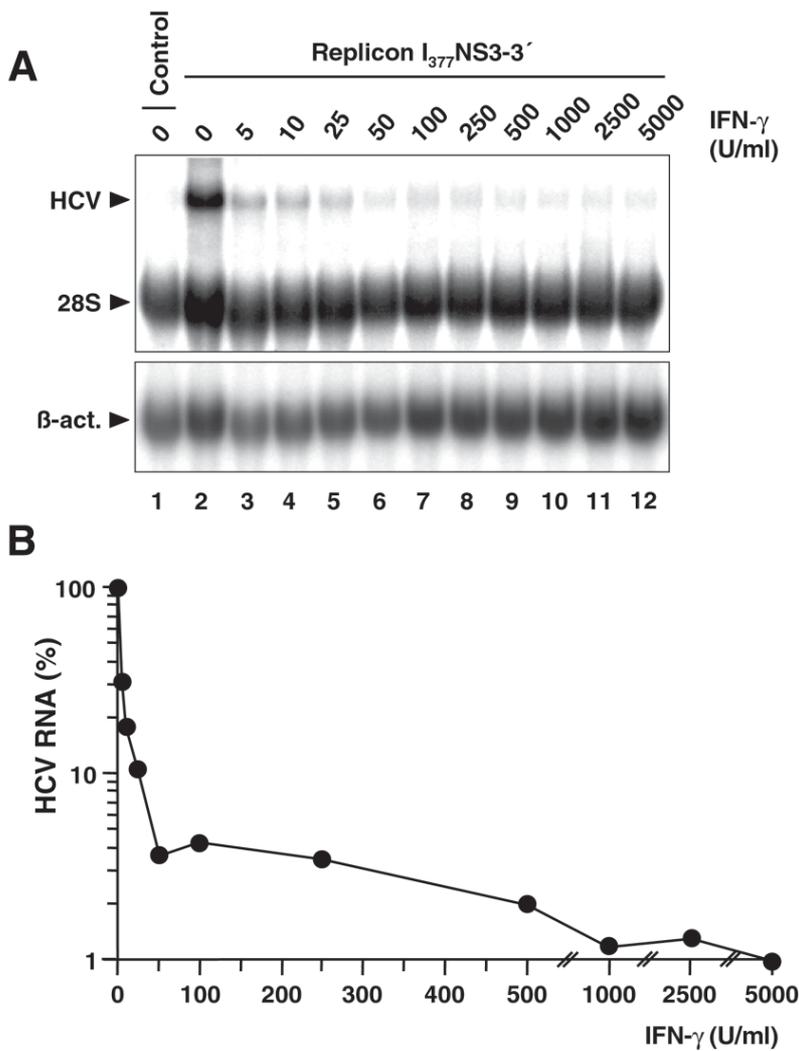
**Fig. 2: IFN- $\gamma$  hemmt die Synthese von HCV-Proteinen**

Westernblotanalyse der Expression von Core, NS3, NS5A und NS5B. Zellen mit den verschiedenen HCV-Replikons wurden auf Zellkulturschalen ausgesät und 16 h später mit 500 U/ml bzw. 5000 U/ml IFN- $\gamma$  72 h lang inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und Zellextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 20  $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Blots wurden mit den monoklonalen Antikörpern C7-50 (Core), 1B6 (NS3), 11H (NS5A), 5B-3B1 (NS5B) und AC-40 (Aktin) gefärbt.

### Die Hemmung der HCV-Replikation durch IFN- $\gamma$ ist dosisabhängig

In der Immunfluoreszenzanalyse hatte sich gezeigt, dass schon eine Konzentration von 10 U/ml IFN- $\gamma$  eine weitreichende Hemmung der HCV-Expression in HuH-7 mit Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3' zur Folge hatte. Für die Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung von IFN- $\gamma$ , wurde eine Northernblot-Analyse mit Konzentrationen von 5 bis 5000 U/ml durchgeführt. Die Detektion mit einer zu den Nucleotiden 8376 - 9440 der HCV-Sequenz kom-

plementären Ribonucleotidprobe zeigte in **Fig. 3A** eine Abnahme der HCV-RNA mit zunehmender IFN- $\gamma$ -Konzentration. Die Dosis-Wirkungskurve in **Fig. 3B** ergab bei 25 U/ml IFN- $\gamma$  eine um 90 % reduzierte RNA-Menge. Die IFN-Konzentration, bei der nur noch 50 % der HCV-RNA vorhanden war (EC50) betrug weniger als 5 U/ml IFN- $\gamma$ , womit die dosis abhängige Wirkung für IFN- $\gamma$  vergleichbar ist mit der Wirkung von IFN- $\alpha$ . [19]



**Fig. 3** Der hemmende Effekt von IFN- $\gamma$  ist dosisabhängig.

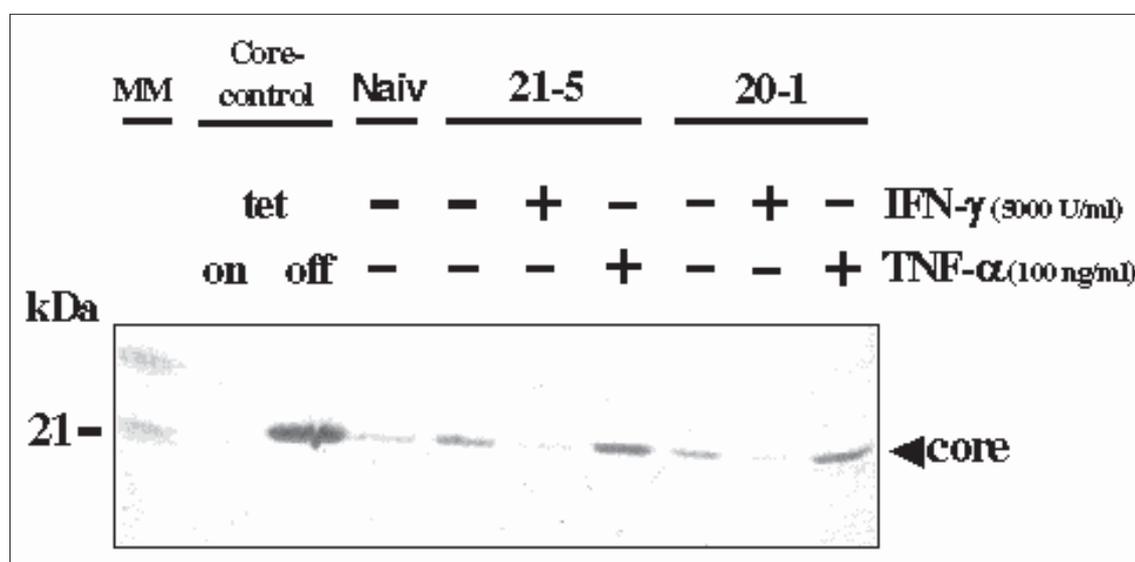
Northernblotanalyse von HCV-RNA positiver Polarität.

Zellen mit dem HCV-Replikon I<sub>377</sub> NS3-3' (9-13) wurden ausgesät, nach 72 h mit IFN- $\gamma$  in verschiedenen Konzentrationen (von 5 bis 5000 U/ml) stimuliert und nach 48 h die RNA isoliert. Pro Spur wurden 10  $\mu$ g RNA aufgetragen und nach Auftrennung im Gel auf eine Nylonmembran geblottet. Die RNA-Mengen auf dem Blot wurden mit einer <sup>32</sup>P-markierten negativ orientierten Ribonucleinsonde analysiert, die zu den Nucleotiden der HCV-Sequenz: 8376 - 9440 (obere Bande) bzw zu  $\beta$ -Aktin (untere Bande) komplementär war. In der Dosis-Wirkungskurve wurde die RNA-Menge gemäß dem  $\beta$ -Aktin-Signal korrigiert. Die HCV-RNA-Menge, die nach der IFN- $\gamma$ -Behandlung noch detektierbar war wurde verglichen mit der HCV-RNA-Menge bei unstimulierten Zellen und die Reduktionsrate gegenüber der IFN- $\gamma$ -Konzentration aufgetragen.

### TNF- $\alpha$ hemmt die HCV-Proteinsynthese nicht

Die IFN- $\gamma$  produzierenden NK-Zellen sezernieren neben IFN- $\gamma$  auch TNF- $\alpha$ . Auf die Replikation von *Hepatitis-B-Virus* zeigen beide Cytokine einen antiviralen Effekt [27]. Um die Wirkung des TNF- $\alpha$  auf die Expression von HCV-Proteinen zu untersuchen, wurden parallel zur Stimulation mit IFN- $\gamma$  HuH-7 mit bicistronischen HCV-Replikons mit TNF- $\alpha$  in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die Immunfluoreszenzanalyse in **Fig. 1A** und **1B** zeigt, dass TNF- $\alpha$  die Expression von NS5A unbeeinflusst lässt. Die Morphologie der Zellen war durch die Cytokinbehandlung ebenfalls nicht beeinträchtigt.

In der Westernblotanalyse in **Fig. 4** wurden HuH-7 mit genomischen Replikons (Klone 20-1 und 21-5) auf die Expression des C-Proteins nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  beurteilt. Als Kontrolle für die Expression des C-Proteins dienten Lysate von UTHCNS3-Zelllinien, die im tet-off-System das C-Protein exprimieren. Im Gegensatz zu einer Behandlung mit IFN- $\gamma$ , zeigte die Stimulation mit TNF- $\alpha$  keinen inhibitorischen Effekt.

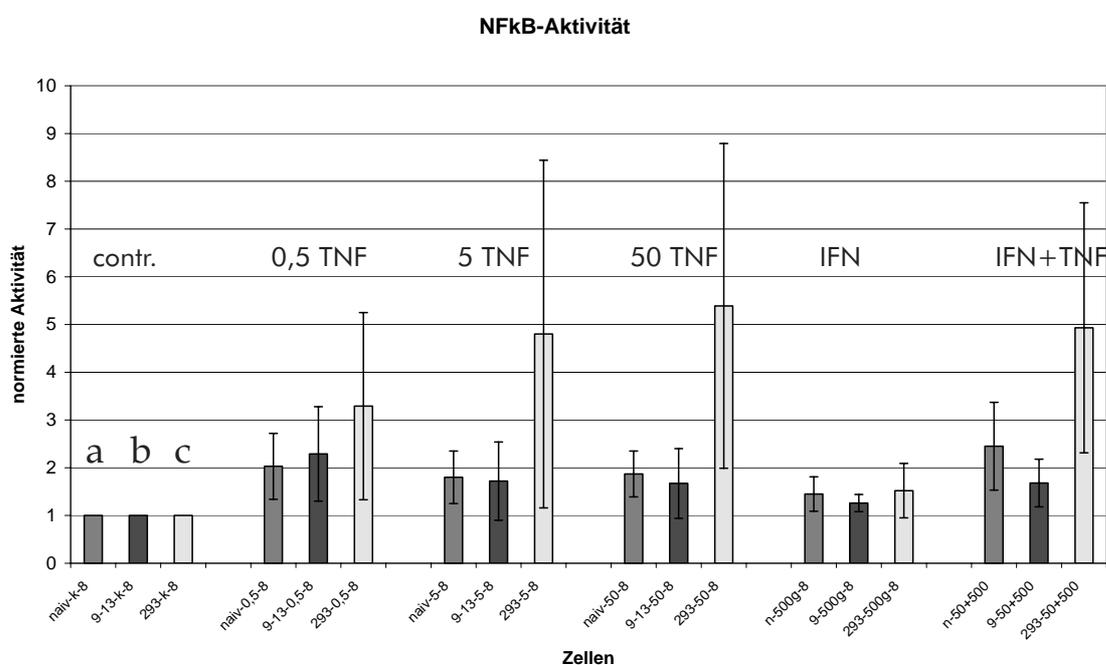


**Fig. 4: Core-Proteinexpression nach IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$**

Westernblotanalyse der Expression von Core. Zellen mit den bicistronischen genomischen HCV-Replikons I<sub>389</sub>/Core-3' (Zellklone 21-5 und 20-1) wurden auf Zellkulturschalen ausgesät und nach 16 h mit 5000 U/ml IFN- $\gamma$  bzw. 100 ng/ml TNF- $\alpha$  für 72 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, Zellextrakte hergestellt und pro Spur 20  $\mu$ g Protein aufgetragen. Zur Kontrolle wurden auf zwei Spuren Zellysate von UTHCNS3-2-Zellen aufgetragen, die tet off-abhängig Core exprimieren. Die Blots wurden mit dem monoklonalen Antikörper C7-50 (Core) gefärbt.

## NFκB-Promotor-Aktivität nach TNF-α-Stimulation

Für den Nachweis der biologischen Aktivität des TNF-α wurden HuH-7 mit HCV-Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3', parentale (naive) HuH-7 und 293-Zellen mit einem NFκB-Plasmid und einem Kontrollplasmid des Dual-Luciferase-Reporter-Assay Systems transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit TNF-α und /oder IFN-γ in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und anschließend die Aktivität des transfizierten NFκB-Promotors gemessen. In ersten Experimenten wurde mit Aktivitätsmessungen nach unterschiedlich langer Inkubationszeit von 4, 8, 12 und 24 h das Maximum der Induktion ermittelt. Die Aktivität stieg nach 4 h noch deutlich an, ging dann aber bis zu 12 h wieder zurück, so dass die folgenden Messungen nach einer Inkubationszeit von 8 h durchgeführt wurden. In **Fig. 5** ist zu sehen um welchen Faktor die Aktivität gegenüber der Grundaktivi-



**Fig. 5: TNF-α aktiviert NFκB**

Dual-Luciferase-Reporter-Assay mit NFκB. Naive HuH-7 (**a**), Zellen mit dem Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3' (**b**) und zum Vergleich 293-Zellen (**c**) wurden ausgesät, nach 24 h mit 0,3 µg pro 6-well ( $8 \times 10^5$  Zellen) des *firefly* Luciferase Reporter-Konstrukts für NFκB und 0,1 µg des Kontroll-Konstrukts *Renilla reniformis* transfiziert und weitere 24 h später mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF-α (0,5 ng/ml, 5 ng/ml, 50 ng/ml), von IFN-γ (500 U/ml) und einer Kombination beider Cytokine (50 ng/ml TNF-α und 500 U/ml IFN-γ) stimuliert. Nach 8 h wurden die Zellen gemäß den Luciferase-System-Vorschriften verarbeitet und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die NFκB-*firefly*-Aktivität wurde in Bezug gesetzt zur *Renilla*-Aktivität der Transfektionskontrolle. Um die relative Aktivität für die stimulierten Zellen zu ermitteln, wurde dieser Quotient verglichen (geteilt) mit dem Quotienten von unstimulierten Zellen. In den dargestellten Diagrammen sind die Mittelwerte der relativen Aktivität aus vier Versuchsreihen mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt.

tät in den nicht stimulierten Zellen zunimmt. Für die 293-Zellen zeigte sich nach Behandlung mit zunehmender Konzentration an TNF- $\alpha$  eine gesteigerte Aktivität bis um den Faktor 6 bei 50 ng/ml. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  hingegen ergab auch bei einer Konzentration von 500 U/ml keine nennenswerte Aktivitätssteigerung. Eine mögliche synergistische Wirkung auf die NF $\kappa$ B-Promoter-Aktivität der beiden Cytokine wurde mit der Kostimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  überprüft. Allerdings zeigte sich kein zusätzlicher Effekt gegenüber der alleinigen TNF- $\alpha$ -Stimulation. Im Vergleich zu den 293-Zellen wiesen HuH-7 nach Cytokinbehandlung nur eine sehr geringe Aktivitätssteigerung um etwa den Faktor 2 auf. Die gesteigerte NF $\kappa$ B-Promotor-Aktivität nach Behandlung der transfizierten Zellen mit TNF- $\alpha$  zeigt die biologische Aktivität des Cytokins.

## Expression spezifischer Proteine nach IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ - Stimulation

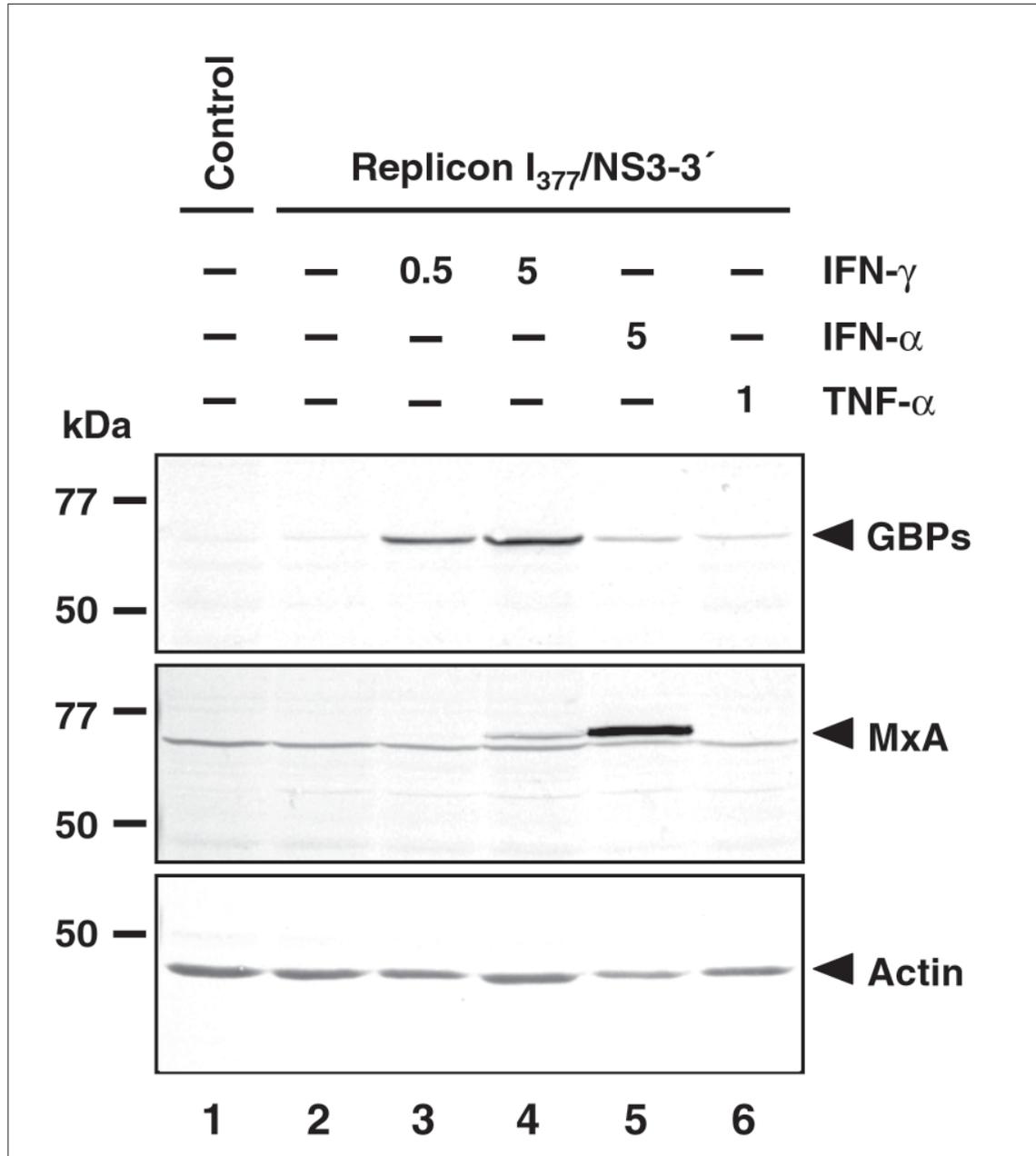
### Expression von IFN-induzierten Proteinen

Die Expression von IFN- $\alpha$  induziertem MxA und IFN- $\gamma$  induziertem GBP wurde in der Westernblotanalyse nachgewiesen. Die Zellen 9-13 mit dem Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3' wurden mit IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  oder TNF- $\alpha$  behandelt und nach Auftrennung der Zelllysate mit Antikörpern gegen GBP oder MxA markiert. Nach IFN- $\gamma$ -Stimulation war die Expression der GBPs entsprechend ihrer IFN- $\gamma$ -Spezifität stark erhöht (**Fig. 6A**). Das IFN- $\alpha$ -spezifische MxA wurde jedoch nicht nur nach IFN- $\alpha$ -Behandlung exprimiert, sondern auch in geringem Maße nach IFN- $\gamma$ . Die Bande 4 zeigt nach Stimulation mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  ebenfalls eine wenn auch schwache Bande für MxA. Um die durch IFN- $\gamma$  induzierte MxA-Menge zu quantifizieren, wurde rekombinant hergestelltes hochaufgereinigtes His-MxA als Standard verwendet. In der Westernblotanalyse wurde die MxA-Expression von Replikonzellen, die mit IFN stimuliert wurden, verglichen mit eine Verdünnungsreihe von 0,1 ng - 20 ng His-MxA (**Fig. 6B**). So wurde festgestellt, dass die mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  behandelten Zellen (9-13) etwa 2 ng MxA exprimieren. Zellen, die mit 500 U/ml IFN- $\alpha$  stimuliert worden waren, wiesen dagegen eine Expression von ca. 18 ng MxA auf. Im Vergleich entspricht die MxA-Expression durch IFN- $\gamma$  etwa einem Zehntel der Expression durch IFN- $\alpha$ .

Um eine HuH-7-spezifische Reaktion auf IFN auszuschließen, wurde getestet, ob die Expression von MxA und GBP auch in anderen Zelllinien durch IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  induziert werden kann.

Hierfür wurden die Zelllinien HepT1, H3TA6 und Vero-Zellen mit IFN- $\alpha$ , bzw. IFN- $\gamma$  behandelt und mit Immunfluoreszenzanalyse die Expression von MxA und GBP nach-

gewiesen. GBP wurde in allen Zelllinien nach IFN- $\gamma$ -Inkubation exprimiert und in geringem Maße nach IFN- $\alpha$ -Stimulation. GBP weist somit in verschiedenen Zelllinien auf IFN- $\gamma$ -Aktivität hin. MxA wurde außer in HuH-7 auch in H3TA6 mit IFN- $\alpha$ , und in geringerem Maße mit IFN- $\gamma$  in seiner Expression stimuliert (Fig. 7)



**Fig. 6A.: Expression von IFN-induzierten Proteinen**

Westernblotanalyse der Expression von MxA und GBP. HuH-7-Zellen mit dem Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3' wurden auf Zellkulturschalen ausgesät, nach 16 h mit 500 bzw. 5000 U/ml IFN- $\gamma$ , 5000 U/ml IFN- $\alpha$  oder 100 ng/ml TNF- $\alpha$  72 h lang inkubiert. Mit den Zellextrakten aus den lysierten Zellen wurde pro Spur 20  $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Färbung der Blots erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper 166 (MxA) bzw. dem polyklonalen GBP-spezifischen Antikörper.

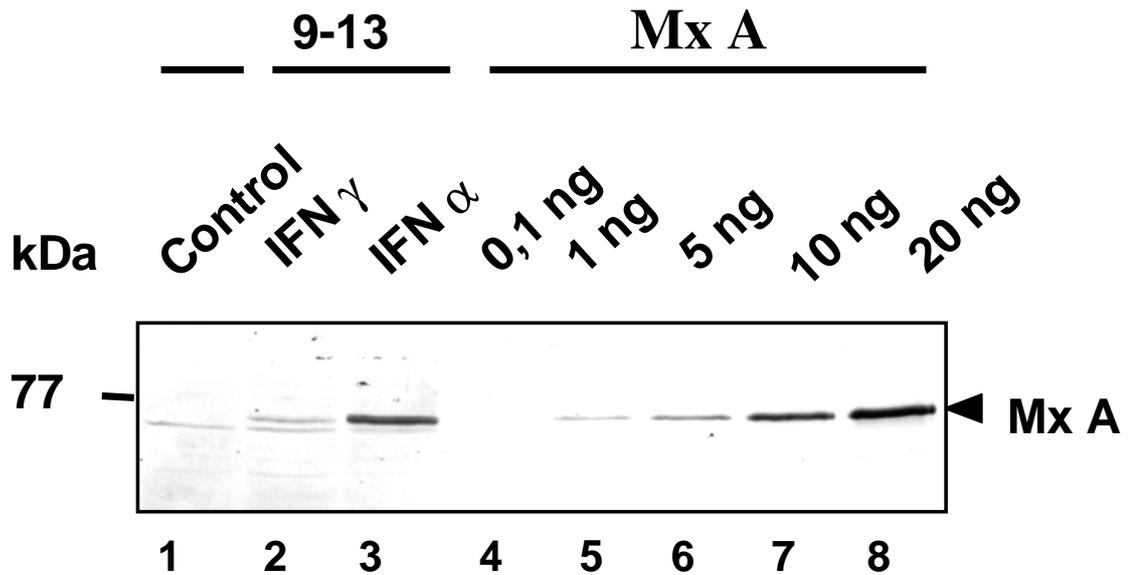


Fig.6B: MxA-Expression nach IFN

Westernblotanalyse der Expression von MxA nach IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha$ .

Zellysate der mit IFN- $\gamma$  bzw. IFN- $\alpha$  stimulierten Zellen mit dem Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3' (9-13), entsprechend Fig.6A, wurden mit 20  $\mu$ g pro Spur aufgetragen und zum Vergleich definierte Mengen an MxA von 0,1 ng bis 20 ng. Der Blot wurde gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper 166 (MxA).

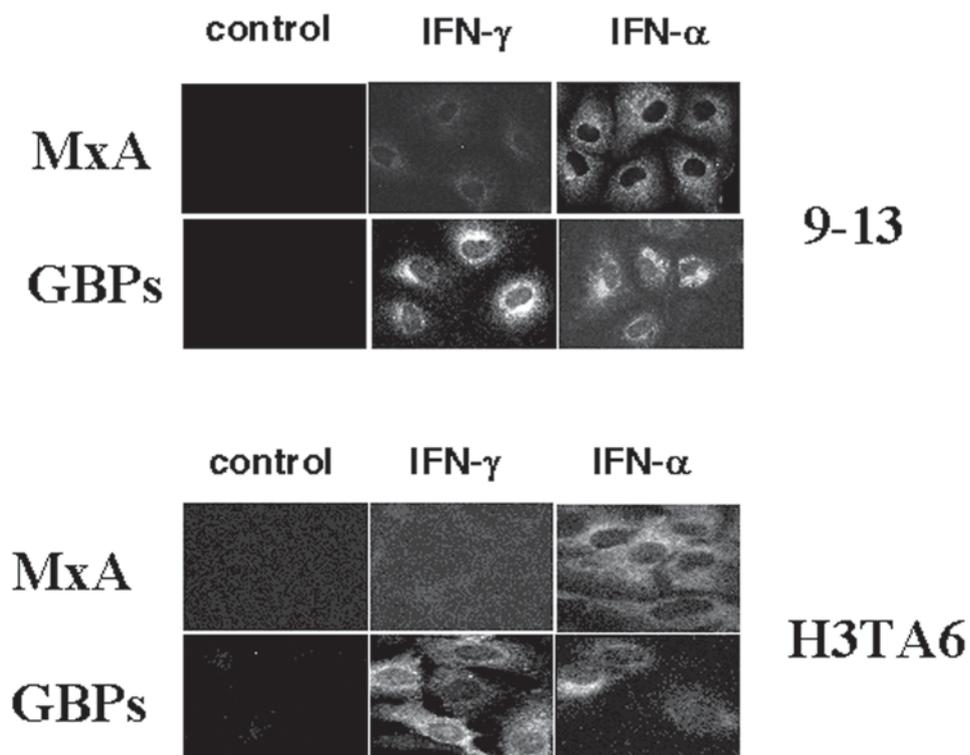
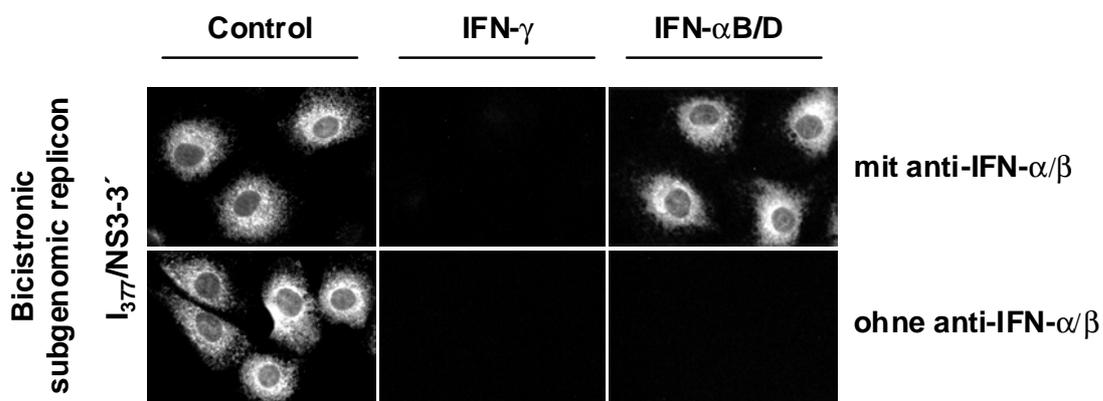


Fig. 7 Expression von IFN-induzierten Proteinen in HuH-7-Zellen und H3TA6-Zellen  
Immunfluoreszenzanalyse der Expression von MxA und GBP. HuH-7-Zellen mit dem Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3' (9-13) und H3TA6-Zellen wurden für 16 h auf Deckgläschen ausgesät, mit 500 U/ml IFN- $\alpha$  bzw. IFN- $\gamma$  behandelt und nach 72 h fixiert. Markiert wurden die permeabilisierten Zellen mit den Antikörpern 166 (MxA) und anti-GBP.

## IFN- $\gamma$ und endogen produziertes IFN- $\alpha$

Die hemmende Wirkung von IFN- $\gamma$  auf die HCV-Expression ist IFN- $\alpha$  - unabhängig

Um die Wirkung von möglichem endogen produziertem IFN- $\alpha$  nach IFN- $\gamma$ -Stimulation zu berücksichtigen, wurde der Effekt von IFN- $\gamma$  auf HuH-7-Zellen mit dem HCV-Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3' in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- $\alpha$ / $\beta$  untersucht. Die Zellen wurden zum einen Teil nur mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  oder IFN- $\alpha$  oder nur mit Medium behandelt und zum anderen Teil gleichzeitig mit zusätzlich 500 NU (neutralisierende Units)/ml Antikörper gegen IFN- $\alpha$ / $\beta$ . Eine alleinige Zugabe von Antikörpern beeinflusste in Kontrollzellen die Expression von NS5A nicht. Die Hemmung durch IFN- $\alpha$  wurde durch Zusatz der Antikörper aufgehoben. Der inhibitorische Effekt von IFN- $\gamma$  war in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern nicht beeinträchtigt (Abb. 8).



**Fig. 8. Die hemmende Wirkung von IFN- $\gamma$  auf die Expression von NS5A wird mit neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- $\alpha$ / $\beta$  nicht verhindert.**

Zellen mit dem Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3' wurden auf Deckgläschen ausgesät und 12 h lang inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  bzw. IFN- $\alpha$  für 72 h behandelt. Die Inkubation erfolgte bei einem Teil der Zellen in Gegenwart (obere Reihe) von 500 NU/ml neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- $\alpha$ / $\beta$ .

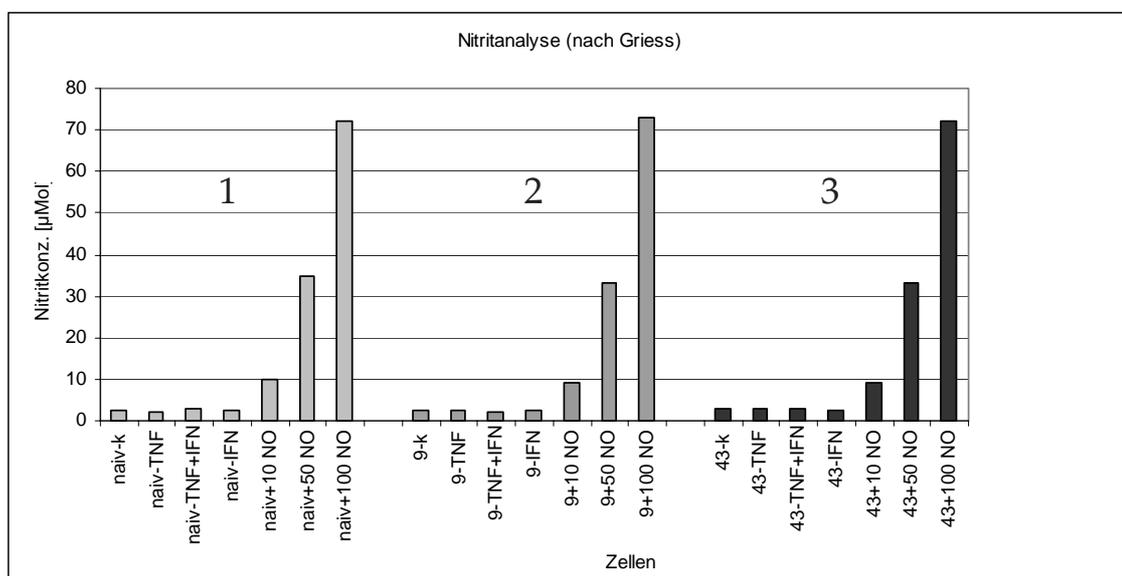
## Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in HuH-7

### HuH-7 produzieren kein NO nach Behandlung mit IFN- $\gamma$ oder TNF- $\alpha$ .

Im Anschluss an die Stimulation der Zellen mit IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  wurde die Produktion des Effektormoleküls NO untersucht.

Durch IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  induziert, katalysiert iNOS die Reaktion von Arginin zu Citrullin und NO, das sofort zu Nitrit und Nitrat oxidiert. Mit Hilfe des Griess-Assays konnte im Zellüberstand von HuH-7 die Nitritkonzentration gemessen werden. Die Zellen wurden sowohl mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  alleine behandelt, als auch mit einer Kombination beider, denn für eine Kostimulation war für Mausemakrophagen gegenüber der alleinigen IFN- $\gamma$ -Stimulation eine gesteigerte Nitritproduktion um den Faktor sechs beschrieben worden [10]. Parallel wurden HuH-7 mit einem NO-Donator behandelt und ebenfalls die Nitritkonzentration im Zellüberstand bestimmt. Die Nitrit-Messung erfolgte nach einer Inkubation von 6, 12, 24, 48 und 72 h.

Die Messergebnisse unterschieden sich nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten nicht voneinander. **Fig. 9** zeigt anhand der Werte nach 24 h, dass weder mit TNF- $\alpha$ , noch mit IFN- $\gamma$  oder einer Kombination beider eine NO<sub>2</sub>-Produktion festgestellt werden konnte. Im Überstand der mit NO-Donatoren behandelten Zellen erreichte die Nitritkonzentration etwa 70-90 % der eingesetzten NO-Konzentration. Die Ergebnisse zeigen, dass in HuH-7 keine messbare Stickstoffmonoxidproduktion stattfindet.



**Fig. 9** HuH-7-Zellen produzieren kein messbares NO<sub>2</sub>  
Griess-Analyse.

Naive HuH-7 (1), Zellen mit dem Replikon I<sub>377</sub>/NS3-3' (2) und dem Replikon I<sub>389</sub>/NS3-3'/Hygubi (3) wurden auf 96-well-Platten ausgesät, nach 16 h mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und einer Kombination aus beiden stimuliert und nach 3, 6, 12, 24, 48 und 72 h im Griess-Assay die Nitrit-Konzentration gemessen. Zu einem Teil der Zellen wurde NONOate zugegeben und parallel gemessen. Die Nitrit-Konzentration wurde entsprechend der Extinktion aus der Nitrit-Standard-Extinktionskurve abgeleitet.



## Diskussion

Viele Aspekte der HCV-Replikation sowie der Interaktion mit dem Immunsystem sind heute noch nicht verstanden. Auch die Wirkmechanismen der derzeit zur Therapie einer Hepatitis C eingesetzten Medikamente IFN- $\alpha$  und Ribavirin sind mangels eines geeigneten Modell-Systems nicht geklärt.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, unter Verwendung des 1999 publizierten HCV-Replikonsystems, die Wirkung verschiedener Cytokine auf die Replikation von HCV aufzuklären.

Mit den Ergebnissen konnte ein neuer Ansatzpunkt für zukünftige Therapieformen aufgezeigt werden. Bei den untersuchten Cytokinen handelt es sich um IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ .

### Die Rolle von IFN- $\gamma$ im Immunsystem des HCV-infizierten Patienten

Aus Studien mit Zellen des Immunsystems von Patienten, die das HCV elimieren konnten, ist bekannt, dass das Zusammenspiel verschiedener T-Zell-Populationen und ihre Fähigkeit IFN- $\gamma$  zu sezernieren eine entscheidende Rolle für die Chronifizierung von HCV spielt. Im Gegensatz zu Personen, die das Virus elimieren konnten, fällt bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion die CTL-Antwort erheblich geringer aus. Interessanterweise zeigen diese T-Zellen meist den sogenannten „stunned phenotype“, was sich dadurch auszeichnet, dass die Zellen sozusagen „verdutzt“ (engl. stunned) sind und nach einer HCV-Infektion anfangs keines oder nur wenig IFN- $\gamma$  und IL-2 produzieren [45]. Individuen, bei denen die HCV-Infektion sich auf eine akute Infektion beschränkte, weisen zu Beginn der Erkrankung eine hohe NK- und T-Helferzell-Aktivität auf und im weiteren Verlauf eine zunehmende Aktivität der CTLs. Da all diese T-Zell-Populationen IFN- $\gamma$  synthetisieren, lag bei diesen Individuen von Erkrankungsbeginn an eine kontinuierliche IFN- $\gamma$ -Produktion vor. Diese hielt auch noch an, wenn im Serum kein Virusantigen mehr nachweisbar war und die Transaminasenkonzentrationen wieder Normwerte erreicht hatten.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun mit Hilfe eines HCV-Replikon-Systems der Frage nachgegangen werden, ob IFN- $\gamma$  neben den immunmodulatorischen Effekten auch einen direkt antiviralen Effekt gegen HCV besitzt.

### **Die inhibitorische Rolle von IFN- $\gamma$ in HCV-Replikons**

Es zeigte sich anhand von Immunfluoreszenz-, Westernblot- und Northernblotanalysen, dass IFN- $\gamma$  einen direkten inhibitorischen Effekt auf die HCV-Replikons ausübt. Die Synthese der HCV-Proteine wurde gehemmt (Fig. 1 und Fig. 2) und die Replikation der HCV-RNA nahm mit zunehmender IFN- $\gamma$ -Konzentration ab (Fig. 3). Mit einer EC-50 von weniger als 5 U/ml ist die Wirkung von IFN- $\gamma$  vergleichbar mit der Inhibition der HCV-Replikation in Replikons durch IFN- $\alpha$  (Fig. 4B) [19]. Ob dieser nun in Zellkultur beobachtete Effekt auch in vivo zutrifft, ist derzeit noch nicht untersucht worden.

### **TNF- $\alpha$ spielt keine Rolle für die HCV-Replikons**

IFN- $\gamma$ -produzierende NK- und T-Helferzellen synthetisieren neben IFN- $\gamma$  meist auch TNF- $\alpha$ . Diese beiden Cytokine spielen neben der immunmodulatorischen auch eine direkt antivirale Rolle für die Kontrolle von viralen Infektionen [81].

Für das *Hepatitis-B-Virus* konnte im Mausmodell für TNF- $\alpha$  ein replikationshemmender Effekt nachgewiesen werden [30] [27]. Ob TNF- $\alpha$  auch bei einer Infektion mit HCV eine inhibitorische Wirkung aufweist, war Gegenstand weiterer Untersuchungen:

Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  ließ die Synthese von HCV-Proteinen unverändert (Fig. 1A und 1B und Fig. 4). Selbst eine Steigerung der Konzentration bis zu 100 ng/ml TNF- $\alpha$  zeigte keine Hemmung der HCV-Proteinexpression.

### **Die Rolle des bicistronischen Charakters der HCV-Replikons**

Die ersten Ergebnisse beruhten auf Experimenten mit bicistronischen HCV-Replikons, in deren Genom zusätzlich zur HCV-IRES eine EMCV-IRES integriert ist. Im weiteren Vorgehen sollte daher untersucht werden, ob die Zytokine auf Replikons ohne EMCV-IRES eine veränderte Wirkung zeigen.

Auch in Zellen mit monocistronischen Replikons hatte IFN- $\gamma$  einen hemmenden, und TNF- $\alpha$  keinen Effekt auf die Replikation von HCV-RNAs. Damit konnte eine abhängig von dem Vorhandensein der EMCV-IRES veränderte Wirkung ausgeschlossen werden (Fig. 1C und Fig. 2).

### **Die Rolle der Strukturproteine für die Cytokinwirkung in HCV-Replikons**

Für das C-Protein ist im Mausmodell eine immunsuppressive Wirkung beschrieben worden. Diese zeigt sich mit einer verminderten CTL-Antwort und einer Unterdrückung der IFN- $\gamma$ - und Il-2-Produktion [44]. Sollte Core womöglich nicht nur die Produk-

tion von IFN- $\gamma$  verhindern, sondern auch dessen Wirkung? Ein weiteres Strukturprotein, das Hüllprotein E2, beeinflusst möglicherweise durch eine Interaktion mit PKR die IFN-Wirkung [87]. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob eine Interaktion von HCV-Proteinen mit PKR die Ursache für die bei einigen Genotypen beobachtete Resistenz gegenüber IFN- $\alpha$  darstellt [86][17].

Eine solche Interaktion hätte womöglich nicht nur eine eingeschränkte IFN- $\alpha$ -Wirkung, sondern auch eine Beeinträchtigung der IFN- $\gamma$ -Wirkung zur Folge. Aus diesem Grunde wurden auch Zellen mit IFN- $\gamma$  inkubiert, die das genomische Replikon besitzen und sowohl das Core-Protein, als auch das E2-Protein exprimieren.

Die Ergebnisse zeigten auch für diese Replikonzellen eine Hemmung der Expression von HCV-Proteinen durch IFN- $\gamma$  und keine Inhibition durch TNF- $\alpha$  (Fig. 1, 4). IFN- $\alpha$  hat in Zellen mit genomischem Replikon ebenfalls eine Hemmung der HCV-Expression zur Folge (persönliche Mitteilung von Ralf Bartenschlager, Institut für Virologie, Universität Mainz). Demnach hat das Vorhandensein der Strukturproteine in den verwendeten Replikonsystemen keinen Einfluss auf die IFN-Wirkung.

Falls PKR in HuH-7-Zellen mit genomischem Replikon von E2 inhibiert wird, so deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die IFN-Wirkung nicht von der Aktivität der PKR abhängig ist. Interessant wäre es daher, die PKR-Expression in den verschiedenen Replikonzellen zu untersuchen.

### **Die Rolle der Cytokin-induzierten Effektoren**

Die biologische Aktivität von TNF- $\alpha$  in HuH-7-Zellen wurde mit einem NF $\kappa$ B-Reporter-Assay bestätigt. Interessant war, dass die NF $\kappa$ B-Promotor-Aktivität nach TNF- $\alpha$ -Stimulation in HuH-7 im Vergleich zu 293-Zellen geringer ausfiel (Fig. 5). Außerdem konnte man beobachten, dass die mit TNF- $\alpha$  stimulierten HuH-7-Zellen auch bei hohen Dosen keine morphologischen Veränderungen zeigten. Dies gibt Anlass zu der Frage, ob HuH-7 womöglich einen Defekt im Signaltransduktionsweg von TNF- $\alpha$  besitzen. Ein weiterer Hinweis für diese Vermutung stellt das Ergebnis der Nitritmessungen dar. Weder durch TNF- $\alpha$  noch durch IFN- $\gamma$  oder eine Kombination beider Zytokine wurde eine messbare Stickstoffmonoxidproduktion induziert. Die Tatsache, dass dies sowohl für parentale HuH-7 als auch für HuH-7 mit Replikon zu beobachten war, macht eine durch das HCV-Replikon bedingte Eigenheit unwahrscheinlich. Eine Inhibition der TNF- $\alpha$ -Aktivität durch HCV-Proteine ist bei Heim *et al.* [32] auch ausgeschlossen worden. Für eine weitergehende Analyse der Signaltransduktionskaskaden von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in HuH-7 wäre interessant, ob durch IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  in HuH-7 die NO-Synthetase iNOS induziert wird.

Um die biologische Aktivität von IFN- $\gamma$  zu beurteilen, wurde die Expression der IFN-induzierten Proteine MxA und GBP untersucht. In der Westernblotanalyse (Fig. 6A) zeigte sich eine spezifisch durch IFN- $\gamma$  induzierte Synthese von GBPs, die mit steigender IFN- $\gamma$ -Konzentration zunahm. Wie erwartet wurde nach der Behandlung mit IFN- $\alpha$  MxA exprimiert. Allerdings zeigte sich auch nach IFN- $\gamma$ -Stimulation eine, wenn auch geringe Expression von MxA. Die Analyse des Verhältnisses von MxA-Expression nach IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha$  ergab einen Wert von etwa 1/10 (Fig. 6B). In Immunfluoreszenzanalysen mit weiteren hepatozellulären Zelllinien, zeigte sich, dass es sich dabei um kein HuH-7 typisches Phänomen handelt, denn auch H3TA6-Zellen exprimierten MxA, nachdem sie mit IFN- $\gamma$  oder IFN- $\alpha$  behandelt worden waren (Fig. 7). Unterstrichen wird dieses Ergebnis durch die Arbeit von Melen *et al.* [54], wo die Expression von MxA durch IFN- $\gamma$  auch für HepG2-Zellen beschrieben wurde.

### **Die Rolle von endogen produziertem IFN- $\alpha$ für die IFN- $\gamma$ -Wirkung**

Ein direkter antiviraler Effekt des MxA war zwar schon bei Frese *et al.* [80] ausgeschlossen worden. Dennoch blieb die Frage, ob die MxA-Expression nach IFN- $\gamma$ -Stimulation von möglicherweise endogen produziertem IFN- $\alpha$  induziert wurde. Eine Produktion von endogenem IFN- $\alpha$  würde die Wirkung von IFN- $\gamma$  relativieren. Die Synthese und Wirkung von IRFs führt zu einer noch nicht vollständig geklärten Verknüpfung der „pathways“ von IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha$  [97] [21] [23].

Aus diesem Grunde wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob die Inhibition der HCV-Replikation möglicherweise nur eine Wirkung von endogen produziertem IFN- $\alpha$  ist.

Mit Hilfe eines Neutralisierungs-Assays konnte jedoch gezeigt werden, dass die IFN- $\gamma$ -Wirkung sich unabhängig von IFN- $\alpha$  entfaltet (Fig. 8). Unterstützt wird dieser Befund von Arbeiten (Mihm, nicht veröffentlicht), die mit Hilfe von RT-PCR die Menge an IFN- $\alpha$ -mRNA bestimmten, die in HuH-7 nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  produziert wird. Dabei stellte sich heraus, dass die Menge an IFN- $\alpha$ -mRNA, die nach IFN- $\gamma$ -Stimulation messbar wird, die Basismenge, die in unstimulierten parentalen HuH-7 zu finden ist, nicht überschreitet. Eine mögliche Erklärung für die Induktion der MxA-Expression durch IFN- $\gamma$  ist eine Bindungsstelle im MxA-Promoter, die sowohl Transkriptionsfaktoren bindet, die durch IFN- $\alpha$  aktiviert werden, als auch diejenigen, die von IFN- $\gamma$  induziert werden [79].

### **Welche Rolle spielt Stickstoffmonoxid für die Wirkung von IFN- $\gamma$ ?**

Mit dem Ergebnis, dass der inhibitorische Effekt von IFN- $\gamma$  sich unabhängig von IFN- $\alpha$  entwickelt, war der Weg geöffnet für Untersuchungen, die Aufschluss darüber geben

können, welcher Teil des Signaltransduktionsweges von IFN- $\gamma$  für diese Wirkung verantwortlich ist. Für HBV [29] und andere Viren, wie das *Japanische Encephalitis Virus* [46] gibt es Hinweise darauf, dass die antivirale Aktivität von IFN- $\gamma$  Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt ist, während IFN- $\alpha/\beta$  seine Wirkung unabhängig von NO entwickelt [40] [74].

Sollte NO für den inhibitorischen Effekt von IFN- $\gamma$  auf die HCV-Replikons eine Rolle spielen, müsste eine NO-Produktion messbar sein. Durch IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  induziert, entsteht bei der durch iNOS katalysierten Reaktion das Reaktionsprodukt NO, das sofort zu Nitrit und Nitrat weiteroxidiert. Mit Hilfe von Nitrit-Messungen, wurde festgestellt, dass HuH-7 mit oder ohne Replikon weder nach IFN- $\gamma$ - noch nach TNF- $\alpha$ -Stimulation messbare Mengen an NO produzieren (Fig. 9).

Für die beiden Cytokine ist eine synergistische Wirkung auf die NO-Produktion in Makrophagen [10] beschrieben worden. Die Bindung von sowohl IRF-1 als auch von NF $\kappa$ B an die jeweilige iNOS-Promotorregion hat eine gesteigerte Transkriptionsrate von iNOS zur Folge [66]. Doch auch nach einer Behandlung der Zellen mit einer Kombination beider Cytokine war keine Produktion von Nitrit als Folgeprodukt von NO nachweisbar. Der inhibitorische Effekt von IFN- $\gamma$  kommt folglich ohne die Produktion von NO zustande.

In einem weiterführenden Experiment wurde die Wirkung von NO-Donatoren auf die Expression von HCV-Proteinen untersucht (persönliche Mitteilung von K. Barth und M. Frese). Mit einer nicht zelltoxischen NO-Dosis blieb die Synthese der HCV-Proteine unverändert. Damit ist eine Effektorrolle von NO für die antivirale IFN- $\gamma$ -Wirkung weitgehend ausgeschlossen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass schon geringe Mengen IFN- $\gamma$  ausreichen, um eine Hemmung der viralen Replikation zu erzielen. Im Hinblick darauf, dass ein Großteil der Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion mit der derzeitigen Standardtherapie nicht geheilt werden können, wäre eine Analyse der IFN- $\gamma$ -Effekte im Tiermodell und bei HCV-Patienten von weitreichendem Interesse. Therapeutisch eingesetzt wird IFN- $\gamma$  derzeit unter anderem bei chronischer Granulomatose [3], Nierenkarzinom [80] und Papillomavirusinfektion [77]. Nebenwirkungen sind Erytheme [1] und meist Grippe ähnliche Symptome wie Fieber und Diarrhoe [3].

Für eine spezifische Therapie, die direkt einen Effektor von IFN- $\gamma$  in seiner Wirkung hemmen kann, bedarf es weiteren Arbeiten zur Suche nach diesem antiviralen Faktor oder dem antiviralen Faktorenkomplex.

Mögliche Kandidaten sind IFN- $\gamma$ -induzierte GTPasen wie Mg21 aus der Familie der LRG-47, GBPs oder IDO. Für das humane GBP-1 ist ein antiviraler Effekt schon beschrieben worden und zwar gegen das *Vesikuläre Stomatitis Virus* und das *Encephalomyokarditisvirus* [1].

Auch IDO zeigt antivirale Wirkung gegenüber dem *Cytomegalievirus* (CMV), indem es mit einer Umwandlung von Tryptophan in Kynurenin die CMV-Replikation hemmt [4]. Interessant wäre auch, ob durch eine Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  nicht nur die MxA-Expression durch IFN- $\alpha$  gesteigert ist [54], sondern auch die antivirale Aktivität gegenüber HCV zunähme.

Abschließend kann gesagt werden, dass mit der vorliegenden Arbeit der Rolle von IFN- $\gamma$  in der Interaktion des Immunsystems mit HCV eine zusätzlich direkte antivirale Komponente zugewiesen wurde.

## Zusammenfassung

Das *Hepatitis C Virus* (HCV) ist die Ursache für die chronische Hepatitis C, eine Erkrankung, die häufig zu den schweren Komplikationen Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom führt. Die Behandlung erfolgt mit einer Kombination aus IFN- $\alpha$  und Ribavirin. Mit dieser Therapie wird bei der akuten HCV-Infektion die Eliminierung des Virus erreicht. Allerdings wird die Infektion nur in wenigen Fällen im akuten Stadium erkannt. Meist befinden sich die Patienten mit HCV-Infektion im fortgeschrittenen Stadium. Hierfür zeigt sich die Therapie derzeit jedoch alles andere als zufriedenstellend, da mit den Medikamenten nur ein Bruchteil der Patienten geheilt werden können.

Das einzige Tiermodell für die Forschung an HCV ist der Schimpanse, der aufgrund des erheblichen finanziellen Aufwands bisher nur zurückhaltend eingesetzt wurde. Auch die Alternative eines Zellkultursystems war lange Zeit nicht verfügbar. Mit der Entwicklung von HCV-Replikonsystemen ermöglichten Lohmann et al. 1999 erstmals intensivere HCV-Studien in Zellkultur. Diese Replikons, die in HuH-7-Zellen replizieren, bildeten die Grundlage meiner Arbeit.

Beobachtungen über die Unterschiede in der Immunantwort von Individuen, die HCV eliminieren können und Patienten, die eine chronische Hepatitis C entwickeln, lieferten Hinweise darauf, dass Interferon(IFN)- $\gamma$  womöglich eine entscheidende Rolle dabei zukommt. Um eine antivirale Wirkung von IFN- $\gamma$  von einer immunmodulatorischen abzugrenzen, habe ich den Effekt von IFN- $\gamma$  auf die Protein- und RNA-Synthese von HCV mit Hilfe von Immunfluoreszenz-, Western- und Northernblotanalyse untersucht. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  zeigte eine eindeutig inhibitorische Wirkung auf die Replikation des HCV-Genoms. TNF- $\alpha$ , das in der Immunantwort meist gleichzeitig freigesetzt wird und für das ein hemmender Effekt auf das *Hepatitis-B-Virus* beschrieben wurde, zeigte jedoch keinerlei inhibitorische Wirkung. Mit einem Neutralisations-Assay mit Antikörpern gegen IFN- $\alpha/\beta$  konnte ich zeigen, dass die Wirkung von IFN- $\gamma$  sich unabhängig von endogen produziertem IFN- $\alpha/\beta$  entwickelt. Hieraus ergibt sich für die Rolle von IFN- $\gamma$  in der Interaktion des Immunsystems mit HCV eine zusätzlich direkte antivirale Funktion. Weiterhin stellte ich anhand von Nitrit-Messungen fest, dass Replikon-haltige Zellen nach IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ -Behandlung kein messbares Stickstoffmonoxid (NO) produzieren. Dies deutet darauf hin, dass NO nicht für den antiviralen Effekt von IFN- $\gamma$  verantwortlich ist.

## Literaturverzeichnis

- [1] Anderson SL, Carton JM, Lou J, Xing L and Rubin BY. 1999. Interferon-induces guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology*, 30: 8-14
- [2] Ausubel FM, Brent R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. 1997. John Wiley and Sons, USA
- [3] Bemiller LS, Roberts DH, Starko KM, Curnutte JT. 1995. Safety and effectiveness of long-term interferon gamma therapy in patients with chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis*, 21: 239-247
- [4] Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier J-L and Micheson S. 1999. Role of IFN-g-induced Indoleamine 2,3 Dioxygenase and Inducible Nitric Oxide Synthase in the Replication of Human Cytomegalievirus in Retinal Pigment Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 162: 957-964
- [5] Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR and Snyder SH. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351: 714-718
- [6] Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach, D, Pemberton J, Moorhead-Louddis J, McHutchison JG, Alter HJ, Chisari FV. 2001. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 33: 267-276
- [7] Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW and Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitisgenome. *Science*, 244: 359
- [8] Crotty S, Cameron CE and Andino R. 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 6895-6900
- [9] Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JYN, Hong Z, Andino R and Cameron CE. 2000. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen, *Nature Medicine*, 6, 12

- [10] Ding A, Nathan and Stuehr DJ. 1988. Release of Reactive Nitrogen Intermediates and Reactive Oxygen Intermediates from Mouse Peritoneal Macrophages. *The Journal of Immunology*, 141: 2407-2412
- [11] Dorman S.E, Uzel G, Roesler J, Bradley JS, Bastian J, Billman G, King S, Filie A, Schermerhorn J and Holland SM. 1999. Viral infections in interferon-gamma receptor deficiency. *Journal of Pediatrics*, 135: 640-643
- [12] Erlandsson L, Blumenthal R, Eloranta ML, Engel H, Alm G, Weiss S and Leanderson T. 1998. Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Current Biology*, 8: 223-226
- [13] Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P and Jahnsen FL. 2001. Plasmacytoid Dendritic Cells (Natural Interferon  $\alpha$ /b-Producing Cells) Accumulate in Cutaneous Lesions. *Am J of Pathology*, 159: 237-243
- [14] Fiette L, Aubert C, Muller U, Huang S, Aguet M, Brahic M and Bureau JF. 1995. Theiler's virus infection of 129Sc mice that lack the interferon alpha/beta or interferon gamma receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 181: 2069-2076
- [15] Fogh J, Trempe G. 1975. New human tumor cell lines. In Human Tumor Cells In Vitro (Fogh J ed). New York and London, *Plenum Press*, pp 115-159
- [16] Fogh J, Wright WC and Loveless JD. 1977. Absence of Hela Cell Contamination in 169 Cell lines Derived From Human Tumors. *J Natl Cancer Inst*, 58: 209-214
- [17] Francois C, Duverlie G, Rebouillat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gatignol A, Wychowski C, Moradpour D and Meurs EF. 2000. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Interferes with the Antiviral Action of Interferon Independently of PKR-Mediated Control of Protein Synthesis. *Journal of Virology*, 74: 5587-5596
- [18] Frese M, Kochs G, Feldmann H, Hertkorn C and Haller O. 1996. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses and hantaviruses by human MxA protein. *Journal of Virology*, 70: 915-923

- [19] Frese M, Pietschmann T, Moradpour D, Haller O and Bartenschlager R. 2001. Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol*, 82: 723-733
- [20] Gale Jr.MJ, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polzak SJ, Gretch DR, Katze MG.. 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, 230: 217-227
- [21] Gessani S, Belardelli F, Pecorelli A, Puddu P and Baglioni C. 1989. Bacterial lipopolysaccharide and gamma interferon induce transcription of beta interferon mRNA and interferon secretion in murine macrophages. *J Virol*, 63: 2785-2789
- [22] Godeny EK, Gauntt CJ. 1987. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol*, 139: 913-918
- [23] Goodbourn S, Didcock K, Randall RE. 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and countermeasures. *Journal of General Virology*, 81: 2341-2364
- [24] Goureau O, Hicks D and Courtois Y. 1994. Human retinal pigmented epithelial cells produce nitric oxide in response to cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 198: 120
- [25] Griess, JP. 1879. *Ber Deutsch Chem Ges*, 12: 426
- [26] Guidotti LG and Chisari FV. 2001. Noncytolytic Control of Viral Infections by the Innate and Adaptive Immune Response. *Annu Rev Immunol*, 19: 65-91
- [27] Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber and Chisari FV. 1996. Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes. *Immunity*, 4: 25-36
- [28] Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, Chisari FV. 1995. High level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 69: 6158-6169

- [29] Guidotti LG, McClary H, Loudis JM and Chisari FV. 2000. Nitric Oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Exp Med*, 191: 1247-1252
- [30] Guilhot, S, Guidotti, LG and Chisari, FV. 1993. Interleukin-2 downregulates HepatitisB-Virus gene expression in transgenic mice by a posttranscriptional mechanism. *Journal of Virology*, 67: 7444-7449
- [31] Haller O, Frese M, Kochs G. 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev sci tech Off int Epiz*, 17: 220-230
- [32] Heim MH, Moradpour D and Blum HE. 1999. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Inhibits Signal Transduction through the JAK-STAT Pathway. *Journal of Virology*, 73: 8469-6475
- [33] Heim MH. 2000. Intracellular signalling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis*, 32: 257-263
- [34] Ichijo TM, Matsumoto A, Kobayashi M, Furihata K, Tanaka E. 1997. Quantitative measurement of HCV RNA in the serum: a comparison of three assays based on different principles. *J Gastroenterol Hepatol*, 12: 500-506
- [35] Ikeda F, Shimomura H, Miyake M, Fujioka SI, Itoh M, Takahashi A, Iwasaki Y, Sakaguchi K, Yamamoto K, Higashi T and Tuji T. 2000. Early clearance of circulating hepatitis C virus enhanced by induction therapy with twice-a-day intravenous injection of IFN- $\beta$ . *J Interferon Cytokine Res*, 20: 831-836
- [36] Isaacs, A and Lindemann, J. 1957. Virus interference I. The Interferon. *Proc R Soc Lond*, 147: 258-267
- [37] Jakschies D, Hochkeppel H.K, Horisberger M.A, Deicher H, Wussow P. 1990. Emergence and decay of the human Mx homolog in cancer patients during and after interferon-alpha-therapy. *J biol Resp Modif*, 9: 305-312

- [38] Jakschies D, Zachoval R, Muller R, Manns M, Nolte KU, Hochkeppel HK, Horisberger MA, Deicher H and vonWussow P. 1994. Strong transient expression of the type I interferon-induced MxA protein in hepatitis A but not in acute hepatitis B and C. *Hepatology*, 19: 857-865
- [39] Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, Le J. 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO-Synthetase induction in macrophages. *Science*, 263: 1612-1615
- [40] Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C and MacMicking JD. 1993. Inhibition of viral replication by interferon-g-induced nitric oxide synthase. *Science*, 261: 1445
- [41] Kolykhalov AA, Agapow EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM and Rice CM. 1997. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, 277: 570-574
- [42] Krieger N, Lohmann V and Bartenschlager R. 2001. Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. *Journal of Virology*, 75: 4614-4624
- [43] Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680
- [44] Large MK, Kittlesen DJ and Hahn YS. 1999. Suppression of Host Immune Response by the Core Protein of Hepatitis C Virus: Possible Implications for Hepatitis C Virus Persistence. *The Journal of Immunology*, 162: 931-938
- [45] Lechner F, Wong D, Dunbarr PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P and Walker BD. 2000. Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus. *J Exp Med*, 191: 1499-1512
- [46] Lin YL, Huang YL, Ma SH, Yeh CT, Chiou SY, CHen LK and Liaou CL. 1997. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J Virol*, 71: 5227

- [47] Lo SY, Selby MJ, Ou JH. 1996. Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol*, 70: 5177-5182
- [48] Lohmann V, Koch JO, Herian U, Theilmann L and Bartenschlager R. 1999. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science*, 285: 110-113
- [49] Lohmann V, Körner F, Dobierzewska and Bartenschlager R. 2001. Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *Journal of Virology*, 75: 1537-1449
- [50] Lorenz, WW, McCann, RO, Longiaru, M & Cormier, MJ. 1991. Isolation and expression of cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 4438-4442
- [51] MacMicking J, Xie Q-w and Nathan C. 1997. Nitric Oxide and Macrophage Function. *Annu Rev Immunol*, 15: 323-350
- [52] Matthews, JC, Hori, K & Cormier, MJ. 1977. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochemistry*, 16: 85-91
- [53] McClary H, Koch R, Chisari FV, Guidotti LG.. 2000. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol*, 74: 2255-2264
- [54] Melen K, Keskinen P, Lehtonen and Julkunen I. 2000. Interferon-induced gene expression and signaling in human hepatoma cell lines. *J Hepatol*, 33: 764-772
- [55] Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Pinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JRT, Tyrrell DLJ and Knetemanz NM. 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Medicine*, 7: 927-933
- [56] Mihm S, Fayyazi A and Ramadori G. 1997. Hepatic Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Transcripts in Chronic Hepatitis C Virus Infection: Relation to Hepatic Viral Load and Liver Injury. *Hepatology*, 26: 451-458

- [57] Miranda KM, Espey MG, Wink DA. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide. Biology and Chemistry*, 5: 62-71
- [58] Modrow S und Falke D. 1997. Molekulare Virologie. *Spektrum Akademischer Verlag*
- [59] Moradpour D, Cerny A, Heim MH and Blum HE. 2001. Hepatitis C: an update. *Swiss Med WKLY*, 131: 211-298
- [60] Moradpour D, Wakita T, Tokushige K, Carlson RI, Wands JR. 1996. Charakterization of three novel monoclonal antibodies against hepatitis C virus core protein. *J Med Virol*, 48: 234-241
- [61] Moradpour D, Wakita T, Wands JR, Blum HE. 1998. Tightly regulated expression of the entire hepatitis C virus structural region in continuous human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 246:920-924
- [62] Muller M, Steinhoff U, Reis L.F, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel R.M. and Aguet M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 264: 1918-1921
- [63] Nakabayashi, H, Taketa, K, Miyano K, Yamane, T, and Sato, J. 1982. Growth of human hepatoma cell lines with differential functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 42: 3858-3863
- [64] Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips J and Levy G.. 1998. Ribavirin Inhibits Viral-Induced Macrophage Production of TNF, Il-1, the Procoagulant fg12 Prothrombinase and Preserves Th1 Cytokine Production But Inhibits Th2 Cytokine Response. *The Journal of Immunology*, 160: 3487-3493
- [65] Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T and Nakanishi K. 1998. Regulation of interferon-gamma production by Il-12 and Il-18. *Current Opinion in Immunology*, 10: 259-264

- [66] Paludan SR, Malmgaard L, Ellermann-Eriksen S, Bosca L and Mogensen SC. 2001. Interferon (IFN)- $\gamma$  and Herpes simplex virus/tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically induce nitric oxide synthase 2 in macrophages through cooperative action of nuclear faktor- $\kappa$ B and IFN regulatory factor-1. *Eur Cytokine Netw*, 12: 297
- [67] Pavlovic J, Zurcher T, Haller O and Staehli P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *Journal of Virology*, 64: 3370-3375
- [68] Pfefferkorn ER. 1982. Interferon- $\gamma$  blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 908-912
- [69] Pietsch TC, Albrecht S, Maschek H, Wolf HK and von Schweinitz D. 1996. Charakterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab Invest*, 74: 809-818
- [70] Pietschmann T, Lohman V, Rutter G, Kurpanek K and Bartenschlager R. 2001. Characterization of Cell Lines carrying self-replicating Hepatitis C Virus RNAs. *Journal of Virology*, 75: 1252-1264
- [71] Praefcke GJK, Geyer M, Schwemmler M, Kalbitzer HR and Herrmann C. 1999. Nucleotide-binding Characteristics of Human Guanylate-binding Protein 1 (hGBP1) and Identification of the Third GTP-binding Motif. *J Mol Biol*, 292: 321-332
- [72] Reed KE and Rice CM. 2000. Overview of Hepatitis C virus Genome Structure, Polyprotein Processing, and Protein Properties, *The Hepatitis C Viruses*, Hagedorn CH and Rice CM (Eds.). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*
- [73] Rehermann B and Chisari FV. 2000. Cell Mediated Immune Response to the Hepatitis C Virus. *The Hepatitis C Viruses*, Hagedorn CH and Rice CM (Eds.). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*

- [74] Reiss CS and Komatsu T. 1998. Does Nitric Oxide Play a Critical Role in Viral Infections? *Journal of Virology*, 72: 4547-4551
- [75] Rincon M, Enslen H, Raingeaud J, Recht M, Zapton T, Su MS, Penix LA, Davis RJ and Flavell RA. 1998. Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO Journal*, 17: 2817-2829
- [76] Roberts RM, Liu L, Guo Q, Leaman D and Bixby J. 1998. The Evolution of the Type I Interferons. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18: 805-816
- [77] Rockley PF and Tyring SK. 1995. Interferons alpha, beta and gamma therapy of anogenital human papillomavirus infections. *Pharmacol Ther*, 65: 265-287
- [78] Roers A, Hochkeppel HK, Horisberger MA, Hovanessian A and Haller O. 1994. MxA gene expression after live virus vaccination: a sensitive marker for endogenous type I interferon. *J Infect Dis*, 169: 807-813
- [79] Ronni, T, Matikainen, S, Lehtonen, A, Palvimo, J, Dellis, J, Van Eylen, F, Goetschy JF, Horisberger, M, Content, J and Julkunen, J. 1998. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res*, 18: 773-781
- [80] Schmidinger M, Steger G, Wenzel C, Locker GJ, Budinsky AC, Brodowicz T, Kramer G, Marberger M and Zielinski CC. 2001. Sequential administration of interferon-gamma, GM-CSF, and interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma: results of a phase II trial. *J Immunother*, 24: 257-262
- [81] Schreiber RD and Farrar MA. 1993. The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterol Jpn*, 28: 88-94.
- [82] Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Sha K, Ho S, Antonenko S and Liu YJ. 1999. The native of the principal type-I interferon-producing cells in human blood. *Science*, 284: 1835-1837

- [83] Staeheli P and Haller O. 1985. Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Mol Cell Biol*, 5: 2150-2153
- [84] Stein-Streilein J, Guffee J. 1986. In vivo treatment of mice and hamsters with antibodies to asialo GM1 increases morbidity and mortality to pulmonary influenza infection. *J Immunol*, 136: 1435-1441
- [85] Takizawa T, Ohashi K, Nakanishi Y. 1996. Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection. *Journal of Virology*, 70: 8128-8132
- [86] Tan SL, Katze MG. 2001. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology*, 284: 1-12
- [87] Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN and Lai MC. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, 285: 107-110
- [88] Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H and Nakanishi K. 2000. Il-12 synergizes with Il-18 or Il-1b for IFN-g production from human T cells. *International Immunology*, 12: 151-160
- [89] Trepo C. 2000. Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 7: 250-257
- [90] Vorlesungen der Inneren Medizin, Universitätsklinik Freiburg
- [91] WHO information. *Fact Sheet* No. 164
- [92] Wölk B, Sansonno D, Kräusslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE and Moradpour D: Subcellular localization stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS5A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines *J Virol*, 2000; 74: 2293-2304

- [93] Xie Q, Kashiwabara Y, Nathan C. 1994. Role of transcription factor NF6B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 269: 4705-4708
- [94] Young HA. 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 16: 563-568
- [95] Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J and Brunda MJ. 2000. Peginterferon alfa-2a in patient with cronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine*, 343: 1723-1724
- [96] Zeuzem S. 1999. Interferon-a und Ribavirin: Fortschritte in der Therapie der chronischen Hepatitis C, *Dtsch med Wschr*, 124: 636-642. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.
- [97] Zhou A, Chen Z, Rummage JA, Jiang H, Kolosov M, Kolosova I, Stewart CA and Leu RW. 1995. Exogenous interferon-gamma induces endogenous synthesis of interferon-alpha and -beta by murine macrophages for induction of nitric oxide synthase. *J Interferon Cytokine Res*, 15: 897-904



## Publikationsliste

### Originalarbeiten

Frese M.\*, Schwärzle V.\*, Barth K., Krieger N., Lohmann V., Mihm S., Haller O., Bartenschlager R. Interferon- $\gamma$  inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology*. 2002 Mar; 35 (3): 694-703

Frese M., Barth K., Kaul A., Lohmann V., Schwärzle V., Bartenschlager R. Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Gen Virol*. 2003 May; 84 (Pt 5): 1253-1259

### Abstracts

Schwärzle V., Lohmann V., Krieger N., Bartenschlager R., Haller O. und Frese M. (2001) Interferon- $\gamma$ , nicht aber TNF- $\alpha$  hemmt die Replikation von Hepatitis C-Virus-RNAs.

*Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden, 14.-17.03.2001 (Poster)*

Frese M., Pietschmann T., Schwärzle V., Moradpour D., Bartenschlager R. und Haller O. (2001) Interferone vom Typ I und II hemmen die Replikation von subgenomischen Hepatitis C Virus-RNAs.

*Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden, 14.-17.03.2001 (Vortrag)*

Schwärzle V. and Frese M. (2001) Interferon- $\gamma$  inhibits hepatitis C virus RNA replication.

*HCV-Regio-Meeting, Basel, 2.05.2001 (Vortrag)*

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name und Vorname:	Verena Schulte, geb. Schwärzle
Adresse:	Harmsenstrasse 24, 22763 Hamburg
Geburtsdatum:	31.03.1978
Geburtsort:	Ulm-Söflingen
Eltern:	Josef und Gerda Schwärzle

### Ausbildung

1984–1988	Grundschule Eggingen/Ermingen, Ulm
1988–1997	Hans und Sophie Scholl–Gymnasium (allgemeine Hochschulreife)
Okt. 1997–Sept. 2003	Studium der Medizin an der Albert Ludwigs Universität Freiburg
August 1999	Ärztliche Vorprüfung
August 2000	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
Sept. 2000–Aug. 2001	Promotion unter Leitung von Prof. Haller, Abteilung Virologie, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg
Sept. 2001–Aug. 2002	ERASMUS-Stipendiatin an der Universität Lund, Schweden
August 2003	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2003–Okt. 2004	Praktisches Jahr an Lehrkrankenhäusern der Universität Hamburg und der Universität Bern, Schweiz
Mai 2005	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

## Abkürzungen

A	aa	„amino acids“
	ATP	Adenosintriphosphat
B	BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat
	BSA	„bovine serum albumin“
C	C	„core“ (Kern) -Protein
	cDNA	„complementary DNA“
	C-Terminus	Carboxyterminus
D	DMEM	„Dulbecco´s modified Eagle medium“
	DNA	„desoxyribonucleic acid“
	ds	„double stranded“
	DTAF	„dichlortriazinyl aminofluorescein“
	DTT	1,4-Dithiothreit
E	E	„envelope“ -Protein
	EC50	Eliminationkonzentration50
	EDTA	„ethylenediaminetetraacetic acid“
	eIF2	„eukaryotic peptide chain initiation factor 2“
	EMCV	„encephalomyocarditis virus“
F	FKS	fötales Kälberserum
G	GAF	„GTPase activating factor“
	GBP	Guanylat bindendes Protein
	GAS	„gamma activation site“
	GDP	Guanosindiphosphat
	G-Protein	„guanyl nucleotide binding protein“
	GTP	Guanosintriphosphat
	GTPase	Guanosintriphosphatase
I	IDO	Indoleamin 2,3-dioxygenase
	IFN	Interferon
	IL	Interleukin
	INOS	„Inducible“ NO-Synthetase
	IRES	„internal ribosomal entry site“
	ISGF3	„interferon-stimulated gene factor 3“
	ISRE	„interferon-stimulated response element“
J	JAK	„Janus kinase“ oder „just another kinase“

K	kb	Kilobasen
	kDa	Kilodalton
	Konz.	Konzentration
M	MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
	MHC	„major histocompatibility complex“
	MOPS	3-(n-Morpholino)propanesulfonic acid
	mRNA	„messenger RNA“
	Mx	„myxovirus resistance“
N	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid+
	NFκB	„nuclear factor-κB“
	NLS	„nuclear localization signal“
	NO	Stickstoffmonoxid
	NS	Nichtstrukturprotein
	N-Terminus	Aminoterminus
	NTL	„non-translated region“
O	OAS	2'-5'Oligoadenylatsynthetase
	ORF	„open reading frame“
P	PBS	„phosphate buffered saline salt“
	PCR	„polymerase chain reaction“
	PKR	„dsRNA-activated protein kinase“
		(Synonyme: P68, DAI, dsI, P1, dsRNA-PK, eIF-2 kinase)
	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
R	Ras	nach viralen Onkogenen aus den „rat sarcoma viruses“
	RNA	„ribonucleic acid“
	RT	Raumtemperatur
S	s.c.	subcutan
	SDS	„sodium dodecyl sulfate“
	SSC	Saline-sodium citrate buffer
	STATs	„signal transducers and activators of transcription“
T	TAE	„Tris acetate EDTA buffer“
	TNF	„tumor necrosis factor“
	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	TRITC	„tetramethyl rhodamine isothiocyanate“
U	U/min	Umdrehungen pro Minute
	UV-Licht	ultraviolettes Licht

» The way to wisdom, I explain,  
Is easy to express,  
To err and err and err again  
But less and less and less.«

*Karl Popper*

