

# Charakterisierung der Hepatitis C Virus Biogenese

## **Dissertation**

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

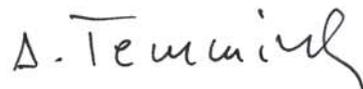
**Carina Banning**

aus Steinfurt

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Prof. Dr. T. DOBNER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Prof. Dr. W. BRUNE  
Tag der Disputation: 01. Juli 2011

Hamburg, den 16. Juni 2011



Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Fachbereichs Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2007 bis April 2011 unter Anleitung von Dr. Michael Schindler und Prof. Dr. Thomas Dobner und Betreuung durch Prof. Dr. Wolfram Brune im Heinrich-Pette-Institut – Leibniz- Institut für Experimentelle Virologie in der Arbeitsgruppe für Viruspathogenese angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Brune

Termin der mündlichen Prüfung: 01.07.2011

# Inhalt

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Das Hepatitis C Virus .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Klassifizierung .....	3
1.1.2 Epidemiologie und Übertragung .....	4
1.1.3 Krankheitsverlauf und Therapie .....	5
1.1.4 Geschichte der HCV Grundlagenforschung .....	8
1.1.5 Morphologie .....	10
1.1.6 Genomorganisation und virale Proteine .....	10
1.1.7 Der virale Replikationszyklus.....	14
<b>1.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung .....</b>	<b>17</b>
<b>2 Material .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Bakterienstämme.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Eukaryotische Zelllinie.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Medien .....</b>	<b>18</b>
2.3.1 Medien für die Anzucht von Bakterien .....	18
2.3.2 Medien für Kultivierung von Huh 7.5 Zellen .....	18
2.3.3 Medienzusätze .....	18
<b>2.4 Oligonukleotide.....</b>	<b>19</b>
2.4.1 Oligonukleotide für Klonierungen .....	19
2.4.2 Sonstige Nukleinsäuren .....	19
<b>2.5 Plasmide .....</b>	<b>20</b>
2.5.1 Expressionsplasmide .....	20
2.5.2 HCV Plasmide.....	20
<b>2.6 Enzyme .....</b>	<b>21</b>
2.6.1 Restriktionsendonukleasen .....	21
2.6.2 Sonstige Enzyme.....	21
<b>2.7 Inhibitoren .....</b>	<b>21</b>
<b>2.8 Antikörper und Färbereagenzien .....</b>	<b>22</b>
2.8.1 Primärantikörper .....	22
2.8.2 Sekundärantikörper.....	22
2.8.3 Sonstige Färbereagenzien .....	23
<b>2.9 Reagenzien.....</b>	<b>23</b>
2.9.1 Chemikalien .....	23
2.9.2 Reagenzsysteme (Kits).....	24
<b>2.10 Geräte und Laborzubehör.....</b>	<b>24</b>

2.11	Lösungen und Puffer .....	25
2.12	Proteinmarker.....	25
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>26</b>
3.1.1	Transformation von <i>E. coli</i> One Shot® Top10.....	26
3.1.2	Kultivierung von Bakterien zur Plasmidisolierung.....	26
3.1.3	DNA-Standardmethoden.....	26
3.1.4	DNA-Sequenzierung .....	26
3.1.5	Ligation von DNA.....	27
3.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA.....	27
3.1.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	27
3.1.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	27
3.1.9	Klonierungen .....	28
3.1.10	<i>In vitro</i> Transkription und RNA Isolierung.....	29
<b>3.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>30</b>
3.2.1	Kultivierung von Huh7.5 Zellen .....	30
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	30
3.2.3	Transfektion von Huh 7.5 Zellen mittels Elektroporation .....	31
3.2.4	Ernte von Virusstocks und Infektion von Zellen .....	31
3.2.5	Ultrazentrifugation zur Konzentration von Virusstocks .....	31
3.2.6	Aufreinigung kleiner Mengen an Virusüberständen .....	32
3.2.7	MTT Viabilitätsassay.....	32
3.2.8	FACS ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> ).....	32
3.2.9	FACS-basierter Apoptose-Assay (Annexin V Färbung) .....	33
3.2.10	Bestimmung des HCV Virustiters im Core-ELISA .....	33
3.2.11	Inaktivierung früher Endosomen.....	33
3.2.12	Luziferase-basierte Assays.....	34
<b>3.3</b>	<b>Biochemische Methoden.....</b>	<b>35</b>
3.3.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....	35
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	35
3.3.3	Westernblot.....	36
<b>3.4</b>	<b>Mikroskopie .....</b>	<b>36</b>
3.4.1	Lebendzell Mikroskopie.....	36
3.4.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Färbungen .....	37
3.4.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen .....	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Konstruktion und Charakterisierung fluoreszenzmarkierter Virusvarianten .....</b>	<b>39</b>
4.1.1	Markierung des Strukturproteins E1 .....	39
4.1.2	Markierung des Strukturproteins Core .....	43
<b>4.2</b>	<b>Analyse der HCV Assemblierung.....</b>	<b>48</b>
4.2.1	Visualisierung der räumlichen und zeitlichen HCV Proteinexpression .....	48
4.2.2	<i>Lipid droplets</i> als Aufbauoberfläche für Virionen.....	52
4.2.3	Korrelative Mikroskopie zur Lokalisation assemblierter Virionen .....	53

<b>4.3</b>	<b>Untersuchung der HCV-Freisetzung .....</b>	<b>55</b>
4.3.1	Charakterisierung virushaltiger Vesikel durch Immunfluoreszenz.....	55
4.3.2	Funktionelle Analysen zum Einfluss früher Endosomen auf die Ausschleusung .....	58
<b>4.4</b>	<b>Alternativer Weg der Virusfreisetzung – Gibt es einen lytischen Zyklus in der HCV Infektion?.....</b>	<b>62</b>
4.4.1	Mikroskopische Hinweise auf eine HCV-induzierte Zellyse.....	62
4.4.2	Funktionelle Analyse zum Einfluss der Apoptose auf die Virusfreisetzung .....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
5.1	Markierte Virusvarianten als innovatives Werkzeug zur Analyse von HCV .....	72
5.2	Zusammenbau und Sekretion der Hepatitis C Viruspartikel .....	73
5.3	Ein lytischer Schritt im HCV Replikationszyklus .....	80
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>85</b>
	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>97</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>98</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>100</b>

## Zusammenfassung

Die Hepatitis C Virus (HCV) Infektion ist eine der häufigsten Ursachen chronischer Lebererkrankungen mit lebensbedrohlichen Folgen. Nach Schätzungen der WHO sind ca. 3% der Weltbevölkerung mit HCV infiziert. Die aktuelle Standardtherapie ist nur bedingt wirksam und nicht direkt gegen das Virus gerichtet. Eine Impfung ist bisher ebenfalls nicht verfügbar. Die Entwicklung eines Zellkultursystems zur Produktion infektiöser Viren im Jahr 2005 legte die Grundlage zum besseren Verständnis des HCV Replikationszyklus. Dennoch sind nach wie vor wichtige Schritte wie HCV Assemblierung und Virusausschleusung nur unvollständig verstanden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch die Entwicklung und Charakterisierung neuer fluoreszenzmarkierter Reporterviren die Visualisierung der Biogenese von HCV in lebenden, virusproduzierenden Zellen ermöglicht. Erstmals wurden funktionelle Reporterviren konstruiert, die Fluoreszenz- und HCV Strukturproteine als Fusionsprotein exprimieren und somit ein wertvolles Werkzeug zur Analyse der späten Phase des viralen Replikationszyklus darstellen.

Durch den Einsatz dieser Reporterviren in Kombination mit verschiedenen Mikroskopietechniken und biochemischen Analysen konnte die räumliche und zeitliche Organisation der HCV Assemblierung und Virusfreisetzung untersucht werden. HCV Strukturproteine und Replikationskomplexe kolokalisieren initial an Lipidspeicherorganellen, den sogenannten *lipid droplets* (LD). Gemeinsam mit Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) stellen diese eine Oberfläche für den Zusammenbau von Viruspartikeln dar. HCV wird dann ausgehend vom ER in vesikulären Strukturen und unter Beteiligung früher Endosomen sekretiert.

Des Weiteren legen die Daten dieser Dissertation nahe, dass HCV zusätzlich zur gerichteten Sekretion viraler Partikel die Virusfreisetzung durch einen lytischen Schritt induziert. Die HCV Pathogenese kann kausal auf den Tod von Leberzellen zurückgeführt werden. Daher könnte diese Beobachtung eine wichtige Erkenntnis zum besseren Verständnis der Krankheitsentstehung im Rahmen der HCV Infektion sein.

In der Summe ist es erstmalig gelungen, die späten Schritte im HCV Replikationszyklus zu visualisieren. Dabei wurden zwei alternative Wege der Virusfreisetzung beschrieben und charakterisiert. Somit leistet diese Dissertation einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Hepatitis C Virus Infektion.

## Summary

About 170 million people worldwide are infected with the Hepatitis C Virus (HCV). Due to the lack of a preventive vaccine and effective antiviral therapies, HCV infection remains one of the major health threads worldwide. The pathogenic mechanisms of HCV infection are still poorly understood. A recently developed tissue culture system that produces infectious virus progeny has greatly enhanced our current understanding of the HCV life cycle. Nevertheless, important steps i.e. the site of viral assembly, budding and egress remain largely elusive.

In this thesis HCV genomes were modified to express chromophores fused in frame within structural as well as non-structural proteins allowing the discrimination of sites of viral RNA replication from those of structural protein expression. With these fluorescently tagged viruses, viral protein localization and movement was analyzed in living cells over time. Furthermore, correlative microscopy techniques combining fluorescence imaging with electron microscopy provides a system to relocalize infected cells and visualize the localization of viral particles at the ultra-structural level.

Thereby a temporal and spatial organization of structural and non-structural protein expression was observed. Initially, structural proteins and replication complexes colocalized at the ER and at the surface of lipid droplets, which seem to act as an assembly scaffold. Later, structural proteins separated from non-structural proteins and localized to vesicles staining positive for early endosomes. Functional analyses confirmed an important role of early endosomes in viral egress and ultra-structural analyses demonstrates the presence of HCV particles in intracellular vesicles. Therefore HCV seems to bud through the ER into vesicular structures and is released dependent on the endosomal pathway.

Further microscopical and biochemical studies suggest an alternative, apoptosis-dependent lytic step in HCV release. Since HCV associated liver injury is directly related to cell death, this finding could have important implications for HCV pathogenesis.

In sum, HCV assembly and egress was successfully visualized for the first time. Thereby two alternative pathways of HCV release were identified and characterized. Thus, this thesis provides important contributions to the understanding of the HCV viral life cycle.

## 1 Einleitung

Eine Leberentzündung, die medizinisch als Hepatitis (griechischen *hepar* = Leber und *titis* = Entzündung) bezeichnet wird, kann auf unterschiedliche Faktoren zurückgeführt werden. Eine wichtige Aufgabe der Leber ist es, Giftstoffe wie Alkohol und Arzneimittel abzubauen. Wird sie allerdings auf Dauer zu stark belastet, kann sie geschädigt werden. Die Hauptursachen für die Ausbildung schwerwiegender Lebererkrankungen sind, neben einem erhöhten Alkohol- und/oder Fettkonsum, häufig virale Infektionen. Bereits in den 70er Jahren konnten die Hepatitis A (HAV) und B (HBV) Viren als Auslöser identifiziert werden, jedoch ließ sich bei etwa 65% der Patienten die Hepatitis nicht auf eine Infektion mit einem dieser beiden Viren zurückführen. Solche Fälle wurden als Nicht-A/Nicht-B Hepatitis bezeichnet (*non-A, non-B hepatitis* (NANBH); Feinstone *et al.*, 1975). 1989 konnte die Arbeitsgruppe um M. Houghton erstmalig mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungsmethoden das Hepatitis C Virus (HCV) als Erreger der NANBH identifizieren und charakterisieren (Choo *et al.*, 1989). Anders als bei Hepatitis A und B ist es bis heute noch immer nicht gelungen einen Impfstoff gegen die Hepatitis C Infektion zu entwickeln.

### 1.1 Das Hepatitis C Virus

#### 1.1.1 Klassifizierung

Das Hepatitis C Virus gehört zu der Familie der *Flaviviridae*, die sich in drei Gruppen unterteilt: die Flaviviren, die Pestiviren und die Hepaciviren.

Zu den Flaviviren gehört unter anderem der Namensgeber der Familie, das Gelbfieber-Virus (YFV), dessen Bezeichnung sich auf die Hautverfärbungen im Zuge einer Infektion zurückführen lässt (lat. *flavus* = gelb). Aber auch das Dengue Virus (DENV), das Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus (FSME), das West-Nil Virus (WNV) und das Japanische B-Enzephalitis Virus, werden in diese Gruppe gezählt, die über Arthropoden als Vehikel verbreitet werden. Die Pestiviren, zu denen das SP-Virus (klassische Schweinepest; CSFV), das BVD/MD-Virus (Bovine Virusdiarrhoe) und die *Border Disease* der Schafe gehören und in denen sich ausschließlich tierpathogene Vertreter finden lassen, werden, wie die Hepaciviren, über unbelebte Vehikel oder direkten Kontakt übertragen.

Die Gruppe der Hepaciviren wird nur durch zwei Vertreter gebildet: Das Hepatitis C Virus, mit dem Menschen als alleinigem Wirt und das GB Virus B (GBV-B), dessen natürlicher Wirt Krallenaffen sind (Stapleton *et al.*, 2011).

Es existieren sechs verschiedene Genotypen von HCV, die sich in ihrer Nukleotidsequenz um mehr als 30% unterscheiden, mit über 100 Subtypen, die ihrerseits wiederum eine Variabilität von über 20%

aufweisen (NIH, 2002; Simmonds *et al.*, 2005). Diese Variabilität kann durch die sehr hohe Mutationsrate und einer Produktion von ca.  $10^{12}$  Partikel pro Individuum und Tag erklärt werden (Neumann *et al.*, 1998). Außerdem besitzt die virale RNA-abhängige RNA Polymerase keine Korrekturfunktion (Neumann *et al.*, 1998). Die beträchtliche genetische Heterogenität aufgrund der Mutationsrate fördert die Rate an chronischen Infektionen und ist vermutlich der Grund für die Schwierigkeiten in der Impfstoffentwicklung und das häufige Versagen einer Therapie.

### 1.1.2 Epidemiologie und Übertragung

Die Infektion mit HCV ist weltweit eine der häufigsten Ursachen chronischer Lebererkrankungen. Sie kann zu Leberzirrhose und dem hochaggressiven Leberzellkarzinom führen, was letztendlich eine Lebertransplantation erforderlich macht. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge sind 130 bis 170 Millionen Menschen, also ca. 3% der Weltbevölkerung (Cooper *et al.*, 1999; WHO, 1999; NIH, 2002) mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Die Häufigkeit des Auftretens von HCV ist regional sehr unterschiedlich (vgl. Abb. 1). In Deutschland beispielsweise liegt die Prävalenz dieses Virus bei 0,4%, was etwa 500.000 Infizierten entspricht. Jährlich kommen mehrere tausend Neuinfektionen hinzu (Palitzsch *et al.*, 1999; Thierfelder *et al.*, 1999; RKI, 2010).

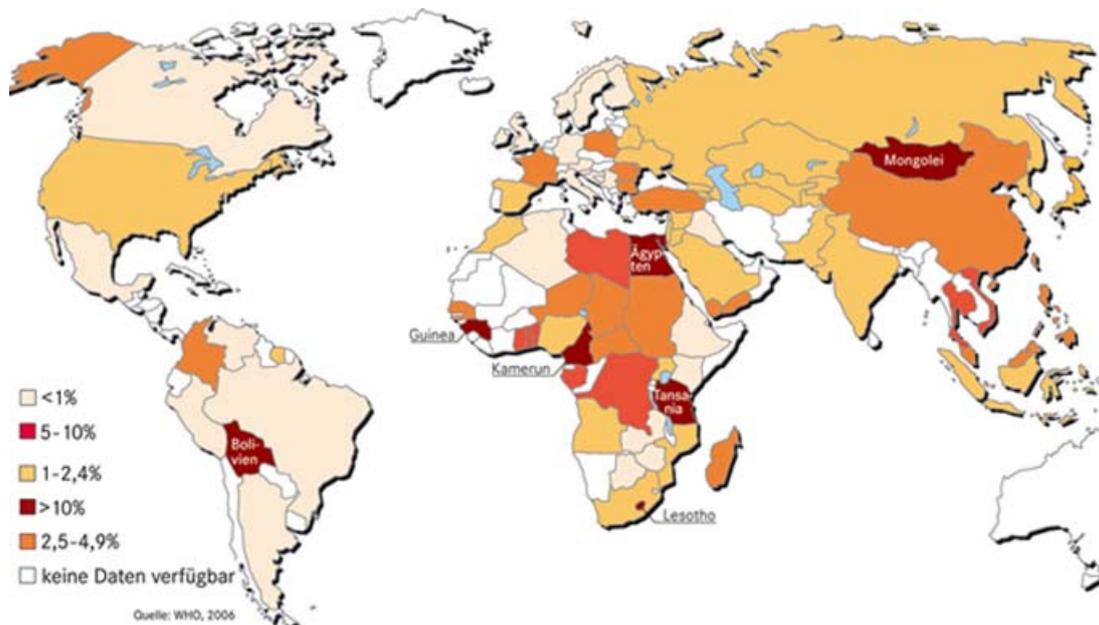


Abb. 1: Weltweite Verbreitung von HCV. (WHO, 2006)

HCV wird vor allem parenteral, also durch direkten Blutkontakt übertragen. Es verbreitete sich weltweit vor allem im späten 20. Jahrhundert über intravenösen Drogenkonsum und mehrfach verwendetes, häufig unsteriles Injektionsbesteck, besonders in Nichtindustrieländern (Armstrong, 2003). In Ägypten liegt die HCV-Antikörper-Prävalenz sogar bei bis zu 20%, was hier auf eine in den 80er Jahren durchgeführte Massenkampagnen parenteraler Therapien gegen die Wurmkrankheit Bilharziose mit kontaminierten medizinischen Geräten zurückgeführt werden kann (Frank *et al.*,

2000). Ein weiteres Beispiel für die lokale Verbreitung von HCV ist die Infektion schwangerer Frauen Ende der 70er Jahre durch eine Anti-D-Immunprophylaxe in der DDR (Meisel *et al.*, 1995; Wiese *et al.*, 2000) und in Irland (Power *et al.*, 1995). Eine solche Antikörperbehandlung wird rhesusnegativen Müttern verabreicht, um das ungeborene und möglicherweise rhesuspositive Kind zu schützen.

Vor dem Einführen von sensitiven Standardtests 1992 gehörten Blutprodukte und vor allem Bluttransfusionen zur Hauptansteckungsquelle. In historischen Kohorten waren 10% oder mehr der Patienten, die eine Bluttransfusion erhalten hatten, HCV positiv (Alter *et al.*, 1989; Heintges und Wands, 1997). Die Hochrisikogruppe der intravenösen Drogenkonsumenten und Personen mit Bluterkrankheit, die vor 1992 mit Blutgerinnungsmitteln behandelt worden sind, weisen die höchste Seroprävalenz von 70-90% auf (NIH, 2002). Heute gelten Blutprodukte in Industrieländern allerdings als sicher (Busch *et al.*, 2003; Pomper *et al.*, 2003). Aktuell stellt die Mehrfachbenutzung von kontaminiertem Spritzbesteck durch Drogenabhängige den Hauptübertragungsweg (80%) dar. Jedoch sind ca. 20% aller Neuinfektionen noch immer unbekanntes Ursprungs (Heintges und Wands, 1997).

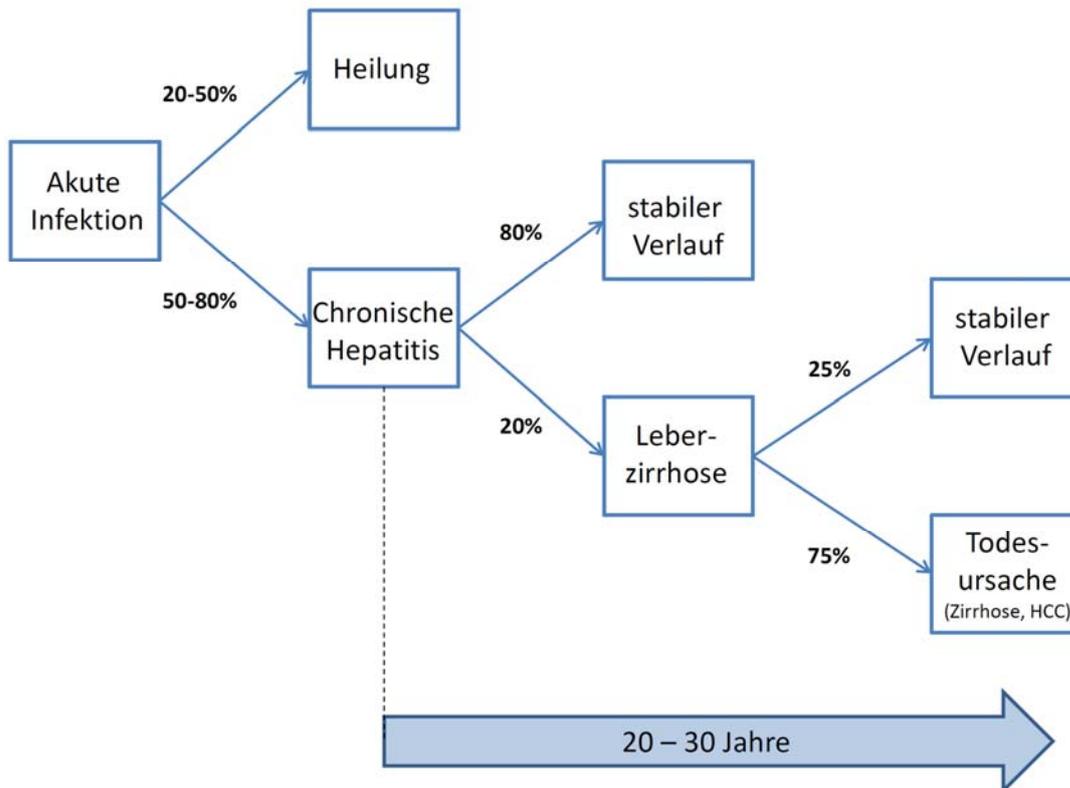
Anders als häufig vermutet gilt eine Übertragung der Hepatitis C Viren über Sexualkontakt als unwahrscheinlich (Vandelli *et al.*, 2004).

### **1.1.3 Krankheitsverlauf und Therapie**

Eine der Bezeichnungen für Hepatitis C ist „stille Epidemie“. Der Grund hierfür ist das kaum vorhandene öffentliche Bewusstsein für das Virus und der schleichende Infektionsverlauf. Dreiviertel aller akuten Infektionen bleiben aufgrund der milden Symptome oft unentdeckt. Dies birgt die Gefahr, dass das Virus unbemerkt weitergegeben werden kann (Alter und Moyer, 1998). Das klassische Erscheinungsbild einer Hepatitis mit Übelkeit und Gelbsucht tritt nur selten auf.

In 60 bis 80% aller Fälle verläuft eine Infektion chronisch, was bei einem Viertel der Betroffenen nach wenigen Jahren zur Leberzirrhose und bei ca. 5% aller Zirrhosepatienten pro Jahr zum Leberzellkarzinom (*hepatocellular carcinoma*, oder HCC) führt (Pawlotsky, 2004; Perz *et al.*, 2006). Die immensen Leberschäden und deren Folgen führen bei dreiviertel der Patienten mit Leberzirrhose zum Tod (vgl.: Abb. 2).

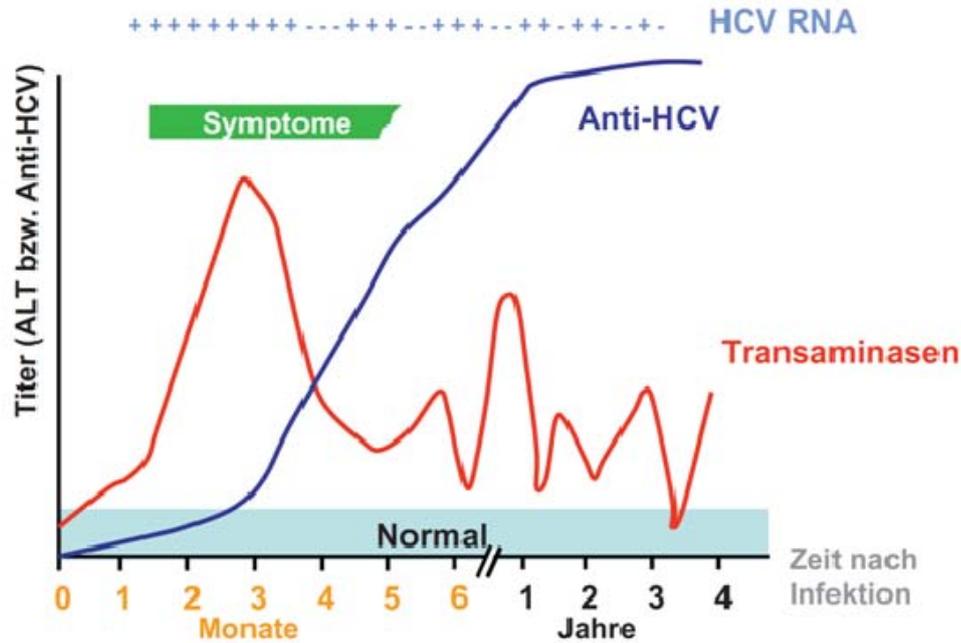
Während der ersten 6-12 Wochen, der akuten Phase der Infektion, steigt die Menge an bestimmten Leberenzymen, den Transaminasen (oder Aminotransferasen), deutlich an (vgl. Abb. 3). Diese Enzyme, hier insbesondere die Alanin Aminotransferase (ALT), befinden sich bei gesunden Menschen innerhalb der Leberzelle. Wird die Leber aber geschädigt, werden die Enzyme ins Blut freigesetzt und signalisieren damit einen Leberschaden. Ein bis drei Wochen nach Exposition kann die HCV RNA mittels PCR detektiert werden, frühestens acht Wochen nach Infektion sind HCV Antikörper nachweisbar (NIH, 2002; Pawlotsky, 2004).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Verlaufes einer Hepatitis C Infektion ohne Behandlung** (in Anlehnung an Pawlotsky, 2004).

Eine Behandlung der Patienten innerhalb der akuten Phase mit Interferon  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) verhindert die Entwicklung einer chronischen Infektion in ca. 90% der Fälle (Jaeckel *et al.*, 2001; Wiegand *et al.*, 2006). Oft ist diese akute Phase jedoch symptomlos und wird daher nicht bemerkt. Während einer symptomatischen akuten Phase kann es auch zur spontanen Selbstheilung kommen, in einigen Studien bei bis zu 50% der Patienten (Gerlach *et al.*, 2003; Hofer *et al.*, 2003). Eine Heilung bedeutet per Definition, dass sechs Monate nach Beendigung einer Therapie keine HCV RNA mehr nachweisbar ist. In 99% der Fälle bleibt dieser Befund auch fünf Jahre nach Ende der Therapie negativ (Manns M, 2008).

In den meisten Fällen (50-80%, vgl. Abb. 2) kommt es allerdings zum chronischen Verlauf der Infektion. Diese besteht per Definition dann, wenn virale RNA über einen Zeitraum von sechs Monaten und darüber hinaus nachweisbar ist. Auch die Symptome der chronischen Hepatitis sind mild, unspezifisch und schwer als solche zu diagnostizieren (Merican *et al.*, 1993; Lauer und Walker, 2001). Die Menge an Transaminasen ist je nach Patient sehr unterschiedlich (Puoti *et al.*, 2002) und es gibt nur eine schwache Korrelation zwischen der Konzentration an Transaminasen und dem leberhistologischen Befund. So zeigen auch Patienten mit normalem Serumspiegel an Transaminasen Zeichen chronischer Entzündungen in der Leber. Außerdem reflektiert die Normalisierung der Konzentration der Transaminasen nach Interferontherapie nicht notwendigerweise eine verbesserte Leberhistologie (Mathurin *et al.*, 1998; NIH, 2002).



**Abb. 3: Serodiagnose der HCV Infektion** (typische Verlaufsmuster; Bartenschlager, 2006).

Der Krankheitsverlauf einer chronischen Hepatitis C Infektion ist abhängig von vielen wirtstypischen Faktoren. Beispielsweise stellen Alter und Geschlecht Risikofaktoren dar. Bei Männern und Menschen im Alter über 50 Jahren kommt es zu einer schnelleren Ausbildung von Leberentzündungen (NIH, 2002; Svirtlih *et al.*, 2007). Außerdem erhöhen schon kleinen Mengen an Alkohol das Risiko einer Fibrose bei chronischer Hepatitis C drastisch (Gitto *et al.*, 2009). Eine aggressivere Progression der Krankheit ist ebenfalls bei Koinfektionen, z.B. mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) oder dem Hepatitis B Virus (HBV) zu beobachten (NIH, 2002; Shepard *et al.*, 2005). Die Rolle viraler Faktoren ist unklar, sie scheint aber nicht signifikant zum Krankheitsverlauf beizutragen, da keine Korrelation zwischen den verschiedenen Genotypen und Quasispezies von HCV und dem phänotypischen Erscheinungsbild der Krankheit gefunden werden kann. Die sichersten Prognosen zum Krankheitsverlauf können bis heute durch Leberbiopsien getroffen werden (Gebo *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu anderen Viren wie HIV, Herpes Simplex Virus oder Cytomegalievirus stehen für die Behandlung von Hepatitis C Infektionen noch keine virusspezifischen Therapeutika zur Verfügung. Die Therapie besteht momentan aus einer Kombination an pegyliertem, also Polyethylenglykol (PEG) gebundenem, Interferon (IFN)- $\alpha$  und Ribavirin, mit der ca. 40% der Patienten mit einer HCV Genotyp 1 Infektion und ca. 80% der Patienten mit einer HCV Genotypen 2 und 3 Infektion geheilt werden können (NIH, 2002). Interferon  $\alpha$  ist ein körpereigenes Zytokin mit vielfachen antiviralen Eigenschaften. Zur Bekämpfung von HCV wird synthetisches Interferon verabreicht. Pegyliertes Interferon  $\alpha$  hat eine verbessertes pharmakokinetisches Profil, womit eine einmalige Einnahme der Medikation pro Woche ausreicht (Manns *et al.*, 2001; Hadziyannis *et al.*, 2004). Ribavirin ist ein Nukleosid Analogon (*nucleoside reverse transcriptase inhibitor* oder NRTI). Es blockiert die Bildung

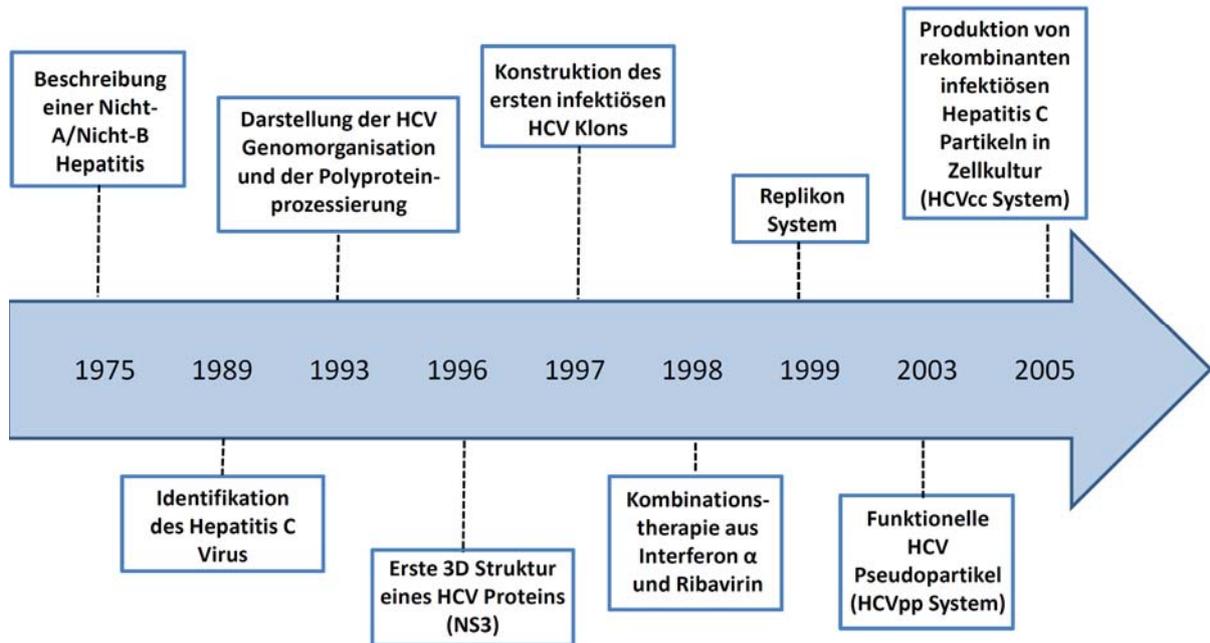
und Speicherung des Nukleotids Guanin und inhibiert die virale Replikation durch Hemmung der DNA und RNA Synthese. Ribavirin wird auch bei vielen anderen Virusinfektionen als Medikation eingesetzt, wie beispielsweise bei Infektionen mit HIV, Influenza Virus, Lassa Virus oder Tollwut. Es wird ausschließlich in Kombination mit Interferon verabreicht. Diese Therapie hat allerdings oftmals starke Nebenwirkungen, wie z.B. grippeartige Symptome, Übelkeit, Blutarmut, Abgeschlagenheit, Depressionen, Suizidgedanken und Autoimmunerkrankungen (Janssen *et al.*, 1994; Wesche *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2007; Andriulli *et al.*, 2008).

Durch intensive Forschung konnten bereits neue Ansätze für eine spezifische HCV Therapie gefunden werden. Die STAT-C (*specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C*) Inhibitoren (Lohmann *et al.*, 1999; Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005) befinden sich momentan in klinischen Phasen und richten sich unter anderem gegen die virale Protease oder Polymerase (Uprichard, 2010).

### 1.1.4 Geschichte der HCV Grundlagenforschung

Nach der ersten Beschreibung des Hepatitis C Virus im Jahr 1989 (Choo *et al.*, 1989) dauerte es über 15 Jahre bis zur Entwicklung eines Zellkultursystems, welches die Produktion infektiösen Materials ermöglicht (vgl. Abb. 4). Dieses sogenannte HCVcc (*cell culture grown HCV*) System stellt einen Meilenstein in der Grundlagenforschung des Hepatitis C Virus dar und schuf die Basis zur Erforschung des gesamten Replikationszyklus (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005). Zuvor wurden mit Hilfe von Bioinformatik, der Infektion von Schimpansen (Kolykhalov *et al.*, 1997) und biochemischen Analysen die Struktur des Genoms, die Polyproteinprozessierung und einige Funktionen viraler Proteine erforscht (Moradpour *et al.*, 2007; Tellinghuisen *et al.*, 2007). Durch das Replikon System konnte erstmals die Replikation viraler RNA untersucht werden (Lohmann *et al.*, 1999). Diese Replikons kodieren für ein Resistenzgen anstelle der viralen Strukturproteine. Nach der Elektroporation in die humane Hepatomazelllinie Huh-7 erlaubt dies die Selektion Replikon-positiver Zellen und damit in diesen die Analyse der HCV RNA Synthese. Durch Einsatz des Replikon Systems konnte die HCV permissive Zelllinie Huh7.5 generiert werden. Ursprüngliche Huh7-Zellen wurden mit HCV-Replikons transfiziert und über eine Behandlung mit IFN- $\alpha$  geheilt. Eine der generierten Zelllinien (Huh7.5) zeigte Adaptationen, die sie für die HCV-Infektion permissiver machten (Blight *et al.*, 2002). Die Infektion und der Eintritt der Viren in die Zelle konnten durch die Entwicklung von auf Retroviren basierenden Pseudopartikeln (*HCV pseudo particles*; HCVpp) mit funktionellen HCV Glykoproteinen auf der Oberfläche studiert werden (Bartosch *et al.*, 2003).

Das Zellkulturmodell, welches in den Jahren 2005 und 2006 entwickelt wurde, bietet die Möglichkeit den vollen Replikationszyklus und damit auch Prozesse, wie Zusammenbau und Ausschleusung viraler Partikel, zu untersuchen.



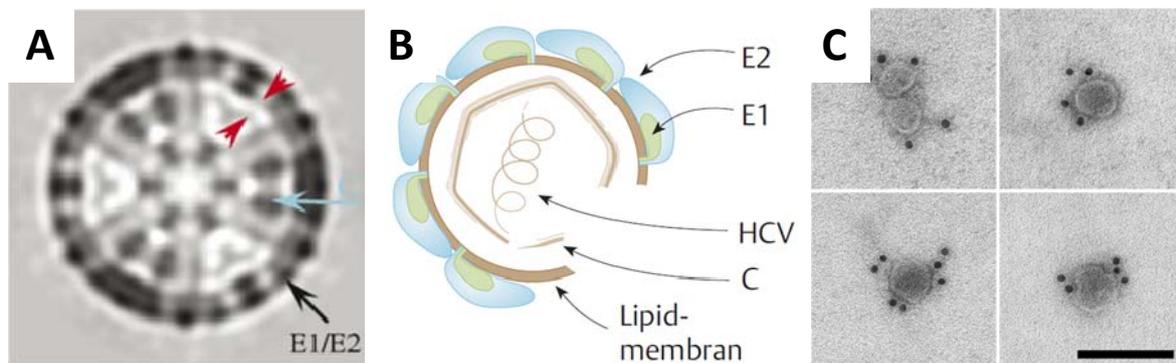
**Abb. 4: Meilensteine der Hepatitis C Virus Grundlagenforschung** (in Anlehnung an Moradpour *et al.*, 2007).

Dazu waren eine permissive Zelllinie und ein Virus notwendig, welches sich in dieser vermehrt. Die Gruppe um Wakita zeigte 2005, dass ein Isolat aus einem japanischen Patienten mit einer seltenen fulminanten Hepatitis („*Japanese Fulminant Hepatitis 1*“; JFH1) in Huh-7-Zellen nicht nur effizient replizierte, sondern auch Viruspartikel (*cell culture grown HCV*) in das Kulturmedium sezernierte. Diese waren nicht nur in Zellkultur, sondern auch *in vivo* infektiös. In der Folge wurde die Effizienz des Infektionssystems durch die Adaptation von JFH1 an die Huh-7 Zellen und durch die Konstruktion von JFH1-Varianten mit Strukturproteinen anderer Virusisolate wesentlich gesteigert (Lindenbach *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005; Pietschmann *et al.*, 2006).

Das HCVcc Modell basiert auf dem Genotyp 2a und alle Untersuchungen werden in Derivaten der Zelllinie Huh-7 durchgeführt. Diese Bedingungen reflektieren die *in vivo* Situation in Hepatozyten nur begrenzt. Zwar arbeiten viele Gruppen an Modellen, die die Infektion von HCV in primären Leberzellen ermöglichen (Buck, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Ploss *et al.*, 2010), jedoch ist die Etablierung eines robusten Systems bisher nicht geglückt. Die für die Grundlagenforschung und Wirkstoffentwicklung wichtige Etablierung eines Kleintiermodells ist aufgrund des sehr engen Wirtstropismus von HCV problematisch. Trotzdem konnten bereits Fortschritte beispielsweise durch Adaptation des Virus an den neuen Wirt (Bitzegeio *et al.*, 2010) oder durch Xenotransplantation (Meuleman *et al.*, 2008) zur Entwicklung eines robusten Mausmodells gemacht werden (Ploss und Rice, 2009). Somit ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt das in dieser Arbeit verwendete HCVcc Modell immer noch das aktuellste und am besten geeignete System für die Hepatitis C Virus Grundlagenforschung.

### 1.1.5 Morphologie

Das Hepatitis C Virus ist ein kleines, umhülltes Virus mit einem einzelsträngigen RNA Genom in positiver Orientierung (ss(+)RNA). Die direkte Visualisierung einzelner HCV Partikel in Zellen stellte sich als enorm schwierig heraus. Es wurde aufgrund verschiedener Filtrationstechniken von einem Durchmesser von ca. 50 nm ausgegangen (Bradley *et al.*, 1985; Yuasa *et al.*, 1991; Burnouf *et al.*, 2003). Erst 2007 wurde die erste 3D Rekonstruktion von Hepatitis C Virus-ähnlichen Partikeln veröffentlicht, die in Insektenzellen produziert wurden (Yu *et al.*, 2007; s. auch Abb. 5 A) und diese Größe bestätigt. Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass sich das virale Oberflächenprotein E1 in Form von *spikes* an der Außenseite des Virions befindet. Mit Hilfe von Kryoelektronenmikroskopie konnten ca. 60 nm große, sphärische, infektiöse und in Zellkultur gewonnene HCV Partikel dargestellt werden. Diese sind von einer Lipiddoppelmembran umgeben (Gastaminza *et al.*, 2010; vgl. Abb. 5 C).

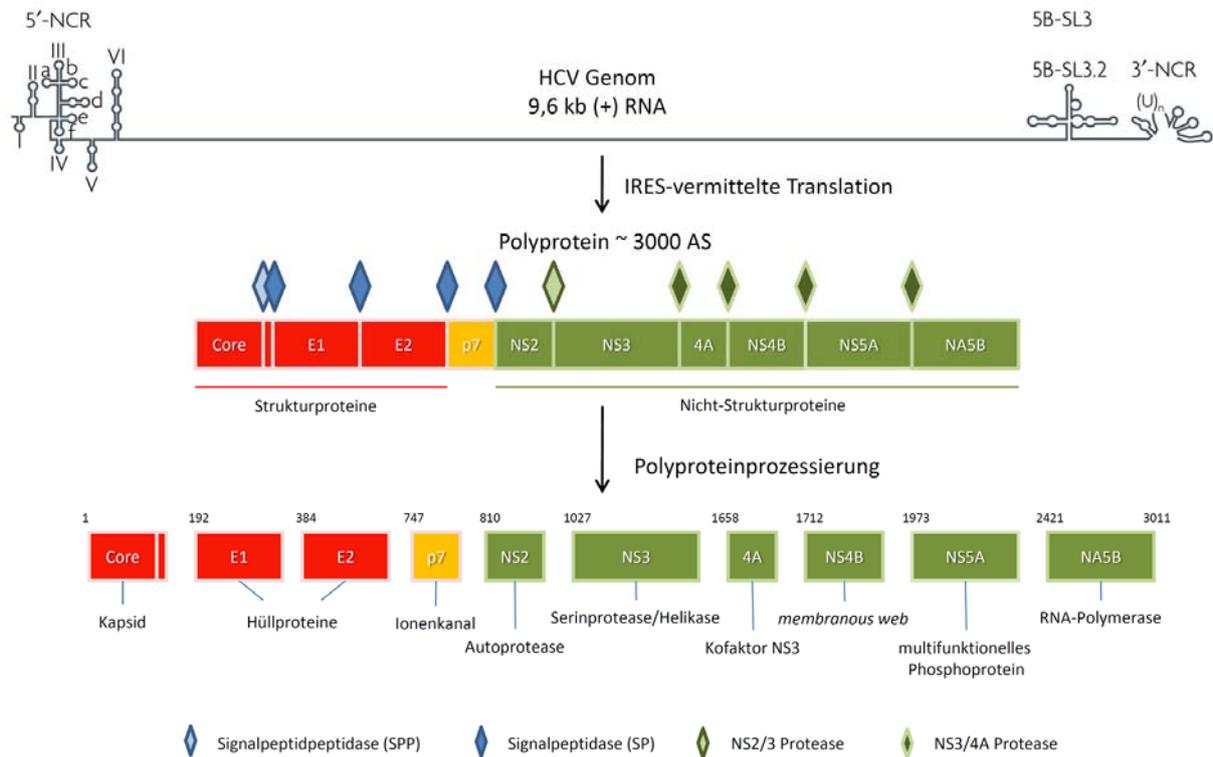


**Abb. 5: Morphologie des HCV Partikels.** **A:** Der 70 nm dicke kryo-EM Schnitt eines HCV-LP Partikels zeigt multiple Schichten in der Organisation des Viruspartikels. Rote Pfeile: Lipiddoppelschicht; blauer Pfeil: Kapsid; schwarzer Pfeil: Glykoproteine E1 und E2 (Yu *et al.*, 2007). **B:** Modell der Virusstruktur; E1,E2: Oberflächenproteine; C: Core; HCV: virales RNA Genom (Pietschmann *et al.*, 2008). **C:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Virionen mit einer 6-nm Gold Antikörpermarkierung des E2 Proteins; Balken: 100 nm (Gastaminza *et al.*, 2010).

Die Dichte der Virionen spielt für die Infektion eine entscheidende Rolle. So sind Viruspartikel mit einer geringen Dichte (<1,06 g/mL) weitaus infektiöser als Partikel höherer Dichte. Da sie mit Lipoproteinen (VLDL: *very low density lipoproteins*; LDL: *low density lipoproteins*) komplexiert vorliegen, spricht man auch von Lipovirionpartikeln (Andre *et al.*, 2002). Der LDL-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle beim Eintritt der Virionen in die Zelle und zudem könnten diese Lipoproteine virale Epitope maskieren und das Hepatitis C Virus so vor dem Immunsystem schützen.

### 1.1.6 Genomorganisation und virale Proteine

Das (+)ssRNA Genom des Hepatitis C Virus hat eine Länge von ca. 9600 Nukleotiden und besteht aus einer 5' nichtkodierenden Region (5'-NCR; *non coding region*), einem offenen Leserahmen, der für das Vorläuferprotein von ca. 3000 Aminosäuren kodiert und einer 3' nichtkodierenden Region (3'-NCR; *non coding region*; s. Abb. 6).



**Abb. 6: Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des Hepatitis C Virus.** Das Hepatitis C Virus enthält ein einzelsträngiges 9,6 kb positiv polarisiertes RNA Genom. Durch IRES-vermittelte Translation entsteht ein Vorläuferpolyprotein, welches mit Hilfe zellulärer und viraler Proteasen prozessiert wird. Dabei entstehen vier strukturelle (Core, E1, E2, p7) und sechs nichtstrukturelle (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) Proteine. IRES: *internal ribosome entry site*; NCR: *noncoding region*; E1/2: *envelope*; NS: *nonstructural* (modifiziert nach Moradpour *et al.*, 2007).

Die 5' NCR ist zwischen verschiedenen HCV Isolaten hochkonserviert und beinhaltet eine IRES (*internal ribosome entry site*), welche die Cap-unabhängige Translation der viralen RNA ermöglicht. Die 3' NCR besteht aus einer variablen Region, einem kurzen Poly(U)-Teil und einer hochkonservierten RNA Region, die als *X-tail* (Kolykhalov *et al.*, 1996) bezeichnet wird. Die konservierten Bereiche sind sowohl im Zellkulturmodell (Friebe und Bartenschlager, 2002) als auch *in vivo* (Kolykhalov *et al.*, 2000) erforderlich für die Replikation. Eine wichtige Interaktion des *X-tail* mit einem kreuzförmigen RNA Element in der Region des NS5B, dem 5B-SL3.2, bildet eine sogenannte *kissing loop* Konformation, die für die Replikation in Zellkultur essenziell ist (Friebe *et al.*, 2005).

Die virale RNA wird in ein Vorläuferpolyprotein umgeschrieben, welches während und nach der Translation durch zelluläre und virale Proteasen in zehn reife Proteine gespalten wird. Die drei Strukturproteine Core, E1, E2 und das p7 Protein werden durch die Signalpeptidase des Endoplasmatischen Retikulums (ER) prozessiert, während die Nicht-Strukturproteine von den zwei viralen Proteasen NS2-3 und NS3-4A gespalten werden.

Das RNA-bindende Coreprotein bildet das Kapsid um das virale RNA Genom. Nach der ersten Spaltung durch die zelluläre Signalpeptidase (SP) am ER enthält das unreife Core Vorläuferprotein (191 Aminosäuren) noch immer die Signalsequenz des E1 Proteins am C-Terminus. Eine zweite

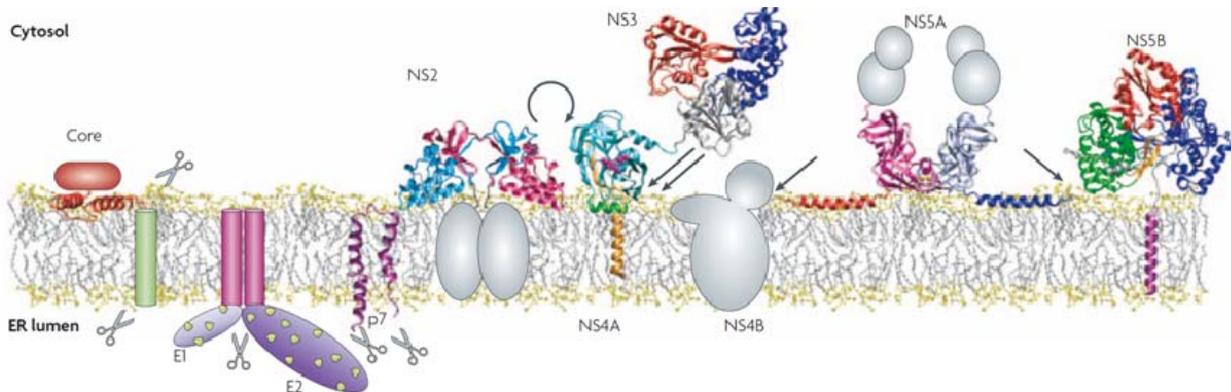
Prozessierung durch eine Signalpeptidpeptidase (SPP) führt zur Entstehung des reifen, aus 174 Aminosäuren bestehenden Coreproteins (McLauchlan *et al.*, 2002). Neben seiner Funktion als Kapsidprotein ist es auch am Aufbauprozess des Viruspartikels und an der Regulation der Translation beteiligt (Ait-Goughoulte *et al.*, 2006). Zum Anderen wird vermutet, dass es einen Einfluss auf die zelluläre Signaltransduktion, die Apoptose, den Lipidmetabolismus und die Kanzerogenität hat (Tellinghuisen und Rice, 2002). Core ist ein typisches Membranprotein und besteht aus zwei Domänen. Die erste Domäne (DI) ist hydrophil und für die RNA Bindung, die Proteinmultimerisierung und die transkriptionelle Regulation verantwortlich (McLauchlan, 2000). Die C-terminale, hydrophobe Domäne (DII) stabilisiert D1 und ist mit Lipidtröpfchen (*lipid droplets*) assoziiert (Boulant *et al.*, 2006; Miyanari *et al.*, 2007).

Die Glykoproteine E1 und E2 bilden einen nicht-kovalenten Komplex an der Oberfläche der Virushülle und sind für die Anheftung und das Eindringen des Virions in die Wirtszelle verantwortlich. Beide Typ 1 Transmembranproteine werden im Lumen des ER posttranslational glykosyliert (Duvet *et al.*, 2002). Die Transmembrandomäne hält die Proteine im ER und ist für ihre Heterodimerisierung zuständig (Lavie *et al.*, 2007). Die Glykane der hochglykosylierten N-terminalen Ektodomänen von E1 und E2 sind wichtig deren Faltung, den Viruseintritt (Goffard *et al.*, 2005) und spielen eine entscheidende Rolle für die Maskierung immunogener Epitope (Helle *et al.*, 2007).

Zwischen der kodierenden Region für die Struktur- und die Nicht-Strukturproteine befindet sich das nur 63 Aminosäuren große p7-Protein. Dieses integrale Membranprotein oligomerisiert und ist für die Bildung und Freisetzung neuer infektiöser Viruspartikel essenziell (Steinmann *et al.*, 2007; Wozniak *et al.*, 2010). P7 stellt aufgrund seiner Sensitivität gegenüber niedermolekularen Inhibitoren eine vielversprechende Zielstruktur für eine antivirale Therapie dar (Griffin, 2010; Liang und Li, 2010). Erst kürzlich wurde postuliert, dass p7 mit dem Nicht-Strukturprotein NS2 assoziiert und diese Interaktion wichtige funktionelle Relevanz beim Prozess der Virusassemblierung hat (Tedbury *et al.*, 2010).

Der C-Terminus des ersten Nicht-Strukturproteins, NS2, bildet mit dem N-Terminus von NS3 eine Autoprotease und ist für die Spaltung dieser beiden Proteine vom Vorläuferprotein verantwortlich (Santolini *et al.*, 1995). Neben seiner Proteaseaktivität wird auch NS2, wie p7, eine Rolle in der Produktion von Partikeln zugesprochen (Jones *et al.*, 2007). Mit Hilfe der verschiedenen Modellsysteme zur Untersuchung von HCV konnte herausgefunden werden, dass Core, E1 und E2, zusammen mit der viralen RNA und einer von der Wirtszelle abgeleiteten Membran das Virion formen und die Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B für die Replikation der RNA sowohl notwendig, wie auch ausreichend sind (Moradpour *et al.*, 2007). Erst vor kurzem wurde postuliert, dass NS2 vermutlich eine wichtige Rolle bei der Regulation von Replikation und Assemblierung hat. Es bindet

sowohl Struktur- wie auch Nicht-Strukturproteine und interagiert direkt mit E1, E2, p7 und NS3 (Ma *et al.*, 2011; Stapleford und Lindenbach, 2011). Eine Interaktion mit NS5A wird diskutiert.



**Abb. 7: Struktur und Membranassoziation der HCV Proteine.** Symbole: Scheren: zelluläre Peptidasen; gebogener Pfeil: Aktivität der NS2-3 Protease; schwarze Pfeile: Prozessierung durch NS3-4A Protease; bekannte Proteinstrukturen sind als Ribbon-Diagramm dargestellt; unbekannte Strukturen erscheinen als weiße Ovale in der vermuteten Größe. Das Coreprotein (rot) enthält zwei amphipathische Helices, die über eine hydrophobe Schleife miteinander verbunden sind. Das E1 Signalpeptid (grün) wird durch eine zelluläre Signalpeptidpeptidase abgespalten. Das E1E2 Glykoprotein Heterodimer ist über die C-terminale Transmembrandomäne miteinander verbunden. Grüne Punkte deuten Glykosylierungsstellen an. Das Viroporin p7 ist als Monomer in violett dargestellt. Die katalytische Domäne von NS2 ist als Dimer in magenta und blau gezeigt. Die Proteasedomäne von NS3 (cyan) ist assoziiert mit der NS4A Proteasedomäne und dessen N-terminalen Transmembrandomäne (gelb) dargestellt. Die Helikasedomäne von NS3 ist silber, rot und blau markiert. Dies zeigt, dass die Helikasedomäne nicht länger mit der Proteasedomäne von NS3 interagiert, wenn diese mit der amphipathischen Helix (grün) mit NS4A assoziiert. NS4B ist mit seiner Transmembrandomäne und der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne gezeigt. Das Dimer aus NS5A Domäne I (magenta und eisblau) mit den N-terminalen amphipathischen Helices (rot und blau) ist in relativer Position zur Membran dargestellt. Domäne II und III sind als weiße Kreise angedeutet. Die RNA-abhängige RNA-Polymerase ist durch die C-terminale Transmembrandomäne mit der Membran assoziiert (Moradpour *et al.*, 2007).

Das multifunktionelle NS3 besteht aus einer N-terminalen Serinprotease und einer C-terminalen RNA-Helikase / NTPase-Domäne (vgl. Abb. 7). Die Proteaseaktivität von NS3 wird durch den Kofaktor NS4A verstärkt. Der NS3-4A-Komplex ist hauptsächlich für die Polyproteinprozessierung der von NS3 *downstream* gelegenen Proteine verantwortlich und demzufolge essenziell für die Entstehung des viralen RNA-Replikationskomplexes (Lindenbach und Rice, 2005). Er ist somit eine Zielstruktur für spezifische Protease-Inhibitoren (Lamarre *et al.*, 2003). Die Serinprotease NS3-4A schneidet und inaktiviert auch zelluläre Proteine. Ein gewisser Teil kolokalisiert beispielsweise mit Mitochondrien (Wölk *et al.*, 2000) und schneidet Cardif, ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch es die RIG-I abhängige antivirale Antwort der Zelle unterbindet (Foy *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005) und somit zur Persistenz und Pathogenese von HCV beiträgt. Die RNA-Helikase / NTPase-Domäne bindet und entwindet die virale RNA während der Replikation (Kim *et al.*, 1995) und wird ebenfalls als Zielprotein für die antivirale Wirkstoffentwicklung in Betracht gezogen (Kwong *et al.*, 2005). Das Nicht-Strukturprotein NS4A dient als Kofaktor für NS3, rekrutiert NS3 zum ER und erhöht dessen Stabilität (Bartenschlager *et al.*, 1995; Wölk *et al.*, 2000).

Ein weiteres Transmembranprotein ist NS4B, welches kotranslational mit der Membran des ER assoziiert (Hugle *et al.*, 2001). Es induziert die Reorganisationen der ER Membran zu sogenannten *membranous web* Strukturen, die für die HCV Replikation wichtig sind (Egger *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2006; Gouttenoire *et al.*, 2010).

Das Nicht-Strukturprotein NS5A wird mehrfach durch zelluläre Kinasen phosphoryliert. Es besteht aus drei Domänen und ist multifunktional. NS5A lokalisiert im Zytoplasma und ist Teil des Replikationskomplexes. Es hat keine enzymatische Funktion, sondern agiert über direkte Interaktion mit viralen und zellulären Proteinen. Es reguliert die virale Replikation und wichtige Signalkaskaden, wie Immunantwort, Zellwachstum und Proliferation (Tellinghuisen und Rice, 2002; Macdonald und Harris, 2004).

Die RNA-abhängige RNA Polymerase NS5B ist die enzymatische Komponente der Replikationsmaschinerie und wurde bereits umfassend charakterisiert (Lesburg *et al.*, 1999; Bressanelli *et al.*, 2002). NS5B hat keine Korrekturfunktion und baut ca. 1 Fehler pro  $10^3$  Nukleotide ein. Damit ist es für die hohe Mutationsrate des Virus verantwortlich. Wie auch bei anderen Viren ist die HCV Polymerase ein Ziel antiviraler Therapien (De Francesco und Migliaccio, 2005).

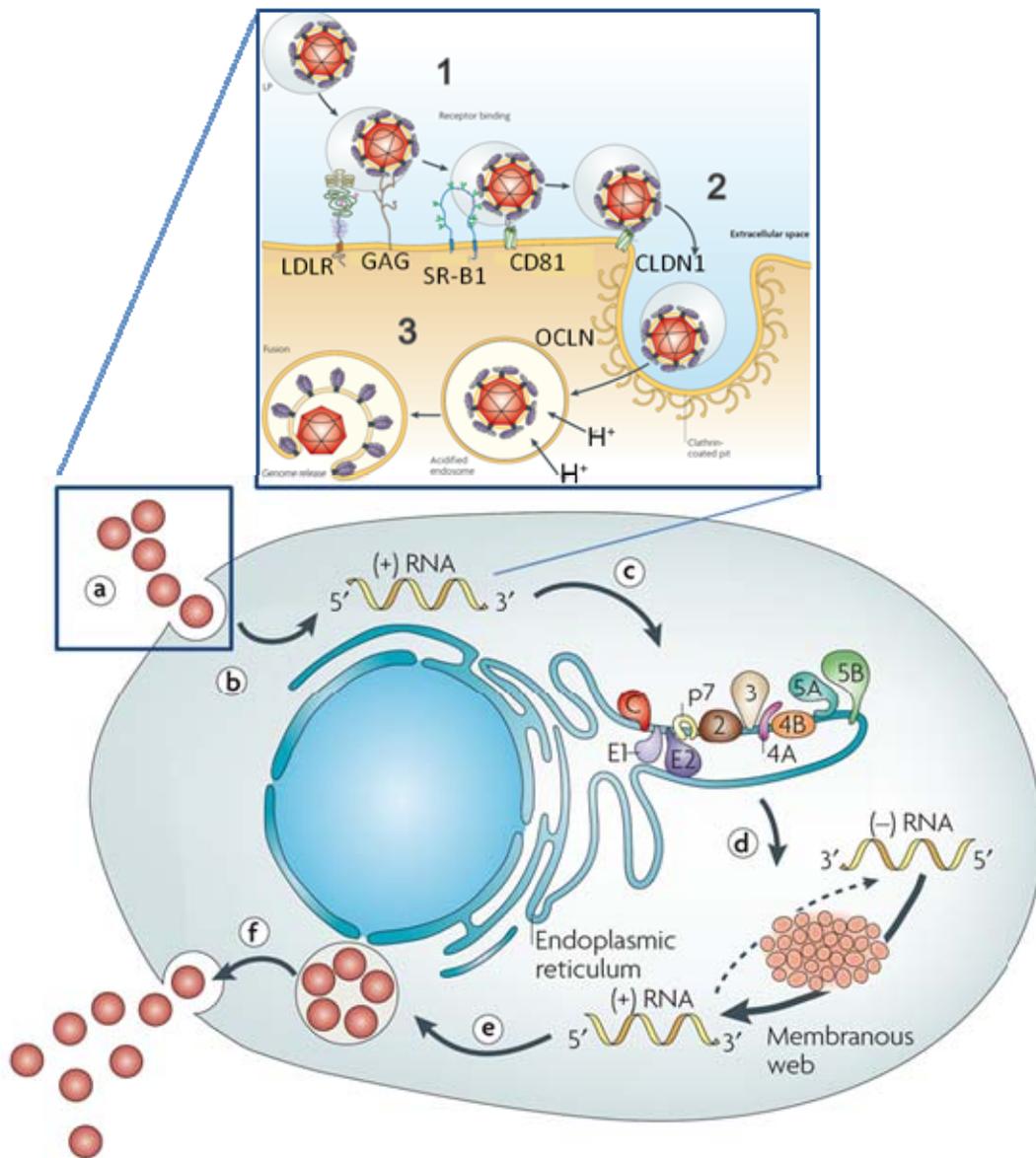
### 1.1.7 Der virale Replikationszyklus

#### 1.1.7.1 HCV Eintritt und RNA Replikation

Die virale Infektion beginnt mit der Anheftung der Viruspartikel an die Zielzelle. Im Falle von Hepatitis C ist dies ein hochorganisierter, komplexer Prozess, der viele verschiedene Wirtsfaktoren einschließt. Bisher wurden sechs Oberflächenproteine gefunden, die am Eintrittsprozess beteiligt sind (vgl. Abb. 8). Der LDL Rezeptor ist vermutlich am ersten Kontakt des Virions, welches mit LDL oder VLDL assoziiert vorliegt, mit der Zelle beteiligt (Agnello *et al.*, 1999; Moradpour *et al.*, 2007). Auch das Glukosaminoglykan (GAG) Heperansufat ist an der frühen Interaktion zwischen Virus und Zelle beteiligt (Barth *et al.*, 2003). HCV Partikel gelangen über die Blutgefäße, die sogenannten Sinusoide, zu den Zielzellen. Vom E2 Glykoprotein können zwei Lektine, DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) und L-SIGN (*liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*) gebunden werden. Diese werden in Sinusoid-assoziierten Zellen exprimiert, fangen vermutlich Viruspartikel ab und leiten sie an Hepatozyten weiter (Gardner *et al.*, 2003; Pöhlmann *et al.*, 2003).

Das Tetraspanin CD81 und SR-BI (*scavenger receptor class B type I*; Scarselli *et al.*, 2002) gelten als primäre Rezeptoren von HCV, binden spezifisch an das Glykoprotein E2 und sind notwendig, aber nicht ausreichend für den Viruseintritt. Für die Bindung an die primären Rezeptoren sind kürzlich zwei weitere essenzielle Korezeptoren, die *tight junction* Proteine Claudin-1 (Evans *et al.*, 2007) und Occludin (Benedicto *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009) entdeckt worden. Vermutlich binden die Virus-

partikel zunächst an den primären Rezeptor und migrieren dann lateral zu den *tight junctions*, wie es beispielsweise von den Coxsackieviren bekannt ist, wo die Korezeptorbindung und schließlich die Aufnahme der Viruspartikel stattfindet (Moradpour *et al.*, 2007).



**Abb. 8: Der Lebenszyklus von HCV.** **a**: Eintritt des Virus; Vergrößerung: **a1**. Anheftung an zelluläre Rezeptoren; **a2**. Viruseintritt über Clathrin-vermittelte Endozytose; **a3** und **b**: Ansäuerung und Entlassung des viralen Genoms ins Zytoplasma; **c**: IRES-vermittelte Translation; Prozessierung des Polyproteins; Bildung des viralen Replikationskomplexes (*membranous web*); **d**: Replikation der RNA; **e**: Zusammenbau der Virionen; **f**: Reifung und Ausschleusung. Translation, Polyproteinprozessierung, *membranous web* Bildung und Replikation sind der Einfachheit halber getrennt dargestellt, finden allerdings in einem engen Raum zueinander statt. GAG, Glukosaminoglykan; LDLR, *low density lipoprotein receptor*; SR-B1, *scavenger receptor class B member 1*; CLDN1, *claudin-1*; OCLN, *occludin*; IRES, *internal ribosome entry site*; LD, *lipid droplets*. Verändert nach Moradpour *et al.*, 2007.

Das Eindringen in die Zelle verläuft über klassische Clathrin-vermittelte Endozytose, Ansäuerung des Endosoms und Fusion von viraler und endosomaler Membran, was zum Entlassen des Kapsids ins Zytoplasma (*uncoating*) führt (Blanchard *et al.*, 2006; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Lavillette *et al.*, 2007). Das RNA Genom kann nun unmittelbar durch Interaktion der IRES-Sequenz mit zellulären

Ribosomeneinheiten translatiert werden. Das resultierende Polyprotein wird durch virale und zelluläre Proteasen in die reifen Struktur- und Nicht-Strukturproteine gespalten (s. Abb. 6 und Kapitel 3.1.6).

Die Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B lagern sich, dirigiert durch NS4B (Gouttenoire *et al.*, 2010), an die umstrukturierte ER-Membran und bilden so einen hochorganisierten Replikationskomplex, der *membranous web* genannt wird (Egger *et al.*, 2002). Die Replikation an veränderten zellulären Membranen zeichnet alle Positiv-Strang RNA Viren aus. Sie nutzen die Membranen unterschiedlicher Organellen, schaffen damit aber immer eine Mikroumgebung, die für ihre Replikation optimal zu sein scheint (Mackenzie, 2005). Innerhalb des Replikationskomplexes von HCV hat zunächst die RNA-abhängige RNA Polymerase NS5B die Aufgabe, komplementäre Minus-Strang RNA aus dem Positiv-Strang RNA Genom zu synthetisieren, die dann ihrerseits ebenfalls als Vorlage für NS5B dient, um im 10-fachen Überschuss neue Positiv-Strang RNA Genome zu amplifizieren (Uprichard, 2010). Bei diesen Prozessen assistiert das Nicht-Strukturprotein NS3 mit seiner Helikasefunktion der Polymerase durch das Entwinden von möglicherweise entstandenen Sekundärstrukturen (Kim *et al.*, 1995).

Eine Vielzahl von zellulären Faktoren ist an der Replikation des Virus beteiligt. So spielt der Lipidmetabolismus und damit einhergehend auch die Fluidität der Membranen für die Replikation eine entscheidende Rolle (Sakamoto *et al.*, 2005; Moradpour *et al.*, 2007).

Zum Beispiel bindet VAP-A (*vesicle-associated membrane protein-associated protein A*), eine Komponente des Vesikeltransports, NS5A und NS5B und steuert die Nicht-Strukturproteine zu cholesterinreichen Membranen, um den Replikationskomplex aufzubauen (Tu *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2004). Weiterhin ist bekannt, dass die zelluläre Isomerase Cyclophilin B mit NS5B interagiert und somit die RNA Bindung stimuliert. Cyclosporin A und Derivate sind bereits als Antagonist für Cyclophilin B bekannt und werden zurzeit als antivirales Agens untersucht (Paeshuyse *et al.*, 2006). Die leberspezifische und in großen Mengen gebildete Mikro-RNA miR-122 hat einen verstärkenden Effekt auf die HCV Replikation (Jopling *et al.*, 2006). Dies sind einige wenige Beispiele aus der großen Anzahl von Wirtsfaktoren, die an der HCV Replikation beteiligt sind (Bode *et al.*, 2009).

### **1.1.7.2 Assemblierung und Austritt aus der Zelle**

Wie sich das neu entstehende Virion zusammenbaut und die Zelle verlässt ist der bisher am wenigsten verstandene Schritt im Vermehrungszyklus von HCV. Die Verbindung von Core und *lipid droplets* ist essenziell und stellt den ersten Schritt bei der Produktion neuer infektiöser Partikel dar (Boulant *et al.*, 2006; Boulant *et al.*, 2007). Kürzlich wurde das Enzym DGAT1, ein wichtiger Faktor für die Entstehung von *lipid droplets*, als Schlüsselfaktor in der Formation von HCV Partikeln identifiziert. Es interagiert mit dem Coreprotein und dirigiert es auf die Oberfläche von *lipid droplets*. Inhibition von DGAT1 führt zu einem drastischen Rückgang der Partikelproduktion (Herker *et al.*, 2010). Somit wird vermutet, dass die Biogenese von HCV an der Oberfläche von *lipid droplets* stattfindet (Miyanari

*et al.*, 2007). Allerdings ist die Visualisierung der Vorgänge an den LD schwierig (Jones und McLauchlan, 2010) und ein klarer Beweis für LD als Assemblierungsoberfläche fehlt bis heute (Bartenschlager *et al.*, 2011). Wie die gebildeten Viruspartikel aus der Zelle ausgeschleust werden ist ebenfalls unklar.

## **1.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Zu Beginn dieser Arbeit war der Vorgang der HCV Assemblierung und Virusausschleusung aus der infizierten Zelle kaum verstanden. Darum war es das Ziel der vorliegenden Dissertation, neue fluoreszenzmarkierte Hepatitis C Reporterviren zu generieren und zu charakterisieren, welche die Visualisierung der HCV Biogenese in infizierten lebenden Zellen ermöglichen. Mit Hilfe dieser Reporterviren sollte dann die zeitliche und räumliche Organisation der späten Schritte im HCV Replikationszyklus analysiert werden. Zur Auflösung ultrastruktureller Vorgänge war es außerdem geplant diese Experimente mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu kombinieren und schließlich mit biochemischen Methoden zu verifizieren. In der Summe sollen die Daten dazu beitragen, den HCV Zusammenbau und die Ausschleusung besser zu verstehen und somit helfen, wertvolle Informationen über den Vermehrungszyklus des Hepatitis C Virus zu gewinnen.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme

One Shot® Top10                      chemisch kompetente *Escherichia coli* F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*araleu*) 7697 *galU* *galk* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG* (Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.2 Eukaryotische Zelllinie

Name	Beschreibung	Referenz
Huh 7.5	Abgeleitete Form der Leberkarzinom-Zelllinie Huh7. Die ursprünglichen Huh7-Zellen wurden mit HCV-Replikons transfiziert und über eine Behandlung mit Interferon- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ ) von diesen geheilt. Diese Zellen besitzen dadurch eine höhere Permissivität für eine HCV-Replikation.	(Blight <i>et al.</i> , 2002)

### 2.3 Medien

#### 2.3.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	10 g/L Bacto-Trypton; 5 g/L Bacto-Hefeextrakt; 8 g/L NaCl; 1 g/L Glukose. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7.2 eingestellt. Zugabe von 100 mg/L Ampicillin bzw. Kanamycin vor Gebrauch.
Luria-Bertani-Agarplatten (LB-Platten)	15 g Agar wurden in 1 L LB-Medium gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 55°C wurde 1 mg/mL Ampicillin zugegeben.
SOC-Medium	20 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 2,5 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM, MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glukose.

#### 2.3.2 Medien für Kultivierung von Huh 7.5 Zellen

DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium; Invitrogen/Gibco) mit 350  $\mu$ g/mL L-Glutamin, 120  $\mu$ g/mL Streptomycinsulfat, 120  $\mu$ g/mL Penicillin und 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS und 1% (v/v) MEM *non essential amino acids* (NEAA).

#### 2.3.3 Medienzusätze

DMSO	Merck KGaA (Darmstadt)
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
MEM non essential amino acids	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Fetalclone II	Hyclone Fisher scientific (Schwerte)
HEPES 1M	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)

## 2.4 Oligonukleotide

### 2.4.1 Oligonukleotide für Klonierungen

#### 2.4.1.1 Verwendete Oligonukleotide für die PCR

Folgende Oligonukleotide wurden von Biomers Deutschland (Ulm) bezogen.

Name	Sequenz (5'-3' Richtung)	Funktion
p5_mCherry- <i>BsiWI</i>	ggcgtacgcatgggtgagcaagggcgag	Amplifikation des mCherry Chromophors für die Markierung des
p3_mCherry- <i>BsiWI</i>	cgcgtacgcctgtacagctcgccatgcc	E1 Proteins von HCV in die vorhandene interne <i>BsiWI</i> Schnittstelle

#### 2.4.1.2 Synthetisierte Oligonukleotide

Das im Folgenden angegebene und mit mtagBFP markierte HCV Corefragment wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und später über einen Übergangsvektor in den pFK Vektor inkloniert (vgl. Methoden 5.1.9). Die rot hervorgehoben Sequenzen zeigen folgende Restriktionsschnittstellen der Reihenfolge nach: *NcoI*, *EcoRI*, *BglII* und *Clal*. Die Sequenz des Coreproteins ist grau hinterlegt und die des Linkers gelb. Die mtagBFP Sequenz ist in blauen Buchstaben dargestellt. Die ersten 48 Basenpaare (also 16 Aminosäuren) der Coresequenz wurden vor das Chromophor synthetisiert, die gesamte Coresequenz folgt nach einem Linker von 15 Basenpaaren ohne das Startcodon ATG.

```

ccatggcgttagtatgagtgtcgtacagcctccaggccccccctcccgggagagccatagtggctctgcggaaccgggtga
gtacaccggaattgccgggaagactgggtccttcttgataaaccactctatgcccgccatttggcgtgccccgcg
aagactgctagccgagtagcgttgggttgcgaaaggccttgtggtactgctgataggcgcttgcgagtgccccgggag
gtctcgtagaccgtgaccatgagcacaaatcctaaacctcaagaaaaacaaaagaacaccaagaatcATGAGCG
AGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGGACAACCATCACTTCAAGTGCACATCCGAG
GGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCTTCGCCTTCGA
CATCTGGCTACTAGCTTCCTTACGGCAGCAAGACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTCAAGCAGT
CCTTCCCTGAGGGCTTACATGGGAGAGAGTCAACACATACGAAGACGGGGCGTGTGACCGCTACCCAGGACACCAGC
CTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACCTTACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAA
AACACTCGGCTGGGAGGCCTTCCAGAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAAACGACATGGCCCTGA
AGCTCGTGGGCGGAGCCATCTGATCGCAAACATCAAGACCACATATAGATCCAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATG
CCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCAACACGAGACCTACGTCGAGCAGCAGAGGT
GGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACCTGGGGCACAAAGCTTAATagatctGGTGACCGGGCGCCagcaciaa
Atcctaaacctcaagaaaaacaaaagaacaccaaaccgtcgccacaagacgttaagtctccgggcgccgagatc
Gttggcggagtatacttgttgcgcgcaggggccccaggttgggtgtgctgcgcgacaaggaagacttcggagcgtccca
Gccacgtggaaggcgccagccatccctaaagatcggcgctccaactggcaaatcctggggaaaaccaggataccctggc
Coctatacggggaatgagggactcggtgggcaggatggctcctgtccccccgaggttcccgctccctcttggggccccaat
gacccccggcataggtcgcgcaacgtgggtaaggtcatcgat

```

### 2.4.2 Sonstige Nukleinsäuren

#### 2.4.2.1 Längenstandard

Gene Ruler™ DNA Ladder Mix Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

### 2.4.2.2 Nukleotide für die Polymerase-Ketten-Reaktion

dNTPs für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden von Stratagene (La Jolla, USA) bezogen.

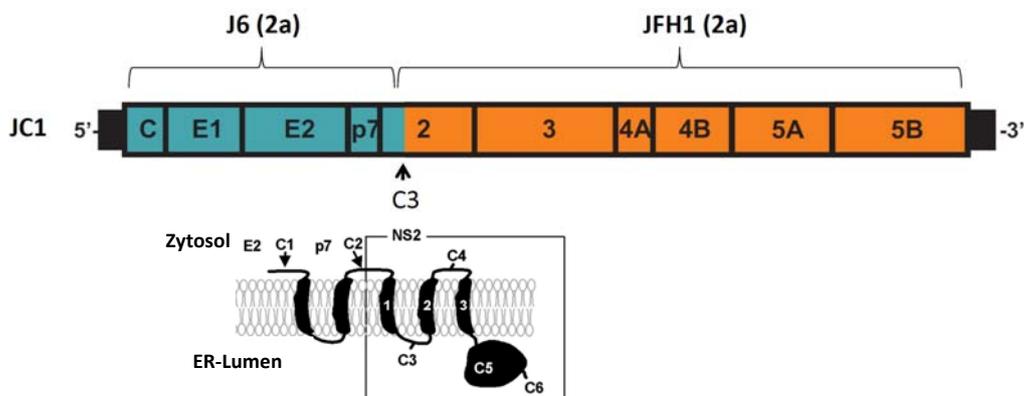
## 2.5 Plasmide

### 2.5.1 Expressionsplasmide

Name	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pmCFP-C1 GalT	Golgi-Marker; modifizierter pmCFP-C1 Vektor, enthält ein Fragment der $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase fusioniert an mCFP	(Rocks <i>et al.</i> , 2010)

### 2.5.2 HCV Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide tragen ausschließlich die Viruschimäre C-846 J6 / 3' JFH1, kurz JC1, bestehend aus zwei Genotyp 2a Virusisolatfragmenten: J6CF (Yanagi *et al.*, 1999) und JFH1 (Wakita *et al.*, 2005). Die Strukturproteine bis direkt nach der ersten Transmembrandomäne von NS2 (entspricht den ersten 846 Aminosäuren des Polyproteins) stammen vom J6CF Isolat, die folgenden Nicht-Strukturproteine von JFH1 (vgl. Abb. 9).



**Abb. 9: Schematische Darstellung der J6/C3/JFH1 Viruschimäre JC1.** Die Virusisolate J6 und JFH1 sind beide dem Genotyp 2a zuzuordnen. C3 ist der dem Zytosol zugewandte Loop zwischen der Transmembrandomäne 1 und 2 von NS2 und die Schnittstelle zwischen beiden Isolaten. Verändert nach Pietschmann *et al.*, 2006.

Alle Konstrukte basieren auf dem pFK Vektor (Lohmann *et al.*, 2001), welcher Ampicillin Resistenz und eine niedrige Kopienzahl (*low copy number plasmid*) aufweist.

Name	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pFK_JC1	Wildtyp HCV JC1 Virusvariante	(Pietschmann <i>et al.</i> , 2006)
pFK_JC1-luc	Bicistronisches Reportervirus, welches für die Firefly Luziferase fusioniert mit den ersten 16 Aminosäuren des Coreproteins im ersten Cistron kodiert. Nach einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) aus dem Encephalomyocarditis Virus	(Wakita <i>et al.</i> , 2005; Koutsoudakis <i>et al.</i> , 2006)

	(EMCV) kodiert es für das volle Genom der Chimäre JC1.	
pFK_JC1-GFP-NS5A	Reportervirus, in welches ein <i>gfp</i> -Gen in die dritte Domäne des NS5A Proteins zwischen die Kodons 382 und 383 kloniert wurde.	(Schaller <i>et al.</i> , 2007)
pFK_JC1-GFP-NS5A/mCherry-E1	Doppelt markiertes Reportervirus basierend auf dem pFK_JC1-GFP Konstrukt (s.o.), welches zusätzlich ein <i>mCherry</i> -Gen innerhalb des Strukturproteins E1 trägt.	Kapitel 3.1.9.1
pFK_JC1-mcherry-E1	Reportervirus, welches ein <i>mCherry</i> -Gen innerhalb des Strukturproteins E1 trägt.	Kapitel 3.1.9.1
pFK_JC1-16Core-mtagBFP-Core	Reportervirus, welches ein <i>mtagBFP</i> -Gen n-terminal fusioniert an das Coreprotein trägt.	Kapitel 3.1.9.3

## 2.6 Enzyme

### 2.6.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden von der New England Biolabs GmbH (Frankfurt) bzw. Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen und mit den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen verwendet.

### 2.6.2 Sonstige Enzyme

Name	Herkunft
0,05% EDTA-Trypsin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Promega GmbH (Mannheim)
Dream Taq™ DNAPolymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Pfu DNA Polymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

## 2.7 Inhibitoren

Name	Herkunft/Referenz
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega (Mannheim)
Brefeldin A	AppliChem (Gatersleben)
Nocodazole	Sigma-Aldrich (München)
Monensin A	Sigma-Aldrich (München)
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich (München)
General Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Dynasore	Invitrogen (Karlsruhe)

## 2.8 Antikörper und Färbereagenzien

### 2.8.1 Primärantikörper

Antigen	Beschreibung	Verdünnung	Herkunft/Referenz
Hepatitis C Virus Core	Monoklonaler anti-Maus Antikörper(Klon C7-50), detektiert Aminosäuren 21-40 des HCV Coreproteins	IF 1:50 WB 1:500	Abcam (Cambridge)
Hepatitis C Virus E2	Breitband neutralisierender, monoklonaler anti-Maus Antikörper(Klon AP33)	IF 1:100 WB 1:100	Genentech, Inc. (San Francisco); (Owsianka <i>et al.</i> , 2005)
Hepatitis C Virus NS5	Monoklonaler anti-Maus Antikörper(Klon 2F6/G11), detektiert den Sequenzabschnitt von Aminosäure 2054 bis 2295 des HCV Genoms	IF 1:50	IBT (Reutlingen)
EEA1	Marker für frühe Endosomen, polyklonaler anti-rabbit Antikörper	IF 1:200	Abcam (Cambridge)
LAMP1	Marker für Lysosomen, monoklonaler anti-Maus (Klon H4A3) Antikörper	IF 1:100	Abcam (Cambridge)
Rab7	Marker für späte Endosomen, monoklonaler anti-Maus Antikörper (Klon Rab7-117)	IF 1:200	Abcam (Cambridge)
CD63	Marker für multivesicular bodies (MVBs), monoklonaler anti-Maus Antikörper (Klon MEM-259)	IF 1:200	Abcam (Cambridge)
Giantin	Marker für den Golgi-Apparat, monoklonaler anti-Maus Antikörper(Klon 9B6)	IF 1:100	Abcam (Cambridge)
Calnexin	Marker für das Endoplasmatische Retikulum, monoklonaler anti-Maus Antikörper (Klon AF18),	IF 1:200	Novus Biologicals (Littleton)
Rab5	Marker für frühe Endosomen, polyklonaler anti-rabbit Antikörper	IF 1:100	Abcam (Cambridge)
β-Aktin	Ladekontrolle für Western Blot Analysen, monoklonaler anti-Maus Antikörper(Klon AC-15)	WB 1:5000	Sigma-Aldrich (München)

### 2.8.2 Sekundärantikörper

Name	Verdünnung	Herkunft/Referenz
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	1:500	Invitrogen (Darmstadt)
Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	1:500	Invitrogen (Darmstadt)
Alexa Fluor® 633 goat anti-mouse IgG (H+L)	1:500	Invitrogen (Darmstadt)
Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG (H+L)	1:500	Invitrogen (Darmstadt)
Alexa Fluor® 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	1:500	Invitrogen (Darmstadt)
IRDye® 680 goat anti-rabbit IgG (H+L)	1:10000	Li-Cor Biotechnology
IRDye® 800 goat anti-mouse IgG (H+L)	1:10000	GmbH (Bad Homburg)

### 2.8.3 Sonstige Färbereagenzien

Name	Beschreibung	Herkunft/Referenz
Draq5	Färbt die DNA der Zelle und damit den Zellkern	Cell Signaling, (Frankfurt a. M.)
Nile-Red	Markiert selektiv intrazelluläre Lipidtropfen ( <i>lipid droplets</i> ); (Greenspan <i>et al.</i> , 1985)	Sigma-Aldrich (München)
ER-Tracker™	Markiert selektiv das Endoplasmatische	Invitrogen (Darmstadt)
Blue-White DPX	Retikulum in lebenden Zellen	
Annexin V-FITC	Marker für apoptotische Zellen, bindet an Phosphatidylserin, dass bei einer apoptotischen Zelle an die Oberfläche transloziert	Invitrogen (Darmstadt)

## 2.9 Reagenzien

### 2.9.1 Chemikalien

Name	Herkunft/Referenz
Agar	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Agarose	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Ampicillin	ratiopharm GmbH (Ulm)
Bacto-Trypton	BD Biosciences Pharmingen (San Diego, USA)
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Glukose	Merck KGaA (Darmstadt)
Hefeextrakt	BD Biosciences Pharmingen (San Diego, USA)
HPLC Wasser	AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Kanamycin	ratiopharm GmbH (Ulm)
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
NaCl	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
NaOH	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Paraformaldehyde (PFA)	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA (Cölbe)
Tris-Acetat-EDTA Puffer (50x)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Chloroform	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
UltraPure™ Glycogen	Invitrogen (Darmstadt)
Natriumacetat	Promega GmbH (Mannheim)
UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl	Invitrogen (Darmstadt)
Alkohol (25:24:1, v/v)	
Magermilchpulver	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich (München)
Sucrose, Ultrapure Bioreagent	Thomas scientific (Swedesboro)
MTT Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma-Aldrich
Diaminobenzidin (DAB)	Calbiochem
Diaminobenzidin (DAB) <i>substrate buffer</i>	Calbiochem
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%	Calbiochem
<i>Peroxidase-conjugated ChromPure human transferrin</i>	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)
ChromPure humanes Transferrin	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)

## 2.9.2 Reagenzsysteme (Kits)

Name	Herkunft/Referenz
Luziferase Assay System	Promega GmbH (Mannheim)
Lysepuffer (P2)	Qiagen (Hilden)
Neutralisationspuffer (P3)	Qiagen (Hilden)
PureYield™ Plasmid Midiprep	Promega GmbH (Mannheim)
Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit	Dianova GmbH (Hamburg)
Resuspensionspuffer (P1)	Qiagen (Hilden)
TA Cloning® Kit	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Takara DNA Ligationskit	Böhringer Ingelheim (Heidelberg)
Wizard® DNA Clean-Up System	Promega GmbH (Mannheim)
TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System	Promega GmbH (Mannheim)
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega GmbH (Mannheim)
QuickTiter™ HCV Core Antigen ELISA Kit	Cell Biolabs, Inc. Über BIOCAT GmbH (Heidelberg)

## 2.10 Geräte und Laborzubehör

Name	Herkunft/Referenz
DNA Gelelektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Multipipette® plus	Eppendorf (Hamburg)
GeneAmp® PCR System 9700	AB Applied Biosystems (Darmstadt)
Gewebekulturplatten (diverse Formen)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Gilson Pipetman®	Gilson Inc. (Middleton, USA)
FACSCantoII™	B&D, Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, (San José, USA)
Influx	B&D, Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, (San José, USA)
HERAsafe® Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH (Hanau)
HERAsafe® Sterilbank	Thermo Fisher Scientific GmbH (Hanau)
Infinite® M200	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
Nanodrop	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Pipetboy acu	IBS INTEGRA Biosciences (Chur, Schweiz)
Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (10 - 1000 µL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Schüttelinkubator Innova® 43 Shaker	New Brunswick (Nürtingen)
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, Germany
UV-Transilluminator GelDoc 2000	Hartenstein (Würzburg)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Gene Pulser Xcell System	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Elektroporator	
Zellkulturflaschen (T25,T75,T175)	Sarstedt (Nümbrecht)
MILLEX GP 0,45µm Filter	Millipore (Schwalbach)
Kryoröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)

Gene Pulser/Micro Pulser Küvetten, 0,4 cm	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Ultrazentrifuge L8-55M	Beckman Coulter (Krefeld)
SW40 Ti Rotor Package, Swing Bucket	Beckman Coulter (Krefeld)
Tube, Thinwall, Polyallomer, 14 mL, 14 x 95 mm (qty. 50)	Beckman Coulter (Krefeld)
Nikon Eclipse Ti	Nikon (Tokyo, Japan)
Zeiss 510 Meta	Carl Zeiss (Jena)
BioStation IM	Nikon (Tokyo, Japan)
Philips CM 120 TEM	Philips (Eindhoven, NL)
Nikon Eclipse TS100	Nikon (Tokyo, Japan)
Odyssey Imaging System	Li-Cor Biotechnology GmbH (Bad Homburg)

## 2.11 Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
FACS-Puffer	2% FKS; 1 mM EDTA in PBS
Mowiol	0,2 M Tris-HCl, pH 8.5; 12% (w/v) Mowiol 4-88; 30% (w/v) Glycerin
Ponceau S	2% (w/v) Ponceau S; 30% (w/v) Trichloressigsäure; 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
10x Tris/Glycin Elektrodenpuffer	1,92 M Glycin, 250 mM Tris Bei 1x Tris/Glycin Zugabe von 0,1% SDS
10x Blotpuffer	1,92 M Glycin, 250 mM Tris Für 1x Blotpuffer in 70% Wasser und 20% Ethanol verdünnen
20x TBST	1 M Tris, 18% (w/v) NaCl, pH Wert auf 7.6 einstellen und dann 1% (v/v) Tween20 zugeben
Blockpuffer	10% Milchpulver in TBST
DEPC- Wasser	0,5% (v/v) DEPC wird in steriles Wasser gegeben , über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert
Zytomix	120 mM KCl, 0.15 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.6), 25 mM HEPES, 2 mM EGTA und 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; der pH wird auf 7.6 mit KOH eingestellt und steril filtrieren. Lagerung bei 4°C. Vor der Elektroporation wird frisch 2 mM ATP (pH 7.6) und 5 mM Glutathione (pH 7.6), zugegeben
20% Sucrose Lösung	20% Sucrose in PBS erwärmen und lösen, dann steril filtrieren
RIPA Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% Na-SDS, 5 mM EDTA
SDS-Ladepuffer	4 mL SDS 10%, 1 mL β-Mercapto-EtOH, 2 mL Glycerin, 0,2 mL EDTA (1M), 1 mL Bromphenolblau 0,1%, 1,3 ml Tris 1 M pH 6.8, 0,5 mL Wasser

## 2.12 Proteinmarker

Name	Herkunft/Referenz
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Transformation von *E. coli* One Shot® Top10

10 µL der Bakterien wurden nach dem Auftauen auf Eis mit 1 µL des Ligationsansatzes (vgl. 5.1.3) bzw. verdünnter Mini-Plasmid-DNA für 15 min inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 sec. Nach Zugabe von 150 µL SOC-Medium und einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 3.1.2 Kultivierung von Bakterien zur Plasmidisolierung

Alle verwendeten Plasmide enthalten entweder ein Kanamycin- oder ein Ampicillin-Resistenzgen. Transformierte Bakterien wurden daher durch Zusatz von 100 µg/mL Ampicillin bzw. 50 µg/mL Kanamycin zum Kulturmedium selektiert. Verwendet wurde der *Escherichia coli*-Stamm One Shot® Top10. Die Kulturen wurden für mindestens 12h bei 37 °C in LB-Flüssigmedium geschüttelt oder auf LB-Agar Platten inkubiert.

#### 3.1.3 DNA-Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis et al., 1989, durchgeführt:

- Plasmid-DNA-Isolierung nach alkalischer Lyse der Bakterien
- Ethanol- and Isopropanolfällung der DNA
- Dephosphorylierung von DNA 5' Enden mit alkalischer Phosphatase
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase
- Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

#### 3.1.4 DNA-Sequenzierung

Sequenzierreaktionen wurden kommerziell bei der Firma MWG-Biotech AG in Auftrag gegeben. 15 µL DNA einer Konzentration von mindestens 100 ng/µL wurden jeweils eingeschickt. Bei Bedarf wurden 15 µL des entsprechenden Sequenzierprimers mit einer Konzentration von 2 pmol in einem separaten Gefäß eingeschickt.

### 3.1.5 Ligation von DNA

Ligationen wurden in der Regel mit dem Takara DNA-Ligationskit (Boehringer Ingelheim) durchgeführt. Plasmid-DNA and Insert-DNA wurden im Verhältnis von 1:4 nach den Protokollen der Hersteller eingesetzt.

### 3.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA für Klonierungen wurde durch alkalische Lyse von Bakterien nach dem Prinzip von Birnboim und Doly, 1979, mit anschließender Isolierung und Reinigung der DNA gewonnen. Für Sequenzierreaktionen oder die Transfektion eukaryotischer Zellen wurden die Präparationen mit dem Pure Yield™ Midiprep Kit (Promega) oder dem Miniprep-Kit (Qiagen) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die DNA wurde in Wasser gelöst und die Konzentrationen mit einem Nanodrop-Gerät der Firma PEQLAB bestimmt.

### 3.1.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden zunächst je nach Größe in einem 0,7-1% Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht. Die Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA anschließend mit dem Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit von Dianova entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert.

### 3.1.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient zur spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen *in vitro* mit Hilfe von thermostabilen Polymerasen. In einem zyklischen Prozess, der sich aus Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung und Elongation zusammensetzt, kommt es zur Amplifikation der spezifischen DNA in einem PCR *Cycler*, dafür wurde das Gene Amp PCR System 9700 von Applied Biosystems eingesetzt. Ein exemplarisches Programm wird in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	Vorgang
1	96°C	5 min	Initiale Denaturierung
	96°C	30 sec	Denaturierung
35	52°C	45 sec	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	2 min	Elongation
1	72°C	8 min	Finale Elongation
	4°C	∞	

Für den Reaktionsansatz wurden ein Reaktionsvolumen von 50 µL mit 100-500 ng DNA, 5 µL 10 x Taq Reaktionspuffer, je 75 pmol 5'- und 3' Primer, 10 mmol dNTP-Gemisch und 0,5 µL Polymerase verwendet.

### 3.1.9 Klonierungen

#### 3.1.9.1 Klonierung der mit mCherry im E1 Protein markierten HCV Konstrukte

Zur Markierung des E1 Proteins von HCV wurde in die im E1 vorhandene *BsiWI* Schnittstelle das Chromophor mCherry inseriert. Dazu wurde mCherry mit Oligonukleotiden (*p5\_mCherry-BsiWI*: *ggcgtacgcatgggtgagcaagggcgag*; *p3\_mCherry-BsiWI*: *cgcgtacgcctgtacagctcgtccatgcc*) über PCR amplifiziert und zunächst in den HCV Vektor *pFK\_JC1-GFP-NS5A* (Schaller et al., 2007) eingefügt. Vektor und PCR Produkt wurden dazu mit *BsiWI* verdaut, der Vektor dephosphoryliert und beide Fragmente ligiert. Zur Überprüfung der Orientierung des mCherry Fragments wurde die DNA mehrerer Klone mit dem Restriktionsenzym *NcoI* verdaut, wobei mCherry an seiner internen *NcoI* Schnittstelle geschnitten wird. Durch Sequenzierung konnte die Richtigkeit des Konstrukts bestätigt werden. Diese Klonierung führte zu einem doppelten Reportervirus, welches sowohl im Nicht-Strukturprotein NS5A mit GFP, wie auch im Strukturprotein E1 mit mCherry markiert ist.

Zur Herstellung eines nur im E1 Protein markiertem Reportervirus wurde aus dem oben hergestellten Konstrukt das GFP enthaltende Fragment, über *AvrII* und *HindIII* entfernt und gegen ein kein GFP enthaltendes, ebenfalls mit *AvrII* und *HindIII* geschnittenes Fragment aus dem *pFK\_JC1-luc* (Koutsoudakis et al., 2006) ausgetauscht.

#### 3.1.9.2 Klonierung eines nicht-markierten JC1 Virus

Für die Herstellung der Nicht-markierten HCV Chimäre JC1 im *pFK* Vektor wurde das GFP enthaltende Fragment aus dem Vektor *pFK\_JC1-GFP-NS5A* (Schaller et al., 2007) über *AvrII* und *HindIII* entfernt und gegen das entsprechende Fragment ohne GFP aus dem HCV-Luziferase Konstrukt *pFK\_JC1-luc* (Koutsoudakis et al., 2006) ausgetauscht.

#### 3.1.9.3 Klonierung des mit mtagBFP im Coreprotein markierten HCV Konstrukts

Um ein Reportervirus zu erhalten, in dem das HCV Coreprotein N-terminal fusioniert an mtagBFP exprimiert wird, wurde die entsprechende Sequenz zur Synthese bei der Firma Eurofins MWG Operon in Auftrag gegeben (vgl. 4.4.1.2). Da in dem Zielvektor *pFK* keine geeigneten Schnittstellen für ein direktes Inserieren zu finden waren, wurde die Sequenz zunächst mit den flankierenden Enzymen *NcoI* und *Clal* in einen Übergangsvektor eingefügt. Dieser basiert auf dem *pBR-NL43* Vektor, der über *SbfI* und *NotI* geöffnet wurde und in den die, ebenfalls über *SbfI* und *NotI* geschnittene und die Strukturproteine beinhaltende, HCV Sequenz eingefügt wurde. Nachdem die synthetisierte Sequenz in den Übergangsvektor inseriert wurde, konnte die gesamte Sequenz der Strukturproteine

wieder über *SfbI* und *NotI* in den pFK Zielvektor eingebracht werden. Durch Kontrollverdau und Sequenzierung wurde die Richtigkeit der Klonierung überprüft.

### 3.1.10 *In vitro* Transkription und RNA Isolierung

Im Jahr 2005 ist es erstmals gelungen infektiöse Hepatitis C Partikel (HCVcc) in Zellkultur zu generieren (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005). Für die Erzeugung von Virionen in der permissiven Zelllinie Huh7.5 muss diese mit dem viralen (+)ssRNA Genom transfiziert werden. Ausgehend von dem pFK Vektor erfolgt die Synthese der dafür nötigen RNA mit Hilfe einer *in vitro* Transkription, welche von Keto *et al.* erstmals ausführlich beschrieben (Kato *et al.*, 2006) und nach dem Prinzip, aber in abgeänderter Form, in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Zunächst wurden die jeweiligen Virusplasmide mit dem Restriktionsenzym *MluI* linearisiert. *MluI* schneidet direkt nach der Terminatorsequenz des T7 Promotors, welche sich hinter dem Ribozym befindet. Die T7 RNA Polymerase bindet an den T7 Promotor und produziert die virale genomische RNA. Am T7 Terminator stoppt die Transkription und das Ribozym entfernt sich selbst und auch die nicht benötigten Teile des Vektors, wie beispielsweise die Ampicillin Resistenzkassette, autokatalytisch. Daraus resultiert eine HCV RNA, welche mit der 5'NCR (*non-coding region*; N-terminale Nicht-kodierende Region) beginnt und mit der 3'NCR (*non-coding region*; C-terminale Nicht-kodierende Region) endet.

10 µg des pFK Vektors wurden mit 2 µL Enzym und 10 µL des entsprechenden Puffers auf insgesamt 100 µL mit Wasser aufgefüllt und bei 37°C für 2 Stunden auf einem Thermoblock bei 350 rpm schüttelnd inkubiert. 2 µL des Ansatzes wurden gelelektrophoretisch auf vollständige Linearisierung überprüft. Die verdauten Plasmide wurden dann mit Hilfe des Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System (Promega) nach Angaben des Herstellers gereinigt und die Konzentration in einem Nanodrop (PEQLAB) vermessen. Die linearisierten Vektoren wurden bei -80°C gelagert oder direkt verwendet. Die *in vitro* Transkription wurde mit Hilfe des T7 RiboMAX<sup>™</sup> Express Large Scale RNA Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde 1 µg der linearisierten DNA eingesetzt. Zusätzlich wurde 1 µL RNasin<sup>®</sup> Plus RNase Inhibitor zum Ansatz hinzu gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37°C ist eine deutliche Trübung des Ansatzes erkennbar. Zur Entfernung der *template* DNA wurde für weitere 15 Minuten die im Kit enthaltene RNase freie DNase zum Ansatz gegeben. Es folgte die Aufreinigung der RNA durch Phenol/Chloroform Extraktion. Um das Volumen zu vergrößern und somit die Effizienz der Extraktion zu erhöhen, wurden zunächst 80 µL RNase freies Wasser zugegeben. Dann wurde die RNA mit 1 Volumen, also 100 µL UltraPure<sup>™</sup> Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol (25:24:1, v/v) extrahiert. Nach ausgiebigem Schütteln wurden die Phasen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000 rpm voneinander getrennt. Die RNA-haltige wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reagiergefäß überführt, dem 1 Volumen Chloroform

zugegeben wurde. Nach erneutem Schütteln wurde wiederum für 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde für die folgende Fällung der RNA in ein neues Reagiergefäß überführt. Es wurde nun eine Mischung aus 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, 1 Volumen Isopropanol, 2,5 Volumen 96% Ethanol und 0,01 Volumen Glycogen zum Ansatz gegeben, mehrfach vorsichtig invertiert und mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die gefällte RNA wurde bei 14.000 rpm und 4°C für 10 Minuten pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vollständig abgenommen, das Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und je nach RNA Menge in 20-50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. RNA löst sich schlechter als DNA in Wasser, daher wurde zum vollständigen Lösen mehrfach auf und ab pipettiert und anschließend 5 Minuten bei 800 rpm und 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des Nanodrop bestimmt und die Qualität in einem 1% Agarose Gel kontrolliert. Damit hier möglichst wenig RNA degradiert wurden Agarose und TAE Puffer in DEPC behandeltem Wasser angesetzt und die Gelelektrophorese für 15 Minuten bei 180 Volt durchgeführt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

### **3.2 Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.1 Kultivierung von Huh7.5 Zellen**

Die adhärenente Zelllinie Huh7.5 wurde in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer humiden Atmosphäre (95% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Als Medium diente DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*, Biochrom) unter Zusatz von 1% (v/v) L-Glutamin, 1% (v/v) Streptomycinsulfat und Penicillin, 1% (v/v) MEM *non essential amino acids* (NEAA) und 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin/EDTA mit einem 10-fachen Überschuss von auf 37°C temperiertem Kulturmedium inaktiviert und die resuspendierten Zellen in einer Dichte von 10-20% neu ausgesät.

#### **3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden  $5 \times 10^6$  Zellen/mL in einer vorgekühlten Lösung aus 10% (v/v) DMSO, 50% Medium und 40% (v/v) FKS aufgenommen und in Kryoröhrchen (Sarstedt) pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden 24 h bei -80°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gehalten.

Die eingefrorenen Zellen wurden möglichst schnell bei 37°C aufgetaut und in vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen zentrifugiert, in frischem, warmem Kulturmedium aufgenommen und kultiviert.

### 3.2.3 Transfektion von Huh 7.5 Zellen mittels Elektroporation

Um die vollständigen Replikation von HCV in Zellkultur zu erreichen, werden Huh7.5 Zellen durch Elektroporation mit der *in vitro* transkribierten viralen (+)ssRNA transfiziert. In Anlehnung an Kato *et al.*, 2006 wird dazu ein leicht verändertes Protokoll verwendet.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst und sorgfältig resuspendiert. Pro Elektroporation wurden  $6 \times 10^6$  Zellen eingesetzt, bei 700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut wie zuvor pelletiert. Für jeden Ansatz wurden 400  $\mu$ L Zytomix mit frisch zugesetztem ATP in einer Endkonzentration von 2 mM und Glutathione in einer Endkonzentration von 5 mM vorbereitet. Außerdem wurden 20 mL Medium pro Ansatz in 50 mL Röhrchen vorgelegt. Das Zellpellet wurde in der entsprechenden Menge Zytomix resuspendiert und zu je 400  $\mu$ L in die Elektroporationsküvetten überführt. Mindestens 5  $\mu$ g der auf Eis aufgetauten RNA wurde in die entsprechende Küvette pipettiert und vermischt. Für die Elektroporation wurde der Gene Pulser Xcell Elektroporator von BioRad mit den Einstellungen von 975  $\mu$ F für die elektrische Kapazität und einer Spannung von 270 V verwendet. Zur Transfektion wurden die Zellen einem Puls ausgesetzt, der nicht länger als 25 ms dauern sollte. Anschließend wurden die Zellen unmittelbar in 20 mL Medium überführt und in passenden Zellkulturflaschen oder Wellplatten verteilt. Nach 4 bis 8 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um die toten Zellen zu entfernen.

### 3.2.4 Ernte von Virusstocks und Infektion von Zellen

Nach 48 bis 72 Stunden wurde der, die Viruspartikel enthaltende Kulturüberstand der elektroporierten Zellen abgenommen und entweder mit einem MILLEX GP 0,45  $\mu$ m Filter (Millipore) filtriert oder bei 4000 rpm und 4°C 20 Minuten zentrifugiert, um störende Zellbestandteile zu entfernen. Virusüberstände wurden bei -80°C gelagert oder direkt verwendet.

Für die Infektion mit diesen Virusüberständen wurden Huh7.5 Zellen einen Tag oder mindestens 4 Stunden zuvor ausgesät, das Medium abgenommen und durch die entsprechenden Virusstocks ersetzt. Nach einer Inkubation von ca. 8 Stunden wurde das Medium gewechselt. Weitere 48 bis 72 Stunden später konnten die Zellen analysiert werden.

### 3.2.5 Ultrazentrifugation zur Konzentration von Virusstocks

Für verschiedene Versuche wurden Virusüberstände mit Hilfe der Ultrazentrifuge L8-55M in einem SW40 Rotor von Beckman Coulter (Krefeld) aufkonzentriert. Dazu wurden in 14 mL (14x95 mm) dünnwandigen Polyallomer Röhrchen 3 mL 20% sterile Sucroselösung vorgelegt, vorsichtig mit Virusüberstand überschichtet und das Röhrchen dabei komplett gefüllt. Zum Austarieren der gegenüberliegenden Proben wurden die Gefäße auf einer Feinwaage gewogen und mit PBS auf das

gleiche Gewicht gebracht. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 36.000 rpm für eine Stunde unter Vakuum. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette mindestens bis auf die Sucroseschicht abgenommen und das Röhrchen gut auf einem Tuch ausgeklopft. Das nicht sichtbare Viruspellet wurde in einem geeigneten Volumen PBS aufgenommen und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die konzentrierten Virusüberstände wurden bei -80°C gelagert.

### **3.2.6 Aufreinigung kleiner Mengen an Virusüberständen**

Zunächst wurden die geernteten Virusüberstände in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert, um die enthaltenden Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben um bei 8000 x g und 4°C für 10 min die Zelltrümmer pelletiert. In einem neuen 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 200 µL sterile 20% Sucrose-Lösung vorgelegt und mit dem von Zelltrümmern befreiten Überstand vorsichtig überschichtet. Die enthaltenden Viren wurden für 90 min bei >20000 x g und 4°C abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, ohne das Pellet zu berühren. Das Viruspellet wurde in neuem Medium aufgenommen.

### **3.2.7 MTT Viabilitätsassay**

Mit Hilfe des MTT-Assays (Mosmann, 1983) ist eine kolorimetrische Messung lebender Zellen aufgrund ihrer Stoffwechselaktivität in Korrelation zur Zellzahl möglich. Vitale, also stoffwechselaktive Zellen reduzieren mit der NADH-abhängigen Succinatdehydrogenase der Mitochondrien das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan.

Um zu bestimmen, ob und in welchen Konzentrationen die verwendeten Substanzen toxisch auf die Zellen wirkten, wurde dieser MTT-Assay durchgeführt. Dafür wurden Zellen im 96 Well Format in 100 µL Medium mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt, nach entsprechender Inkubationszeit wurde 10 µL MTT-Lösung zugefügt und für 3-4 h im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und durch 100 µL Ethanol/DMSO (1:1) ersetzt, wodurch sich die gebildeten Formazankristalle nach 10-20 minütiger Inkubation auf einem Schüttelinkubator lösten. Die Absorption der Lösung wurde bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm im Photometer Infinite® M200 von Tecan vermessen. Die Zellüberlebensrate berechnet sich durch den Vergleich des Signals der behandelten Zellen zur Kontrolle.

### **3.2.8 FACS (*fluorescence activated cell sorting*)**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften analysiert und sortiert werden.

In dieser Arbeit wurden Huh7.5 Zellen auf Transfektions- und Infektionseffizienz der Fluoreszenzprotein-tragenden Reporterviren mit dem BD FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Geräten Canto II und Influx untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Laserausstattungen konnte mtagBFP nur im Canto II, mCherry nur im Influx und in beiden Geräten GFP detektiert werden. Die Zellen wurden hierfür mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche gelöst, in Medium resuspendiert, gewaschen und in 2% PFA aufgenommen. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei 4°C wurden die Zellen analysiert. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit den Programmen FACSDiva (Becton Dickinson, Heidelberg) bzw. FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, USA).

### **3.2.9 FACS-basierter Apoptose-Assay (Annexin V Färbung)**

Durch die Färbung mit Annexin V-FITC kann die Apoptoserate in Huh7.5 Zellen mit Hilfe der Zytometrie ermittelt werden. Phosphatidylserin (PS) befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin V bindet an PS. Durch Markierung von Zellen mit Annexin V-FITC kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen (Vermes *et al.*, 1995). Die zu untersuchenden Zellen wurden vom Boden des Wells abgelöst, mit PBS gewaschen und pro Ansatz mit 100 µL Annexin V Bindepuffer, welcher Annexin V-FITC in einer Verdünnung von 1:20 enthielt, versetzt. Nach dem Resuspendieren der Zellen wurde die Suspension für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 100 µL Annexin Bindepuffer in 2% PFA Lösung zum Fixieren der Zellen wurden diese erneut 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Analyse erfolgte unmittelbar am FACS Influx (BD).

### **3.2.10 Bestimmung des HCV Virustiters im Core-ELISA**

Um eine Aussage über den HCV Virustiter im Zellkulturüberstand machen zu können, wurde zur Detektion des HCV Coreproteins ein klassischer *Sandwich-ELISA* (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) der Firma Cell Biolabs (QuickTiter™ HCV Core Antigen ELISA Kit) nach Herstellerangaben verwendet.

### **3.2.11 Inaktivierung früher Endosomen**

Transferrin-tragende frühe Endosomen wurden in lebenden Zellen selektiv vernetzt und somit inaktiviert, um den Beitrag dieser Endosomen zur Ausschleusung der assemblierten Viruspartikel aus der Zelle zu untersuchen. Die Vernetzung von Transferrin-bindenden Kompartimenten wurde bereits zuvor beschrieben (Pond und Watts, 1997; Brachet *et al.*, 1999) und hier mit folgendem Versuchsaufbau durchgeführt.

Huh7.5 Zellen wurden durch Elektroporation mit viraler RNA des Luziferase-exprimierenden Reportervirus transfiziert und das Medium nach ca. 16 Stunden gewechselt. 48 bis 72 Stunden nach der Transfektion wird die Expression der Luziferase mit dem Firefly Luziferase Assay (vgl. 5.2.10.1) kontrolliert. War eine ausreichende Produktion an Virus gewährleistet, wurden die Zellen für 1,5 Stunden bei 37°C in Medium mit 0,1% FKS ausgehungert. Das Medium wurde für weitere 2 Stunden durch Medium mit 0,1% FKS, 20 mM Hepes und entweder 20 µg/mL Peroxidase-gekoppeltem Transferrin (HPR-Tf) oder reinem Transferrin (Tf) der gleichen Konzentration ersetzt und bei 19°C inkubiert. Die Zellen nehmen so das Transferrin über den Transferrinrezeptor (TfR) auf und markieren den Transferrinrezeptor-positiven endosomalen Weg in der Zelle. Die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen, um das an der Oberfläche gebundene Transferrin zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen für 10 Minuten mit 10% FKS in PBS auf Eis inkubiert. Das Inaktivieren der HPR-Tf positiven Kompartimente erfolgte durch die Inkubation der Zellen auf Eis für 10 bis 60 Minuten im Dunkeln mit einfach-konzentrierter Diaminobenzidin (DAB) Lösung, der 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt wurde. DAB ist ein Substrat der Meerrettichperoxidase (HRP). Es wird durch die HRP oxidiert und bildet ein unlösliches Präzipitat, welches hier zum Vernetzen der HPR-Tf positiven Endosomen führt. Die Reaktion wurde durch mehrfaches Waschen mit kaltem PBS gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen in dem kleinstmöglichen Volumen an Normalmedium für das gewählte Wellformat bei 37°C für 4-5 Stunden inkubiert. Der Überstand der Zellen wurde geerntet, mit 2.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und neue Zellen damit infiziert, um zu sehen, wie viele infektiöse Viruspartikel noch in den Überstand sezerniert werden konnten. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

### **3.2.12 Luziferase-basierte Assays**

#### **3.2.12.1 Firefly Luziferase Assay**

Die Firefly Luziferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* ist ein Reporter gen, welches bicistronisch von dem Vektor pFK\_JC1-luc kodiert wird und eine schnelle relative Quantifizierung der mit diesem Hepatitis C Viruskonstrukt transfizierten bzw. infizierten Zellen erlaubt.

Dieses Enzym konnte mit Hilfe eines Luziferase-Aktivitätstests nachgewiesen werden, welcher darauf basiert, dass die Luziferase das zugegebene Substrat Luziferin in Gegenwart von ATP und Mg<sup>2+</sup> oxidativ decarboxyliert, wobei Lichtblitze entstehen (Lumineszenz), die im Luminometer nachweisbar sind. Dabei ist die Lumineszenz direkt proportional zur Menge der Luziferase-Expression.

Die Luziferaseanalyse wurde mit Hilfe des Luziferase Reporter Assay Systems (Promega) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 30 µL (96-Well-Format) Lysepuffer lysiert. Dazu wurden die Platten mindestens 30 min bei 4°C inkubiert. 25 µL der lysierten Zellen wurden in eine weißwandige Platte überführt. Unmittelbar vor der Messung der

Lumineszenz im Infinite® M200 von Tecan wurden 50 µL Luziferin-Lösung hinzupipettiert und das luminometrische Signal gemessen.

### **3.2.12.2 Luminometrische Messung der Caspase Aktivität**

Mit Hilfe des Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems von Promega wurde die Caspase-abhängige Apoptose der Zellen durch ein Lumineszenzsignal gemessen, das proportional zur Menge aktivierter Caspasen ist. Zwei enzymatische Schritte laufen bei diesem Nachweis unmittelbar hintereinander ab: Das Caspase-Glo® 3/7 Reagenz enthält ein Substrat für die Caspasen-3 und -7 (Z-DEVD-Aminoluziferin), das gespalten wird und dabei Aminoluziferin freisetzt. Das Aminoluziferin dient als Substrat für die thermostabile "Ultra Glo™-Luziferase", welche eine Luziferasereaktion mit verlängerter Halbwertszeit katalysiert. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

## **3.3 Biochemische Methoden**

### **3.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten**

Zur Gewinnung von Proteinlysat für Westernblot-Analysen wurden die adhärenente Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst, durch Zugabe von Medium inaktiviert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 1250 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde für die Lyse der Zellen in einer geeigneten Menge kaltem RIPA-Puffer aufgenommen, durch Pipettieren vermischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden in einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 20.000 x g und 4°C die unlöslichen Bestandteile pelletiert. Der Überstand (Lysat) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert

### **3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen wurde mittels diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Fertiggelelen der Firma Biorad (Mini-Protean TGX Gel, 12%) durchgeführt. Die Proteinlysate wurden mit 2X SDS-Ladepuffer versetzt und zur Denaturierung 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Taschen der Gele wurden in einer Elektrodenpuffer enthaltenden Mini-Protean Gelkammer (Biorad) mit den Proben beladen und die Elektrophorese zunächst bei 80 V für ca. 15 Minuten durchgeführt, solange sich die Proteine noch im Sammelgel befinden. Die Trennung der Proteine im Trenngel erfolgt bei 160 V für ca. 30 Minuten. Als Proteinstandard wurden der Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder von Fermentas eingesetzt.

### 3.3.3 Westernblot

Die Expression von endogenen und überexprimierten Proteinen wurde mit Hilfe von Westernblot-Analysen nachgewiesen. Nach Trennung der zu analysierenden Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine durch Semi-Dry-Blot (Biorad) auf eine Protran Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell) übertragen. Der Transfer wurde durch Färbung der Membran in Ponceau S-Färbelösung kontrolliert. Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Membran in 10% Magermilchpulver/TBS-T für mindestens 30 min geschwenkt. Die Primärantikörper wurden in 10% Magermilchpulver/TBS-T verdünnt und über Nacht mit der Membran bei 4°C leicht geschwenkt. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 3x 10 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte 2 h Inkubation mit dem Sekundärantikörper (konjugiert mit IRDye Infrarot-Farbstoffen), der ebenfalls in 10% Magermilchpulver/TBS-T verdünnt war. Dann wurde wieder 3x 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Signale der mit IRDye gekoppelten Sekundärantikörper (Licor) wurden mit dem Licor Odyssey Imaging System visualisiert und quantifiziert. Die Membran wurde nach erneutem Absättigen in Milchpulverlösung für die Inkubation mit weiteren Antikörpern wieder verwendet.

## 3.4 Mikroskopie

### 3.4.1 Lebendzell Mikroskopie

#### 3.4.1.1 Nikon Eclipse Ti

Mit Hilfe der in dieser Arbeit konstruierten Reporterviren, die Fluoreszenzproteine fusioniert an viralen Proteinen exprimieren, ist es möglich, in der lebenden Zelle in Echtzeit die Bewegungen der einzelnen Proteine zu verfolgen. Für diese Aufnahmen wurde das voll motorisierte Nikon Eclipse Ti Livecell Mikroskop mit einem Hardware basierten *perfekt focus* System und einer Nikon DS-Qi1 Hochgeschwindigkeitskamera verwendet. Die Zellen wurden in 35 mm Schalen mit optischem Boden (Ibidi) kultiviert und direkt in einer TokaiHit Inkubationskammer bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit dem CFI Apochromat 60X TIRF Objektiv (Numerische Appretur 1.49) analysiert.

Die Auswertungen der Rohdaten wurde mit der Nikon Software NIS Elements AR V3.1 durchgeführt. Weitere Bearbeitungen, wie die 3D Rekonstruktionen und die Erstellung der Videosequenzen, wurden mit der Bitplane Imaris 6.4.2 Software und mit den lizenzfreien Softwareprogrammen ImageJ V1.4.2 sowie VirtualDub V1.9.8 vorgenommen.

#### 3.4.1.2 Färbung des ER in der lebenden Zelle

Als Farbstoff zur spezifischen Markierung des Endoplasmatischen Retikulums in der lebenden Zelle wurde der ER-Tracker™ Blue-White DPX von Invitrogen in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS verwendet. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann mit der Färbelösung für

30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen wieder in Medium kultiviert und im Livecell Mikroskop analysiert.

### 3.4.1.3 Färbung von lipid droplets

In lebenden Zellen wurde ebenfalls eine selektive Färbung der Lipid Tröpfchen (*lipid droplets*) mit Nile-Red vorgenommen (Greenspan *et al.*, 1985). Dazu wurde die Nile-Red Stocklösung 1:100 in PBS verdünnt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und dann zum weiteren Kultivieren und zur Analyse mit Medium überschichtet.

### 3.4.1.4 BioStation IM (Nikon)

Lebendzellaufnahmen von Zellen, die das sowohl im Nicht-Strukturprotein wie auch im Strukturprotein markierte Reportervirus pFK\_JC1-GFP-NS5A/mCherry-E1 exprimieren, wurden in der BioStation IM von Nikon angefertigt. Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus Inkubationskammer, die eine gleichbleibende optimale Umgebung für die Zellen garantiert und einem invertierten motorisierten Mikroskop mit Phasenkontrast und Fluoreszenzdetektion. Die Zellen wurden in 35 mm Schalen mit optischem Boden (Ibidi) kultiviert und konnten in der BioStation IM über einen langen Zeitraum beobachtet werden. Die Bearbeitung der Videos wurde mit der geräte-eigenen Software und den lizenzfreien Softwareprogrammen ImageJ V1.4.2 und VirtualDub V1.9.8 vorgenommen.

## 3.4.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Färbungen

Für die konfokale Mikroskopie stand ein Zeiss CLSM510 Meta Konfokalmikroskop zur Verfügung. Huh7.5 Zellen wurden mit viraler RNA transfiziert, in 24 Well Platten auf 12mm Deckgläser ausgesät und für den angegebenen Zeitraum kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit 2% PFA für mindestens 20 Minuten bei 4°C fixiert. Teilweise wurden die Zellen direkt in Mowiol eingebettet und nach einer Inkubation von mehreren Stunden am Mikroskop untersucht. Die Immunfluoreszenzfärbung verschiedener zellulärer und viraler Proteine erfolgte nach folgendem Protokoll. Die mit PFA fixierten Zellen wurden gewaschen und für die Permeabilisierung mit einer 1% Saponin/PBS Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Saponin abgenommen und unspezifische Bindungsstellen durch PBS/10% FKS für 30 Minuten abgesättigt. Der erste Antikörper wurde in den angegebenen Verdünnungen (vgl. 4.8.1) in PBS mit 1% FKS angesetzt und auf die Zellen gegeben. Es folgt zur Bindung des Antikörpers ein Inkubationsschritt von 2 Stunden bei 4°C. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS/1% FKS gewaschen und der zweite Antikörper, welcher ebenfalls in PBS/1% FKS nach den Angaben (in Kapitel 4.8.2) verdünnt wurde, für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Nach dem Waschen der Deckgläser wurden diese in Mowiol eingebettet, welchem für einige Versuche zum Färben der Zellkerne Draq5 in einer Konzentration von 1:1.000 zugesetzt wurde.

Zur selektiven Färbung der Lipid Tröpfchen (*lipid droplets*) mit Nile-Red (Greenspan *et al.*, 1985). wurde die Stocklösung 1:100 in PBS verdünnt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und dann in Mowiol eingebettet.

Die Aufnahmen wurden mit der gerätespezifischen Zeiss und der Bitplane Imaris 6.4.2 Software bearbeitet.

### **3.4.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen**

#### **3.4.3.1 Korrelative Mikroskopie**

Für die korrelative Mikroskopie wurden Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisation der HCV produzierenden Zellen und Elektronenmikroskopie (EM) für hochauflösende Bilder genau dieser Zellen kombiniert. Dafür wurden mit RNA transfizierte oder infizierte Zellen in 35 mm Ibidi Schälchen mit optischem Boden und Rastergitter ausgesät und kultiviert. Nach in den Abbildungen angegebener Inkubationszeit wurden für die Relokalisation zum einen Übersichtsaufnahme der fluoreszierenden Zellen auf dem Raster direkt im Nikon Eclipse Ti Mikroskop gemacht. Zum Anderen wurden Zellen zunächst mit 2% PFA fixiert und für die Übersichtsaufnahmen im Zeiss CLSM510 Meta Konfokalmikroskop untersucht. Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Reporterviren und des Rasters im Boden der Ibidi Schale ermöglichte das Lokalisieren markierter Zellen im Fluoreszenzmikroskop und das spätere zielgerichtete Schneiden dieser Zellen für die EM-Aufnahmen. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 2,5% Glutaraldehyd (GA) fixiert. Die folgenden Schritte wurden von Carola Schneider, Forschungsgruppe Elektronenmikroskopie, am HPI durchgeführt. Die fixierten Proben wurden von ihr in einem EPON Harz (Carl Roth) eingebettet und für ultra-dünne Schnitte prozessiert. Die Schnitte wurden dann mit 2% Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. EM Aufnahmen wurden ebenfalls durch Carola Schneider sowie durch Barbara Holstermann, Forschungsgruppe Elektronenmikroskopie des HPI an einem Philips CM 120 TEM bei 80 kV unter Verwendung einer Gatan Multiscan 794 Kamera durchgeführt.

#### **3.4.3.2 3D-Mikrokultivierungsverfahren für Zellen**

Mit Hilfe besonderer Mikroröhrchen, welche den Austausch von Nährstoffen und Wasser durch die semipermeablen Wände gewährleisten, war es möglich, Zellen in einer Dreidimensionalen (3D) Kultur wachsen zu lassen. Dafür wurden HCV produzierende und nicht produzierende Zellen durch Kapillarkräfte in die Röhrchen eingesaugt und die Röhrchen dann durch Anpressdruck verschlossen. Die Röhrchen mit den enthaltenden Zellen können im Medium schwimmend über einen langen Zeitraum kultiviert werden. Nach Inkubation wurden die Zellen im Röhrchen mit 2,5% Glutaraldehyd (GA) fixiert und wie oben beschrieben für die Elektronenmikroskopie in Kooperation mit der Forschungsgruppe Elektronenmikroskopie von Carola Schneider prozessiert.

## 4 Ergebnisse

Die Etablierung der Kultivierung infektiöser Hepatitis C Viren in Zellkultur 2005 legte die Grundlage für die Untersuchung des vollen viralen Lebenszyklus (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005). Trotzdem sind die Vorgänge des Zusammenbaus von Viruspartikeln und deren Ausschleusung aus der Zelle nur sehr unvollständig verstanden. Um diese späte Phase des viralen Lebenszyklus näher zu untersuchen und zu verstehen, sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit fluoreszenzmarkierte Viren hergestellt und zur weiteren Aufklärung dieser Vorgänge verwendet worden.

### 4.1 Konstruktion und Charakterisierung fluoreszenzmarkierter Virusvarianten

Die Fusion viraler Proteine mit Fluoreszenzproteinen schafft die Möglichkeit, komplexe Prozesse innerhalb der lebenden Zelle zu visualisieren. So konnten beispielsweise wichtige Erkenntnisse zum HIV-1 Lebenszyklus durch die Verwendung einer im Kapsidprotein markierten Virusvariante gewonnen werden (Hubner *et al.*, 2007). Die Beobachtung der Lokalisation und Bewegung von HCV Proteinen in der Wirtszelle in Echtzeit mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie ermöglicht ein besseres Verständnis der Biogenese auch dieses Virus. In der vorliegenden Arbeit wird daher die Konstruktion und Charakterisierung neuer Virusvarianten beschrieben, die entweder das fluoreszenzmarkierte Strukturprotein E1 oder Core enthalten.

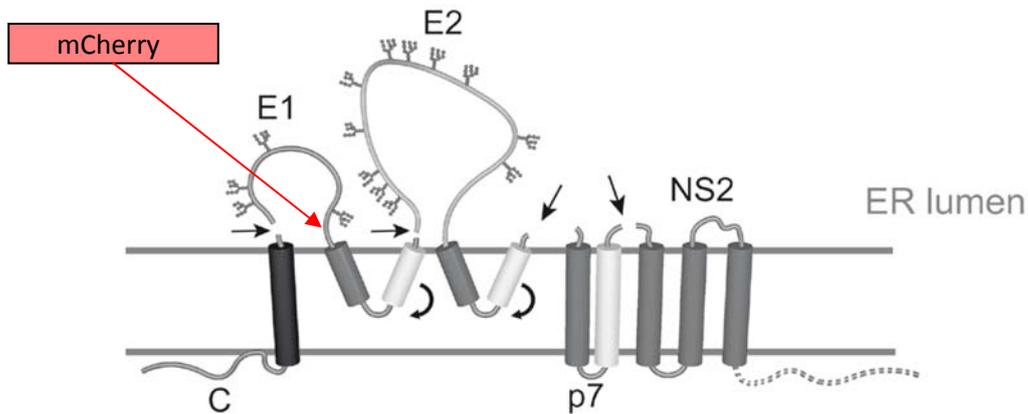
#### 4.1.1 Markierung des Strukturproteins E1

##### 4.1.1.1 Herstellung von JC1-mCherry und JC1-mCherry/GFP Virusvarianten

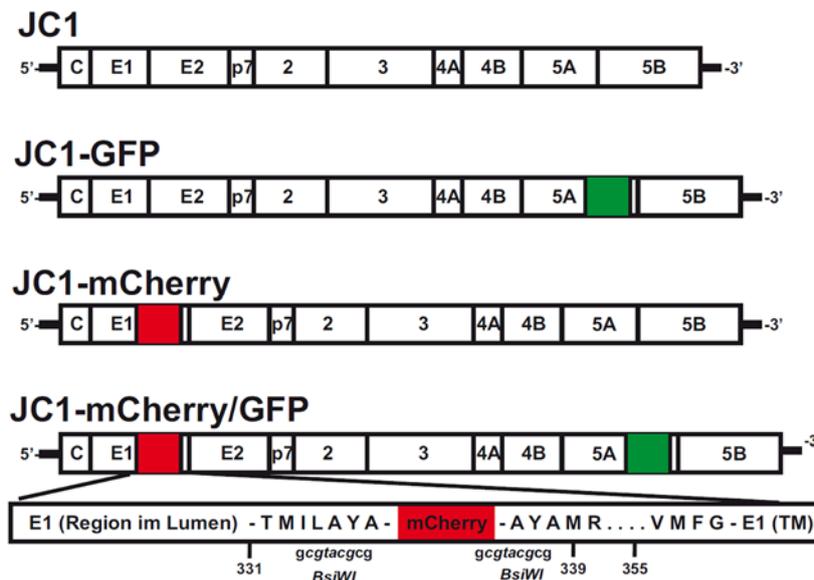
Das Hepatitis C Virus repliziert sein Genom in Analogie zu anderen Plusstrang-RNA-Viren in einem membranassoziierten Replikationskomplex, dem *membranous web*, bestehend aus replizierender RNA, viralen Proteinen und alterierten zellulären Membranen. Die Gruppe um Ralf Bartenschlager (Schaller *et al.*, 2007) hat mit der Einfügung von GFP in das Nicht-Strukturprotein NS5A, einem Phosphoprotein mit multiplen Funktionen, erstmals die Grundlage dafür gelegt, die Replikation des Hepatitis C Virus in lebenden Zellen direkt beobachten zu können. Die Insertion des Chromophors erfolgte hierbei in die dritte Domäne des Proteins, welche zwischen den Genotypen nur schwach konserviert ist und Deletionen oder auch Insertionen toleriert. Mit Hilfe von Lebendzellmikroskopie und dem Replikon-System konnten diese Replikationskomplexe und deren Bewegung in der Zelle bereits studiert werden. Es ist daher bekannt, dass große NS5A-Akkumulationen die charakteristischen *membranous web* Strukturen repräsentieren (Wölk *et al.*, 2008).

Um auch Strukturproteine beobachten zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit Virusvarianten hergestellt, die im E1 Protein mit dem monomeren und rot-fluoreszierenden Chromophor mCherry markiert ist.

Die beiden HCV Oberflächenproteine E1 und E2 sind Typ I Transmembranproteine mit einer hochglykosylierten N-terminalen Ektodomäne im ER-Lumen und einem C-terminalen hydrophoben Anker (vgl. Abb. 10). Auf der Virusoberfläche bilden sie ein funktionelles E1-E2-Dimer, dass für die Anheftung und das Eindringen des Virions in die Wirtszelle verantwortlich ist (Drummer *et al.*, 2003).



**Abb. 10: Prozessierung von E1 und E2 des HCV Vorläuferproteins.** Die Pfeile deuten Spaltstellen der zellulären Signalpeptidasen an. Die Topologie der Transmembranomänen der Oberflächenproteine entspricht der vor dem Schneiden durch die Peptidasen. Die Veränderung der Topologie ist durch die gebogenen Pfeile angedeutet. Die verzweigten Strukturen auf der Ekotdomäne von E1 und E2 stellen wichtige Glykosylierungsstellen dar. In rot wird die Insertionsstelle von mCherry angedeutet. Verändert nach Lavie *et al.*, 2007.



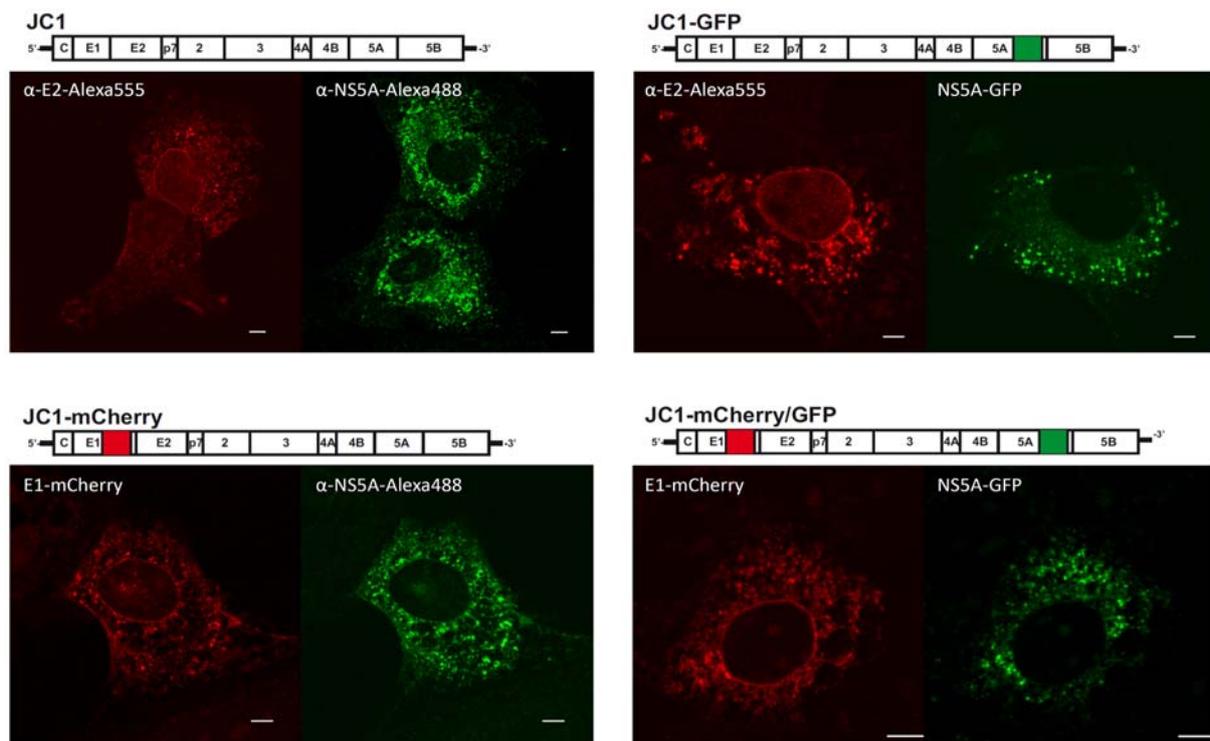
**Abb. 11: Schematische Darstellung der verwendeten markierten Virusvarianten.** Die Insertion von mCherry erfolgte über die *BsiWI* Schnittstelle zwischen der vierten Glykosylierungsstelle und der Transmembrandomäne (TM) des E1 Proteins. In dem Virus JC1-mCherry/GFP sind sowohl die Markierung im E1 Strukturprotein wie auch die im NS5A Nicht-Strukturprotein vorhanden.

Die Insertion der mCherry Sequenz *in frame* erfolgte über die in der JC1 und JC1-GFP Viruschimäre vorhandene *BsiWI* Restriktionsschnittstelle an Aminosäureposition 336 des Vorläuferproteins (s. Abb. 11, nähere Erläuterung dazu in den Kapiteln 2.5.2, 3.1.9.1, 3.1.9.2 und Abb. 9). Dabei wird mCherry zwischen der vierten Glykosylierungsstelle und der Transmembrandomäne des E1 Proteins inseriert

(vgl. Abb. 10). Es standen somit vier Virusvarianten zur Verfügung: unmarkiertes (JC1), GFP und mCherry einfach markiertes (JC1-GFP bzw. JC1-mCherry) sowie doppelt markiertes Virus (JC1-mCherry/GFP).

#### 4.1.1.2 Charakterisierung von JC1-mCherry und JC1-mCherry/GFP

Zur Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten Viren wurde *in vitro* transkribierte RNA in Huh7.5 Zellen elektroporiert und die subzelluläre Lokalisation der viralen Fusionsproteine mit nicht markierten Viren durch Immunfluoreszenz verglichen (vgl. Abb. 12). Es war kein Antikörper gegen das E1 Protein erhältlich, weshalb ein Antikörper gegen E2 verwendet wurde. Da E1 und E2 dimerisieren lokalisieren sie in den gleichen Bereichen (Deleersnyder *et al.*, 1997).

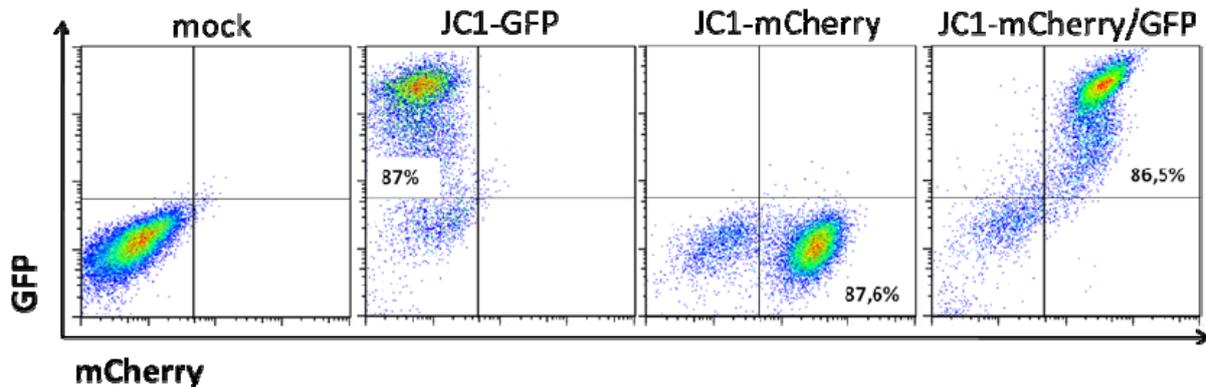


**Abb. 12: Lokalisation der Proteine NS5A und E1 bzw. E2 (CLSM 510 Meta (Zeiss)).** Huh7.5 Zellen wurden mit der RNA der angegebenen Virusvarianten elektroporiert und nach ca. zwei Tagen fixiert. Die jeweils nicht markierten Proteine wurden mit den angegebenen Antikörpern angefärbt. Für den Vergleich der Verteilung von viralen Fusionsproteinen mit nicht-markierten Proteinen wurden konfokale Bilder aufgenommen. Der Balken entspricht einer Länge von 5  $\mu$ m.

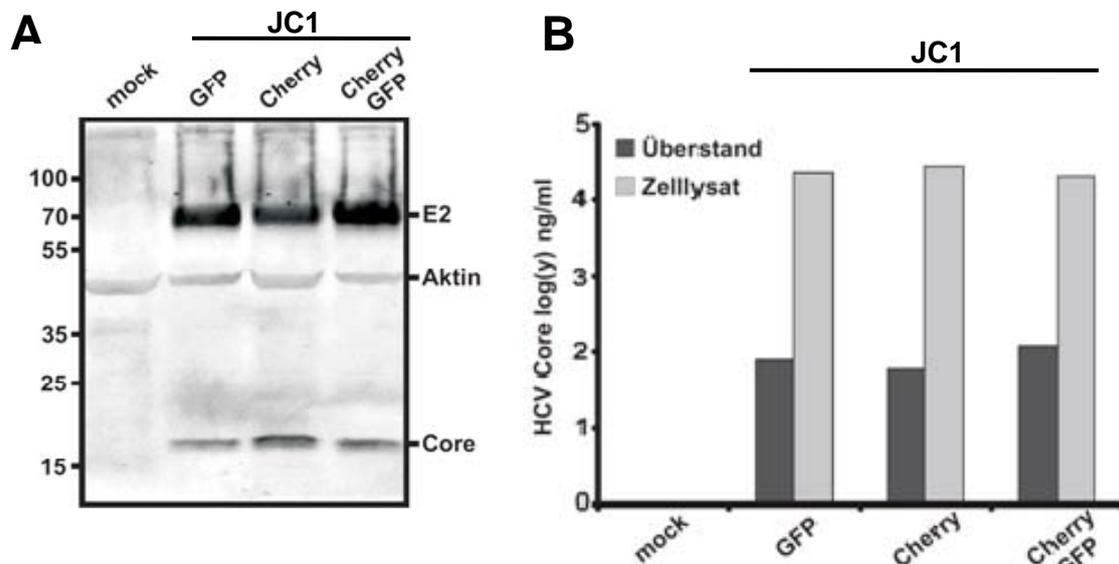
NS5A lokalisiert in vesikulären Strukturen, welche die *membranous web* Komplexe visualisieren (Wölk *et al.*, 2008), und in allen vier Virusvarianten klar zu erkennen sind. E1-mCherry und E2 lokalisieren ringförmig um den Zellkern und in einer netzartigen Struktur (Abb. 12). Ebenso gibt es punktförmige E1/E2 Akkumulationen. Diese Verteilung erinnert stark an die typische Lokalisation des Endoplasmatischen Retikulums (ER) innerhalb einer Zelle.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die neu generierten HCV JC1-mCherry und JC1-mCherry/GFP Varianten mit dem gut charakterisierten HCV JC1-GFP (Schaller *et al.*, 2007) verglichen. Zunächst wurde dazu die Elektroporationseffizienz der für die Analyse verwendeten Zellen im FACS kontrolliert

(vgl. Abb. 13). Western Blot Analysen zeigten, dass die Expression von Core und E2 aller verwendeten Konstrukte vergleichbar ist (s. Abb. 14 A).



**Abb. 13: Bestimmung der Elektroporationseffizienz (FACS Influx (BD)).** Huh7.5 Zellen wurden mit der RNA der angegebenen Virusvarianten elektroporiert und 3 Tage später im FACS auf ihre Chromophorexpression kontrolliert. Die Zellen und deren Überstand wurden für die Analysen im Western Blot und im ELISA weiter verwendet. Es sind beispielhaft die repräsentativen Daten eines von drei durchgeführten Experimenten gezeigt.

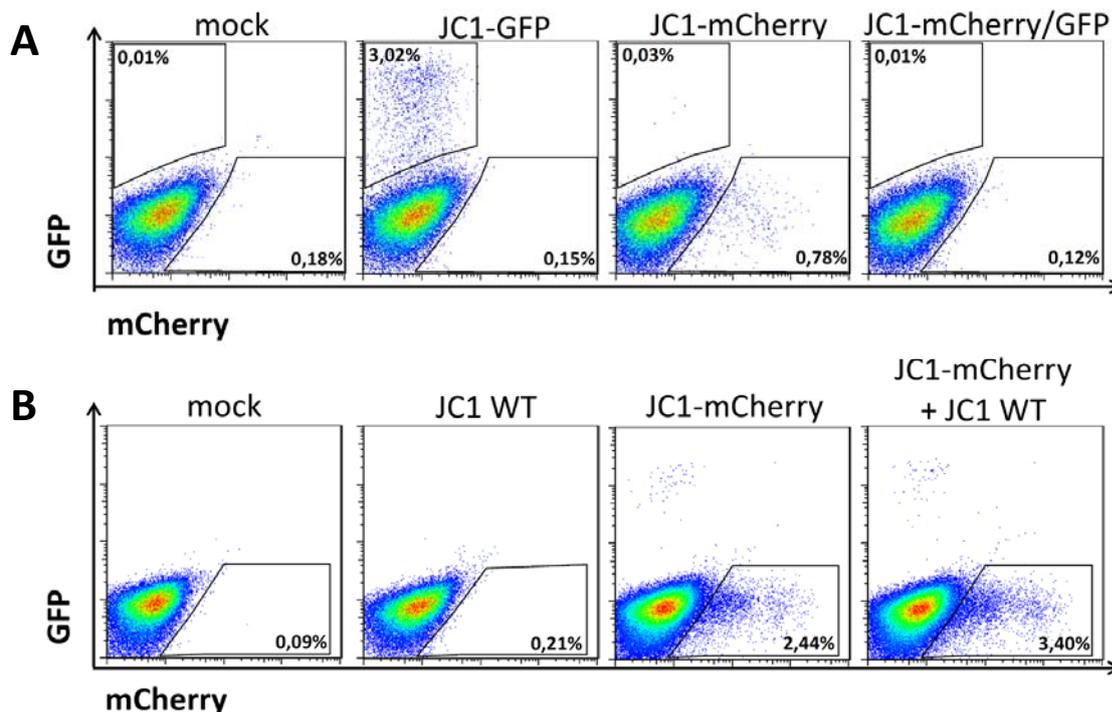


**Abb. 14: Vergleich der Proteinexpression und Partikelsekretion der neuen Virusvarianten JC1-mCherry bzw. JC1-mCherry/GFP mit dem beschriebenen Virus JC1-GFP (Schaller *et al.*, 2007).** **A:** Das Lysat von Huh7.5 Zellen, die zuvor mit viraler RNA elektroporiert wurden, wurde mit Hilfe einer Western Blot Analyse auf die Expression der viralen Proteine E2 und Core untersucht. Aktin diente hierbei als Ladekontrolle. Ein Größenstandard ist links in kDa angedeutet. **B:** Der Zellkulturüberstand und das Zelllysat von mit viraler RNA elektroporierten Huh7.5 Zellen wurde nach 72h Inkubation geerntet und mittels ELISA auf die Menge an enthaltendem Coreprotein untersucht. Dabei wurden die erhaltenen Werte auf die per FACS-Analyse bestimmte Elektroporationseffizienz, also die Menge an fluoreszenzpositiven Zellen bezogen. Es sind beispielhaft die repräsentativen Daten eines von drei durchgeführten Experimenten gezeigt.

Da alle HCV Proteine als ein Vorläuferprotein exprimiert werden, kann daraus geschlossen werden, dass auch die anderen viralen Proteine in gleichem stöchiometrischem Verhältnis produziert werden. Um zu analysieren, ob auch Viruspartikel in den Überstand sezerniert werden, wurde die Menge an Coreprotein mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert (vgl. Abb. 14 B). Auch hier wurden im direkten Ver-

gleich mit dem JC1-GFP Konstrukt ähnliche Mengen an Core sowohl im Überstand als auch in den Zelllysaten ermittelt.

Um die Infektiosität der verschiedenen JC1 Varianten zu untersuchen, wurden Huh7.5 Zellen mit den in Abb. 14 quantifizierten Überständen inokuliert und 72 Stunden nach Infektion die Zahl infizierter Zellen im FACS ermittelt. Im Vergleich zu JC1-GFP (3% Infektion) war JC1-mCherry (0,8% Infektion) deutlich attenuiert und JC1-mCherry/GFP nicht infektiös (Abb. 15 A). Durch Koelektroporation mit dem nicht markierten Wildtypvirus JC1 konnte die Infektionsrate des JC1-mCherry Reportervirus um ca. ein Drittel gesteigert werden, im hier dargestellten Beispiel von 2,4% auf 3,4% (Abb. 15 B).



**Abb. 15: Infektion von naiven Huh7.5 Zellen mit den unterschiedlichen Virusvarianten.** Huh7.5 Zellen wurden mit den Virusüberständen elektroporierter Huh7.5 Zellen infiziert und nach drei Tagen geerntet. Die Analyse erfolgte im FACS Influx (BD). A: Infektion von Zellen mit JC1-GFP, JC1-mCherry und JC1-mCherry/GFP im Vergleich. B: Vergleich der Infektion von Zellen mit JC1-mCherry Virusüberstand mit JC1-mCherry und JC1 Wildtyp RNA koelektroporierten Zellen.

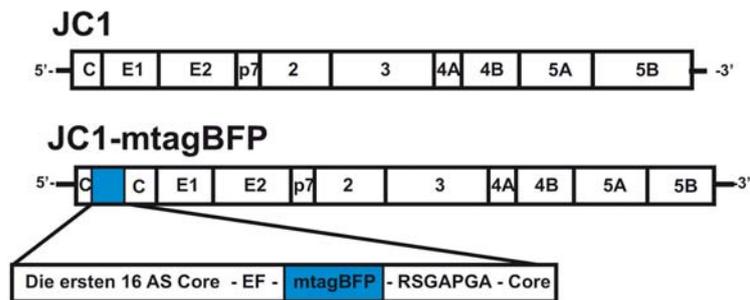
Die Charakterisierung der HCV JC1-mCherry und JC1-GFP/mCherry Varianten zeigte, dass die subzelluläre Lokalisation, die virale Genexpression und die Partikelfreisetzung durch die Fluoreszenzfarbstoffe nicht beeinträchtigt werden. Des Weiteren ist die JC1-mCherry Variante infektiös, wenn auch attenuiert. Dies bedeutet, dass HCV-JC1 mCherry und GFP/mCherry dazu geeignet sind, die intrazellulären späten Vorgänge des viralen Replikationszyklus zu untersuchen.

#### 4.1.2 Markierung des Strukturproteins Core

Ein weiteres wichtiges Werkzeug zum besseren Verständnis der Hepatitis C Virus Biogenese ist ein funktionelles im Kapsidprotein Core markiertes Reportervirus.

#### 4.1.2.1 Herstellung von JC1-mtagBFP

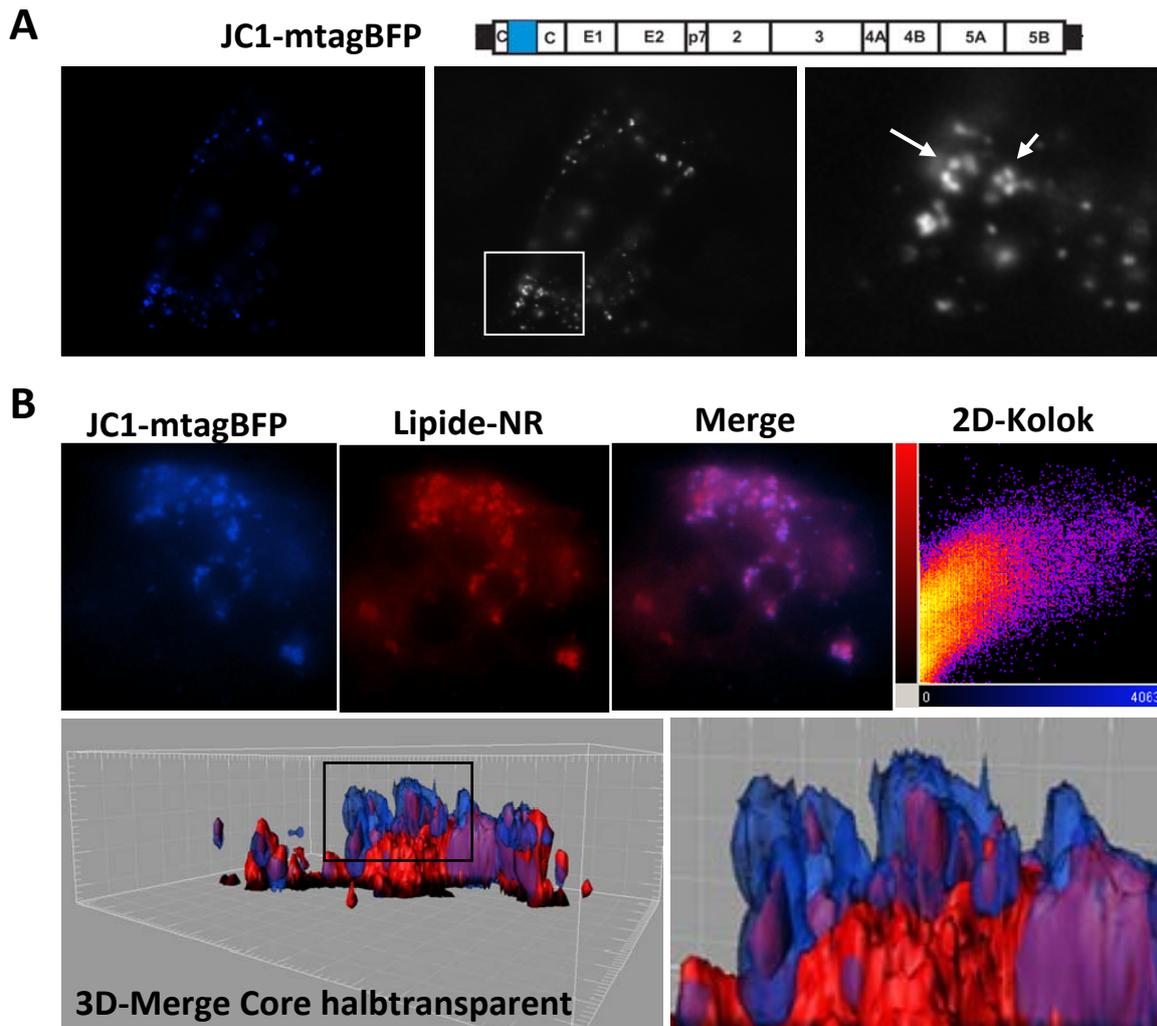
Zur Herstellung einer Core-markierten HCV Variante sollte das Protein am N-Terminus über einen kurzen Linker mit mtagBFP fusioniert werden, einem monomeren Farbstoff mit blauer Fluoreszenz (vgl. Abb. 16; Subach *et al.*, 2008). Vor dem Marker wurden die ersten 16 Aminosäuren des Core-proteins eingefügt, da diese für die HCV IRES-abhängige Translation essenziell sind (Li *et al.*, 2003; nähere Erläuterungen dazu in Kapitel 2.4.1.2 und 3.1.9.3). In Abb. 16 ist eine schematische Darstellung der JC1-mtagBFP Virusvariante abgebildet.



**Abb. 16: Schematische Darstellung der markierten Virusvariante JC1-mtagBFP.** Die Markierung des Core Protein erfolgte am N-Terminus des Proteins über einen Linker (RSGAPGA). Die sich vor dem mtagBFP befindlichen ersten 16 Aminosäuren (AS) des Core Proteins sind für die Translation der viralen Proteine essenziell und wiederholen sich auch nach dem Chromophor.

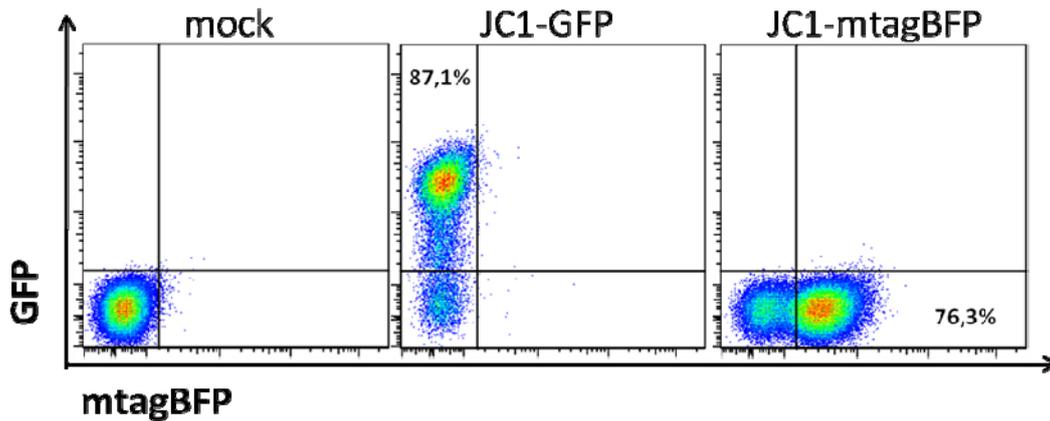
#### 4.1.2.2 Charakterisierung von JC1-mtagBFP

Um das hergestellte Konstrukt zu charakterisieren, wurden mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Expression des Core-markierten Virus ist an punktförmigen Strukturen in der Zelle zu erkennen (vgl. Abb. 17 A). Es werden daneben auch ringförmige Strukturen sichtbar, die auf eine Anlagerung von markiertem Coreprotein an der Oberfläche von *lipid droplets* schließen lassen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden JC1-mtagBFP exprimierende Zellen mit dem spezifischen Lipidfarbstoff Nile-Red angefärbt. Besonders in der 3D-Rekonstruktion ist zu erkennen, dass auch das Fusionsprotein aus Core und BFP wie das unmarkierte Protein (vgl. Abb. 24) auf der Oberfläche der Lipide lokalisiert (Abb. 17 B).

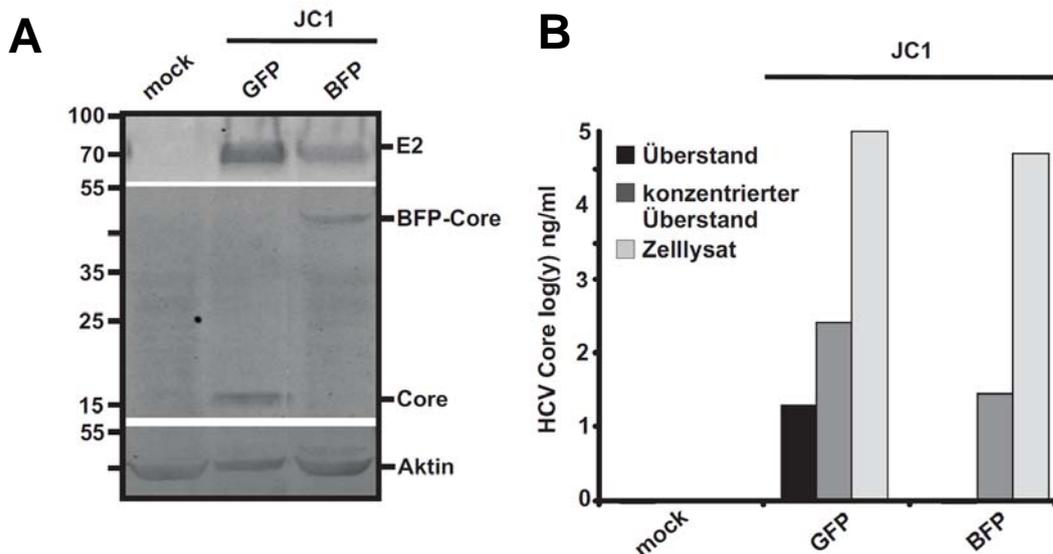


**Abb. 17: Lokalisation der am Coreprotein markierten Virusvariante JC1-mtagBFP (Nikon Ti Eclipse).** Huh7.5 Zellen wurden mit JC1-mtagBFP RNA elektroporiert, auf speziellen Schalen mit optischem Boden ausgesät und für zwei Tage inkubiert. **A:** Reportervirus exprimierende Zelle. Zur besseren Sichtbarkeit wurde die Fluoreszenz in Farbe und in Schwarz-Weiß dargestellt. Der weiße Rahmen kennzeichnet den daneben dargestellten vergrößerten Bereich. Die Pfeile deuten auf ringförmige Strukturen. **B:** In den elektroporierten Zellen wurden die *lipid droplets* mit dem spezifischen membrangängigen roten Farbstoff Nile-Red (NR) angefärbt. In der oberen Reihe ist die Maximumintensitätsprojektion (MIP) dargestellt, eine halbtransparente Visualisierungsmethode für 3D-Bilddaten. In dem zweidimensionalen Kolokalisationsdiagramm (2D-Kolok) sind die Intensitäten der einzelnen Pixel in den Kanälen für das mtagBFP (X-Achse) und das rote Nile-Red (Y-Achse) aufgetragen. Die untere Reihe zeigt die 3D-Rekonstruktion des Z-Stapels mit Hilfe der Bitplane Imaris Software. Der schwarze Rahmen umgrenzt die im rechten Nachbarbild vergrößerte Darstellung. Die Oberfläche des blauen Coresignals ist halbtransparent dargestellt.

Die Expression der viralen Proteine E2 und Core und die Sezernierung von Partikeln in den Überstand wurde mit der JC1-GFP Virusvariante (Schaller *et al.*, 2007) verglichen. Zunächst wurde dazu die Elektroporationseffizienz der verwendeten Zellen mit Hilfe einer FACS-Analyse kontrolliert (vgl. Abb. 18).



**Abb. 18: Bestimmung der Elektroporationseffizienz (FACS Canto II (BD)).** Huh7.5 Zellen wurden mit der RNA der angegebenen Virusvarianten elektroporiert und 3 Tage später im FACS auf ihre Fluoreszenzproteinexpression kontrolliert. Es sind beispielhaft die repräsentativen Daten eines von drei durchgeführten Experimenten gezeigt.



**Abb. 19: Vergleich der Proteinexpression und Partikelsekretion der neuen Virusvariante JC1-mtagBFP mit dem beschriebenen Virus JC1-GFP (Schaller *et al.*, 2007).** **A:** Das Lysat von Huh7.5 Zellen, die zuvor mit viraler RNA elektroporiert wurden, wurde mit Hilfe einer Western Blot Analyse auf die Expression der viralen Proteine E2 und Core untersucht. Aktin diente hierbei als Ladekontrolle. Ein Größenstandard ist links in kDa angedeutet. **B:** Der Zellkulturüberstand und das Zelllysat von mit viraler RNA elektroporierten Huh7.5 Zellen wurde nach 72 h Inkubation geerntet und mittels ELISA auf die Menge an enthaltendem Coreprotein untersucht. Dabei wurden die erhaltenen Werte auf die zuvor per FACS-Analyse bestimmte Elektroporationseffizienz, also die Menge an fluoreszenzpositiven Zellen, bezogen. Es sind die repräsentativen Daten eines von drei durchgeführten Experimenten gezeigt.

Im Western Blot konnten sowohl für JC1-GFP wie auch für die neue, Core markierte JC1-mtagBFP Variante virale Proteine detektiert werden. Allerdings sind die Banden für das GFP Virus stärker. In dem in Abb. 19 dargestellten Versuch war die Elektroporationseffizienz für das BFP Virus etwas geringer. Die höher laufende Bande für das Coreprotein zeigt die erfolgreiche Expression des Fusionsproteins aus mtagBFP und Core. Da alle HCV Proteine als ein Vorläuferprotein exprimiert werden,

kann daraus geschlossen werden, dass auch die anderen viralen Proteine in gleichem stöchiometrischem Verhältnis produziert werden.

Die zugehörigen Überstände und das Lysat wurden ebenfalls im HCV Core ELISA untersucht. Im direkt von den JC1-mtagBFP produzierenden Zellen geernteten Überstand ist kein Coreprotein detektierbar. In den konzentrierten Überständen allerdings wird Core im ELISA nachgewiesen.

Um die Infektiosität des neu konstruierten Virus zu untersuchen, wurden Überstände elektroporierter Zellen gesammelt und Huh7.5 Zellen infiziert (Abb. 20).



**Abb. 20: Infektion von naiven Huh7.5 Zellen mit dem Core-markierten Virus (FACS Canto II (BD)).** Huh7.5 Zellen wurden mit den Überständen JC1-GFP und JC1-mtagBFP elektroporierter Huh7.5 Zellen infiziert und nach drei Tagen geerntet. Die Analyse erfolgte im FACS Canto II (BD).

Trotz schlechter Infektionseffizienzen konnten 0,2% (JC1-GFP) und 0,1% (JC1-mtagBFP) der Zellen infiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass HCV JC1-mtagBFP zwar attenuiert, aber dennoch infektiös zu sein scheint.

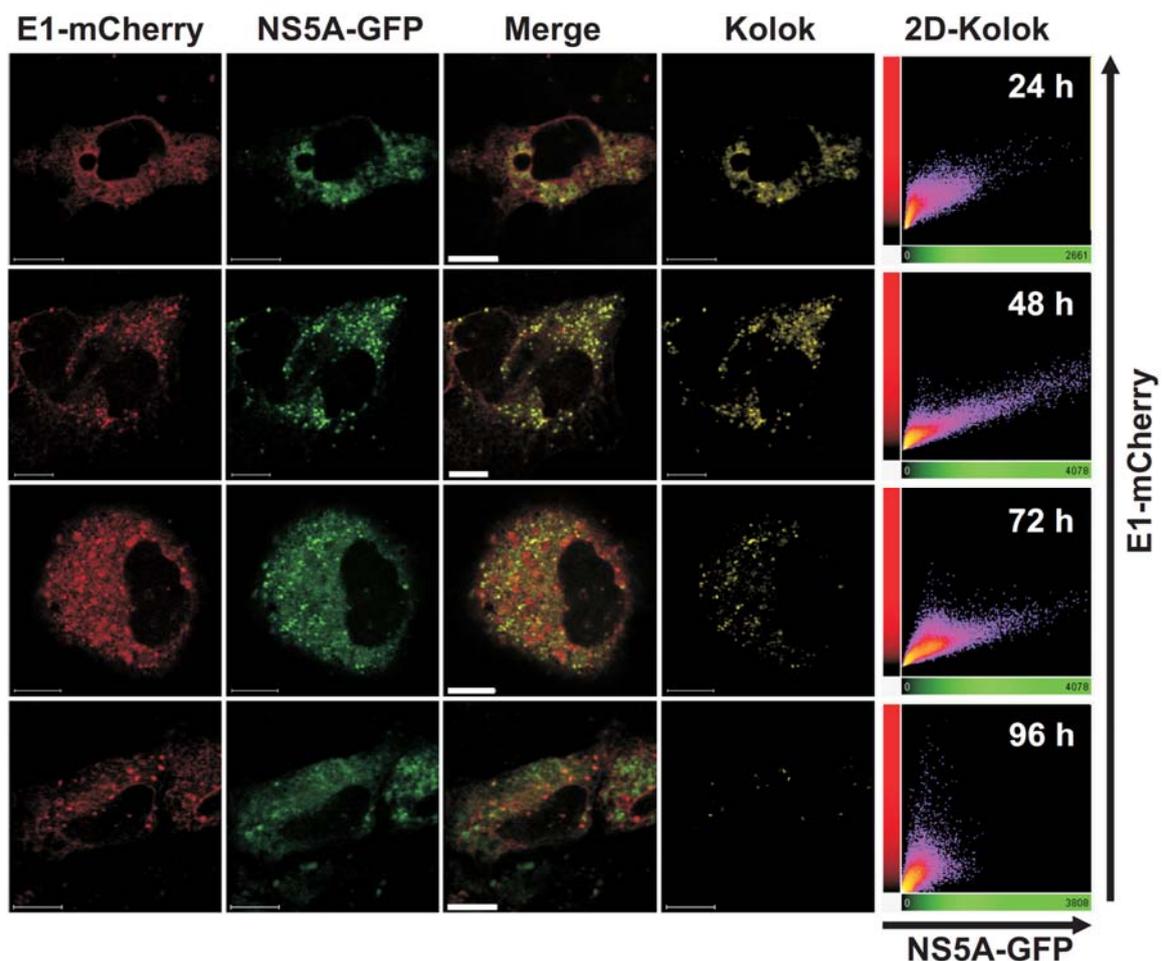
Zusammengenommen wurde eine Core-markierte Virusvariante hergestellt, in der die Genexpression kaum beeinträchtigt zu sein scheint. Die Partikelsekretion und die Infektiosität ist gegenüber der JC1-GFP Variante möglicherweise attenuiert und sollte in weiteren Analysen genauer untersucht werden. Das markierte Coreprotein zeigt unterdessen die erwartete Lokalisation an der Oberfläche von *lipid droplets* und könnte deshalb in weiteren Studien wertvoll für die Untersuchung der HCV Freisetzung sein.

## 4.2 Analyse der HCV Assemblierung

### 4.2.1 Visualisierung der räumlichen und zeitlichen HCV Proteinexpression

#### 4.2.1.1 Analyse fixierter Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

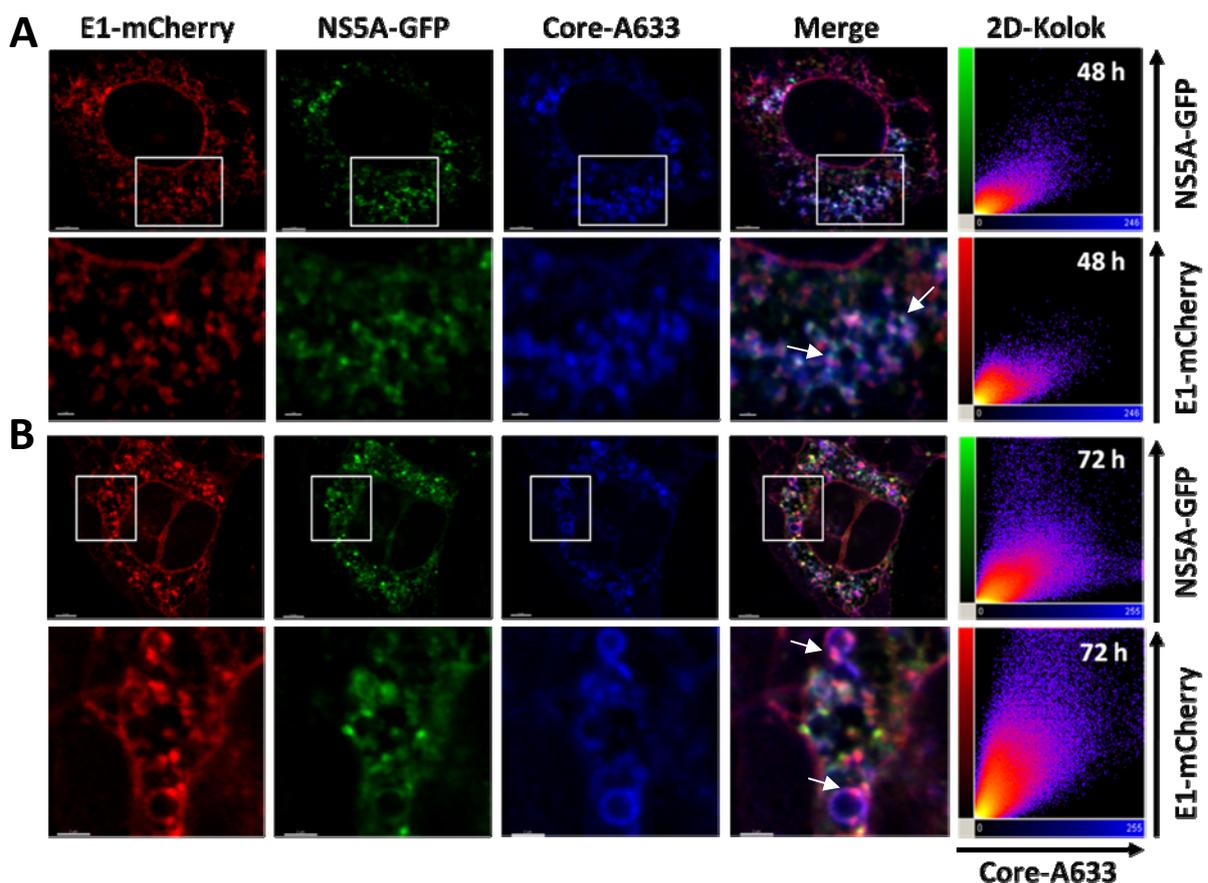
Die in 6.1 charakterisierte Virusvariante JC1-mCherry/GFP exprimiert mCherry im Strukturprotein E1 und GFP im Nicht-Strukturprotein NS5A. Dies ermöglicht die simultane Visualisierung beider Proteine in Virus exprimierenden Zellen und damit die Untersuchung der zeitlichen und räumlichen Organisation der Virusreplikation.



**Abb. 21: Zeitliche und räumliche Veränderung in der Lokalisation von Struktur- und Nicht-Strukturproteinen (CLSM 510 Meta (Zeiss)).** Konfokale Aufnahmen von Huh7.5 Zellen, die mit JC1-mCherry/GFP RNA elektroporiert wurden 24 bis 96 Stunden nach Elektroporation. In dem zweidimensionalen Kolokalisationsdiagramm (2D-Kolok) sind die Intensitäten der einzelnen Pixel in den Kanälen für GFP (X-Achse) und mCherry (Y-Achse) aufgetragen. Die Verteilung der Pixel, die in diesem Diagramm innerhalb eines bestimmten Schwellenwerts der Kolokalisation liegen erscheinen im Kolokalisationsbild (Kolok) gelb. Der Balken entspricht einer Größe von 5  $\mu\text{m}$ .

Zunächst wurden konfokale Aufnahmen von JC1-mCherry/GFP produzierenden Huh7.5 Zellen gemacht, die ein, zwei, drei oder vier Tage nach Elektroporation fixiert wurden (s. Abb. 21). Zur Analyse der Kolokalisation beider Farben wurde ein Kolokalisationsdiagramm (2D-Kolok, Abb. 21 rechte Spalte) angefertigt, in welchem die Pixel nach ihrer Intensität in den Kanälen für GFP (X-Achse)

und für mCherry (Y-Achse) aufgetragen sind. Befinden sich die Pixel im Intensitätsprofil auf einer Diagonale zeigt dies die Kollokalisierung der Fluoreszenzfarbstoffe an. Bei zunehmender Trennung (angenähert parallel zur X- oder Y-Achse) kollokalisieren die untersuchten Proteine weniger miteinander. 24 und 48 Stunden nach Elektroporation der Zellen, konnte eine deutliche Kollokalisierung der Struktur (E1-mCherry) und Nicht-Strukturproteine (NS5A-GFP) beobachtet werden. Zu späteren Zeitpunkten (72h – 96h) gab es immer noch Bereiche partieller Kollokalisierung, wobei sich E1 und NS5A zunehmend voneinander trennten und E1 in zellulären Vesikeln lokalisierte (Abb. 16).



**Abb. 22: Zeitliche und räumliche Lokalisation der HCV Strukturproteine E1 und Core sowie des Nicht-Strukturproteins NS5A (CLSM 510 Meta (Zeiss)).** Konfokale Aufnahmen von Huh7.5 Zellen, die mit JC1-mCherry/GFP RNA elektroporiert und zu 48 (A) bzw. 72 (B) Stunden nach Elektroporation fixiert wurden. Der Nachweis des Coreproteins erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und eines Alexa633 Sekundärantikörpers. In dem zweidimensionalen Kollokalisationsdiagramm (2D Kolok) sind die Intensitäten der einzelnen Pixel in den Kanälen für Alexa633 (X-Achse) und mCherry bzw. GFP (Y-Achse) aufgetragen. Der weiße Rahmen zeigt den in der jeweils darunter liegenden Zeile vergrößerten Ausschnitt der Zelle. Der Balken entspricht einer Größe von 5  $\mu\text{m}$ . Die weißen Pfeile deuten auf typische Ringstrukturen und zeigen im Bildteil A die Kollokalisierung aller drei Proteine und im Bildteil B die Akkumulationen von E1 und Core auf der Oberfläche der Ringstrukturen bei denen weniger bis keine Kollokalisierung mit NS5A beobachtet werden kann.

Um analog die Verteilung des HCV Coreproteins zu untersuchen, wurden JC1-mCherry/GFP exprimierende Zellen mit anti-HCV Core Antikörper gefärbt (Abb. 22). Nach 48 Stunden, also zu einem frühen Zeitpunkt des Replikationszyklus, lokalisieren alle drei Proteine gemeinsam um ringförmige Strukturen (s. Abb. 22 A). Auch im Kollokalisationsdiagramm erkennt man eine Überlagerung

von Coreprotein (X-Achse) sowohl mit E1 (Y-Achse, rot) als auch mit NS5A (Y-Achse, grün). In der Vergrößerung deuten weiße Pfeile beispielhaft auf kolokalisierende Bereiche an ringförmigen Strukturen.

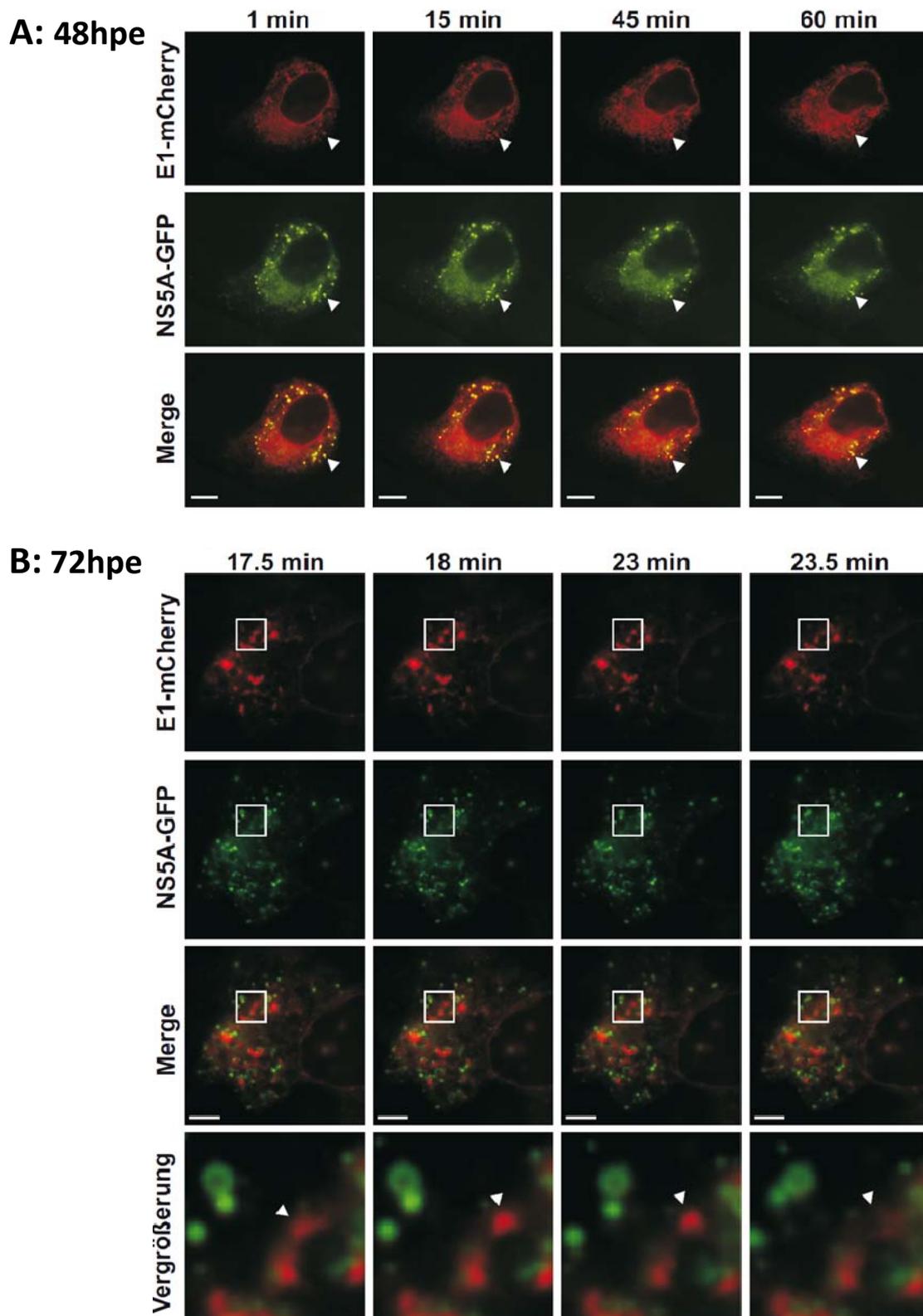
In einer späteren Phase nach 72 Stunden sind Bereiche auf der Oberfläche der ringförmigen Strukturen zu erkennen, an denen sich besonders die Strukturproteine Core und E1, nicht aber das Nicht-Strukturprotein NS5A zu punktförmigen, vesikulären Akkumulationen zusammenlagern (Abb. 22 B). In den Kolokalisationsdiagrammen ist hier eine starke diagonale Verteilung der Pixel in Diagramm von Core gegen E1 zu erkennen, wohingegen sich die Pixel parallel zu beiden Achsen im Diagramm von Core und NS5A finden lassen, was auf eine Trennung der Lokalisationen dieser beiden Proteine hindeutet.

### **4.2.1.2 Analyse der Bewegung viraler Proteine in der lebenden Zelle**

Zur Untersuchung der Bewegung und Verteilung von E1 und NS5A in lebenden HCV exprimierenden Zellen wurden Huh7.5 Zellen mit JC1-mCherry/GFP RNA elektroporiert. 48 und 72 Stunden nach Elektroporation wurde die Bewegung von E1 und NS5A für jeweils ca. 30-60 min im Lebendzelmikroskop aufgenommen (Abb. 18).

In Übereinstimmung mit den Daten aus fixierten Zellen ist erkennbar, dass nach 48 Stunden E1 und NS5A kolokalisieren. Des Weiteren bewegen sich E1 und NS5A gemeinsam, was darauf hin deutet dass sich beide am oder im selben subzellulären Kompartiment befinden.

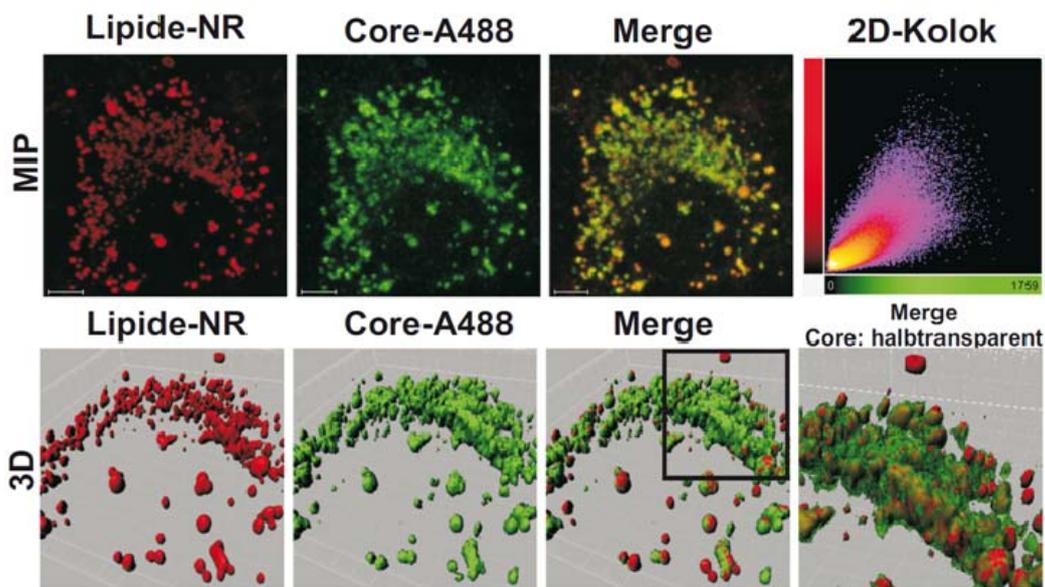
Zu einem späten Zeitpunkt kann insbesondere in der Überlagerung der beiden Kanäle eine Trennung von E1 und NS5A festgestellt werden. In der Vergrößerung ist ein Abschnitt dargestellt, an dem Strukturprotein an der Oberfläche einer ringförmigen Struktur akkumuliert und verschwindet. Dabei könnte es sich um ein oder mehrere Viruspartikel handeln, die an der Oberfläche eines *lipid droplets* assemblieren und dann über vesikulären schnellen Transport die Zelle verlassen.



**Abb. 23: Zeitliche und räumliche Veränderung in der Lokalisation und der Bewegung des Strukturproteins E1 sowie des Nicht-Strukturproteins NS5A.** Einzelbilder von Videosequenzen der Lebendzellmikroskopie im Nikon Eclipse Ti Mikroskop. Huh7.5 Zellen wurden JC1-mCherry/GFP RNA elektroporiert, auf speziellen Schalen mit optischem Boden (Ibidi) ausgesät und zu 48 bzw. 72 Stunden nach Elektroporation (hpe) für einen längeren Zeitraum im Lebendzellmikroskop analysiert. Vier exemplarische Einzelbilder der Videosequenzen sind mit dem jeweiligen Zeitpunkt nach Videobeginn (min) dargestellt. **A:** Einzelzelle, 48 hpe. Die Pfeilspitze deutet auf eine beispielhafte Akkumulation von E1 (rot) und NS5A (grün), die sich über die Zeit miteinander bewegt. **B:** Einzelzelle, 72 hpe. Das weiße Rechteck verdeutlicht den, in der unteren Reihe vergrößerten Abschnitt des Videos. Hier deutet die Pfeilspitze auf eine über die Zeit entstehende und wieder verschwindende Akkumulation, die nur rote Fluoreszenz zeigt. Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 Lipid droplets als Aufbauoberfläche für Virionen

Lipide, insbesondere die zellulären Speicherorganellen *lipid droplets*, sind essenziell für die Produktion von Hepatitis C Viren (Barba *et al.*, 1997; Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007; Boulant *et al.*, 2008). Bei den in den Analysen dieser Arbeit beobachteten ringförmigen Strukturen, um die sich E1, Core und NS5A anlagerten, könnte es sich um solche *lipid droplets* handeln. Huh7.5 Zellen wurden mit HCV JC1 RNA elektroporiert und die subzelluläre Lokalisation von Core und Lipiden mit Hilfe des lipophilen Farbstoffs Nile-Red untersucht (Abb. 24).



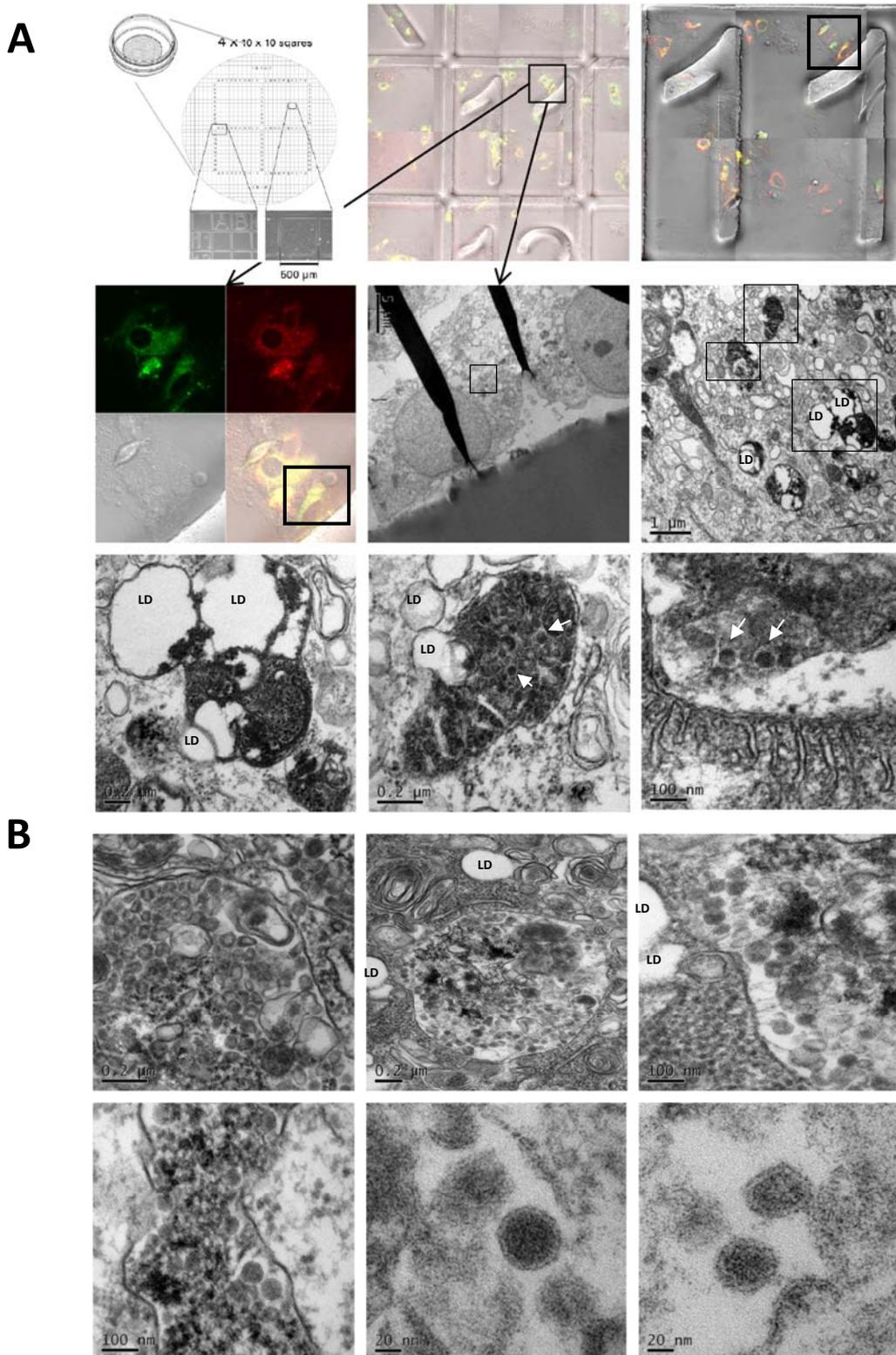
**Abb. 24: Konfokale Aufnahmen zur Lokalisation des HCV Coreproteins (CLSM 510 Meta (Zeiss)).** Huh7.5 Zellen wurden mit der RNA des unmarkierten JC1 Wildtypvirus elektroporiert, nach ca. 48 Stunden fixiert und das Coreprotein mit spezifischen Antikörpern (A488: sekundärer Antikörper Alexa488) nachgewiesen. Die *lipid droplets* wurden mit dem spezifischen membrangängigen roten Farbstoff Nile-Red (NR) angefärbt. In der oberen Reihe ist die Maximumintensitätsprojektion (MIP), eine halbtransparente Visualisierungsmethode für 3D-Bilddaten, dargestellt. In dem zweidimensionalen Kolokalisationsdiagramm (2D-Kolok) sind die Intensitäten der einzelnen Pixel in den Kanälen für das grüne Alexa488 (X-Achse) und das rote Nile Red (Y-Achse) aufgetragen. Die untere Reihe zeigt die 3D-Rekonstruktion des Z-Stapels mit Hilfe der Bitplane Imaris Software. Der schwarze Rahmen umgrenzt die im rechten Nachbarbild vergrößerte Darstellung. Hier wurde die Oberfläche des grünen Signals halbtransparent dargestellt. Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

In der Maximumintensitätsprojektion (MIP), aber noch deutlicher in der 3D-Rekonstruktion mit der halbtransparenten Oberfläche des grün dargestellten Coreproteins ist dessen Lokalisation um die rot-markierten *lipid droplets* zu erkennen. In dem 2D-Kolokalisationsdiagramm kann eine diagonale Verteilung der Pixelintensitäten beobachtet werden, was die Kolokalisation von Core und Lipid verdeutlicht (s. Abb. 24).

### 4.2.3 Korrelative Mikroskopie zur Lokalisation assemblierter Virionen

In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnten besonders in einer späteren Phase (72 Stunden nach Elektroporation), vesikuläre Akkumulationen gefunden werden, die Strukturproteine des Hepatitis C Virus E1 und Core enthalten, nicht aber das Nicht-Strukturprotein NS5A (vgl. Abb. 22 B und Abb. 23 B). Dies lässt vermuten, dass sich in diesen Strukturen assemblierte Viruspartikel befinden. Aufgrund der Auflösungsgrenze der Fluoreszenzmikroskopie, die limitiert durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts bei maximal 200 nm liegt, ist es nicht möglich, Akkumulationen markierter Virusproteine von assemblierten Virionen zu unterscheiden. Daher wurde der Ansatz der korrelativen Mikroskopie gewählt, der die Fluoreszenzmikroskopie mit der Transmissionselektronenmikroskopie verbindet (s. auch Kapitel 3.4.3.1). Durch die Elektronenmikroskopie (EM) kann die notwendige Auflösung erreicht werden, um Viruspartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm darstellen zu können. Die Verwendung spezieller Zellkulturschalen, in deren Boden ein Raster eingestanz ist, machte es möglich, HCV produzierende Zellen durch ihre Fluoreszenz zu identifizieren und für die EM Analysen zu relokalisieren (Abb. 25 A). Exemplarisch wurde eine Zelle am Steg der im Gitter enthaltenen Zahl 11 für die Analyse verwendet (gekennzeichnet durch die schwarzen Rahmen). In dieser HCV exprimierenden Zellen konnten auf ultrastruktureller Ebene Areale identifiziert werden, an denen sich elektronendichte Bereiche auf der Oberfläche von *lipid droplets* befinden. Ausgehend von einigen *lipid droplets* bilden sich elektronendichte vesikuläre Strukturen, die virusähnliche Partikel mit einem typischen Durchmesser von 50 nm enthalten (Abb. 25 A, Pfeile). Abb. 25 B zeigt Bilder aus anderen untersuchten Zellen. Auch hier können *lipid droplets* und vesikuläre, membranumschlossene Bereiche mit virusähnlichen Partikeln ausgemacht werden. Daneben sind ebenfalls einzelne Viruspartikel mit charakteristischer Größe und Morphologie in hoher Auflösung gezeigt.

Die Untersuchungen der räumlichen und zeitlichen Organisation der HCV Struktur- und Nicht-Strukturproteine haben gezeigt, dass E1, Core und NS5A zunächst, also 48 Stunden nach Elektroporation, gemeinsam um *lipid droplets* lokalisieren. Durch die simultane Bewegung von E1 und NS5A in lebenden Zellen konnte demonstriert werden, dass sich beide Proteine in einem gemeinsamen Komplex befinden. Später, also 72 Stunden nach Elektroporation, konnte weiterhin eine Kollokalisierung der Strukturproteine E1 und Core aber deren Separation von NS5A beobachtet werden. Die Akkumulation von E1 an der Oberfläche der *lipid droplets* ohne eine Kollokalisierung mit NS5A lässt die Entstehung eines Vesikels mit assemblierten Virionen vermuten. In ultrastrukturellen EM-Analysen konnten virusähnliche Partikel in vesikulären Strukturen gefunden werden, die der Morphologie freier Partikeln in der neuesten Literatur (Gastaminza *et al.*, 2010) deutlich ähneln.



**Abb. 25: Korrelative Mikroskopie und elektronenmikroskopische Analyse HCV produzierender Zellen (Zeiss CLSM 510 Meta; Philips CM 120 TEM).** Huh7.5 Zellen wurden mit JC1-mCherry/GFP RNA elektroporiert und auf Schalen mit optischem Boden und Gitter (Ibidi) ausgesät (A, oben links). **A:** Für die Analyse wurde eine Zelle ausgewählt, die sich in Nähe der eingestanzten 11 befand. Diese wurde aufgrund ihrer Fluoreszenz als HCV produzierend identifiziert und konnte für die EM Analyse relokalisiert werden. Die betreffende Zelle und vergrößerte Bereiche sind jeweils mit einem schwarzen Quadrat umrahmt. Die weißen Pfeile zeigen Viruspartikel. **B:** EM Aufnahmen aus unterschiedlichen Zellen in unterschiedlicher Vergrößerung. LD: *lipid droplet*. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit der Forschungsgruppe für Elektronenmikroskopie des HPI von Carola Schneider angefertigt (vgl. Kap. 3.4.3.1).

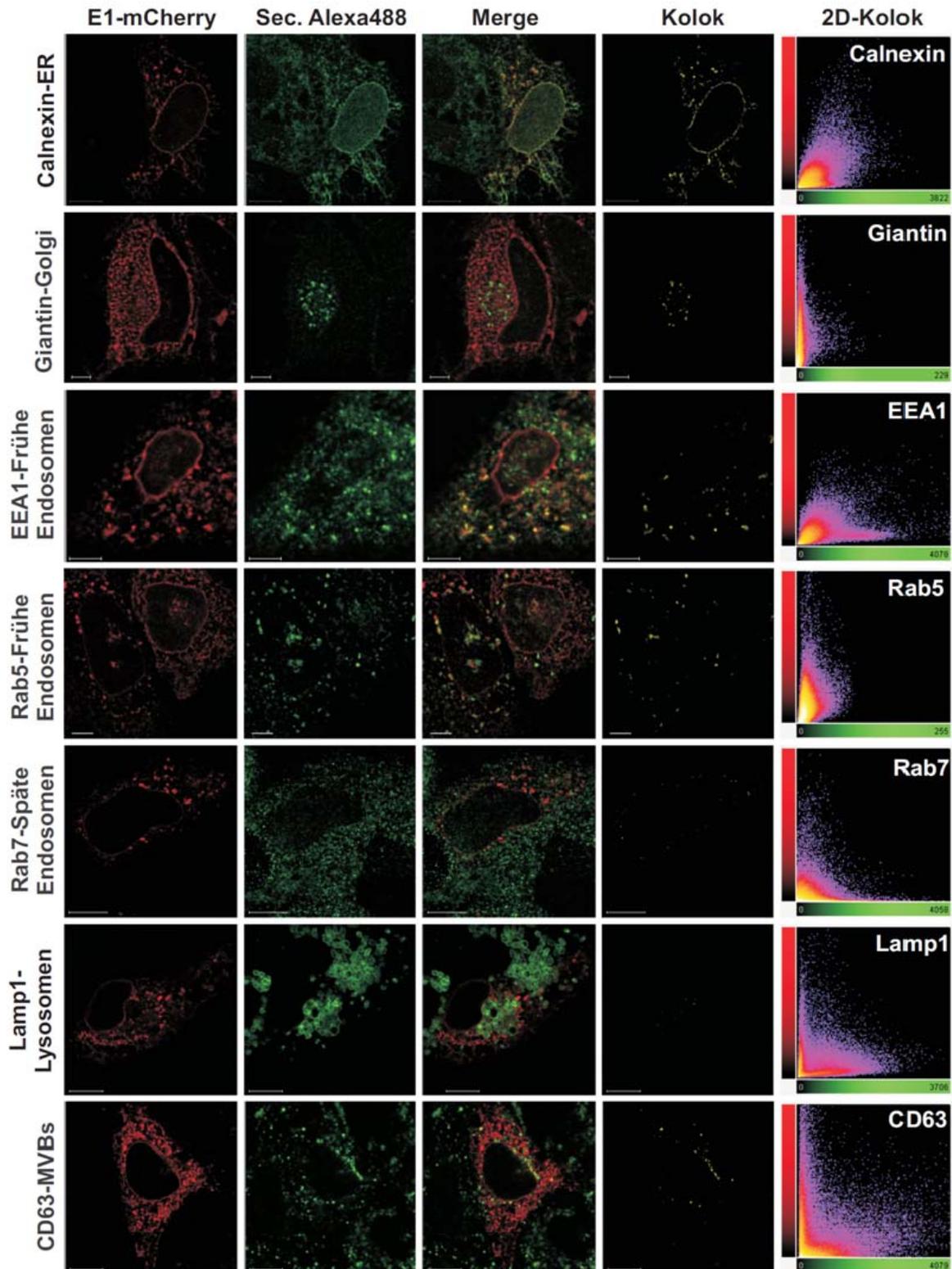
## 4.3 Untersuchung der HCV-Freisetzung

### 4.3.1 Charakterisierung virushaltiger Vesikel durch Immunfluoreszenz

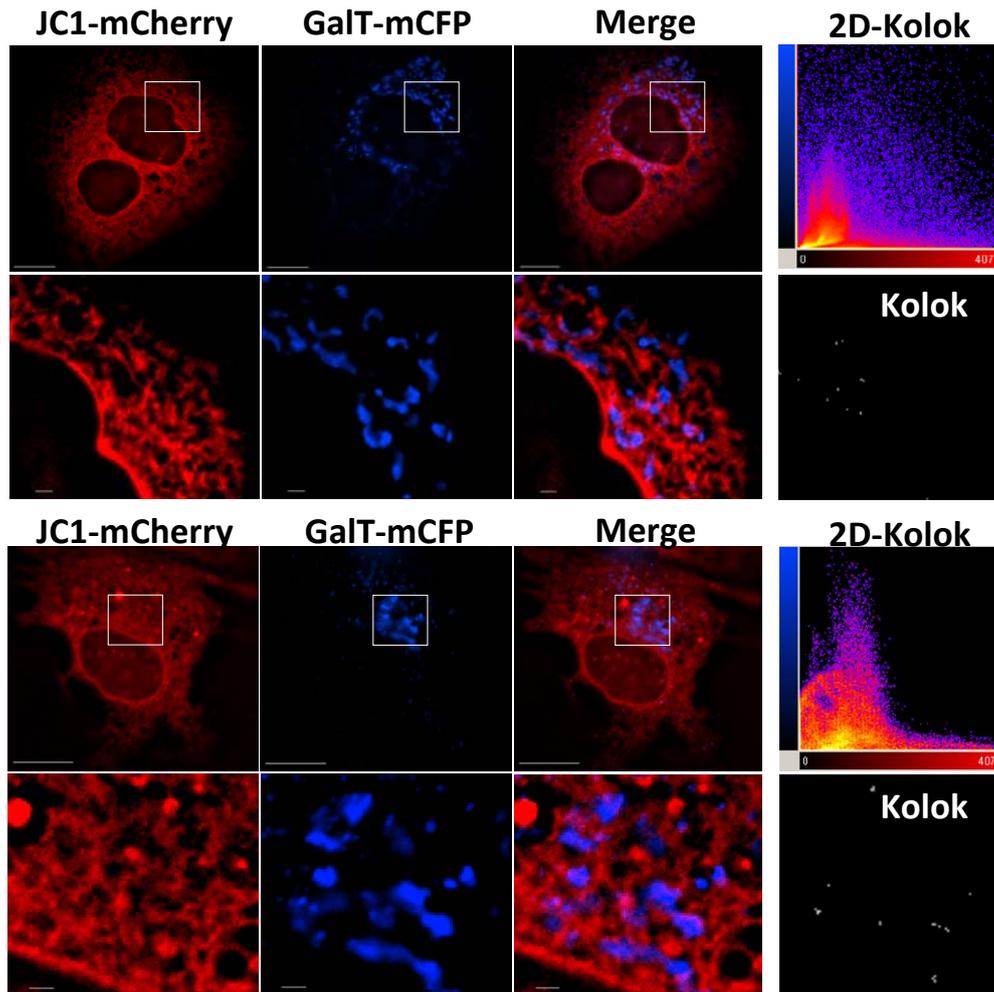
Zur Charakterisierung der virushaltigen Vesikel wurden HCV JC1-mCherry exprimierende Huh7.5 Zellen nach ca. drei Tagen fixiert und intrazellulär mit verschiedenen Antikörpern gegen zelluläre Kompartimente gefärbt.

Der ER-Marker Calnexin kolokalisierte deutlich mit E1, sowohl in netzartigen Strukturen, im Ring um den Zellkern, als auch in Vesikeln (Abb. 21). Im Gegensatz hierzu, kolokalisierte E1 nur schwach mit Giantin, einem Marker für den Golgi-Apparat. Weder späte Endosomen, noch Lysosomen oder MVBs (*multivesicular bodies*) zeigen eindeutig kolokalisierende Regionen. Allerdings kolokalisiert E1 in Vesikeln mit Markern für frühe Endosomen, EEA1 und Rab5 (Abb. 21).

Viele Viren, unter anderem auch Vertreter der Familie der Flaviviridae, wie z.B. das Dengue Virus, werden über den klassischen sekretorischen Weg, der das Endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und zelluläre Vesikel enthält, ausgeschleust (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Färbungen mit Giantin deuteten darauf hin, dass der Golgi-Apparat bei der HCV Freisetzung keine Rolle spielt (vgl. Abb. 26). Deshalb wurde dieser in lebenden HCV JC1-mCherry exprimierenden Zellen mit einem  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase-CFP (GalT) Fusionsprotein visualisiert (Rocks *et al.*, 2010). In den beiden dargestellten Zellen kolokollieren E1 und GalT nicht (s. Abb. 27). In der Lebendzellmikroskopie bewegen sich die beiden Proteine unabhängig voneinander. Diese Daten sprechen gegen eine Beteiligung des Golgi-Apparats im Rahmen der HCV Freisetzung.

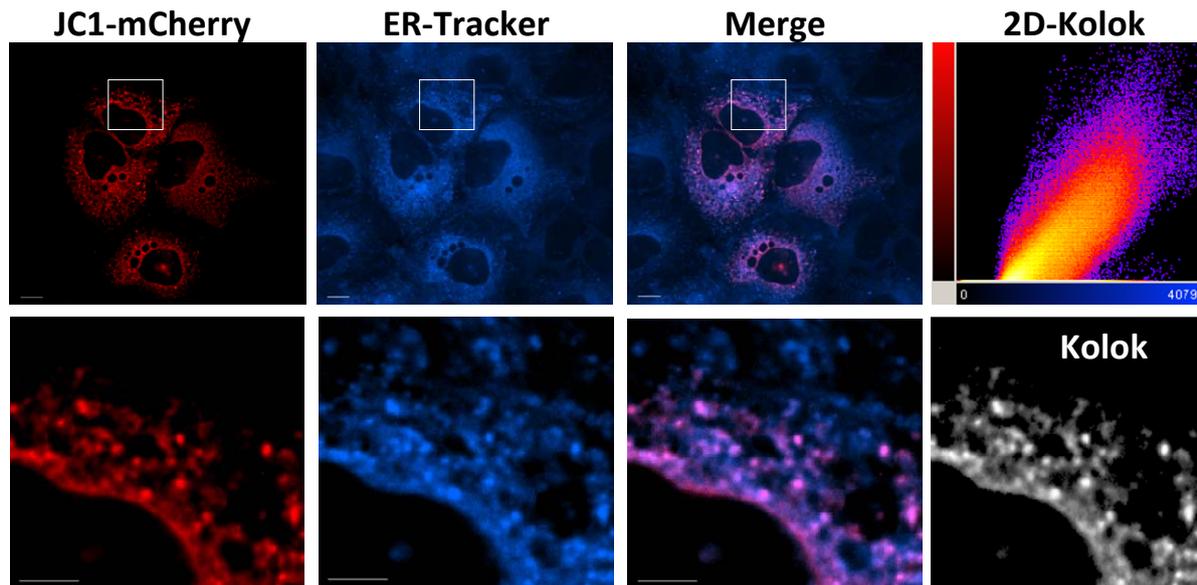


**Abb. 26: Studie zur Kolo­kalisierung des HCV Strukturproteins E1 und Markern zellulärer Kompartimente (CLSM 510 Meta (Zeiss)).** Konfokale Aufnahmen von Huh7.5 Zellen, die mit HCV JC1-mCherry RNA elektroporiert und ca. drei Tage nach Elektroporation fixiert wurden. Der Nachweis der zellulären Kompartimente erfolgte mit Hilfe von Antikörpern gegen spezifische Marker (s. Beschriftung in der Abbildung) und jeweils eines sekundären Alexa488 Antikörpers. In dem zweidimensionalen Kolo­kalisationsdiagramm (2D Kolok) sind die Intensitäten der einzelnen Pixel in den Kanälen für Alexa488 (X-Achse) und mCherry (Y-Achse) aufgetragen. Die Verteilung der Pixel, die in diesem Diagramm innerhalb eines bestimmten Schwellenwerts der Kolo­kalisierung liegen, erscheinen im Kolo­kalisationsbild (Kolok) gelb. Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.



**Abb. 27: Lokalisationsuntersuchung des Strukturproteins E1 und des Markers für den Golgi-Apparat GalT im Lebendzellmikroskop (Nikon Eclipse Ti).** Huh7.5 Zellen wurden mit der RNA der im E1 markierten Virusvariante JC1-mCherry elektroporiert, auf speziellen Schalen mit optischem Boden (Ibidi) ausgesät und zwei bis drei Tage nach Elektroporation für einen längeren Zeitraum im Lebendzellmikroskop analysiert. Hier sind beispielhaft Momentaufnahmen zweier Zellen aus den erstellten Videosequenzen dargestellt. Der weiße Rahmen markiert den in der jeweils unteren Reihe vergrößerten Bereich. In dem zweidimensionalen Kolokalisationsdiagramm (2D-Kolok) sind die Intensitäten der einzelnen Pixel in den Kanälen für mCherry (X-Achse) und mCFP (Y-Achse) aufgetragen. Die Verteilung der Pixel, die in diesem Diagramm innerhalb eines bestimmten Schwellenwerts der Kolokalisation liegen, erscheinen im Kolokalisationsbild (Kolok) weiß. Der Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$  im oberen und 15  $\mu\text{m}$  im unteren Bild.

Zur Verifizierung der Kolokalisation von E1 mit dem ER-Marker Calnexin wurden ebenfalls Zellen mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie untersucht. Die Färbung des ER lebender HCV JC1-mCherry exprimierender Zellen wurde mit dem membrangängigen Lebendzellfarbstoff ER-Tracker™ Blue-White DPX (Invitrogen) durchgeführt (Abb. 28). E1 und ER-Tracker zeigen eine eindeutige Kolokalisation und bewegen sich gemeinsam. Das deutet auf die Expression des Oberflächenproteins E1 von HCV am ER hin. Besonders die vesikulären Akkumulationen des mCherry-markierten E1 Proteins sind ER-positiv.



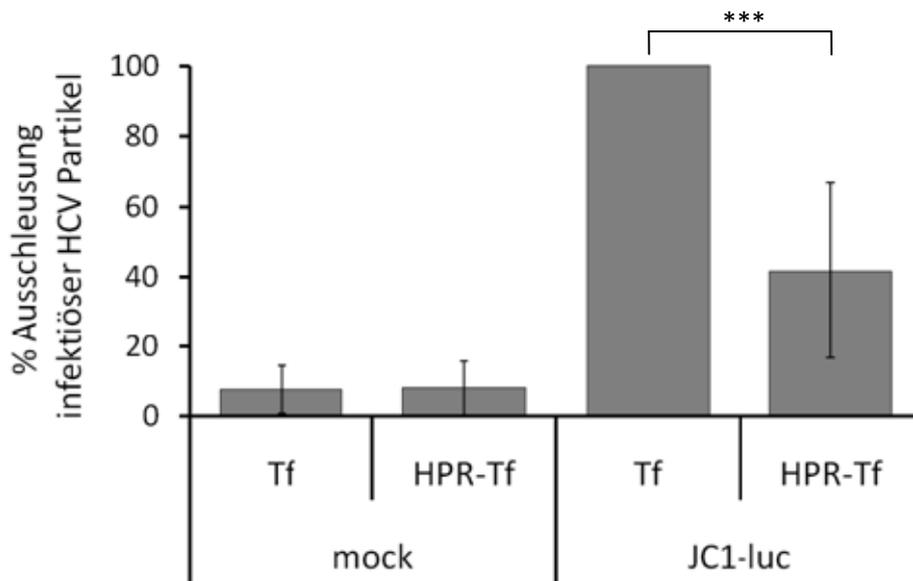
**Abb. 28: Kolokalisation des Strukturproteins E1 und eines ER Lebendzellmarkers im Lebendzellmikroskop (Nikon Eclipse Ti).** Huh7.5 Zellen wurden mit der RNA der im E1 markierten Virusvariante JC1-mCherry elektroporiert, auf speziellen Schalen mit optischem Boden (Ibidi) ausgesät und zwei bis drei Tage nach Elektroporation mit dem Lebendzellmarker für das Endoplasmatische Retikulum ER-Tracker™ Blue-White DPX (Invitrogen) angefärbt (vgl. Kapitel 3.4.1.1) und für einen längeren Zeitraum im Lebendzellmikroskop analysiert. Hier ist beispielhaft eine Momentaufnahme einer Zelle aus der erstellten Videosequenz dargestellt. Der weiße Rahmen markiert den in der unteren Reihe vergrößerten Bereich. In dem zweidimensionalen Kolokalisationsdiagramm (2D-Kolok) sind die Intensitäten der einzelnen Pixel in den Kanälen für mCherry (X-Achse) und ER-Tracker (Y-Achse) aufgetragen. Die Verteilung der Pixel, die in diesem Diagramm innerhalb eines bestimmten Schwellenwerts der Kolokalisation liegen, erscheinen im Kolokalisationsbild (Kolok) weiß. Der obere Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ , der untere 5  $\mu\text{m}$ .

Zusammengenommen erwiesen sich die charakterisierten vesikulären Strukturen des HCV E1 Proteins als positiv für Marker des ER und früher Endosomen. Die Sekretion von Hepatitis C Virionen aus der Zelle scheint demnach abhängig vom ER und von frühen Endosomen zu verlaufen. Sowohl der Golgi-Apparat wie auch späte Endosomen, Lysosomen und MVBs (*multivesicular bodies*) scheinen nicht an der Ausschleusung beteiligt zu sein.

#### 4.3.2 Funktionelle Analysen zum Einfluss früher Endosomen auf die Ausschleusung

##### 4.3.2.1 Inaktivierung von Endosomen durch Vernetzung

Frühe Endosomen, die Peroxidase-gekoppeltes Transferrin tragen, können in lebenden Zellen selektiv vernetzt und somit inaktiviert werden (Pond und Watts, 1997; Brachet *et al.*, 1999). Diese Methode wurde verwendet, um den Beitrag solcher Endosomen an der Ausschleusung der assemblierten Viruspartikel aus der Zelle zu untersuchen. Tatsächlich sind signifikant weniger Partikel im Überstand der Zellen mit inaktivierten Endosomen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektierbar (Abb. 29).

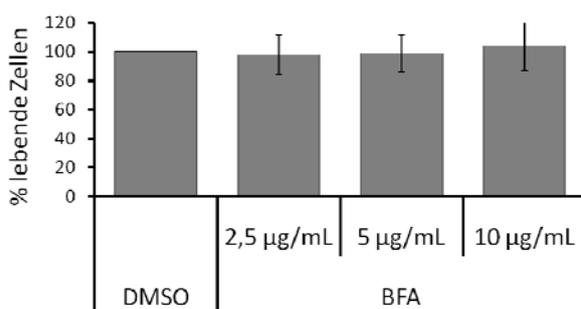


**Abb. 29: Inaktivierung von Endosomen führt zu einer verminderten Sekretion von HCV.** JC1-Luziferase Reportervirus (JC1-luc) produzierende Huh7.5 Zellen wurden mit Peroxidase (HRP, *horseradish-peroxidase*)-gekoppeltem Transferrin (HRP-Tf) inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit nicht-gekoppeltem Transferrin (Tf) behandelt. Nach 2 Stunden Inkubation bei RT wurden die Peroxidase-haltigen Kompartimente durch Zugabe des HPR-Substrates DAB inaktiviert. Die Zellen wurden gewaschen und mit neuem Medium versetzt. Nach 4 bis 5 Stunden wurde das Medium geerntet und neue Zellen damit infiziert. Der Luziferase Assay dieser Zellen erfolgte ca. 3 Tage nach Infektion (s. Kapitel 3.2.11). Es wurden 8 unabhängige Experimente durchgeführt. Die relative Luziferase Aktivität der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Das Ergebnis ist statistisch hochsignifikant (\*\*\*:  $p < 0,0001$ ;  $n=8$ ).

#### 4.3.2.2 Charakterisierung des Transportweges von HCV Partikeln aus der Zelle durch Inhibitoren

Die aus den bisherigen Daten hergeleitete Hypothese besagt, dass sich HCV Partikel ausgehend vom ER an der Oberfläche von *lipid droplets* in ein frühes endosomales Kompartiment abschnüren. Ein gut charakterisierter Inhibitor des Transports und der Produktion von Vesikeln aus dem ER heraus ist Brefeldin A (BFA; Klausner *et al.*, 1992). Er inhibiert die frühe Phase der Vesikelsekretion und führt zur Akkumulation von Proteinen im ER.

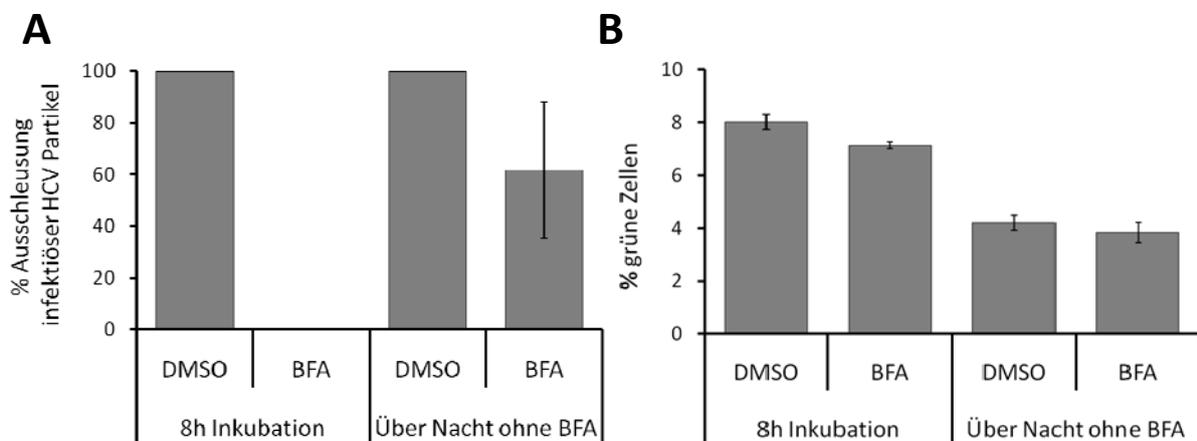
Zunächst wurde die Substanz auf eventuelle toxische Effekte im MTT Assay untersucht (vgl. Abb. 30). Die in den Analysen verwendete Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zeigt keinen toxischen Einfluss auf die verwendeten Huh7.5 Zellen.



**Abb. 30: MTT Test zur Toxizität von Brefeldin A auf Huh7.5 Zellen.** Huh7.5 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von BFA für acht Stunden inkubiert und dann auf Toxizität untersucht. Die DMSO Lösungsmittel-Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

Die Inkubation HCV JC1-luc produzierender Zellen mit BFA führte zu einer Hemmung der Sekretion infektiöser Viruspartikel in den Überstand (Abb. 31 A). BFA ist ein reversibler Inhibitor, dessen Effekt durch Waschen der Zellen mit Inhibitor-freiem Medium aufgehoben werden kann. Nach einer Inkubation der Zellen über Nacht konnten so im Überstand wieder Viruspartikel detektiert werden.

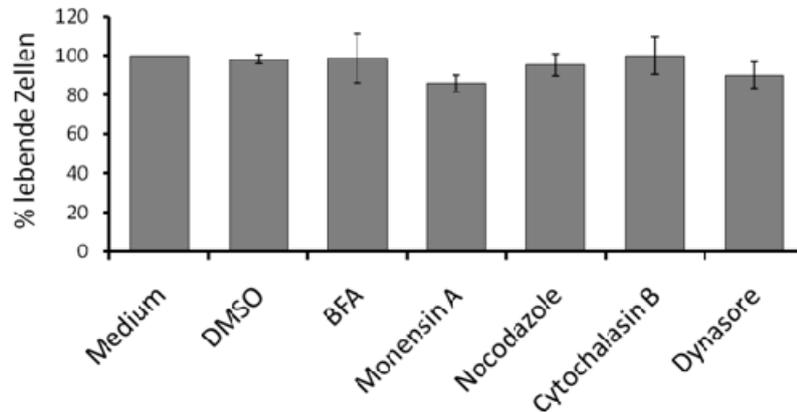
Um einen Effekt auf die Replikation des Virus in dem untersuchten Zeitraum von acht Stunden auszuschließen, wurden HCV JC1-mCherry/GFP exprimierende Zellen mit dem Inhibitor behandelt. Das Fusionsprotein aus GFP und NS5A ist ein Teil des Replikationskomplexes und kann somit als Marker für die Replikation verwendet werden. Die Zellen wurden nach Behandlung im FACS untersucht. In diesem Experiment war kein Effekt von BFA auf den Replikationskomplex festzustellen (s. Abb. 31 B).



**Abb. 31: Brefeldin A inhibiert die Sekretion, aber nicht die Replikation von HCV-RNA.** **A:** JC1-Luziferase Reportervirus produzierende Huh7.5 Zellen wurden zwei Tage nach Elektroporation mit neuem Medium, welches 5 µg/mL BFA oder zur Kontrolle DMSO enthielt, für acht Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Überstand geerntet und neues Medium ohne Zusätze zugegeben. Nach weiterer Inkubation über Nacht wurden auch diese Überstände geerntet. Huh7.5 Zellen wurden mit den gesammelten Überständen infiziert und nach 3 Tagen auf Reporteraktivität untersucht. Es sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die relative Luziferase-Aktivität der DMSO behandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. **B:** JC1-mCherry/GFP Reportervirus produzierende Huh7.5 Zellen wurden zwei Tagen nach Elektroporation mit neuem Medium, welches 5 µg/ml BFA oder zur Kontrolle DMSO enthielt, für acht Stunden inkubiert. Die Anzahl grüner Zellen aus der Hälfte der Ansätze wurden im FACS vermessen. Den restlichen Zellen wurde neues Medium ohne Zusätze gegeben. Nach weiterer Inkubation über Nacht wurden auch diese Zellen im FACS vermessen.

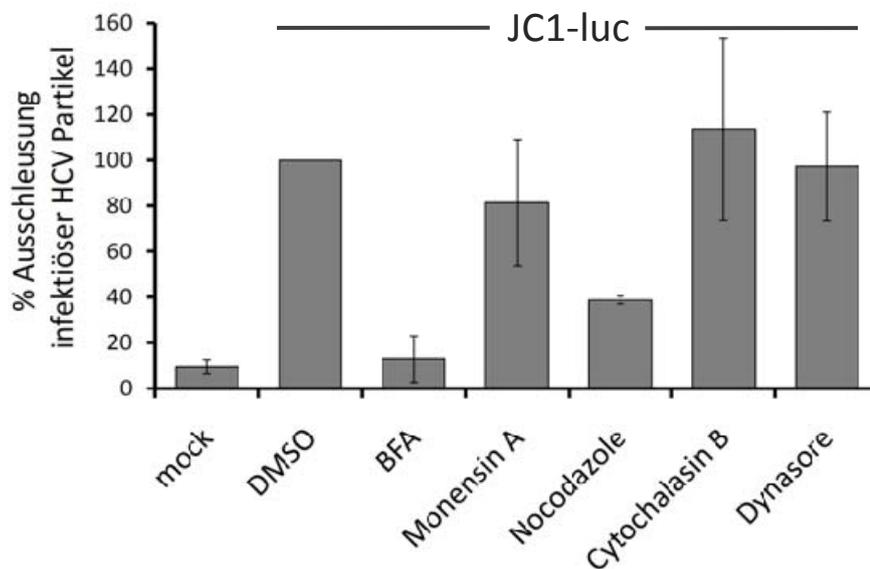
Um den Ausschleusungsmechanismus von HCV und die Beteiligung zellulärer Transportwege weiter zu charakterisieren, wurden bekannte Inhibitoren verschiedener Stationen des klassischen sekretorischen Wegs verwendet. Neben BFA wurde Monensin A (Tartakoff *et al.*, 1978) eingesetzt, welches den Transport innerhalb des Golgi-Apparats blockiert. Nocodazole (Rogalski und Singer, 1984) führt zur Depolymerisation der Mikrotubuli und somit zu einem Stopp der Mikrotubuli-abhängigen Translokation zwischen ER und Golgi. Durch die Zerstörung des Aktinzytoskeletts der Zelle unterbindet Cytochalasin B (Forer *et al.*, 1972) den Vesikeltransport entlang der Aktinfilamente. Es wurde ebenfalls ein Dynamininhibitor verwendet, Dynasore (Macia *et al.*, 2006), der den endozyto-

tischen Eintritt der Viruspartikel in die Zelle inhibiert. Alle Inhibitoren wurden im MTT Test in der verwendeten Konzentration auf ihre toxischen Eigenschaften untersucht und als nicht toxisch befunden (s. Abb. 32).



**Abb. 32: MTT Test zur Toxizität der verwendeten Inhibitoren auf Huh7.5 Zellen.** Huh7.5 Zellen wurden mit den im Assay verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren von 5 µg/mL BFA, 3 µg/mL Monensin A, 10 µg/mL Nocodazole, 5 µg/mL Cytochalasin B und 80 µM Dynasore für acht Stunden inkubiert und dann auf Toxizität untersucht. Die DMSO Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

40 bis 48 Stunden nach Elektroporation wurden die JC1-luc exprimierende Zellen für acht Stunden mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt und mit deren Überstand neue Huh7.5 Zellen infiziert (Abb. 33). Um einen eventuellen Effekt der sich im Überstand befindlichen Inhibitoren auf den Eintritt der Viren in die Zelle auszuschließen, wurden die Virusüberstände zuvor über einen Sucrosegradienten aufgereinigt (vgl. Kapitel 3.2.6).



**Abb. 33: Analyse des Einflusses verschiedener Inhibitoren auf die Sekretion infektiöser HCV Partikel.** JC1-Luziferase Reportervirus produzierende Huh7.5 Zellen wurden 40 bis 48 Stunden nach Elektroporation mit neuem Medium, welches 5 µg/mL BFA, 3 µg/mL Monensin A, 10 µg/mL Nocodazole, 5 µg/mL Cytochalasin B, 80 µM Dynasore oder zur Kontrolle DMSO enthielt, für acht Stunden inkubiert und der Überstand geerntet. In drei unabhängigen Versuchen wurden die Virusüberstände zur Entfernung des im Überstand befindlichen Inhibitors pelletiert, in neuem Medium aufgenommen und die Zellen damit infiziert. Die relative Luziferase Aktivität der DMSO behandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

BFA inhibierte die Partikelsekretion um ca. 90%. Monensin A zeigte hingegen einen nur sehr geringen bis keinen Effekt auf die Menge an infektiösen Viren im Überstand. Nocodazole inhibierte die

Sekretion von Viruspartikeln zu ca. 50%, wohingegen Cytochalasin B und Dynasore keinen Einfluss auf die Menge freigesetzter Viren hatten.

In den funktionellen Analysen konnte die Abhängigkeit der HCV Partikelsekretion vom frühen endosomalen Vesikeltransport und dem ER bestätigt werden. In Übereinstimmung mit den Daten aus Immunfluoreszenzexperimenten und der Lebendzellmikroskopie inhibiert Monensin A die HCV Partikelfreisetzung nicht. Dies spricht gegen eine wichtige Rolle des Golgi-Apparats bei der HCV Freisetzung.

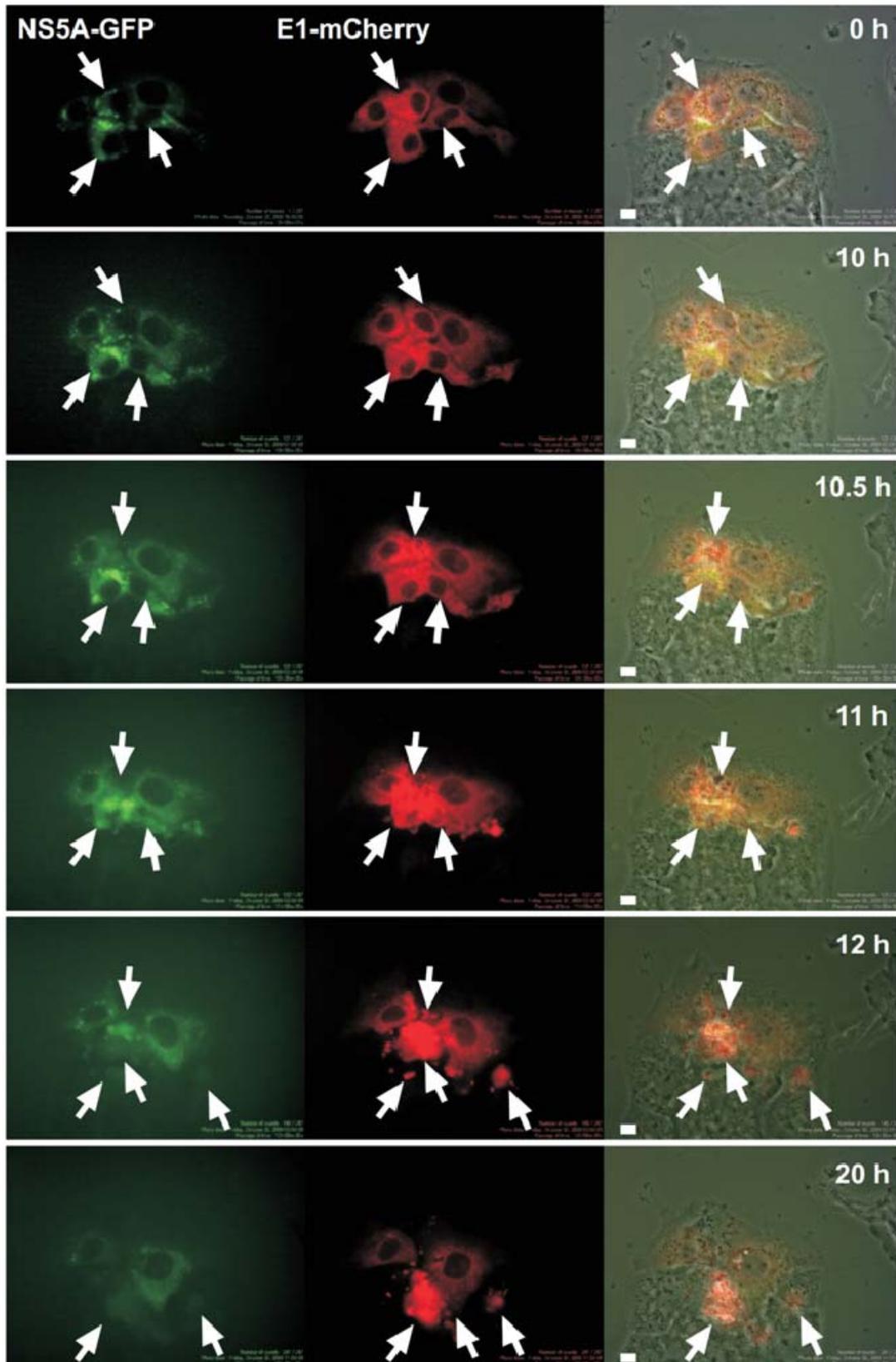
#### **4.4 Alternativer Weg der Virusfreisetzung – Gibt es einen lytischen Zyklus in der HCV Infektion?**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Beobachtungen gemacht, die neben dem zuvor beschriebenen, aktiv regulierten, vesikulären Transport von Viruspartikeln aus der Zelle, auf einen lytischen Weg zur Freisetzung hindeuten.

##### **4.4.1 Mikroskopische Hinweise auf eine HCV-induzierte Zelllyse**

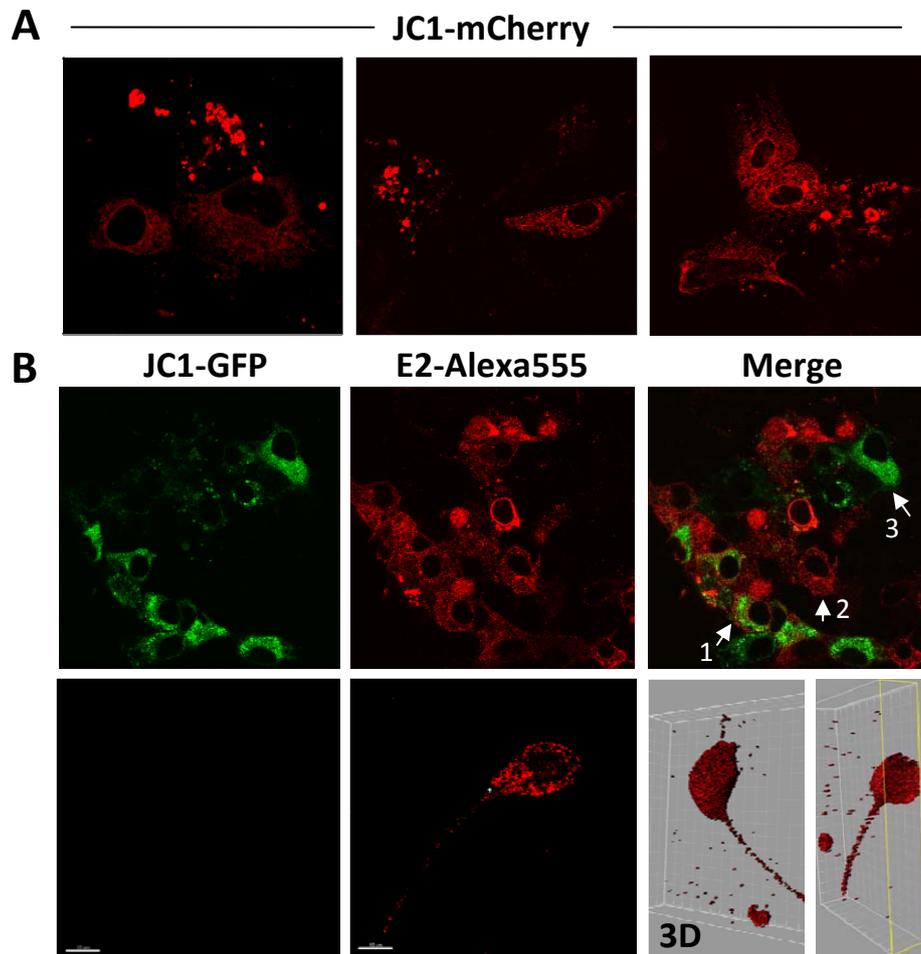
Die Beobachtung des Verhaltens von Hepatitis C Virus produzierenden Zellen im Ganzen und die Bewegung einzelner viraler Proteine in subzellulären Kompartimenten ist mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie und der hier entwickelten fluoreszenzmarkierten Viren möglich. Dabei konnte in vielen der erstellten Videosequenzen zur Analyse der HCV Biogenese das Absterben von virusproduzierenden Zellen beobachtet werden. Bei der Langzeitbeobachtung HCV JC1-mCherry/GFP exprimierender Zellen ca. 48 Stunden nach Elektroporation für weitere 20 Stunden konnte ein Absterben HCV-positiver Zellen beobachtet werden (Abb. 34). Die Pfeile in der Abbildung deuten auf drei Zellen, die sich während des Beobachtungszeitraums ablösen. Nach 20 Stunden bleibt membranassoziiertes, rot-fluoreszierendes E1 Protein übrig, wobei das Signal des Nicht-Strukturproteins NS5A verschwindet.

Ein Problem in der Lebendzellmikroskopie ist das Auftreten von Phototoxizität durch das häufige Belichten der Probe. Diese ist auf reaktive Sauerstoffradikale zurückzuführen, die als Nebenprodukte bei der Fluoreszenzanregung entstehen und die lebenden Zellen schädigen können. Die typischen E1-haltigen Reste, deren Entstehung hier beobachtet wurde, wurden allerdings auch bei konfokalen Bildern gefunden, in denen Zellen zu einem späten Zeitpunkt, also ca. drei Tage nach Elektroporation, fixiert wurden (vgl. Abb. 30 A). Da die Proben hier zunächst fixiert und dann aufgenommen wurden, kann Phototoxizität nicht als Grund für das Sterben der Zellen angeführt werden.



**Abb. 34:** Einzelbilder von Videosequenzen der Lebendzellmikroskopie in der BioStation IM (Nikon). Huh7.5 Zellen wurden JC1-mCherry/GFP RNA elektroporiert, auf speziellen Schalen mit optischem Boden (Ibidi) ausgesät und direkt in der Inkubationskammer des Mikroskops kultiviert. Das Video, von welchem Einzelbilder verschiedener Zeitpunkte (in Stunden; h) dargestellt sind, startet ca. 48 Stunden nach Elektroporation und läuft für 20 weitere Stunden. Die weißen Pfeile deuten auf Zellen, die während des Beobachtungszeitraums sterben.

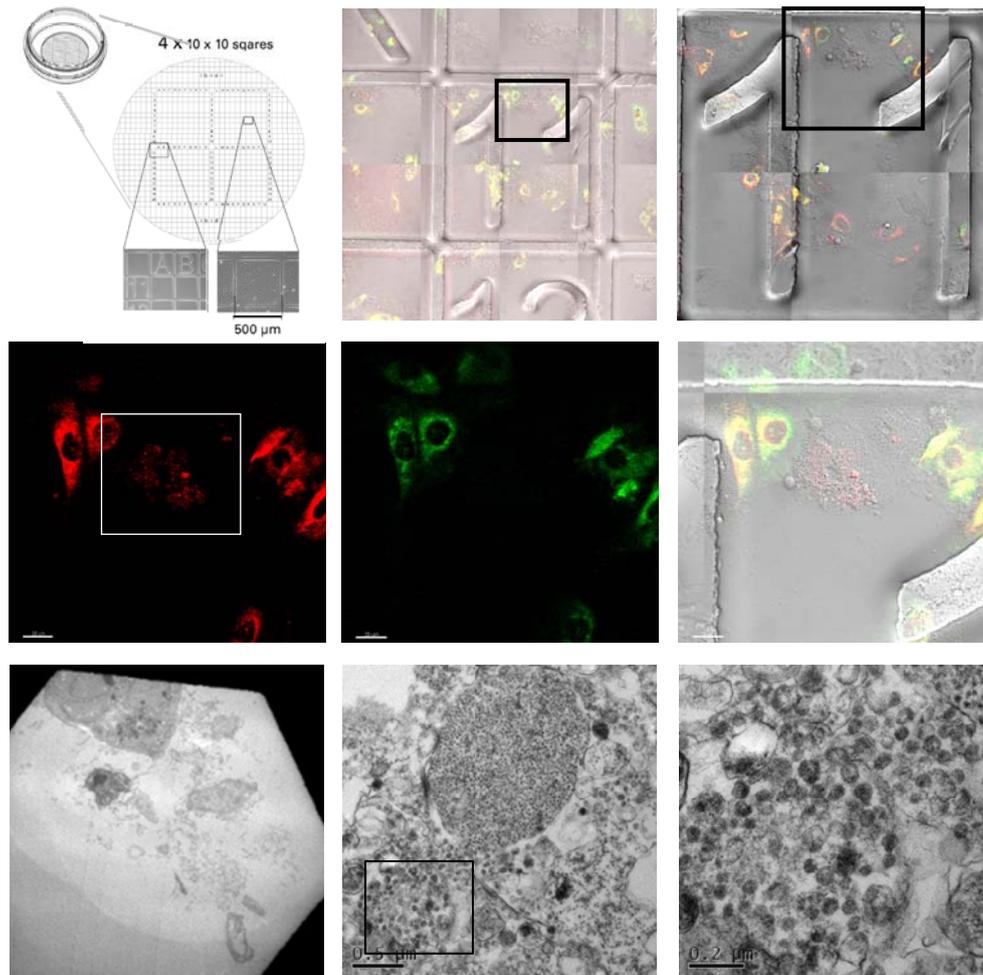
Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch im Rahmen einer Infektion der Zellen zu beobachten ist, wurden Huh7.5 Zellen mit dem JC1-GFP Virus infiziert, drei Tage später fixiert und die Oberfläche mit dem E2 Antikörper angefärbt. Dabei konnte ohne Zellpermeabilisierung intrazelluläres E2 Protein nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass HCV exprimierende Zellen ihre Membranzintegrität verlieren und lytisch werden (Abb. 35 B).



**Abb. 35: Indizien zur virusinduzierten Zellyse in der konfokalen Mikroskopie (Zeiss CLSM 510 Meta).** **A:** Beispielaufnahmen von Huh7.5 Zellen, die mit JC1-mCherry RNA elektroporiert und nach ca. drei Tagen fixiert wurden. **B:** Huh7.5 Zellen, die mit virushaltigem Überstand JC1-GFP elektroporierter Zellen infiziert und nach ca. drei Tagen fixiert wurden. Nicht permeabilisierte Zellen wurde mit einem spezifischen E2 und einem sekundären Alexa555 Antikörper angefärbt. Die weißen Pfeile deuten auf jeweils eine Zelle, die sowohl grünes wie auch rotes (1), eine die nur rotes (2) und eine die nur grünes Signal zeigt (3). In der unteren Reihe ist eine Zelle dargestellt, die nicht grün ist, aber E2 Signal aufweist. Unten rechts ist die zugehörige 3D-Rekonstruktion mit Hilfe der Bitplane Imaris Software ganz und geschnitten dargestellt.

Besonders Zellen mit schwacher oder nicht detektierbarer NS5A-GFP Expression zeigen starkes E2 positives Signal. Dies lässt vermuten, dass analog zum Ergebnis mit JC1-mCherry/GFP Viren (Abb. 34) infizierte Zellen zu einem späten Zeitpunkt die RNA-Replikation abschalten und lytisch werden (vgl. Abb. 35 B, z.B. Zellen 1 und 2).

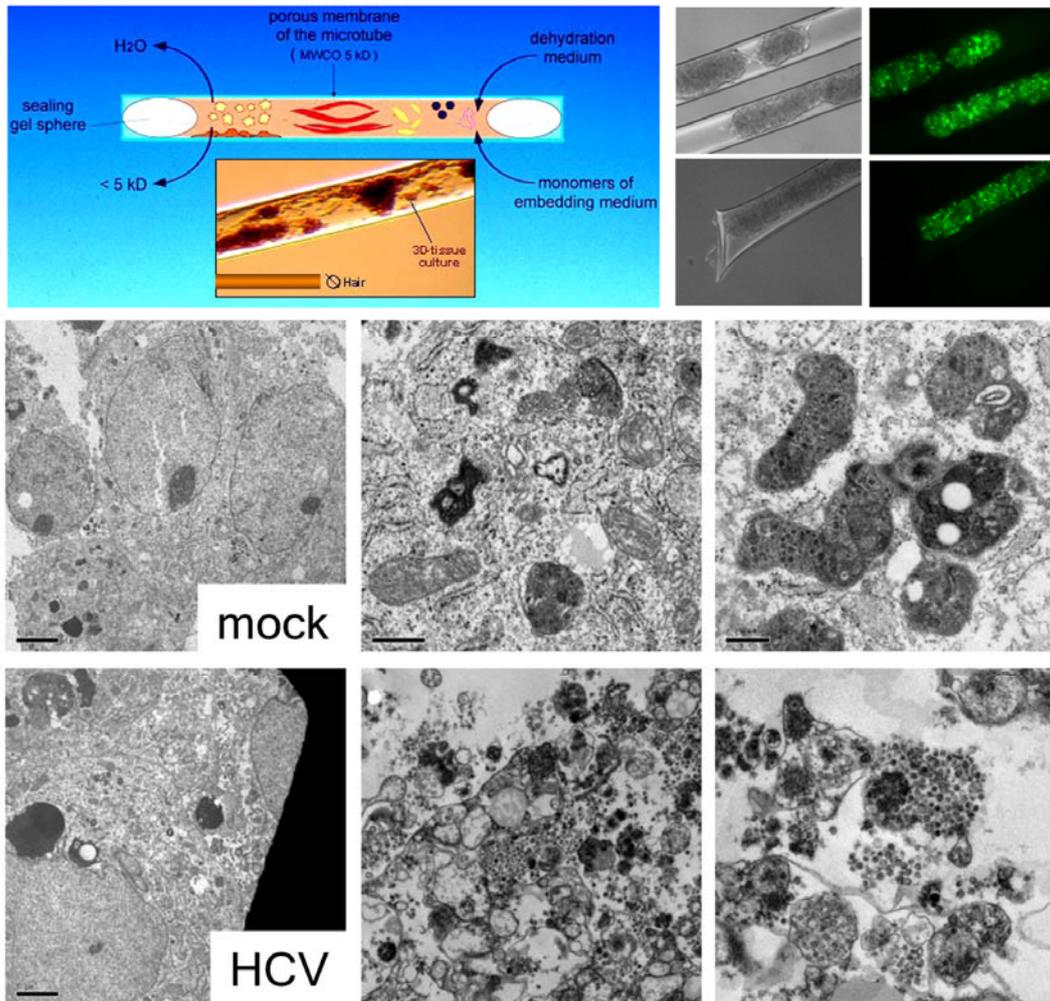
Der Verlust der zellulären Integrität konnte auch im Rahmen der korrelativen Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie, die oben bereits beschrieben wurde (s. Kapitel 4.2.3) beobachtet werden.



**Abb. 36: Korrelative Mikroskopie und elektronenmikroskopische Analyse HCV produzierender Zellen (Zeiss CLSM 510 Meta; Philips CM 120 TEM).** Huh7.5 Zellen wurden mit JC1-mCherry/GFP RNA elektroporiert, auf speziellen Schalen mit optischem Boden (Ibidi) ausgesät, auf denen ein Gitter eingestanz ist (in Bildteil A oben links dargestellt). Für die Analyse wurde eine Zelle ausgewählt, die aufgrund ihrer nur roten Fluoreszenz als HCV produzierend identifiziert wurde und eine stark veränderte Morphologie aufwies. Diese konnte mit Hilfe des Gitters für die EM Analyse relocalisiert werden. Die betreffende Zelle ist mit einem schwarzen bzw. weißen Quadrat umrahmt. Das schwarze Quadrat begrenzt den nebenstehend vergrößerten Bereich. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit der Forschungsgruppe für Elektronenmikroskopie des HPI von Carola Schneider angefertigt (vgl. Kap. 3.4.3.1).

Die dargestellte Zelle (s. Abb. 36, schwarzer Rahmen) zeigte lediglich E1 Expression bei deutlich veränderter Morphologie. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von exakt dieser Zelle zeigten bereits in der Übersichtsaufnahme (Abb. 36, unten links) den Erschöpfungszustand der Zelle, den Verlust vieler Membranen und die kaum vorhandene Struktur des Zytoplasmas. In höherer Auflösung ist das massive Auftreten von Viruspartikel zu beobachten (s. Abb. 36, unten rechts).

Das Aussehen und die Struktur virusproduzierender Zellen nach einem sehr langen Zeitraum der Inkubation sollte daraufhin in einem nächsten Versuch mit einer anderen Kultivierungsmethode analysiert werden.



**Abb. 37: Kultivierung virusproduzierender Zellen in 3D über einen langen Zeitraum (Zeiss CLSM 510 Meta; Philips CM 120 TEM).** Zur Kultivierung von Zellen im dreidimensionalen Raum wurden Mikroröhrchen verwendet, welche den Austausch von Nährstoffen und Wasser durch semipermeable Wände gewährleiten (schematische Darstellung der Röhrchen oben links. Oben rechts: Beispielhaft mit dem JC1-GFP elektroporierte Huh7.5 Zellen, kultiviert in Mikroröhrchen im Weißlicht und in der Fluoreszenzansicht). Nach einer siebentägigen Inkubation von Huh7.5 Zellen, die entweder ohne RNA (mock) oder mit der RNA des JC1-GFP Virus (HCV) elektroporiert und danach direkt in den oben beschriebenen Mikroröhrchen kultiviert wurden, wurden die Zellen fixiert und für die Elektronenmikroskopie prozessiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit der Forschungsgruppe für Elektronenmikroskopie des HPI von Carola Schneider angefertigt (vgl. Kap. 3.4.3.2).

Mit Hilfe besonderer Mikroröhrchen, welche den Austausch von Nährstoffen und Wasser durch semipermeable Wände gewährleiten, war es möglich Zellen dreidimensional zu kultivieren. Nach Inkubation von sieben Tagen wurden die Röhrchen mit 2,5% Glutaraldehyd (GA) fixiert und für die Elektronenmikroskopie prozessiert (Abb. 37).

In den Kontrollzellen (mock) ist, im Gegensatz zu den HCV produzierenden Zellen, intaktes Zytoplasma zu erkennen. Es werden verschiedene zelluläre Strukturen, Membranen und auch elektrodichte Bereiche sichtbar. In den HCV produzierenden Zellen haben die Zellmembranen ihre Struktur und Integrität verloren. Stattdessen sind massive Mengen an virusähnlichen Partikeln zu finden, die sich in oder in der Nähe von membranumschlossenen Kompartimenten befinden.

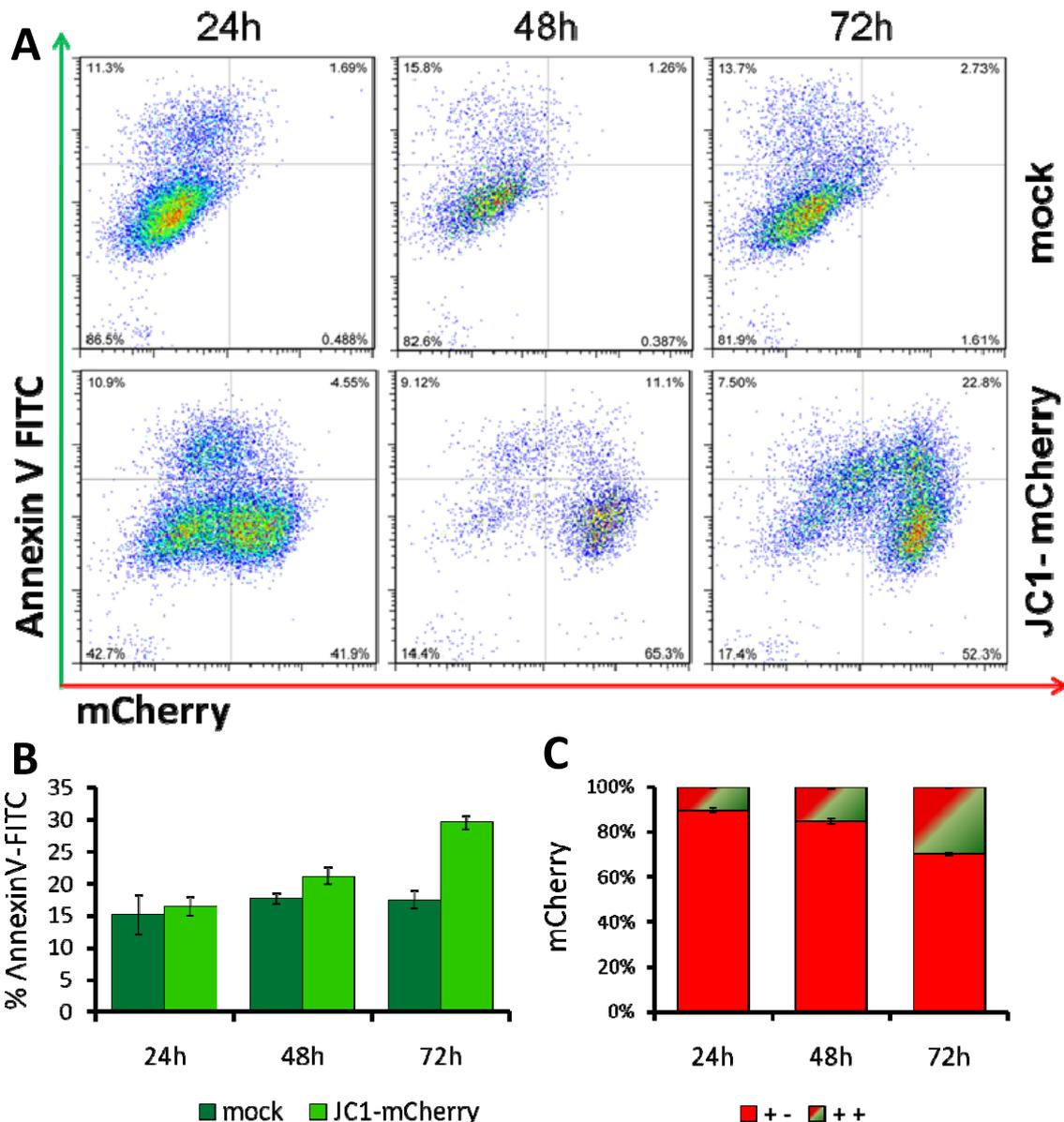
Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass zu einem späten Zeitpunkt der Virusreplikation HCV exprimierende und infizierte Zellen die Integrität der Plasmamembran verlieren, sterben und gefüllt mit Partikeln zurückbleiben. Der Vergleich der Morphologie freier Partikeln in der neuesten Literatur (Gastaminza *et al.*, 2010) mit der hier gefundenen Partikel zeigt, dass es hier um HCV Virionen handelt.

### **4.4.2 Funktionelle Analyse zum Einfluss der Apoptose auf die Virusfreisetzung**

Visuell sind die Veränderung HCV infizierter Zellen der Apoptose sehr ähnlich. Ob es sich dabei tatsächlich um HCV induzierte Apoptose und Lyse handelt, die potentiell die Virusfreisetzung begünstigt, sollte durch weitere Experimente geklärt werden.

Durch die Färbung mit Annexin V wurde die Apoptoserate in virusproduzierenden und Kontrollzellen alle 24 Stunden für drei Tage mittels FACS quantifiziert (Abb. 38). Phosphatidylserin (PS) befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert, woran Annexin V bindet (Vermes *et al.*, 1995).

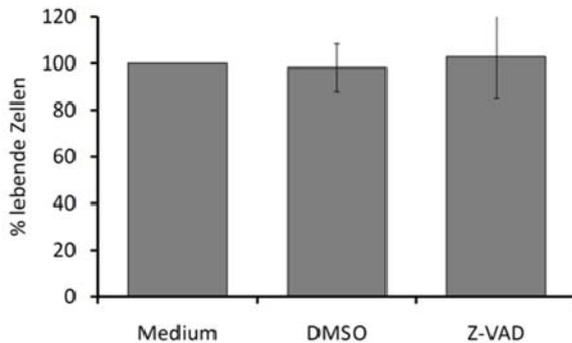
JC1-mCherry exprimierende Zellen und Kontrollzellen (mock) wurden jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden mit Annexin V-FITC angefärbt und analysiert (Abb. 38 A). Der Vergleich aller Annexin V positiven Zellen zeigte, dass nach 24 und auch nach 48 Stunden ähnlich viele apoptotische Zellen in Kontroll- und JC1-mCherry exprimierenden Kulturen gefunden wurden. Nach 72 Stunden konnte in den virusproduzierenden Zellen ein Drittel mehr apoptotische Zellen detektiert werden als in den Kontrollzellen (Abb. 38 B). In Abb. 38 C wurde das Verhältnis von apoptotischen Zellen zur Gesamtmenge aller virusproduzierenden Zellen dargestellt. Nach 72 Stunden war der Anteil gleichzeitig virusproduzierender und apoptotischer Zellen von ca. 10% (24 h) bzw. 15% (48 h) auf etwa 30% gestiegen. In diesem Experiment konnte also bestätigt werden, dass HCV-produzierende Zellen eine erhöhte Apoptoserate zu einem späten Zeitpunkt der Virusreplikation aufweisen.



**Abb. 38: Bestimmung der Apoptoserate für virusproduzierende und Kontrollzellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Virusreplikation im Annexin V Assay.** Huh7.5 Zellen wurden mit JC1-mCherry RNA elektroporiert, nach vier Stunden gewaschen und in neuem Medium für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden (h) wurden die Zellen jeweils mit Annexin V-FITC gefärbt und im FACS Influx (BD) im Doppelsatz vermessen. **A:** FACS Rohdaten von jeweils einer Messung der Doppelbestimmung. **B:** Auswertung der Messergebnisse aller Annexin V-FITC positiven Zellen zu allen Zeitpunkten im Vergleich der virusproduzierenden zu den Kontrollzellen. **C:** Auswertung zum Verhältnis der nur mCherry positiven zu den doppelt positiven Zellen der JC1-mCherry elektroporierten Zellen zu allen Zeitpunkten. +-: mCherry positiv und Annexin V negativ; ++: mCherry positiv und Annexin V positiv.

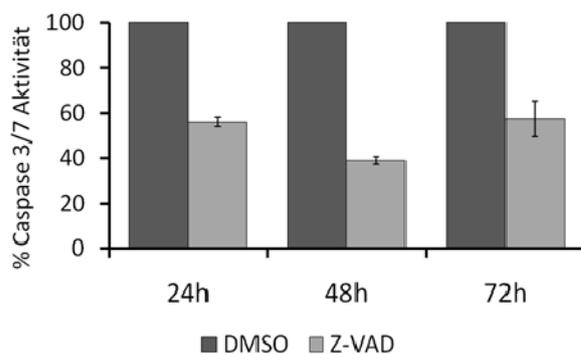
Daraufhin sollte untersucht werden, welchen Einfluss Apoptose auf die Sekretion von Viruspartikeln ausübt. Dazu wurde der Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK eingesetzt. Die Familie der Caspasen (*cysteiny/aspartate specific protease*) ist eine Gruppe von Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum (Cysteinproteasen). Sie spalten Peptidbindungen C-terminal von Aspartat. Caspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose und spalten Proteine und Nukleinsäuren der Zelle und auch eventueller Schädlinge (Creagh und Martin, 2001; Denault und Salvesen, 2002). Zunächst wurde der

Inhibitor in der verwendeten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  auf eventuelle toxische Effekte im MTT Assay untersucht und als nicht toxisch für die Zellen identifiziert (vgl. Abb. 39).



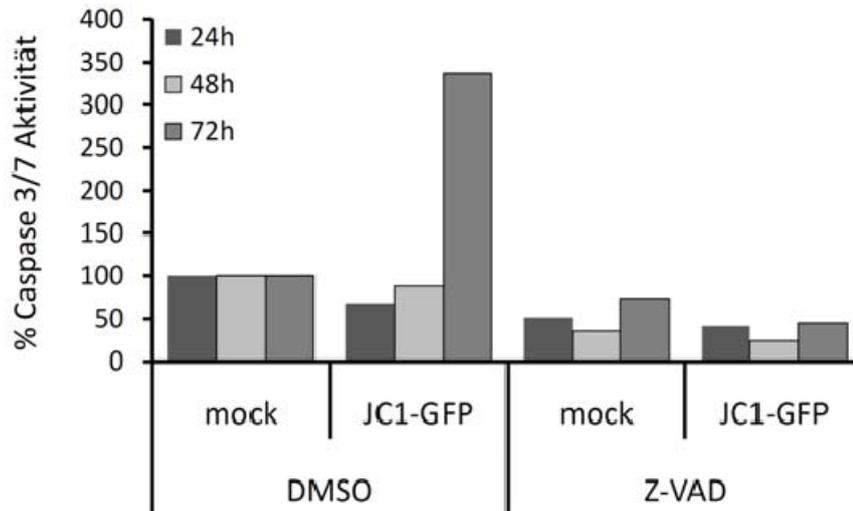
**Abb. 39: MTT Test zur Toxizität des Z-VAD-FMK Caspase Inhibitors auf Huh7.5 Zellen.** Huh7.5 Zellen wurden mit der in den Assays verwendeten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  inkubiert und dann mit Hilfe des MTT-Tests auf Toxizität untersucht. Die Mediumkontrolle wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

Um den Effekt von Z-VAD-FMK in den verwendeten Huh7.5 Zellen zu überprüfen, wurden diese mit dem Inhibitor inkubiert und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay System (Promega) untersucht. Zu allen analysierten Zeitpunkten zeigte Z-VAD-FMK einen hemmenden Effekt auf die Aktivität der untersuchten Caspasen in Huh7.5 Zellen (vgl. Abb. 40).



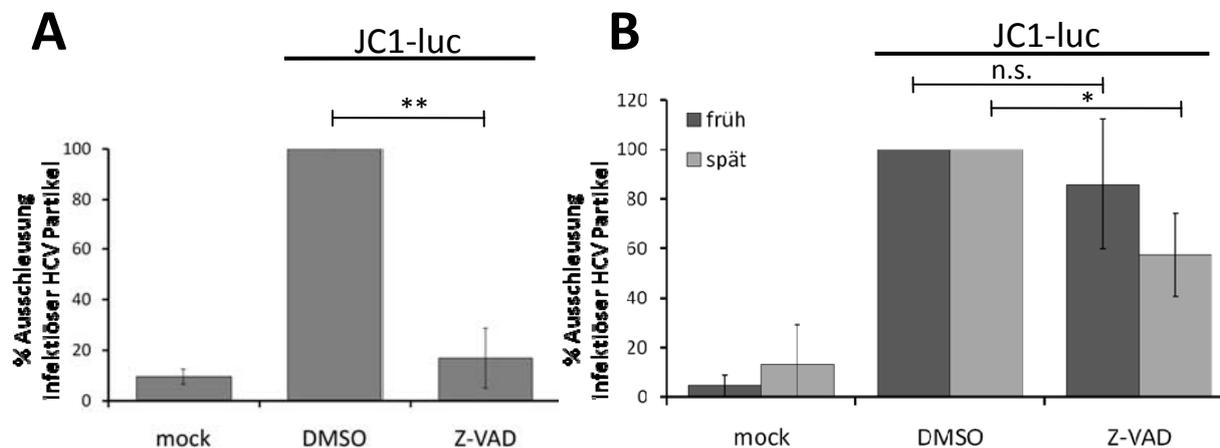
**Abb. 40: Hemmender Effekt durch Z-VAD-FMK auf die Caspase Aktivität in Huh7.5 Zellen.** Huh7.5 Zellen wurden mit 50  $\mu\text{M}$  Inhibitor behandelt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten auf ihren Einfluss auf die Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) untersucht. Die Kontrollzellen (DMSO) wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

Die HCV-abhängige Induktion von Caspasen und die Hemmung dieser durch Z-VAD-FMK wurden in einem nächsten Schritt untersucht. Dazu wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in JC1-GFP exprimierenden Zellen und der Einfluss von Z-VAD-FMK alle 24 Stunden bestimmt. Nach 72 Stunden (Abb. 41) zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Caspase Aktivität in virusproduzierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Dieser Effekt konnte durch den Inhibitor aufgehoben werden. Da sich die Messung der Caspase Aktivität auf alle Zellen eines Ansatzes bezieht, war eine hohe Elektroporationsrate wichtig. Diese wurde zu jedem Zeitpunkt im FACS untersucht und lag immer bei ca. 90% (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 41: Induktion der Caspase Aktivität durch HCV zu einem späten Zeitpunkt der Virusreplikation.** Huh7.5 Zellen, die mit der RNA des JC1-GFP Virus elektroporiert wurden und Kontrollzellen (mock) wurden entweder nicht oder mit 50  $\mu$ M Z-VAD-FMK behandelt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten im Hinblick auf die Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) untersucht. Die Kontrollzellen (mock; DMSO) wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

Im nächsten Schritt wurden JC1-luc exprimierende Zellen ca. 48 Stunden nach Elektroporation für acht Stunden mit dem Caspaseinhibitor behandelt, der Überstand geerntet, aufgereinigt und neue Zellen damit infiziert. Dabei zeigt sich, dass Zugabe von Z-VAD-FMK die HCV Partikelfreisetzung signifikant inhibiert (Abb. 42 A).



**Abb. 42: Der Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK beeinflusst die Freisetzung von HCV Partikeln.** **A:** Reportervirus (JC1-luc) produzierende Huh7.5 Zellen wurden ca. 48 Stunden nach Elektroporation mit neuem Medium, welches Z-VAD-FMK in einer Konzentration von 50  $\mu$ M oder zur Kontrolle DMSO enthielt, für acht Stunden inkubiert und der Überstand geerntet. In drei unabhängigen Versuchen wurden die Virusüberstände zur Entfernung des im Überstand befindlichen Inhibitors pelletiert, in neuem Medium aufgenommen und die Zellen damit infiziert. Das Ergebnis ist statistisch sehr signifikant (\*\*:  $p < 0,001$ ;  $n=3$ ). **B:** Effekt des Inhibitors auf einen frühen oder späten Zeitpunkt in der Virusreplikation. Zellen wurden entweder vier Stunden (früh) oder 40 Stunden (spät) nach Elektroporation gewaschen und in Anwesenheit des Inhibitors inkubiert. Etwa 32 Stunden später wurde der jeweilige Überstand geerntet. Naive Huh7.5 Zellen wurden mit den Überständen infiziert, die zum frühen und zum späten Zeitpunkt geerntet wurden. Die relative Luziferase Aktivität der DMSO behandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Das Ergebnis für den späten Wert ist statistisch signifikant (\*:  $p < 0,01$ ;  $n=5$ )

Die mikroskopischen Analysen legten nahe, dass HCV-infizierte Zellen erst ca. 50-70 Stunden nach Elektroporation bzw. Infektion Zeichen von Zelllyse und Apoptose zeigen. Daher sollte mit einem anderen Versuchsaufbau der Effekt von Z-VAD-FMK auf frühe und auf späte Zeitpunkte der Virusausschleusung analysiert werden. Hierfür wurden die Zellen entweder vier Stunden nach Elektroporation (früher Zeitpunkt) oder erst 40 Stunden nach Elektroporation (später Zeitpunkt) für jeweils 32 Stunden in Gegenwart des Inhibitors inkubiert. Anschließend wurden Huh7.5 Zellen mit den Überständen dieser Kulturen infiziert (Abb. 42 B). Zu einem frühen Zeitpunkt war kein oder nur ein geringer Einfluss des Caspaseinhibitors auf die Partikelfreisetzung zu beobachten. Die Zugabe zu einem späten Zeitpunkt führte zur signifikant verminderten Freisetzung von Viruspartikeln in den Überstand (Abb. 42 B). In den funktionellen Analysen konnte festgestellt werden, dass virusproduzierende Zellen ein höheres Maß an Apoptose aufweisen. Wird diese durch den Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK gehemmt, werden zu einem späten Zeitpunkt weniger Partikel freigesetzt.

In der Summe legen die mikroskopischen und funktionellen Analysen nahe, dass zu späten Zeitpunkten der HCV Replikation ein apoptoseinduzierter lytischer Schritt zur HCV Weiterverbreitung beiträgt.

## 5 Diskussion

Weltweit leiden etwa 170 Millionen Menschen an einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis C Virus, allein in Deutschland sind ca. 500.000 Patienten betroffen. HCV verursacht eine schleichende, oft tödlich endende Entzündung der Leber. Die heute vorherrschende Therapie aus Interferon und Ribavirin ist unspezifisch und schlecht wirksam. Es gibt keine Impfung und auch eine frühere Infektion mit dem Virus garantiert keinen Schutz. Durch die stete Erforschung und der damit verbundenen Verbesserung des Wissens über den HCV Lebenszyklus, können neue Ansätze für eine spezifisch gegen dieses Virus gerichtete Therapie oder sogar einen Impfstoff gefunden werden.

Die Mechanismen der HCV Partikelassemblierung und Freisetzung sind nur unvollständig verstanden. Genau diese späte Phase der Virusreplikation zu untersuchen, war Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Das hier verwendete System der Kultivierung von HCV (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005) bietet gegenüber vorherigen Modellen den Vorteil, dass es die Analysen in Gegenwart aller viralen Proteine mit dem voll replikationsfähigen Virus in Zellkultur ermöglicht.

### 5.1 Markierte Virusvarianten als innovatives Werkzeug zur Analyse von HCV

Fluoreszenzmarkierte Viren allgemein können einen wichtigen Beitrag für die Analyse von Virus-Wirts-Wechselwirkungen leisten. Virusmutanten mit fluoreszenzmarkierten Strukturproteinen sind die Basis zur Visualisierung von Viruszusammenbau und Ausschleusung. Wichtige Erkenntnisse über solche späten Prozesse des viralen Lebenszyklus von Herpes- (Desai und Person, 1998; Desai *et al.*, 2003) oder auch HI-Viren (Hubner *et al.*, 2007) konnten so gewonnen werden.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, fluoreszenzmarkierte funktionelle Virusvarianten zur Erforschung der Hepatitis C Virus Biogenese zu entwickeln. Dabei wurde ein im E1-Glykoprotein markiertes Virus konstruiert und zur weiteren Aufklärung der späten Phase des viralen Lebenszyklus verwendet. Auch die Konstruktion eines sowohl im E1- als auch im NS5A-Protein doppelt markierten Reportervirus ermöglicht die Betrachtung beider Proteine in einer lebenden Zelle zur gleichen Zeit. Das Chromophor wurde dabei zwischen die vierte Glykosylierungsstelle und die Transmembrandomäne des E1-Proteins inseriert. Damit wird möglichst wenig Einfluss auf wichtige Eigenschaften, wie das Glykosylierungsmuster und die Membranlokalisation genommen. Diese funktionellen Reporterviren sind damit ein wertvolles Werkzeug zur Analyse von Zusammenbau und Ausschleusung der Viruspartikel.

Darüber hinaus wurde für weitere Studien ein am Kapsidprotein Core markiertes Virus hergestellt und charakterisiert. Mit diesem Reportervirus könnten neue Erkenntnisse über die Funktionen des Coreproteins, wie z.B. Verpackung der RNA ins Kapsid und weitere Prozesse des Viruszusammenbaus

gewonnen werden. Das Kapsid enthält das Genom des Virus im Inneren des Partikels und bildet das Gerüst für den Aufbau der E1/E2 Glykoproteindimer-enthaltenden Virushülle. Dem aktuellen Modell zufolge schließt das Coreprotein das virale RNA Genom in der Nähe von ER-Membran und *lipid droplets* ein, formt dabei ein RNA-enthaltendes Kapsid und erhält seine Virushülle durch Knospung durch die ER-Membran (Gastaminza *et al.*, 2010; Roingeard *et al.*, 2004; Miyanari *et al.*, 2007). Wie die virale RNA in das Kapsid verpackt wird, ist unklar. Durch Dimerisierung von Core entsteht eine Spalte, in die sich die RNA einlagern könnte (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Auch befinden sich viele positiv geladene Aminosäuren in der ersten Domäne des Proteins (Hope *et al.*, 2002). Aufgrund fehlender Strukturdaten und einer fehlenden Signalsequenz für die Verpackung ist diese Theorie jedoch hoch spekulativ. So könnte die Verpackung der RNA in das Kapsid auch von Protein-Protein Interaktionen anstatt von Protein-RNA Interaktionen abhängen (Steinmann *et al.*, 2008).

Die nachgewiesene Infektiosität von E1- und Core-markierten Virusvarianten, wenn auch attenuiert gegenüber Wildtypvirus, birgt Potential für über diese Arbeit hinausgehende Studien z.B. zur Untersuchung von frühen Zeitpunkten der Infektion. Das JC1-mCherry/GFP doppelt-markierte Virus ist in den durchgeführten Analysen hingegen nicht in der Lage, Huh7.5 Zellen zu infizieren, was vermutlich am größeren Genom liegt. Der Nachteil markierter Viren besteht in der Insertion eines weiteren Leserahmens in das Genom. Dadurch wird dieses länger und somit ineffizient verpackt. Außerdem muss sichergestellt werden, dass die Markierung das Virus funktionell nicht beeinträchtigt. Der Vorteil fluoreszierender Reporterviren liegt in der Möglichkeit der direkten Visualisierung viraler Proteine und deren Bewegung in lebenden Zellen im Kontext der natürlichen Expression und im Wechselspiel mit allen anderen viralen Proteinen. Neueste Mikroskopietechniken, wie STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) oder STED (*Stimulated Emission Depletion*) ermöglichen außerdem die physikalischen Auflösungsgrenzen deutlich herab zu setzen (Fernandez-Suarez und Ting, 2008; Huang *et al.*, 2010). Mit geeigneten Fluoreszenzproteinen und der neuen Technik der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie wäre es somit möglich, einzelne Virionen zu visualisieren. Dies kann in Kombination mit Varianten der hier konstruierten Viren einen weiteren wertvollen Beitrag zum Verständnis des Zusammenbaus und auch der Ausschleusung von HCV leisten. Daher sind Experimente in Planung Varianten mit geeigneten Chromophoren herzustellen und mittels STORM zu studieren.

In dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, funktionelle Viren zu konstruieren, welche fluoreszenzmarkierte Strukturproteine exprimieren und so wertvolle Werkzeuge für die Erforschung von Virusassemblierung und Freisetzung darstellen.

## 5.2 Zusammenbau und Sekretion der Hepatitis C Viruspartikel

Der Fokus der vorliegenden Studie lag auf der Analyse der Zusammenbau- und Ausschleusungsprozesse mit Hilfe der zuvor beschriebenen fluoreszenzmarkierten Hepatitis C Viren. E1, NS5A und

Core lokalisieren zu frühen Zeitpunkten der Virusproduktion an *lipid droplets*. Dieses Speicherorganell für Lipide stellt einen essenziellen Bestandteil für die Replikation des Virus dar (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007; Boulant *et al.*, 2008). Die gleichzeitige Bewegung von E1 und NS5A in den Videosequenzen zeigte deutlich, dass die Kolo-kalisation nicht zufällig war, sondern beide Proteine Teil eines Komplexes darstellten. 72 Stunden nach Elektroporation wurde eine beginnende Trennung von dem Nicht-Strukturprotein NS5A und den Strukturproteinen E1 und Core deutlich. An der Oberfläche von *lipid droplets* bildeten sich zu diesem Zeitpunkt vesikuläre Strukturen aus E1 und Coreprotein. Bei diesen Strukturen handelte es sich höchstwahrscheinlich um die Orte der Knospung von Virionen und der Akkumulation assemblierter Partikel.

Die Assemblierung von Virionen scheint an der Oberfläche von *lipid droplets* ausgehend von ER-Membranen stattzufinden. Sowohl die Immunfluoreszenz zur Markierung des ER mit Calnexin, wie auch die Lebendzellanalyse mit dem ER-Tracker™ Blue-White DPX zeigten eine eindeutige Kolo-kalisation von E1 mit dem ER. Besonders die vesikulären E1 positiven Strukturen sind ebenfalls ER positiv, was darauf hindeutet, dass die Membran der sich abschnürenden Vesikel vom ER abstammt. Diese Befunde sind konsistent mit früheren Daten aus einem HCVpp Modellsystem (Voisset und Dubuisson, 2004; Roingeard *et al.*, 2004). Auch spätere Arbeiten (Gastaminza *et al.*, 2008) beschreiben die HCV Assemblierung und Reifung im ER und in einem bislang nicht näher definierten dem ER nachgeschalteten Kompartiment. In der aktuellen Literatur zur Assemblierung von Hepatitis C Virionen wird im Einklang mit hier gewonnenen Daten vermutet, dass *lipid droplets* eine Oberfläche für die HCV Assemblierung darstellen. Wie genau diese stattfindet blieb bislang unklar. Auch die Visualisierung des Prozesses an der Oberfläche von *lipid droplets* stellte sich bisher als schwierig heraus (Jones und McLauchlan, 2010) und ein klarer Beweis für Lipide als Assemblierungs-oberfläche fehlte bis heute (Bartenschlager *et al.*, 2011). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen hingegen sehr deutlich, dass die Ringstrukturen, welche die *lipid droplets* repräsentieren, eine Oberfläche für die Zusammenlagerung viraler Proteine zu bilden scheinen. Auch in den angefertigten ultrastrukturellen Analysen zeigte sich an dieser Stelle die Akkumulation virusähnlicher Partikel in Vesikeln. Da eine Antikörpermarkierung dieser Strukturen nicht gelungen ist, wird hier zunächst von virusähnlichen Partikeln gesprochen. Vergleicht man aber die Morphologie freier Partikel in der neuesten Literatur (Gastaminza *et al.*, 2010) mit der hier gefundenen Partikel sind eindeutige Ähnlichkeiten festzustellen. Also wird davon ausgegangen, dass es sich hier tatsächlich um voll assemblierte Hepatitis C Virionen handelt, die sich in vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle befinden. Damit wird hier erstmalig diese Lokalisation von assemblierten Virionen im HCVcc System innerhalb einer Zelle beschrieben.

Für den Virusaufbau ist nicht nur die in der Literatur oft beschriebene Interaktion von Core mit *lipid droplets* entscheidend. Auch eine Interaktion mit der umgebenden ER Membran in der *membranous web* Struktur ist notwendig, da sich hier der Replikationskomplex und somit das neue RNA Genom

befindet, welches in das Kapsid verpackt werden muss. Wie sich allerdings die Replikationskomplexe und die *lipid droplets* für eine Interaktion von Core und RNA annähern, ist bislang unklar (Boulant *et al.*, 2008; Welte, 2009; Miyanari *et al.*, 2007).

NS5A stellt ein wichtiges in diesen Prozess involviertes Protein dar. Durch Mutagenesestudien verschiedener Gruppen zeigte sich, dass die Domäne I (DI) dieses Proteins für eine Interaktion mit *lipid droplets* verantwortlich ist. Fehlt diese, kommt es auch zu keiner Interaktion von anderen Nicht-Strukturproteinen oder der viralen RNA mit *lipid droplets*. Die dritte Domäne (DIII) von NS5A hingegen interagiert mit Core auf der *lipid droplet* Oberfläche (Miyanari *et al.*, 2007; Appel *et al.*, 2008). Das Rekrutieren von NS5A zu *lipid droplets* ist essenziell für den Virusaufbau und stellt einen der ersten Schritte hierfür dar. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es bei der Koordination der Prozesse von Replikation und Assemblierung auch eine zeitliche Komponente zu geben scheint. Dies gibt Anlass zu der Schlussfolgerung, dass zu frühen Zeitpunkten eher die Produktion von RNA und Proteinen im Vordergrund steht, es zu späten Zeitpunkten allerdings zum gehäuftem Auftreten von Assemblierungsprozessen kommt (vgl. Modell Abb. 43 A). Wie der genaue Ablauf von Replikation und Zusammenbau reguliert wird, ist aber weiterhin unbekannt.

Für eine Klärung dieser Prozesse spielen die anderen hier nicht untersuchten Proteine des Virus eine entscheidende Rolle. Beispielsweise ist das p7 Protein für den Viruseintritt und auch die RNA-Synthese entbehrlich, aber für den Zusammenbau und/oder die Ausschleusung des Virus essenziell (Jones *et al.*, 2007; Steinmann *et al.*, 2007). In welcher Phase dieser späten Prozesse im Lebenszyklus von HCV das Protein eine wichtige Aufgabe übernimmt und ob dessen Eigenschaft Ionenkanäle zu bilden dafür eine Rolle spielt, muss noch untersucht werden (Tedbury *et al.*, 2010; Wozniak *et al.*, 2010). Darüber hinaus hat p7 Einfluss auf die Membrantopologie von NS2, das ebenfalls eine wichtige Rolle beim HCV Zusammenbau spielen soll (Ma *et al.*, 2011; Stapleford und Lindenbach, 2011). Aber auch NS3 scheint entscheidend für die Assemblierung zu sein (Ma *et al.*, 2011).

Interaktionen von allen zehn HCV Proteinen untereinander sind für nahezu alle Stationen der Virusreplikation essenziell, doch bislang fehlte eine geeignete Methode zur umfassenden Analyse (Jones und McLauchlan, 2010). Ein laufendes Projekt untersucht diese direkten Interaktionen mit Hilfe eines in unserem Labor entwickelten FACS-basierten FRET Assays (Banning *et al.*, 2010). So können neue Interaktionen gefunden und im Folgenden auf ihre Funktion bei Assemblierung und Ausschleusung von HCV untersucht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Virusvarianten können in anschließenden Studien ebenfalls als ein potentes Werkzeug zur näheren Betrachtung auch der Beteiligung anderer Proteine an Assemblierungsprozessen genutzt werden.

Die Glykoproteine E1 und E2 sind Typ 1 Transmembranproteine und werden im Lumen des ER post-translational glykosyliert (Duvet *et al.*, 2002). So ist eine Knospung in das Lumen des ER durch die Topologie dieser Proteine gegeben. Der in der vorliegenden Studie beobachtete starke inhibitorische

Effekt von Brefeldin A (BFA) auf die Partikelsekretion deutet übereinstimmend auf einen Transport der Virionen vom ER in ein, dem ER nachgeschaltetes vesikuläres Kompartiment hin. BFA inhibiert die frühe Phase der Vesikelsekretion aus dem ER und führt zur Akkumulation von Proteinen in diesem (Klausner *et al.*, 1992). So wird höchstwahrscheinlich die für die Virusknospung essenzielle Abschnürung vom ER unterbunden (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Klausner *et al.*, 1992). Der inhibierende Effekt von BFA auf die Sekretion des Pestivirus BVDV (Bovine Virusdiarrhö-Virus) ohne Beeinflussung von Assemblierung und Infektiosität wurde bereits beschrieben (Macovei *et al.*, 2006). Ein diskutierter Einfluss des Inhibitors auf die RNA-Synthese des Virus (Goueslain *et al.*, 2010) konnte hier nicht beobachtet werden, was durch die Arbeit von Gastaminza *et al.*, 2008 bestätigt wird.

Neben Brefeldin A wurde Monensin A eingesetzt, welches den Transport innerhalb des Golgi-Apparats blockiert (Tartakoff *et al.*, 1978). Dieser Inhibitor hat kaum einen Einfluss auf die Sekretion vom Hepatitis C Partikeln, was in Einklang mit den mikroskopischen Daten gegen eine Beteiligung des Golgi-Apparats an der aktiven Freisetzung von HCV spricht. Jedoch könnte der Golgi-Apparat wichtig für den Transport von Komponenten des Assemblierungsprozesses sein (Amako *et al.*, 2011). Das allgemeine Postulat, dass der Golgi-Apparat an der HCV Freisetzung beteiligt ist, stützt sich vor allem auf die Erkenntnisse über den Ausschleusungsprozess verwandter Viren, wie z.B. dem zur Gruppe der Flaviviren gehörenden Dengue Virus (DENV; Chambers *et al.*, 1990; Welsch *et al.*, 2009) und dem zu den Pestiviren gezählten Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV; Weiskircher *et al.*, 2009), die als Modellsysteme für HCV verwendet werden. Dagegen deuten die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der Golgi-Apparat keinen Effekt auf die Partikel ausschleusung zu haben scheint.

Nocodazole führt zur Depolymerisation der Mikrotubuli und somit zu einem Stopp der Mikrotubuli-abhängigen Translokation zwischen ER und Golgi oder anderen, dem ER nachgeschalteten Kompartimenten (Rogalski und Singer, 1984). Die Verwendung dieses Inhibitors führte zur verminderten Ausschleusung von Viruspartikeln. Nocodazole wurde in der Literatur bereits mit einer geringeren Fähigkeit zur Assemblierung von Virionen in Verbindung gebracht (Boulant *et al.*, 2008). Ob oder welchen Einfluss das Mikrotubuli-Netzwerk auf den Vesikeltransport ausübt ist unklar und sollte weiter untersucht werden.

Wie HCV aus der Zelle ausgeschleust wird, war zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt. Befinden sich die zusammgebauten Viren in Vesikeln im Zytoplasma, müssen diese zur Sekretion an die Plasmamembran transportiert werden. Die meisten Viren benutzen für den Austritt die zelluläre Maschinerie. Das E1 Protein befindet sich nach der Assemblierung an *lipid droplets* in Vesikeln, die mit Markern für frühe Endosomen (Rab5 und EEA1) kolokalisieren. Rab5, eine kleine GTPase, und dessen Effektor EEA1, sind an der Regulation und dem Aufbau früher Endosomen beteiligt und für deren Fusionsverhalten verantwortlich (Christoforidis *et al.*, 1999). Eine Kolokalisation von E1 mit anderen untersuchten vesikulären Kompartimenten (Golgi, späte Endosomen, Lysosomen, MVB)

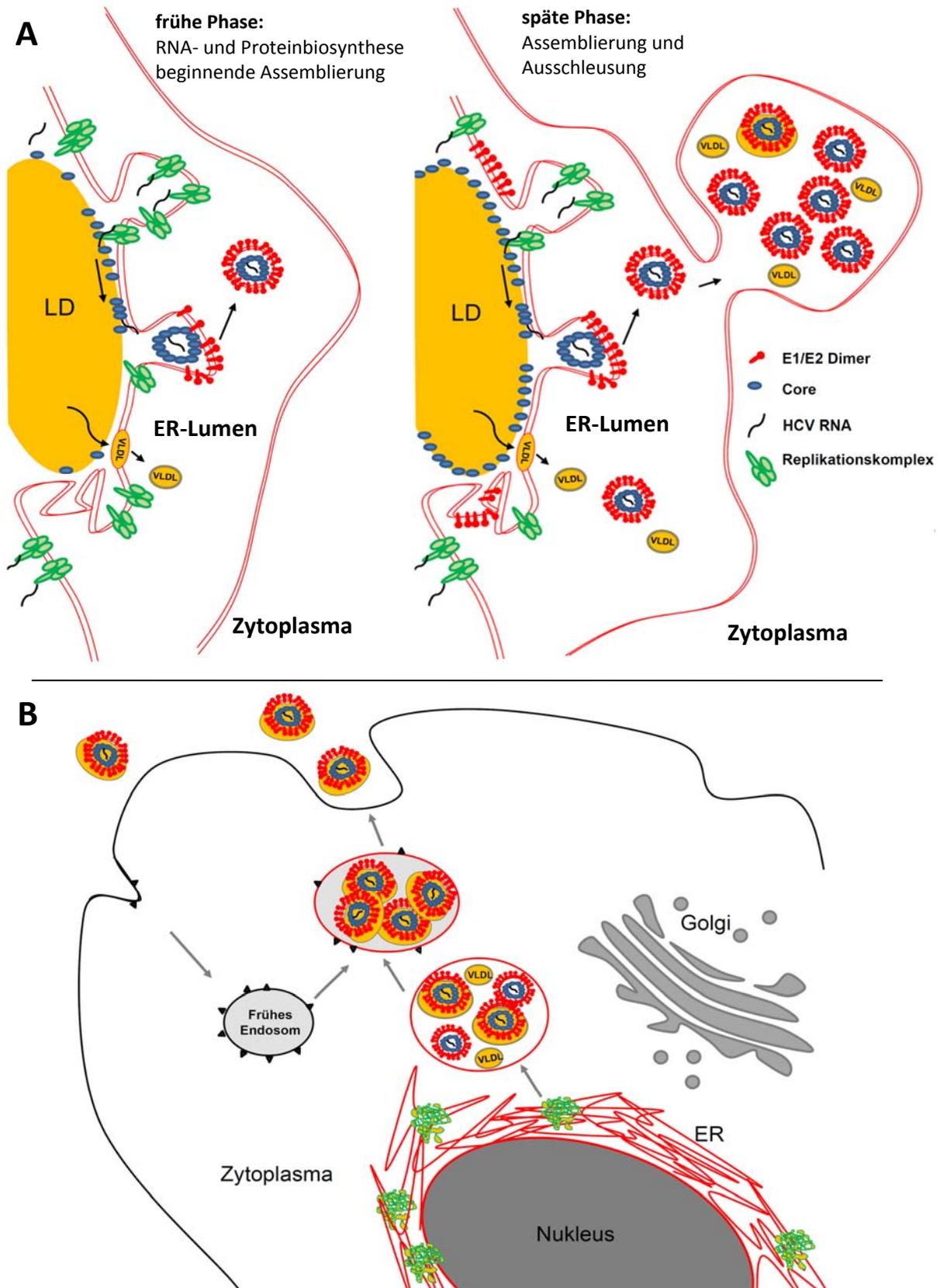
konnte nicht festgestellt werden. Damit scheint der frühe endosomale Weg der Zelle an der Sekretion von HCV beteiligt zu sein. Durch funktionelle Analysen konnte diese Vermutung erhärtet werden. Nach Inaktivierung früher Endosomen durch deren Vernetzung wurden signifikant weniger infektiöse Viruspartikel im Überstand gefunden. Dies bestätigt, dass Endosomen an der Ausschleusung von Virionen aus Huh7.5 Zellen beteiligt sind. In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde die Kolo-kalisation von frühen und späten Endosomen mit Core beobachtet (Lai *et al.*, 2010) und durch den Einsatz von Inhibitoren gezeigt, dass die Viren für ihre Sekretion einen Endosomen-basierten Weg aus der Zelle nehmen, der unabhängig vom endosomalen Eintritt des Virus stattfindet. Wie endosomale Vesikel in die Ausschleusung involviert sind, ist allerdings nicht weiter bekannt. Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus könnten im Folgenden z.B. *Knockdown*-Studien mit siRNA gegen Proteine des endosomalen Weges der Zelle Aufschluss über die Bedeutung dieser für die Sekretion geben.

Andere Gruppen stellten einen Effekt des ESCRT Komplexes (*endosomal sorting complex required for transport*) auf die HCV Partikelsekretion fest (Corless *et al.*, 2010; Ariumi *et al.*, 2011). Die Bildung von Endosomen ist von den Multiproteinkomplexen des ESCRT abhängig, welche in die Sortierung zellulärer Proteine involviert ist. Der ESCRT-Signalweg wird für die endgültige Teilung der Zellmembran in mehreren wichtigen biologischen Prozessen benötigt. Dazu gehört auch die endosomale, intraluminale Vesikelbildung und Sortierung, HIV-Knospe und Zytokinese (Raiborg und Stenmark, 2009). VPS4-ATPasen vollführen eine Schlüsselrolle für diesen Signalweg, indem sie Membran-assoziierte ESCRT-III-Verbindungen erkennen und deren Abbau katalysieren (Babst *et al.*, 2002). Wird die Funktion von VPS4 unterbunden, führt dies zur Dysfunktion des ESCRT und auch zur reduzierten HCV Sekretion (Corless *et al.*, 2010). Es wird angenommen, dass die virusenthaltenden, endosomalen Vesikel zur Plasmamembran transportiert und dort exozytotisch entlassen werden, wie es für die meisten, im Zytoplasma assemblierenden Viren der Fall ist. Andere Flaviviren, wie das Dengue-Virus (DENV) oder das Kunjin-Virus (KUNV), werden beispielsweise im rauen ER zusammengebaut, reifen während des Transportes über den Golgi-Apparat und werden dann exozytotisch entlassen (Chambers *et al.*, 1990; Mackenzie und Westaway, 2001; Lobigs und Lee, 2004). Der Prozess des Vesikeltransports zur Plasmamembran und der Exozytose wird durch die Proteine des Exocyst-Komplexes und des SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) reguliert. Der Exocyst-Komplex besteht aus acht Proteinen und ist für den Transport von dem Golgi-Apparat nachgeschalteten Vesikeln und die Anheftung dieser an die Plasmamembran verantwortlich (Hsu *et al.*, 2004; Wang und Hsu, 2006). Die SNARE Proteine katalysieren demgegenüber die Fusion von Vesikel- und Plasmamembran (Brown und Pfeffer, 2010; Liu und Pappas, 2010). Unlängst wurde beschrieben, dass die Proteine des Exocyst-Komplexes, besonders Exo70, einen immensen Einfluss auf die Sekretion von Dengue Viruspartikeln ausüben (Chen *et al.*, 2011). Die Untersuchung der

SNARE und Exocyst Komponenten in Zusammenhang mit der HCV Sekretion könnte weitere wichtige Erkenntnisse über den Prozess der Virusausschleusung liefern.

Unabhängig von der Beobachtung, dass frühe Endosomen wichtig für die Ausschleusung von HCV Partikeln sind, wird der VLDL Weg (*very low density lipoproteins*) häufig im Zusammenhang mit ihrer Reifung und Sekretion genannt. VLDL ist ein Bestandteil des Blutplasmas und an dem Transport von Triglyceriden, Cholesterin und Phospholipiden von der Leber zu den Geweben beteiligt. Die Apolipoproteine apoB und apoE stabilisieren das VLDL. In der Blutbahn zirkulierende Viruspartikel sind mit VLDLs komplexiert und werden LVPs (*lipovirionparticle*) genannt (Andre *et al.*, 2002). Diese Partikel weisen aufgrund ihres hohen Fettanteils eine geringere Dichte auf als solche, die aus virusproduzierenden Zellen isoliert wurden (Gastaminza *et al.*, 2006), was auf einen Reifungsprozess im Zuge der Ausschleusung schließen lässt. LVPs enthalten neben viraler RNA und dem Coreprotein auch die VLDL Proteine apoB und apoE. In ER-Membranen, an denen die Replikationskomplexe von HCV aufgebaut werden, findet man ebenfalls apoB und apoE (Chang *et al.*, 2007; Gastaminza *et al.*, 2008). Erst kürzlich wurde eine Interaktion zwischen NS5A und apoE entdeckt, die essenziell für die Ausschleusung infektiöser Partikel zu sein scheint (Benga *et al.*, 2010). Es gibt verschiedene Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen, welche die Rolle der einzelnen Faktoren des VLDL Weges in der Reifung und Entlassung des Virus unterschiedlich bewerten. Höchstwahrscheinlich ist der Transport von VLDL mit dem der HCV Sekretion verbunden. Auf welche Weise bleibt allerdings eine noch zu klärende Frage (Jones und McLauchlan, 2010; Syed *et al.*, 2010; Bartenschlager *et al.*, 2011). Der Ort der Fusion der HCV und VLDL Sekretionsmaschinerie ist ebenfalls noch nicht gefunden worden. Es wird diskutiert, ob diese Fusion einer VLDL Vorstufe mit unreifen Virionen während des Transits über den Golgi-Apparat oder unabhängig von diesem, in einem anderen, dem ER nachgeschaltetem Kompartiment stattfindet (Syed *et al.*, 2010). Den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten zufolge nutzt das Virus für seine Sekretion nicht den Golgi-Apparat. Im Einklang damit und entgegen vieler anderer Publikationen wird von der Gruppe um Nielsen *et al.*, 2008, welche die Dichte von HCV-RNA enthaltender Partikel der humanen Leber untersucht haben, eine Assoziation mit dem Golgi-Apparat ebenfalls in Frage gestellt. Die Untersuchung des VLDL-Weges im Zusammenhang mit einer endosomalen Ausschleusung des Virus könnte wichtige Informationen über die Sekretion von HCV liefern und mit den fluoreszenzmarkierten Virusvarianten in weiterführenden Studien untersucht werden.

Aus den hier gewonnenen Erkenntnissen ergibt sich unter Berücksichtigung aktueller Publikationen daher folgendes Modell der HCV Assemblierung und Ausschleusung:



**Abb. 43: Modell zur HCV Assemblierung und Ausschleusung.** **A:** Frühe und späte Phase der HCV Assemblierung an der Oberfläche von *lipid droplets* (LD) ins ER Lumen und spätere Ausbildung von ER Vesikeln. VLDL gelangt ebenfalls von *lipid droplets* ins ER Lumen. Die Reifung der Partikel während der Ausschleusung zu weniger dichten und damit infektiöseren Partikeln könnte während des gemeinsamen Transports von Virionen und VLDL geschehen. **B:** Vesikel aus dem ER verschmelzen vermutlich mit frühen Endosomen und werden exozytotisch ausgeschleust.

### 5.3 Ein lytischer Schritt im HCV Replikationszyklus

In den mikroskopischen und funktionellen Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten Hinweise auf eine, durch das Hepatitis C Virus eingeleitete Apoptose und/oder Lyse infizierter Zellen gefunden werden. Gibt es also neben dem aktiv regulierten, vesikulären Transport von Viruspartikeln aus der Zelle bei HCV einen lytischen Weg der Freisetzung?

Tatsächlich können Viren im Allgemeinen sowohl Apoptose stimulieren als auch hemmen. Nahezu allen Proteinen des Hepatitis C Virus werden in der Literatur Apoptose-stimulierende und gleichzeitig auch inhibierende Eigenschaften zugeschrieben (Fischer *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008). Welche Bedeutung die Apoptose im Kontext einer HCV Infektion hat, ist bisher nicht verstanden. Generell ist der programmierte Zelltod eine Abwehrreaktion und führt zur Beseitigung einer Infektion im Organismus (Everett und McFadden, 1999). In der HCV-infizierten Leber jedoch, wird trotz erhöhter Apoptoseraten in Hepatozyten eine Persistenz der Viren beobachtet (Calabrese *et al.*, 2000).

Zu späten Zeitpunkten nach Elektroporation wurde in den Videosequenzen eine Apoptose oder ein Apoptose-ähnlicher Prozess in JC1-mCherry/GFP Virus-produzierenden Zellen beobachtet, in der am Ende keine grüne Fluoreszenz (NS5A/Replikation) aber eindeutig rotes Strukturprotein (E1/Viruspartikel) übrig blieb.

In infizierten Zellen werden zellfremde virale Proteine gebildet und gleichzeitig normale zelleigene Funktionen unterdrückt. Zellpathologische Veränderungen sind dann oft die Folge und können schließlich zum Absterben der Zelle führen. Es muss allerdings zwischen einer Zerstörung der Wirtszelle zu einem späten Zeitpunkt der Virusvermehrung und einem programmierten Zelltod als energieabhängigen Prozess des Zellselbstmordes unterschieden werden. Unter Apoptose versteht man die Selbsterstörung der Zelle als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli. Sie ist charakterisiert durch eine Reihe morphologischer Eigenschaften und biochemischer Prozesse, die unter anderem zur Schrumpfung, teilweisen Ablösung adhärent wachsender Zellen und zum Aufquellen der Plasmamembran führen. Dieses Verhalten ist deutlich in den im Rahmen dieser Arbeit erstellten Videosequenzen in virusproduzierenden Zellen zu einem späten Zeitpunkt nach Elektroporation zu beobachten. Letztendlich zerbricht die Zelle in sog. apoptotische Fragmente, die phagozytiert werden, ohne eine Entzündungsreaktion zu induzieren. Allgemein gesehen ist die zellautonome Apoptose eine schnell ablaufende Verteidigungsstrategie des Organismus. Andererseits kann die Induktion von Apoptose den lytischen Infektionsverlauf und eine damit verbundene bessere Virusweiterverbreitung zu Nachbarzellen hervorrufen, ohne dabei eine Entzündung mit Aktivierung des Immunsystems zu provozieren.

Ob es sich bei den hier gemachten Beobachtungen tatsächlich um Apoptose handelt, wurde zunächst nur vermutet. Das Sterben der Zellen hätte ebenfalls auf die, in der Lebendzellanalyse häufig auftretende, Phototoxizität zurückgeführt werden können. Reaktive Sauerstoffradikale, die als Neben-

produkte bei der Fluoreszenzanregung entstehen, können die lebenden Zellen schädigen. Ein sehr wichtiges Argument gegen die Phototoxizität als Grund ist allerdings, dass die typischen roten Reste, deren Entstehung beobachtet wurde, auch bei konfokalen Bildern sichtbar waren, in denen Zellen zu einem späten Zeitpunkt fixiert wurden. Da die Proben zunächst fixiert und erst dann analysiert wurden, kann Phototoxizität nicht als Grund für das Sterben der Zellen angeführt werden.

In einem späten Stadium der Apoptose, das zur Nekrose oder auch Lyse der Zelle führen kann, kann die Plasmamembran beschädigt werden, was die Aufnahme von beispielsweise Propidiumjodid (PI), aber auch von Antikörpern möglich macht (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Der Verlust der Integrität der Plasmamembran HCV exprimierender Zellen wurde hier in verschiedenen Experimenten beobachtet. Diese sterben und lassen E1 Protein-assoziierte Membranen und/oder Virus-gefüllte Membransäcke zurück.

Sowohl durch Annexin V Färbung wie auch durch die Messung der Caspase Aktivität virusproduzierender Zellen, konnte eine gesteigerte Apoptoserate zu einem späten Zeitpunkt (72 Stunden nach Elektroporation) der Virusreplikation festgestellt werden. In der Literatur wird die Apoptose im Zusammenhang mit HCV kontrovers diskutiert (Fischer *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008). Das Coreprotein soll sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften haben (Ray *et al.*, 1998; Marusawa *et al.*, 1999; Dumoulin *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 2009). Aber auch E2 und NS4A (Chiou *et al.*, 2006; Nomura-Takigawa *et al.*, 2006) sind in der Lage, Apoptose zu induzieren. In Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit zeigen Experimente mit dem HCVcc System, dass durch die Replikation des gesamten HCV Genoms die Apoptose der Wirtszelle durch Caspasen ausgelöst wird (Deng *et al.*, 2008; Lan *et al.*, 2008).

Um zu beobachten, ob die Induktion von Caspase-abhängiger Apoptose einen Einfluss auf die Freisetzung von Viruspartikeln haben könnte, wurde der generelle Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK eingesetzt. Dabei hat sich gezeigt, dass bei Inhibition der Caspaseaktivität 48 Stunden nach Infektion die Virusfreisetzung stark inhibiert wurde. In einem weiteren Versuchsaufbau wurde zwischen dem Einfluss der Caspaseinhibition zu frühen (bis 40 Stunden) und späten Zeitpunkten auf die HCV Freisetzung differenziert. Auch hier hat sich der Effekt der Caspaseinhibition auf die Partikelfreisetzung zu späten Zeitpunkten bestätigt. Zusammengefasst scheint in einem ersten Stadium der aktive Transport assemblierter Virionen mit Hilfe von Vesikeln zur Plasmamembranoberfläche im Vordergrund zu stehen. Später könnte dann Virus induzierte Apoptose zur Partikelfreisetzung beitragen. Möglicherweise akkumuliert 72 Stunden nach Elektroporation das schon als Apoptose-induzierendes Protein beschriebene Core in der Zelle (Zhu *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 2009). Core könnte stöchiometrisch zum Umschalten von aktiver Vesikelsekretion zur Apoptose und späterer Lyse der Zelle führen. Es ist auch vorstellbar, dass die von der Wirtszelle durch die Anwesen-

heit des Virus eingeleitete Apoptose von diesem erfolgreich so umgelenkt wird, dass die im Inneren produzierten Viren nicht durch die Apoptose abgebaut sondern freigesetzt werden.

Welchen Effekt HCV induzierte Apoptose im Menschen hat, muss noch geklärt werden. Tatsächlich wird in Hepatozyten eines mit HCV infizierten Organismus eine erhöhte Apoptoserate beobachtet. Es scheint sich dabei um einen universellen, HCV Genotyp-unabhängigen Mechanismus zu handeln (Calabrese *et al.*, 2000; Bantel *et al.*, 2001). Oft werden die optisch als apoptotisch identifizierten Zellen in histologischen Schnitten in enger Nachbarschaft zu infiltrierten Lymphozyten beobachtet, was auf eine Abwehrreaktion zytotoxischer T-Zellen schließen lässt (Calabrese *et al.*, 2000). Es ist jedoch unklar, ob die apoptotischen oder nekrotischen Zellen in der Leber tatsächlich HCV infiziert sind. In diesem Kontext wären immunhistologische Analysen von Leberbiopsien HCV infizierter Patienten interessant, um zu klären, ob die im Lebergewebe tot erscheinenden Zellen HCV positiv sind.

Die erhöhten Apoptoseraten in der Leber HCV Infizierter bleiben bei chronischer Infektion permanent erhöht (Bantel *et al.*, 2001; Mengshol *et al.*, 2007). Dies führt zu einem gesteigerten Zellumsatz, was in Konsequenz zum Ausbilden von Leberzirrhose und Leberkrebs führen kann. Es wird angenommen, dass durch den erhöhten Zellumsatz zum Einen das Ersetzen des Lebergewebes durch Bindegewebe (Zirrhose) gefördert wird, sich zum Anderen aber auch die Mutationsrate der Zellen erhöht. Die könnte die Entstehung von Leberkrebs induzieren. Die momentan verwendete Therapie mit Interferon führt ebenfalls zur Induktion von Apoptose, wobei der Zusammenhang von Interferon-induzierter Eliminierung des Virus und der Apoptose infizierter Hepatozyten ungewiss ist (Pavio und Lai, 2003; Garcia *et al.*, 2006). Bei der Hepatitis B Virus Infektion, wo es zu einem ähnlichen Krankheitsbild wie bei HCV kommt, bilden sich Nukleokapside in infizierten Zellen, die auch nach induzierter Apoptose in Hepatozyten überleben können und potenziell infektiös bleiben (Pasquetto *et al.*, 2000). Durch Aufnahme solcher Nukleokapside von benachbarten Zellen wäre es denkbar, dass diese infiziert werden und das Virus so persistieren kann. Unabhängig von HCV wurde im Tiermodell zur Untersuchung von Leberschäden durch die Inhibition von Apoptose eine verminderte Ausbildung von Fibrose beobachtet (Canbay *et al.*, 2004), wohingegen eine starke Induktion von Apoptose zur fulminanten Hepatitis führte (Ogasawara *et al.*, 1993; Kohli *et al.*, 1999). Daraufhin wurde sogar eine anti-apoptotische Therapie zur Prävention von Leberschäden bei der HCV Infektion vorgeschlagen (Feldstein und Gores, 2004; Guicciardi und Gores, 2005). Andererseits konnte in einer Untersuchung von Hsu *et al.*, 2003 durch pro-apoptotische Gentherapie in Mäusen ein Rückgang der HCV-RNA Mengen im Serum detektiert werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass im hier verwendeten Modell die HCV Expression zu späten Zeitpunkten der Virusreplikation Apoptose induziert. Dies erhöht die Freisetzung von Viruspartikeln. Somit lässt sich in HCV produzierenden Huh7.5 Zellen ein lytischer

Schritt im viralen Lebenszyklus postulieren. Die Diskussionen in der Literatur über die Induktion von Apoptose durch HCV und deren Folgen sind kontrovers. In weiterführenden Studien soll dieser Prozess mechanistisch näher charakterisiert und die *in vivo* Relevanz analysiert werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
apoB	Apolipoprotein B
apoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäuren
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
ER	Endoplasmatische Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GA	Glutaraldehyd
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein (engl. <i>green fluorescent protein</i> )
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	Hepatitis C Virus <i>cell culture system</i>
HCVpp	Hepatitis C Virus <i>pseudoparticle system</i>
IF	Immunfluoreszenz
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
LD	<i>Lipid droplet</i>
mCFP	Monomeres Cyan fluoreszierendes Protein (engl. <i>monomeric cyan fluorescent protein</i> )
mCherry	Monomeres Rot fluoreszierendes Protein
MEM	Modified Eagle's Medium
miRNA	<i>micro RNA</i>
mL	Milliliter
ms	Millisekunde
mtagBFP	Monomeres blau fluoreszierendes Protein (engl. <i>monomeric blue fluorescent protein</i> )
NEAA	Nicht essenzielle Aminosäuren (engl. <i>Non essential amino acids</i> )
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure (eng. <i>Ribonucleic acid</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodiumdodecylsulfate</i> )
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
V	Volt
v/v	Volumenanteil
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WB	Western Blot

Aminosäuren wurden nach 1-Buchstaben-Code abgekürzt.

## 7 Literatur

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. and Zhang, Q. X.** (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12766-12771.
- Ait-Goughoulte, M., Hourieux, C., Patient, R., Trassard, S., Brand, D. and Roingeard, P.** (2006) Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. *J Gen Virol*, 87, 855-860.
- Alter, H. J., Purcell, R. H., Shih, J. W., Melpolder, J. C., Houghton, M., Choo, Q. L. and Kuo, G.** (1989) Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*, 321, 1494-1500.
- Alter, M. J. and Moyer, L. A.** (1998) The importance of preventing hepatitis C virus infection among injection drug users in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 18 Suppl 1, S6-10.
- Amako, Y., Syed, G. H. and Siddiqui, A.** (2011) Protein Kinase D Negatively Regulates Hepatitis C Virus Secretion through Phosphorylation of Oxysterol-binding Protein and Ceramide Transfer Protein. *J Biol Chem*, 286, 11265-11274.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G. and Lotteau, V.** (2002) Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol*, 76, 6919-6928.
- Andriulli, A., Mangia, A., Iacobellis, A., Ippolito, A., Leandro, G. and Zeuzem, S.** (2008) Meta-analysis: the outcome of anti-viral therapy in HCV genotype 2 and genotype 3 infected patients with chronic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 28, 397-404.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. and Bartenschlager, R.** (2008) Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*, 4, e1000035.
- Ariumi, Y., Kuroki, M., Maki, M., Ikeda, M., Dansako, H., Wakita, T. and Kato, N.** (2011) The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One*, 6, e14517.
- Armstrong, G. L.** (2003) Commentary: Modelling the epidemiology of hepatitis C and its complications. *Int J Epidemiol*, 32, 725-726.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T. and Emr, S. D.** (2002) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*, 3, 271-282.
- Banning, C., Votteler, J., Hoffmann, D., Koppensteiner, H., Warmer, M., Reimer, R., Kirchhoff, F., Schubert, U., Hauber, J. and Schindler, M.** (2010) A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PLoS One*, 5, e9344.
- Bantel, H., Luger, A., Poremba, C., Luger, N., Held, J., Domschke, W. and Schulze-Osthoff, K.** (2001) Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 34, 758-767.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J., Miyamura, T. and Brechot, C.** (1997) Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1200-1205.
- Bartenschlager, R.** (2006) Virusaufbau, Replikationszyklus, Klassifikation, Virusnachweisverfahren [http://www.medizinische-fakultaet-hd.uni-heidelberg.de/fileadmin/inst\\_hygiene/molekulare\\_virologie/PDF/WS06\\_07/ws06-07\\_03\\_virusdiagnostik\\_und\\_verlaufsformen.pdf](http://www.medizinische-fakultaet-hd.uni-heidelberg.de/fileadmin/inst_hygiene/molekulare_virologie/PDF/WS06_07/ws06-07_03_virusdiagnostik_und_verlaufsformen.pdf)
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T. and Koch, J. O.** (1995) Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol*, 69, 7519-7528.

- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V. and Andre, P.** (2011) Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol*, 19, 95-103.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H. E. and Baumert, T. F.** (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem*, 278, 41003-41012.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. and Cosset, F. L.** (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*, 197, 633-642.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Bartosch, B., Cosset, F. L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernandez, A., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M. and Majano, P. L.** (2009) The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol*, 83, 8012-8020.
- Benga, W. J., Krieger, S. E., Dimitrova, M., Zeisel, M. B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T. F. and Schuster, C.** (2010) Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology*, 51, 43-53.
- Berg, C. P., Schlosser, S. F., Neukirchen, D. K., Papadakis, C., Gregor, M., Wesselborg, S. and Stein, G. M.** (2009) Hepatitis C virus core protein induces apoptosis-like caspase independent cell death. *Virology*, 6, 213.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-1523.
- Bitzegeio, J., Bankwitz, D., Hueging, K., Haid, S., Brohm, C., Zeisel, M. B., Herrmann, E., Iken, M., Ott, M., Baumert, T. F. and Pietschmann, T.** (2010) Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathog*, 6, e1000978.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. and Rouille, Y.** (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 80, 6964-6972.
- Blight, K. J., McKeating, J. A. and Rice, C. M.** (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, 76, 13001-13014.
- Bode, J. G., Brenndorfer, E. D., Karthe, J. and Haussinger, D.** (2009) Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication. *Biol Chem*, 390, 1013-1032.
- Boulant, S., Douglas, M. W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P. and McLauchlan, J.** (2008) Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic*, 9, 1268-1282.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J. P., Penin, F. and McLauchlan, J.** (2006) Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem*, 281, 22236-22247.
- Boulant, S., Targett-Adams, P. and McLauchlan, J.** (2007) Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol*, 88, 2204-2213.
- Brachet, V., Pehau-Arnaudet, G., Desaymard, C., Raposo, G. and Amigorena, S.** (1999) Early endosomes are required for major histocompatibility complex class II transport to peptide-loading compartments. *Mol Biol Cell*, 10, 2891-2904.
- Bradley, D. W., McCaustland, K. A., Cook, E. H., Schable, C. A., Ebert, J. W. and Maynard, J. E.** (1985) Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology*, 88, 773-779.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F. A. and De Francesco, R.** (2002) Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J Virol*, 76, 3482-3492.
- Brown, F. C. and Pfeffer, S. R.** (2010) An update on transport vesicle tethering. *Mol Membr Biol*, 27, 457-461.

- Buck, M.** (2008) Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures. *PLoS One*, 3, e2660.
- Burnouf, T., Radosevich, M., El-Ekiaby, M., Satoh, S., Sato, T., Amin, S. N., Savidge, G. F. and Goubran, H. A.** (2003) Nanofiltration of single plasma donations: feasibility study. *Vox Sang*, 84, 111-119.
- Busch, M. P., Kleinman, S. H. and Nemo, G. J.** (2003) Current and emerging infectious risks of blood transfusions. *JAMA*, 289, 959-962.
- Calabrese, F., Pontisso, P., Pettenazzo, E., Benvegna, L., Vario, A., Chemello, L., Alberti, A. and Valente, M.** (2000) Liver cell apoptosis in chronic hepatitis C correlates with histological but not biochemical activity or serum HCV-RNA levels. *Hepatology*, 31, 1153-1159.
- Canbay, A., Feldstein, A., Baskin-Bey, E., Bronk, S. F. and Gores, G. J.** (2004) The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 308, 1191-1196.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. and Rice, C. M.** (1990) Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, 44, 649-688.
- Chang, K. S., Jiang, J., Cai, Z. and Luo, G.** (2007) Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol*, 81, 13783-13793.
- Chen, Z., Lin, X., Zhang, Z., Huang, J., Fu, S. and Huang, R.** (2011) EXO70 protein influences dengue virus secretion. *Microbes Infect*, 13, 143-150.
- Chiou, H. L., Hsieh, Y. S., Hsieh, M. R. and Chen, T. Y.** (2006) HCV E2 may induce apoptosis of Huh-7 cells via a mitochondrial-related caspase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 453-458.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. and Houghton, M.** (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359-362.
- Chou, A. H., Tsai, H. F., Wu, Y. Y., Hu, C. Y., Hwang, L. H., Hsu, P. I. and Hsu, P. N.** (2005) Hepatitis C virus core protein modulates TRAIL-mediated apoptosis by enhancing Bid cleavage and activation of mitochondria apoptosis signaling pathway. *J Immunol*, 174, 2160-2166.
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. and Zerial, M.** (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature*, 397, 621-625.
- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., Houghton, M., Parham, P. and Walker, C. M.** (1999) Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, 10, 439-449.
- Corless, L., Crump, C. M., Griffin, S. D. and Harris, M.** (2010) Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *J Gen Virol*, 91, 362-372.
- Creagh, E. M. and Martin, S. J.** (2001) Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans*, 29, 696-702.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T. and Traganos, F.** (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27, 1-20.
- De Francesco, R. and Migliaccio, G.** (2005) Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*, 436, 953-960.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. and Dubuisson, J.** (1997) Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol*, 71, 697-704.
- Denault, J. B. and Salvesen, G. S.** (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev*, 102, 4489-4500.
- Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I. and Hotta, H.** (2008) Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase 3-dependent pathway. *J Virol*, 82, 10375-10385.
- Desai, P., Akpa, J. C. and Person, S.** (2003) Residues of VP26 of herpes simplex virus type 1 that are required for its interaction with capsids. *J Virol*, 77, 391-404.

- Desai, P. and Person, S.** (1998) Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol*, 72, 7563-7568.
- Drummer, H. E., Maerz, A. and Pombourios, P.** (2003) Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett*, 546, 385-390.
- Dumoulin, F. L., vsn dem Bussche, A., Sohne, J., Sauerbruch, T. and Spengler, U.** (1999) Hepatitis C virus core protein does not inhibit apoptosis in human hepatoma cells. *Eur J Clin Invest*, 29, 940-946.
- Duvet, S., Op De Beeck, A., Cocquerel, L., Wychowski, C., Cacan, R. and Dubuisson, J.** (2002) Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 occurs posttranslationally in a mannosylphosphoryldolichol-deficient CHO mutant cell line. *Glycobiology*, 12, 95-101.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. and Bienz, K.** (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, 76, 5974-5984.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tschernie, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. and Rice, C. M.** (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446, 801-805.
- Everett, H. and McFadden, G.** (1999) Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol*, 7, 160-165.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. and Holland, P. V.** (1975) Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*, 292, 767-770.
- Feldstein, A. E. and Gores, G. J.** (2004) An apoptosis biomarker goes to the HCV clinic. *Hepatology*, 40, 1044-1046.
- Fernandez-Suarez, M. and Ting, A. Y.** (2008) Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 929-943.
- Fischer, R., Baumert, T. and Blum, H. E.** (2007) Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol*, 13, 4865-4872.
- Forer, A., Emmersen, J. and Behnke, O.** (1972) Cytochalasin B: does it affect actin-like filaments? *Science*, 175, 774-776.
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P. M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. and Gale, M., Jr.** (2005) Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2986-2991.
- Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E. S., Anwar, W. and Sallam, I.** (2000) The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, 355, 887-891.
- Friebe, P. and Bartenschlager, R.** (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol*, 76, 5326-5338.
- Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J. P. and Bartenschlager, R.** (2005) Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol*, 79, 380-392.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J. W. and Lai, M. M.** (2004) Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol*, 78, 3480-3488.
- Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. and Esteban, M.** (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70, 1032-1060.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T. and Olson, W. C.** (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4498-4503.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W. and Chisari, F. V.** (2008) Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol*, 82, 2120-2129.

- Gastaminza, P., Dryden, K. A., Boyd, B., Wood, M. R., Law, M., Yeager, M. and Chisari, F. V.** (2010) Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol*, 84, 10999-11009.
- Gastaminza, P., Kapadia, S. B. and Chisari, F. V.** (2006) Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol*, 80, 11074-11081.
- Gebo, K. A., Herlong, H. F., Torbenson, M. S., Jenckes, M. W., Chander, G., Ghanem, K. G., El-Kamary, S. S., Sulkowski, M. and Bass, E. B.** (2002) Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. *Hepatology*, 36, S161-172.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Zachoval, R., Gruener, N. H., Jung, M. C., Ulsenheimer, A., Schraut, W. W., Schirren, C. A., Waechtler, M., Backmund, M. and Pape, G. R.** (2003) Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*, 125, 80-88.
- Gitto, S., Micco, L., Conti, F., Andreone, P. and Bernardi, M.** (2009) Alcohol and viral hepatitis: a mini-review. *Dig Liver Dis*, 41, 67-70.
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F. L., Montpellier, C. and Dubuisson, J.** (2005) Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol*, 79, 8400-8409.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J. and Rouille, Y.** (2010) Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, 84, 773-787.
- Gouttenoire, J., Penin, F. and Moradpour, D.** (2010) Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev Med Virol*, 20, 117-129.
- Greenspan, P., Mayer, E. P. and Fowler, S. D.** (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, 100, 965-973.
- Griffin, S.** (2010) Inhibition of HCV p7 as a therapeutic target. *Curr Opin Investig Drugs*, 11, 175-181.
- Guicciardi, M. E. and Gores, G. J.** (2005) Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*, 54, 1024-1033.
- Hadziyannis, S. J., Sette, H., Jr., Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H., Jr., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P. J., Lin, A. and Ackrill, A. M.** (2004) Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*, 140, 346-355.
- Heintges, T. and Wands, J. R.** (1997) Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology*, 26, 521-526.
- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z. Y., Fong, S., Penin, F., Dubuisson, J. and Voisset, C.** (2007) The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol*, 81, 8101-8111.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., Farese, R. V., Jr. and Ott, M.** (2010) Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med*, 16, 1295-1298.
- Hofer, H., Watkins-Riedel, T., Janata, O., Penner, E., Holzmann, H., Steindl-Munda, P., Gangl, A. and Ferenci, P.** (2003) Spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C can be predicted by repeated measurements of serum viral load. *Hepatology*, 37, 60-64.
- Hope, R. G., Murphy, D. J. and McLauchlan, J.** (2002) The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem*, 277, 4261-4270.
- Hsu, E. C., Hsi, B., Hirota-Tsuchihara, M., Ruland, J., Iorio, C., Sarangi, F., Diao, J., Migliaccio, G., Tyrrell, D. L., Kneteman, N. and Richardson, C. D.** (2003) Modified apoptotic molecule (BID) reduces hepatitis C virus infection in mice with chimeric human livers. *Nat Biotechnol*, 21, 519-525.

- Hsu, S. C., TerBush, D., Abraham, M. and Guo, W.** (2004) The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int Rev Cytol*, 233, 243-265.
- Huang, B., Babcock, H. and Zhuang, X.** (2010) Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell*, 143, 1047-1058.
- Hubner, W., Chen, P., Del Portillo, A., Liu, Y., Gordon, R. E. and Chen, B. K.** (2007) Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1. *J Virol*, 81, 12596-12607.
- Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E. and Moradpour, D.** (2001) The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*, 284, 70-81.
- Jaeckel, E., Cornberg, M., Wedemeyer, H., Santantonio, T., Mayer, J., Zankel, M., Pastore, G., Dietrich, M., Trautwein, C. and Manns, M. P.** (2001) Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med*, 345, 1452-1457.
- Janssen, H. L., Brouwer, J. T., van der Mast, R. C. and Schalm, S. W.** (1994) Suicide associated with alfa-interferon therapy for chronic viral hepatitis. *J Hepatol*, 21, 241-243.
- Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J. and Rice, C. M.** (2007) Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol*, 81, 8374-8383.
- Jones, D. M. and McLauchlan, J.** (2010) Hepatitis C virus: assembly and release of virus particles. *J Biol Chem*, 285, 22733-22739.
- Jopling, C. L., Norman, K. L. and Sarnow, P.** (2006) Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71, 369-376.
- Kato, T., Date, T., Murayama, A., Morikawa, K., Akazawa, D. and Wakita, T.** (2006) Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc*, 1, 2334-2339.
- Kim, D. W., Gwack, Y., Han, J. H. and Choe, J.** (1995) C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 215, 160-166.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J.** (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol*, 116, 1071-1080.
- Kohli, V., Selzner, M., Madden, J. F., Bentley, R. C. and Clavien, P. A.** (1999) Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*, 67, 1099-1105.
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M. and Rice, C. M.** (1997) Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, 277, 570-574.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M. and Rice, C. M.** (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*, 70, 3363-3371.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M. and Rice, C. M.** (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol*, 74, 2046-2051.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. and Bartenschlager, R.** (2006) Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol*, 80, 5308-5320.
- Kwong, A. D., Rao, B. G. and Jeang, K. T.** (2005) Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 845-853.
- Lai, C. K., Jeng, K. S., Machida, K. and Lai, M. M.** (2010) Hepatitis C virus egress and release depend on endosomal trafficking of core protein. *J Virol*, 84, 11590-11598.
- Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., Bos, M., Cameron, D. R., Cartier, M., Cordingley, M. G., Faucher, A. M., Goudreau, N., Kawai, S. H., Kukolj, G., Lagace, L., LaPlante, S. R., Narjes, H., Poupard, M. A., Rancourt, J., Sentjens, R. E., St George, R., Simoneau, B., Steinmann, G., Thibeault, D., Tsantrizos, Y. S., Weldon, S. M., Yong, C. L.**

- and Llinas-Brunet, M.** (2003) An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*, 426, 186-189.
- Lan, L., Gorke, S., Rau, S. J., Zeisel, M. B., Hildt, E., Himmelsbach, K., Carvajal-Yepes, M., Huber, R., Wakita, T., Schmitt-Graeff, A., Royer, C., Blum, H. E., Fischer, R. and Baumert, T. F.** (2008) Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *J Immunol*, 181, 4926-4935.
- Lauer, G. M. and Walker, B. D.** (2001) Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 345, 41-52.
- Lavie, M., Goffard, A. and Dubuisson, J.** (2007) Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol*, 9, 71-86.
- Lavillette, D., Pecheur, E. I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F. and Cosset, F. L.** (2007) Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol*, 81, 8752-8765.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F. and Weber, P. C.** (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol*, 6, 937-943.
- Li, D., Takyar, S. T., Lott, W. B. and Gowans, E. J.** (2003) Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in HuH7 and CV-1 cells. *J Gen Virol*, 84, 815-825.
- Liang, X. and Li, Z. Y.** (2010) Ion channels as antiviral targets. *Viol Sin*, 25, 267-280.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A. and Rice, C. M.** (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 309, 623-626.
- Lindenbach, B. D. and Rice, C. M.** (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 436, 933-938.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S. and Klausner, R. D.** (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*, 56, 801-813.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B. and Wang, T.** (2009) Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol*, 83, 2011-2014.
- Liu, W. and Parpura, V.** (2010) SNAREs: could they be the answer to an energy landscape riddle in exocytosis? *ScientificWorldJournal*, 10, 1258-1268.
- Lobigs, M. and Lee, E.** (2004) Inefficient signalase cleavage promotes efficient nucleocapsid incorporation into budding flavivirus membranes. *J Virol*, 78, 178-186.
- Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A. and Bartenschlager, R.** (2001) Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol*, 75, 1437-1449.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. and Bartenschlager, R.** (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285, 110-113.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J. M., Shanmugam, S., Singh, S. M., Lemon, S. M. and Yi, M.** (2011) Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol*, 85, 86-97.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M. and Yi, M.** (2008) NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol*, 82, 7624-7639.
- Macdonald, A. and Harris, M.** (2004) Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol*, 85, 2485-2502.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C. and Kirchhausen, T.** (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*, 10, 839-850.
- Mackenzie, J.** (2005) Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic*, 6, 967-977.

- Mackenzie, J. M. and Westaway, E. G.** (2001) Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol*, 75, 10787-10799.
- Macovei, A., Zitzmann, N., Lazar, C., Dwek, R. A. and Branza-Nichita, N.** (2006) Brefeldin A inhibits pestivirus release from infected cells, without affecting its assembly and infectivity. *Biochem Biophys Res Commun*, 346, 1083-1090.
- Manns M, L. K., Gordon SC, Pockros PJ, Haeussinger D, Hadziyiannis S,** (2008) Sustained virologic response after peginterferon alfa-2b and ribavirin treatment predicts long-term clearance of HCV at 5-year follow-up. *Journal of Hepatology*, S300-S300.
- Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M. and Albrecht, J. K.** (2001) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, 358, 958-965.
- Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T. and Shimotohno, K.** (1999) Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol*, 73, 4713-4720.
- Mathurin, P., Moussalli, J., Cadranet, J. F., Thibault, V., Charlotte, F., Dumouchel, P., Cazier, A., Huraux, J. M., Devergie, B., Vidaud, M., Opolon, P. and Poynard, T.** (1998) Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology*, 27, 868-872.
- McLauchlan, J.** (2000) Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*, 7, 2-14.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. and Martoglio, B.** (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*, 21, 3980-3988.
- Meisel, H., Reip, A., Faltus, B., Lu, M., Porst, H., Wiese, M., Roggendorf, M. and Kruger, D. H.** (1995) Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet*, 345, 1209-1211.
- Mengshol, J. A., Golden-Mason, L. and Rosen, H. R.** (2007) Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 4, 622-634.
- Merican, I., Sherlock, S., McIntyre, N. and Dusheiko, G. M.** (1993) Clinical, biochemical and histological features in 102 patients with chronic hepatitis C virus infection. *Q J Med*, 86, 119-125.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwollegem, T., Desombere, I., Reiser, H. and Leroux-Roels, G.** (2008) Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology*, 48, 1761-1768.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. and Tschopp, J.** (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437, 1167-1172.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. and Shimotohno, K.** (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*, 9, 1089-1097.
- Moradpour, D., Penin, F. and Rice, C. M.** (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*, 5, 453-463.
- Mosmann, T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G.** (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, 3, 13-22.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J. and Perelson, A. S.** (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*, 282, 103-107.

- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Martin, C., Lowther, D., Purcell, P. J., King, B. J., Neely, D. and Toms, G. L. (2008) Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size. *J Gen Virol*, 89, 2507-2517.
- NIH (2002) National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C 2002 (June 10-12, 2002). *Gastroenterology*, 123, 2082-2099.
- Nomura-Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Kitazawa, S., Ishido, S., Sada, K. and Hotta, H. (2006) Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol*, 87, 1935-1945.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. and Nagata, S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364, 806-809.
- Owsianka, A., Tarr, A. W., Juttla, V. S., Lavillette, D., Bartosch, B., Cosset, F. L., Ball, J. K. and Patel, A. H. (2005) Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol*, 79, 11095-11104.
- Paeshuyse, J., Kaul, A., De Clercq, E., Rosenwirth, B., Dumont, J. M., Scalfaro, P., Bartenschlager, R. and Neyts, J. (2006) The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology*, 43, 761-770.
- Palitzsch, K. D., Hottentrager, B., Schlottmann, K., Frick, E., Holstege, A., Scholmerich, J. and Jilg, W. (1999) Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11, 1215-1220.
- Pasquetto, V., Wieland, S. and Chisari, F. V. (2000) Intracellular hepatitis B virus nucleocapsids survive cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis. *J Virol*, 74, 9792-9796.
- Pavio, N. and Lai, M. M. (2003) The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci*, 28, 287-304.
- Pawlotsky, J. M. (2004) Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*, 12, 96-102.
- Perz, J. F., Armstrong, G. L., Farrington, L. A., Hutin, Y. J. and Bell, B. P. (2006) The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*, 45, 529-538.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L. and Bartenschlager, R. (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7408-7413.
- Pietschmann, T., Steinmann, E. and Ciesek, S. (2008) [Hepatitis C virus cell culture models--new perspectives for research and clinic]. *Dtsch Med Wochenschr*, 133, 1580-1584.
- Ploss, A., Khetani, S. R., Jones, C. T., Syder, A. J., Trehan, K., Gaysinskaya, V. A., Mu, K., Ritola, K., Rice, C. M. and Bhatia, S. N. (2010) Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3141-3145.
- Ploss, A. and Rice, C. M. (2009) Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep*, 10, 1220-1227.
- Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R. W., Rice, C. M. and McKeating, J. A. (2003) Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*, 77, 4070-4080.
- Pomper, G. J., Wu, Y. and Snyder, E. L. (2003) Risks of transfusion-transmitted infections: 2003. *Curr Opin Hematol*, 10, 412-418.
- Pond, L. and Watts, C. (1997) Characterization of transport of newly assembled, T cell-stimulatory MHC class II-peptide complexes from MHC class II compartments to the cell surface. *J Immunol*, 159, 543-553.
- Power, J. P., Lawlor, E., Davidson, F., Holmes, E. C., Yap, P. L. and Simmonds, P. (1995) Molecular epidemiology of an outbreak of infection with hepatitis C virus in recipients of anti-D immunoglobulin. *Lancet*, 345, 1211-1213.

- Puoti, C., Castellacci, R., Montagnese, F., Zaltron, S., Stornaiuolo, G., Bergami, N., Bellis, L., Precone, D. F., Corvisieri, P., Puoti, M., Minola, E. and Gaeta, G. B.** (2002) Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J Hepatol*, 37, 117-123.
- Raiborg, C. and Stenmark, H.** (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458, 445-452.
- Ray, R. B., Meyer, K., Steele, R., Shrivastava, A., Aggarwal, B. B. and Ray, R.** (1998) Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem*, 273, 2256-2259.
- Reddy, K. R., Shiffman, M. L., Morgan, T. R., Zeuzem, S., Hadziyannis, S., Hamzeh, F. M., Wright, T. L. and Fried, M.** (2007) Impact of ribavirin dose reductions in hepatitis C virus genotype 1 patients completing peginterferon alfa-2a/ribavirin treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5, 124-129.
- RKI** (2010) Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Virushepatitis B, C und D im Jahr 2009. *Epidemiologisches Bulletin*, 1-14.
- Rocks, O., Gerauer, M., Vartak, N., Koch, S., Huang, Z. P., Pechlivanis, M., Kuhlmann, J., Brunsveld, L., Chandra, A., Ellinger, B., Waldmann, H. and Bastiaens, P. I.** (2010) The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell*, 141, 458-471.
- Rogalski, A. A. and Singer, S. J.** (1984) Associations of elements of the Golgi apparatus with microtubules. *J Cell Biol*, 99, 1092-1100.
- Roingeard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., Brand, D. and Ait-Goughoulte, M.** (2004) Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell*, 96, 103-108.
- Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Tsukuda, T., Shimma, N., Aoki, Y., Arisawa, M., Kohara, M. and Sudoh, M.** (2005) Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol*, 1, 333-337.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G. and Monica, N.** (1995) The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol*, 69, 7461-7471.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. and Vitelli, A.** (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*, 21, 5017-5025.
- Schaller, T., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. and Bartenschlager, R.** (2007) Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J Virol*, 81, 4591-4603.
- Shepard, C. W., Finelli, L. and Alter, M. J.** (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*, 5, 558-567.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J. and Widell, A.** (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42, 962-973.
- Stapleford, K. A. and Lindenbach, B. D.** (2011) Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol*, 85, 1706-1717.
- Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J. and Simmonds, P.** (2011) The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol*, 92, 233-246.
- Steinmann, E., Brohm, C., Kallis, S., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T.** (2008) Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol*, 82, 7034-7046.

- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. (2007) Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog*, 3, e103.
- Subach, O. M., Gundorov, I. S., Yoshimura, M., Subach, F. V., Zhang, J., Gruenwald, D., Souslova, E. A., Chudakov, D. M. and Verkhusha, V. V. (2008) Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe. *Chem Biol*, 15, 1116-1124.
- Svrtlih, N., Jevtovic, D., Simonovic, J., Delic, D., Dokic, L., Gvozdenovic, E., Boricic, I., Nestic, Z., Neskovic, G. and Urban, V. (2007) Older age at the time of liver biopsy is the important risk factor for advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*, 54, 2324-2327.
- Syed, G. H., Amako, Y. and Siddiqui, A. (2010) Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 21, 33-40.
- Tartakoff, A., Vassalli, P. and Detraz, M. (1978) Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. *J Cell Biol*, 79, 694-707.
- Tedbury, P., Welbourn, S., Pause, A., King, B., Griffin, S. and Harris, M. (2010) The sub-cellular localisation of the hepatitis C virus non-structural protein NS2 is regulated by an ion channel-independent function of the p7 protein. *J Gen Virol*.
- Tellinghuisen, T. L., Evans, M. J., von Hahn, T., You, S. and Rice, C. M. (2007) Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol*, 81, 8853-8867.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J. and Rice, C. M. (2005) Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature*, 435, 374-379.
- Tellinghuisen, T. L. and Rice, C. M. (2002) Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol*, 5, 419-427.
- Thierfelder, W., Meisel, H., Schreier, E. and Dortschy, R. (1999) [Prevalence of antibodies to hepatitis A, hepatitis B and hepatitis C viruses in the German population]. *Gesundheitswesen*, 61 Spec No, S110-114.
- Tu, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B. and Lai, M. M. (1999) Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology*, 263, 30-41.
- Uprichard, S. L. (2010) Hepatitis C virus experimental model systems and antiviral drug research. *Virol Sin*, 25, 227-245.
- Vandelli, C., Renzo, F., Romano, L., Tisminetzky, S., De Palma, M., Stroffolini, T., Ventura, E. and Zanetti, A. (2004) Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol*, 99, 855-859.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.
- Voisset, C. and Dubuisson, J. (2004) Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell*, 96, 413-420.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. and Liang, T. J. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 11, 791-796.
- Wang, S. and Hsu, S. C. (2006) The molecular mechanisms of the mammalian exocyst complex in exocytosis. *Biochem Soc Trans*, 34, 687-690.
- Weiskircher, E., Aligo, J., Ning, G. and Konan, K. V. (2009) Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virol J*, 6, 185.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J. and Bartenschlager, R. (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*, 5, 365-375.

- Welte, M. A.** (2009) Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. *Biochem Soc Trans*, 37, 991-996.
- Wesche, B., Jaeckel, E., Trautwein, C., Wedemeyer, H., Falorni, A., Frank, H., von zur Muhlen, A., Manns, M. P. and Brabant, G.** (2001) Induction of autoantibodies to the adrenal cortex and pancreatic islet cells by interferon alpha therapy for chronic hepatitis C. *Gut*, 48, 378-383.
- WHO** (1999) Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat*, 6, 35-47.
- Wiegand, J., Buggisch, P., Boecher, W., Zeuzem, S., Gelbmann, C. M., Berg, T., Kauffmann, W., Kallinowski, B., Cornberg, M., Jaeckel, E., Wedemeyer, H. and Manns, M. P.** (2006) Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: the HEP-NET acute-HCV-II study. *Hepatology*, 43, 250-256.
- Wiese, M., Berr, F., Lafrenz, M., Porst, H. and Oesen, U.** (2000) Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology*, 32, 91-96.
- Wölk, B., Buchele, B., Moradpour, D. and Rice, C. M.** (2008) A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J Virol*, 82, 10519-10531.
- Wölk, B., Sansonno, D., Krausslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E. and Moradpour, D.** (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol*, 74, 2293-2304.
- Wozniak, A. L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S. M. and Weinman, S. A.** (2010) Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog*, 6, e1001087.
- Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U. and Bukh, J.** (1999) Hepatitis C virus: an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. *Virology*, 262, 250-263.
- Yu, G. Y., Lee, K. J., Gao, L. and Lai, M. M.** (2006) Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol*, 80, 6013-6023.
- Yu, X., Qiao, M., Atanasov, I., Hu, Z., Kato, T., Liang, T. J. and Zhou, Z. H.** (2007) Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology*, 367, 126-134.
- Yuasa, T., Ishikawa, G., Manabe, S., Sekiguchi, S., Takeuchi, K. and Miyamura, T.** (1991) The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre. *J Gen Virol*, 72 ( Pt 8), 2021-2024.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. and Chisari, F. V.** (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9294-9299.
- Zhu, H., Elyar, J., Foss, R., Hemming, A., Hall, E., Lecluyse, E. L. and Liu, C.** (2009) Primary human hepatocyte culture for HCV study. *Methods Mol Biol*, 510, 373-382.
- Zhu, N., Khoshnan, A., Schneider, R., Matsumoto, M., Dennert, G., Ware, C. and Lai, M. M.** (1998) Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol*, 72, 3691-3697.

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

---

Name	Carina Banning
Geburtsdatum und -ort	08. August 1982, Steinfurt
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

## Ausbildung

---

08 / 1993 – 06 / 2002	Arnold-Janssen- Gymnasium, Neuenkirchen
09 / 2002-08/2007	Studium der Biotechnologie an der Westfälische Wilhelms-Universität Münster Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie und Betriebswirtschaftslehre
01/2007-08/2007	Diplomarbeit zum Thema: „Charakterisierung und Definition intrazellulärer Angriffspunkte für die antivirale Therapie - Untersuchung eines niedermolekularen Inhibitors auf Influenza A Virus -induzierte Signalwege“ Angefertigt am Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung im Institut für Molekulare Virologie bei Prof. Dr. Stephan Ludwig, Münster Abschluss: Diplom Biotechnologin
11/2007 – 07/2011	Promotion im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg Am Heinrich-Pette-Insitut Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie In der Nachwuchsgruppe Viruspathogenese unter Leitung von Dr. Michael Schindler Thema: „Charakterisierung der Hepatitis C Virus Biogenese“

## Mitgliedschaft

---

Gesellschaft für Virologie (GfV)

## Preise

---

04/2010	Young scientists travel award der GfV 4th European Congress of Virology, Como, Italien Poster: “A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyze protein-protein interactions in living cells”
03/2011	Young scientists travel award der GfV 21st Annual Meeting of the GfV, Freiburg, Deutschland Vortrag: “Imaging the Hepatitis C Virus”

## Publikationen

### Publikationen (peer-reviewed)

Kühl A, **Banning C**, Marzi A, Votteler J, Steffen I, Bertram S, Glowacka I, Konrad A, Stürzl M, Guo JT, Schubert U, Feldmann H, Behrens G, Schindler M, Pöhlmann S (2011); „The Ebola virus glycoprotein and HIV-1 Vpu employ different strategies to counteract the antiviral factor tetherin”, *The Journal of Infectious diseases*, in press

**Banning C**, Votteler J, Hoffmann D, Koppensteiner H, Warmer M, Reimer R, Kirchhoff F, Schubert U, Hauber J, Schindler M (2010); “A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells”; *PLoS ONE*, publ. 22. Februar 2010

Schindler M, Rajan D, **Banning C**, Wimmer P, Koppensteiner H, Iwanski A, Specht A, Sauter D, Dobner T, Kirchhoff F (2010) “Vpu serine 52 dependent counteraction of tetherin is required for HIV-1 replication in macrophages, but not in ex vivo human lymphoid tissue”, *Retrovirology* 2110, 7:1

Toussaint H, Gobert FX, Schindler M, **Banning C**, Kozik P, Jouve M, Kirchhoff F, Benaroch P. (2008); “Human immunodeficiency virus type 1 nef expression prevents AP-2-mediated internalization of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain”, *J Virol.* 2008 Sep;82(17):8373-82.

### Publikationen (nicht peer-reviewed)

**Banning C** und Schindler M (2010); „Mit FRET und FACS auf Partnersuche“; *Laborjournal* 04/2010

Schindler M und **Banning C** (2010); „Durchflusszytometrie - Analyse von Protein-Interaktionen durch FRET und FACS“, *Biospektrum*; 03.10; 16. Jahrgang; S. 298-302

Schindler M, **Banning C**, Schneider B, Hohenberg H (2009);“Virologische Fährtenuche - Kombinierte Mikroskopietechniken zur Abbildung von Virusinfektionen“, *BIOforum* 03/2009, S.31

### Vorträge

**Banning C**, „Imaging the Hepatitis C Virus“, 21st Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie" (GfV, Society for Virology) together with the "Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V." (DVV), Freiburg, Deutschland, 23.-26.03.2011

**Banning C**, “Imaging the biogenesis of Hepatitis C virus”, International HIV workshop IX, Academia Belgica, Rome, Italien, 22.-23.10.2010

**Banning C**, “Imaging the biogenesis of Hepatitis C virus”, Annular Retreat Virus-Host Interaction, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, Deutschland, 13.11.2009

**Banning C**, „A FACS-based FRET assay to analyze interactions between viral and cellular proteins in living cells”, 19th Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie" (GfV, Society for Virology) Leipzig, Deutschland, 18-21.03.2009

**Banning C**, "A FACS-based FRET assay to analyze lentiviral protein interactions in living cells", Annual Retreat Virus-Host Interaction, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, Deutschland, 21.11.2008

## **Eingeladene Vorträge**

**Banning C**, "Imaging the biogenesis of Hepatitis C Virus", Seminarvortrag in der Abteilung für Physikalische Biochemie, AG Molekulare Mechanismen viraler Pathogenese, PD Dr. Matthias Geyer, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund, Deutschland, 14.06.2011

**Banning C**, „FACS-FRET: A novel system to measure protein-protein interactions“, Group of Prof. Savithri, Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore, Indien, 23.04.2011

**Banning C**, "A FACS-based FRET assay", Seminartag der Leibniz-Graduate School "Modellsysteme für Infektionskrankheiten" des Leibniz-Center Infection (LCI), Hamburg, Deutschland, 11.01.2011

**Banning C**, "A novel system to measure protein-protein interactions", Summer School der Goethe-Universität Frankfurt, Woffelsbach, Deutschland, 01.09.2010

## **Poster**

**Banning C**, Votteler J, Hoffmann D, Koppensteiner H, Warmer M, Reimer R, Kirchhoff F, Schubert U, Hauber J, Schindler M. (2010); "A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyze protein-protein interactions in living cells", 4th European Congress of Virology/Annual Spring Meeting of GfV 2010, Como, Italien, 07.-11.04.2010

Koppensteiner H, Gaudin R, **Banning C**, Holstermann B, Schneider C, Hohenberg H, Benaroch P, Schindler S, (2010); „Microscopical analysis of HIV-1 Assembly in Macrophages“, 4th European Congress of Virology/Annual Spring Meeting of GfV 2010, Como, Italien, 07.-11.04.2010

Schindler M, **Banning C**, Iwanski A, Specht A, Rajan D, Sauter D, Kirchhoff F (2009); „A serine phosphorylation site in HIV-1 Vpu is required for efficient replication in macrophages but not in *ex vivo* human lymphoid tissue“, 19th Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie" (GfV, Society for Virology) Leipzig, Deutschland, 18.-21.03.2009

Gundlach S, **Banning C**, Iwanski A, Kirchhoff F, Schindler M (2008); „Inhibition of Transferrin-Receptor Uptake by Nef-alleles Derived from Asymptomatic Lentiviral Infections“, GfV "Gesellschaft für Virologie" Annual Meeting, Heidelberg, Deutschland, 05.-08.03.2008

Ludwig S, Ehrhardt C, Droebner K, Rückle A, **Banning C**, Hrinčius E, Hoppe K, Leban J, Strobl S, Vitt D, Planz O (2008); "The NF-kappaB-Inhibitor SC75741 efficiently blocks influenza virus propagation in vitro and in vivo without the tendency to induce resistant virus var" GfV "Gesellschaft für Virologie" Annual Meeting, Heidelberg, Deutschland, 05.-08.03.2008

## Danksagung

Besonders möchte ich mich an diese Stelle bei Dr. Michael Schindler für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Dissertation in der Nachwuchsgruppe Viruspathogenese am Heinrich-Pette-Institut anfertigen durfte. Als mein Betreuer habe ich von ihm durch Herausforderungen, Ansporn und Anerkennung sehr viel lernen dürfen. Vielen Dank für die hilfreichen Diskussionen und die Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mit bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Dobner sehr herzlich danken.

Prof. Dr. Wolfram Brune danke ich ebenfalls für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit. Auch sei hier mein Dank an Prof. Dr. Hans Will und Prof. Dr. Udo Wienand gerichtet, die die Begutachtung meiner Disputation übernehmen, an Prof. Dr. Alexander Haas als Vorsitzenden sowie an alle Fragesteller.

Ohne die aktive Mitarbeit durch Erstellung der EM-Aufnahmen und die vielfachen Tipps und Hilfen bei allen Mikroskopiefragen seitens der Kollegen aus der Forschungsgruppe Elektronenmikroskopie wäre ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Vor allem danke ich hierbei Dr. Heinrich Hohenberg, Dr. Rudolph Reimer, Martin Warmer, Hendrik Herrmann, Carola Schneider und Barbara Holstermann.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle dem FACS-Team Arne Düsedau und Cordula Grüttner danken, die mich besonders auch bei meinem FRET-Projekt unterstützt haben.

Vor allem danke ich natürlich allen meinen Kollegen aus der AG76, auch denen, die nicht mehr dabei sind, für die tolle Atmosphäre, die konstruktiven Diskussionen, die Hilfen und die nette Zeit, auch außerhalb des Labors. Eine großes DANKE an alle Schindler Hasis.

Bedanken möchte ich mich hier gesondert nochmals bei Swantje, Kristin und Marcel für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Mathilde und Ludwig dafür, dass sie mich immer uneingeschränkt unterstützt haben. Ich danke Euch für die Rückendeckung und den unerschütterlichen Glauben an mich.

Marcel danke ich dafür, dass er immer für mich da ist. *De todo o meu coração: Muito obrigado por tudo!*