

**Modulation der intrahepatischen Signalvermittlung
durch die NS3/4A Protease/Helikase
des Hepatitis C Virus**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Erwin Daniel Brenndörfer

aus Kronstadt

September 2008

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

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

Referent: PD Dr. Johannes Bode
Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold
Dritter Referent: Prof. Dr. Ulf Dittmer

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2009

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlichtin Originalarbeiten

Frelin L, Brenndörfer ED, Ahlén G, Weiland M, Hultgren C, Alheim M, Glaumann H, Rozell B, Milich DR, Bode JG, Sällberg M. **(2006)** *The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumour necrosis factor alpha mediated liver disease.* Gut 55 (10): 1475-83

Ehltling C, Lai WS, Schaper F, Brenndörfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, Ludwig S, Blackshear PJ, Gaestel M, Häussinger D, Bode JG. **(2007)** *Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade.* J Immunol 178 (5): 2813-26

Bode JG, Brenndörfer ED, Häussinger D. **(2007)** *Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus.* Arch Biochem Biophys 462 (2): 254-65

Bode JG*, Brenndörfer ED*, Häussinger D. **(2008)** *Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response.* Biol Chem Aug 19 (Epub ahead of print)

Brenndörfer ED, Karthe J, Frelin L, Cebula P, Erhardt A, Schulte am Esch J, Hengel H, Bartenschlager R, Sällberg M, Häussinger D, Bode JG. **(2008)** *The hepatitis C virus non-structural 3/4A protease activates EGF-induced signal-transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase.* (submitted)

Frelin L, Weiland M, Derk E, Ahlén G, Jiao J, Brenndörfer ED, Bode JG, Sällberg M. **(2008)** *Hepatitis C virus non-structural 3/4A induces TNF α in vivo to promote hepatocyte survival and regeneration.* (manuscript in preparation)

(*gleichberechtigte Erstautoren)

als Posterbeiträge

Ehltling C, Schaper F, Brenndörfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, Häussinger D, Bode J.G. *Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 mRNA stability by TNF α involves activation of the MKK6/p38^{MAPK} cascade.* International Symposium of Inflammatory Bowel Disease – Research drives clinics, September 2005, Münster

Brenndörfer ED, Frelin L, Ahlén G, Hultgren C, Alheim M, Glaumann H, Rozell B, Millich DR, Sällberg M, Bode JG. *The hepatitis C virus non-structural 3/4A protein confers resistance to TNF α induced liver damage in vivo: A new mechanism of immune-escape.* 9th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) - Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes, November 2005, Weimar

Ehltling C, Schaper F, Brenndörfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, Ludwig S, Häussinger D, Bode JG. *Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 mRNA stability by TNF α involves activation of the MKK6/p38MAPK cascade.* 9th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) - Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes, November 2005, Weimar

Brenndörfer ED, Frelin L, Ahlén G, Hultgren C, Alheim M, Häussinger D, Sällberg M, Bode JG. *Modifikation TNF α -induzierter Signalvermittlung durch das NS3/4A-Protein des Hepatitis C Virus in NS3/4A-transgenen Mäusen.* 22. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Januar 2006, Leipzig

Ehltling C, Matthes RJ, Schaper F, Brenndörfer ED, Gaestel M, Ludwig S, Häussinger D, Bode JG. *Mitogen activated protein kinase activated protein kinase (MK2) is crucial for basal as well as TNF α -induced expression of SOCS3 mRNA.* 10th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) - Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes, November 2006, Weimar

Frelin L, Weiland M, Derk E, Ahlén G, Jiao J, Brenndörfer ED, Bode JG, Sällberg M. *Hepatitis C virus non-structural 3/4A induces TNF α in vivo to promote hepatocyte survival and regeneration*. 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oktober 2008, San Antonio, USA

Brenndörfer ED, Karthe J, Frelin L, Cebula P, Erhardt A, Sällberg M, Häussinger D, Bode JG. *The hepatitis C virus non-structural 3/4A protease cleaves the T-cell protein tyrosine phosphatase thereby interfering with EGF-induced signal-transduction*. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2008, San Francisco, USA

als Vorträge

Brenndörfer ED, Karthe J, Frelin L, Cebula P, Erhardt A, Sällberg M, Häussinger D, Bode JG. *The hepatitis C virus non-structural 3/4A protease interferes with EGF-induced signal-transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase*. 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oktober 2008, San Antonio, USA

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
1. EINLEITUNG	13
1.1 Das Hepatitis C Virus	13
1.1.1 Aufbau von HCV	13
1.1.2 Infektions- und Replikationszyklus von HCV	15
1.1.3 In die HCV-Replikation involvierte Wirtsproteine	17
1.1.4 HCV-bedingte Pathologie	18
1.1.5 Therapie von HCV	19
1.1.6 HCV-Modellsysteme	20
1.2 HCV NS3/4A	21
1.3 Antivirale Immunantwort	24
1.4 Der EGFR-Signalweg	28
1.5 Die Tyrosinphosphatase TC-PTP	32
1.6 Der Akt-Signalweg	33
1.7 Zielsetzung	37
2. MATERIAL UND METHODEN	38
2.1 Material, Substanzen und Lösungen	38
2.2 Methoden	43
2.2.1 Zellbiologische Methoden	43
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	45
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	52
2.2.4 Virologische Methoden	55
2.2.5 Tierexperimentelle Methoden	58
2.2.6 Analyse humaner Leberproben	59
2.2.7 Statistische Auswertung	60

3.	ERGEBNISSE	61
3.1	HCV NS3/4A beeinflusst die intrahepatische Signalvermittlung durch Modulation der Zytokin- und Chemokinsekretion	61
3.1.1	In NS3/4A-transgenen Tieren ist die LPS- bzw. TNF α -induzierte STAT1-Aktivierung unterdrückt	61
3.1.2	In NS3/4A-transgenen Tieren liegt keine Hemmung der interferon-induzierten STAT1-Aktivierung vor	63
3.1.3	In NS3/4A-transgenen Tieren ist die Expression von IFN γ gehemmt, es treten jedoch keine Unterschiede bei der IFN α -Expression auf	64
3.1.4	Die mCXCL9-Expression ist in NS3/4A-transgenen Mäusen erniedrigt, während mCCL2 und mCCL17 verstärkt exprimiert werden	65
3.1.5	In NS3/4A-transgenen Tieren sowie Huh 9-13-Zellen ist der p38MAPK-Signalweg konstitutiv aktiviert	67
3.1.6	In NS3/4A-transgenen Tieren ist die Aktivierung von NF κ B und STAT3 verstärkt	69
3.2	HCV NS3/4A interferiert mit der EGF-induzierten Signalantwort durch Spaltung von TC-PTP	71
3.2.1	EGF stimuliert die Replikation von HCV	71
3.2.2	HCV sensitiviert Zellen für die EGF-Signalantwort	72
3.2.3	HCV supprimiert NS3/4A-abhängig die Expression von TC-PTP	76
3.2.4	Der Knockdown von TC-PTP führt zu verstärkter EGF-induzierter Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und zu erhöhter basaler und EGF-induzierter Akt-Aktivierung	82
3.2.5	TC-PTP reguliert die Akt-Aktivierung durch Dephosphorylierung von PP2A	84
3.2.6	Die Akt-Aktivität ist essentiell für die HCV-Replikation	87
3.2.7	Die EGFR-Aktivität ist für die HCV-Replikation nicht essentiell, aber für die die HCV-Replikation verstärkenden Effekte von EGF notwendig	89
4.	DISKUSSION	91
4.1	HCV NS3/4A beeinflusst die intrahepatische Signalvermittlung durch Modulation der Zytokin- und Chemokinsekretion	91
4.2	HCV NS3/4A interferiert mit der EGF-induzierten Signalantwort und der Akt-Aktivierung durch Spaltung von TC-PTP	101

5.	ZUSAMMENFASSUNG	107
6.	SUMMARY	109
7.	LITERATURVERZEICHNIS	111
8.	DANKSAGUNG	125
9.	LEBENS LAUF	126

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ala	Alanin
AP1	<i>activator protein 1</i>
AS	Aminosäure(n)
Asp	Asparaginsäure
ATF	<i>activating transcription factor</i>
bp	Basenpaar/e
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CARDIF	<i>CARD adaptor inducing IFNβ</i>
Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
CMV	Cytomegalievirus
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Eps15	<i>EGFR pathway substrate clone 15</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ErbB	<i>avian erythroblastosis oncogene B</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain-containing protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GalN	Galaktosamin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Grb	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
GSK	<i>glycogen synthase kinase</i>
HCV	Hepatitis C Virus
Her	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
His	Histidin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
I κ B	<i>inhibitor of κB</i>
IKK	<i>inhibitor of NFκB (IκB) kinase</i>
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
KO	<i>knockout</i>
LB	<i>Luria-broth</i>
LGP	<i>laboratory of genetics and physiology</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDA	<i>melanoma differentiation-associated gene</i>
mLST	<i>mammalian lethal with sec-13</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MoMLV	Moloney Maus Leukämie Virus
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NK	<i>natural killer</i>
NS	nicht strukturell

NTP	Nukleosidtriphosphat
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDK	<i>phosphoinositide-dependent kinase</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PHLPP	<i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase
PIAS	protein inhibitor of activated STAT
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PK	Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>
PTP	<i>protein tyrosine phosphatase</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rezeptor
RIG	<i>retinoic acid inducible gene</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RT	Raumtemperatur
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Ser	Serin
SHP	<i>src-homology phosphatase</i>
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TANK	<i>Traf family member-associated NFκB activator</i>
TBK	<i>TANK-binding kinase</i>

TC-PTP	<i>T-cell protein tyrosine phosphatase</i>
Thr	Threonin
TGF	transforming growth factor
tk	<i>thymidine kinase</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	<i>TNF receptor associated protein</i>
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRE	<i>tetracycline-response element</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFNβ</i>
Tyk	Tyrosinkinase
Tyr	Tyrosin
U	unit(s)
UTR	<i>untranslated region</i>
VV	Vaccinia-Virus
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom 4-Chlor-3-indolyl β -D-Galaktopyranosid

1. EINLEITUNG

1.1 Das Hepatitis C Virus

Bereits Mitte der 70er Jahre wurde festgestellt, dass zahlreiche Blutkonserven mit Erregern kontaminiert sind, die eine NonA-NonB-Hepatitis hervorrufen¹. 1989 gelang schließlich die Entdeckung und Charakterisierung des Hepatitis C Virus (HCV)². Die weltweite Bedeutung von HCV wird dadurch deutlich, dass 40% aller chronischen Lebererkrankungen HCV-bedingt sind und etwa 3% der Weltbevölkerung mit HCV infiziert sind. In Deutschland liegt die Prävalenz bei 0,6%. Während HCV früher vor allem durch Bluttransfusionen und Blutprodukte übertragen wurde, ist durch die eingeführten Testverfahren das Risiko dieses Infektionsweges in Deutschland sehr gering. Die Mehrzahl der Neuinfektionen in Deutschland tritt heute bei Drogenabhängigen durch das gemeinsame Benutzen von Spritzen auf.

1.1.1 Aufbau von HCV

Das Hepatitis C Virus (HCV) gehört zum Genus *Hepacivirus* innerhalb der Familie der *Flaviviridae*, der neben HCV weitere humanpathogene Viren wie das Gelbfiebervirus und das Denguevirus aber auch wichtige tierpathogene Viren wie das Virus der klassischen Schweinepest und das Virus der bovinen Virusdiarrhö angehören³.

HCV wird aufgrund von Sequenzvariationen in 6 Hauptgenotype klassifiziert, die weiter in Subtypen unterteilt sind. In Deutschland am häufigsten vorkommend ist der HCV-Genotyp 1b.

HCV bildet Viruspartikel mit einem Durchmesser von 40-70 nm bestehend aus einer Hüllmembran, in die virale Glykoproteine eingelagert sind und einem Capsid, das das virale Genom enthält. Das HCV-Genom mit einer Länge von 9600 Basen besteht aus einzelsträngiger RNA in Plusstrangorientierung und ist aus einer 5'-nichtkodierenden Region mit einer die Bindung der Ribosomenuntereinheiten vermittelnden IRES (*internal ribosome entry site*)-Sequenz, einem einzelnen großen Leserahmen (*open reading*

frame) und einer 3'-nichtkodierenden Region zusammengesetzt (Abbildung 1.1). Der einzelne Leserahmen kodiert für ein Vorläuferprotein mit etwa 3000 Aminosäuren Länge, das co- und posttranslational in die strukturellen Proteine Core, E1 und E2, in p7 und die nichtstrukturellen Proteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B gespalten wird⁴ (Abbildung 1.1).

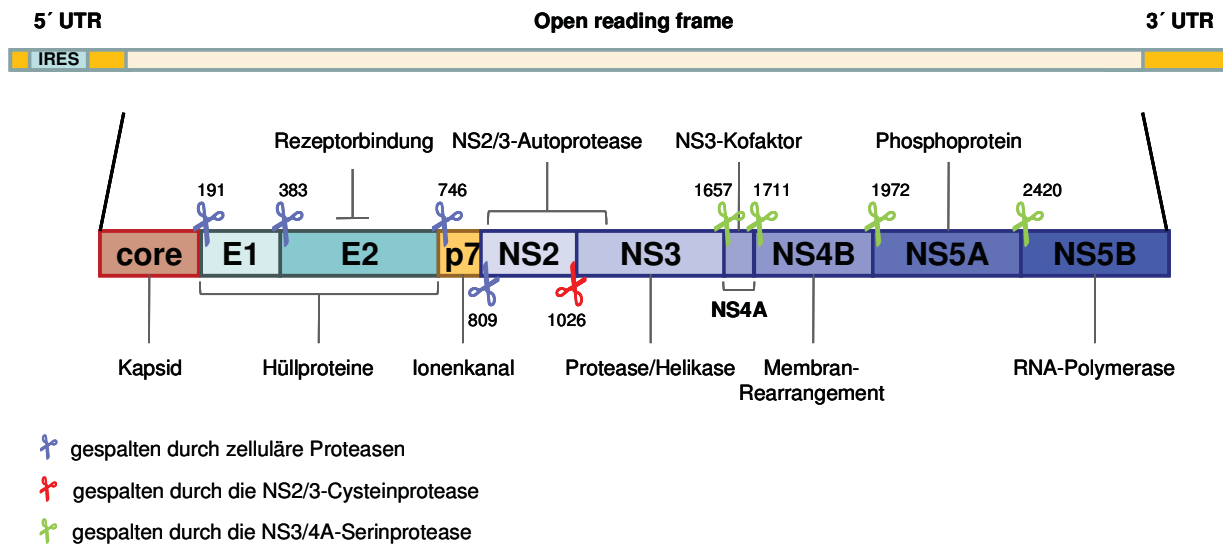


Abbildung 1.1: **Zusammensetzung und Prozessierung des HCV-Polyproteins.** Das 9600 Basen große RNA-Genom von HCV ist ein einzelsträngiges, lineares Molekül in Plusstrangorientierung, das aus einer 5'-nichtkodierenden Region, einem einzelnen großen Leserahmen und einer 3'-nichtkodierenden Region zusammengesetzt ist. Die die Bindung der Ribosomenuntereinheiten vermittelnde IRES-Sequenz, die für die Translation essentiell ist, ist in der 5'-nichtkodierenden Region lokalisiert. Die Translation des einzelnen großen Leserahmens hat ein etwa 3000 Aminosäuren langes Polyprotein zur Folge, das co- und posttranslational in die strukturellen Proteine Core, E1 und E2, in p7 und in die nichtstrukturellen Proteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B gespalten wird. Die Spaltung der HCV-Proteine Core, E1, E2 und p7 wird von zellulären Proteasen durchgeführt, während die Spaltung an der Position NS2/NS3 durch die NS2/3-Cysteinprotease und die der weiteren nichtstrukturellen Proteine durch die NS3/4A-Serinprotease erfolgt. (abgeändert nach Brenndörfer *et al*⁵)

Während das HCV core Protein das virale Nukleokapsid bildet, sind E1 und E2 als glykosylierte Heterodimere Bestandteil der Hüllmembran. Das Viroporin p7 ist ein Kationenkanal mit Funktionen bei der Bildung und Freisetzung der Viruspartikel. Die nichtstrukturellen Proteine NS2 bis NS5B sind für das Prozessieren des viralen

Polyproteins und die HCV-Replikation essentiell. Die Prozessierung von core, E1, E2 und p7 erfolgt durch zelluläre Peptidasen, die weiteren proteolytischen Spaltungen werden jedoch durch die viralen Proteinasen NS2/3 und NS3/4A bewerkstelligt. Die zinkabhängige Cysteinprotease NS2/3 ist für die Spaltung der NS2/NS3-Bindung verantwortlich, die übrigen NS-Proteine werden durch die enzymatische Wirkung der Serinprotease NS3/4A freigesetzt (Abbildung 1.1). NS3 ist ein multifunktionelles Protein mit der Aktivität einer Serinprotease im N-terminalen und der Aktivität einer RNA-Helikase/NTPase im C-terminalen Bereich, während NS4A als Cofaktor der NS3-Protease und für die Membranassoziation des NS3/4A-Komplexes wichtig ist. NS4B hat eine essentielle Funktion in der Induktion der spezifischen Membranstrukturen, die für die effektive Replikation von HCV nötig sind. NS5A liegt als mehrfach phosphoryliertes Protein vor, das in die Regulation der HCV-Replikation involviert ist. NS5B schließlich ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase, die die Replikation der genomischen RNA katalysiert. Durch Translationsinitiation von einem alternativen Leserahmen entstehen die ARF(*alternative reading frame*)- oder F(*frame shift*)-Proteine, deren Rolle im viralen Lebenszyklus aber noch unklar ist ⁴.

1.1.2 Infektions- und Replikationszyklus von HCV

Das Hepatitis C Virus kann nur Menschen und Schimpansen infizieren. Im Serum des infizierten Wirtes zirkuliert HCV in unterschiedlichen Formen. Die mit LDL (*low-density lipoprotein*) und VLDL (*very low-density lipoprotein*) assoziierte Form repräsentiert die infektiöse HCV-Fraktion. Daneben kommen an Immunglobuline gebundene und freie Virionen vor. Hepatozyten sind die hauptsächlichen Zielzellen von HCV, die Infektion anderer Zelltypen wurde aber ebenfalls beschrieben. Der Zelltropismus wird durch die Bindung des viralen Glykoproteins E2 an spezifische zelluläre Rezeptoren bestimmt. Das zur Zeit gültige Modell geht davon aus, dass die von dendritischen Zellen bzw. lebersinusoidalen Endothelzellen exprimierten Lektine DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) und L-SIGN (*liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) HCV-Partikel in der Leber abfangen und somit die Interaktion mit Hepatozyten erleichtern.

Glykosaminoglykane und der LDL-Rezeptor dienen als initiale Rezeptorstrukturen über die die Interaktion der HCV-Partikel mit den affineren Rezeptoren SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) und CD81 vermittelt wird. Nach Interaktion mit der *Tight Junction*-Komponente Claudin-1 werden die HCV-Partikel durch Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert, bevor durch Fusion der zellulären und viralen Membranen in einem sauren endosomalen Kompartiment die zytoplasmatische Freisetzung und Entpackung der Kapside erfolgen kann.

Kurz nach Beginn der IRES-abhängigen Translation der viralen RNA findet aufgrund eines Signalpeptids am C-Terminus von core der Transport des Translationskomplexes zum rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) statt, worin die translatierten und prozessierten HCV-Proteine eingebaut werden. NS4B induziert Membranalterationen, die den Aufbau membranassoziierter Replikationskomplexe ermöglichen. Diese katalysieren die Amplifikation der positivsträngigen RNA-Genome mit negativsträngiger RNA als Zwischenschritt. Die neu generierten RNA-Genome können als mRNA für die Synthese von viralen Proteinen, als Matrize für die Produktion weiterer Genome oder zum Einbau in Nukleokapside dienen. Die verstärkte Anlagerung von RNA-Genomen an die ER-Membran führt zur Einstülpung der Membran in das ER-Lumen, so dass sich der initiale *Budding*-Komplex bildet, der sich schließlich abschnürt. Während des folgenden Transports durch den Golgi-Apparat werden E1 und E2 glykosyliert, bevor durch Fusion von Golgi-Vesikeln mit der Zytoplasmamembran die infektiösen Viruspartikel freigesetzt werden³ (Abbildung 1.2).

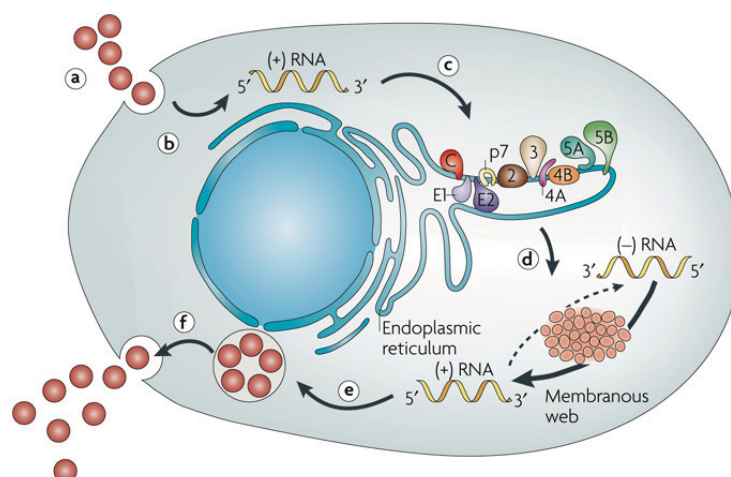


Abbildung 1.2: **Infektions- und Replikationszyklus von HCV.** **a)** Bindung und Internalisierung von HCV; **b)** Freisetzung und Entpackung der HCV-Partikel; **c)** IRES-vermittelte Translation und Prozessierung; **d)** RNA-Replikation; **e)** Zusammenbau der viralen Partikel; **f)** Freisetzung von HCV. Hier zur Vereinfachung getrennt dargestellte Schritte verlaufen teilweise parallel (z.B. die Schritte c und d). (übernommen aus ³)

1.1.3 In die HCV-Replikation involvierte Wirtsproteine

HCV nutzt nicht nur die zelluläre Translationsmaschinerie, um virale Proteine zu synthetisieren, zelluläre Wirtsproteine sind auch für die virale Replikation essentiell. Die Immunophiline Cyclophilin B und FKBP (*FK506 binding protein*)⁸, die die enzymatische Funktion einer Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerase besitzen, interagieren mit NS5B bzw. NS5A und regulieren dadurch die HCV-Replikation ^{6, 7}. Die Interaktion von Cyclophilin B mit NS5B verstärkt die Assoziation von NS5B mit der viralen RNA ⁶. Cyclosporin A und seine Derivate, die als Cyclophilin-Inhibitoren wirken, inhibieren die HCV RNA-Replikation und sind in Studien bereits in der Behandlung von Hepatitis C-Patienten eingesetzt worden ^{8, 9}. Die Bedeutung von FKBP8 für die HCV-Replikation beruht vor allem auf seiner Funktion als Co-Chaperon des Hitzeschockproteins Hsp90, das durch Bindung an FKBP8 zu NS5A rekrutiert wird ⁷. Der Knockdown von FKBP8 und die Behandlung mit dem Hsp90-Inhibitor Geldanamycin haben jeweils eine Verringerung der HCV-Replikation zur Folge ^{7, 10}. Cyclophilin B, FKBP8 und Hsp90 scheinen für die korrekte Faltung von an der HCV-Replikation beteiligten Proteinen eine wichtige Rolle zu spielen.

VAP (*vesicle-associated membrane protein-associated protein*)-A und -B bilden Homo- und Heterodimere und sind in den Ceramidtransport involviert ¹¹. Sie interagieren mit NS5A und NS5B ^{12, 13}. Der Knockdown von VAP-A oder VAP-B führt zu einer deutlichen Verringerung der HCV-Replikation ^{13, 14}, was für eine Rolle bei der Assoziation von HCV mit Lipidkomponenten und dem *Remodelling* von Membran-strukturen durch HCV spricht. Die wichtige Bedeutung von Lipidkomponenten für die HCV-Replikation konnte dadurch belegt werden, dass die HCV-Replikation durch gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren gesteigert wird, während sie durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren eine Verringerung erfährt ¹⁵. Außerdem hat die Inhibierung der Sphingolipid-Biosynthese ebenfalls eine Reduktion der HCV-Replikation zur Folge ¹⁶. Die Inhibition

der HCV-Replikation durch Hemmung der Geranylgeranylation¹⁶ konnte zum Teil durch die Entdeckung, dass das geranylgeranylierte Protein FBL2 für die effiziente HCV-Replikation nötig ist¹⁷, erklärt werden. Lipide sind neben der Replikation auch für weitere Schritte des Replikationszyklus von HCV essentiell. Kürzlich wurde die herausragende Funktion der *Lipid Droplets*, einer Organelle, die als Speicher neutraler Lipide dient, für den Zusammenbau von HCV-Partikeln und somit der Produktion infektiöser Viren nachgewiesen¹⁸.

1.1.4 HCV-bedingte Pathologie

Eine Infektion mit Hepatitis C Virus kann nach einer Inkubationszeit von 6-8 Wochen zu einer Leberentzündung führen, im Allgemeinen verläuft die Infektion in der akuten Phase jedoch inapparent. In etwa 20% der Fälle erfolgt eine spontane HCV-Elimination¹⁹, die mit einer robusten, langandauernden und multispezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antwort verbunden ist^{20, 21}. Bei 80% der Infizierten entwickelt sich jedoch eine persistierende Infektion, die bei 30% dieser Patienten einen chronisch-aggressiven Verlauf annimmt, der schließlich zum Auftreten von Leberfibrose und Leberzirrhose führt. HCV-Patienten mit Leberzirrhose haben ein jährliches Risiko von etwa 5%, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln^{22, 23}.

Die in chronisch HCV-infizierten Patienten vorhandenen HCV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen besitzen verringerte proliferative Fähigkeiten, verharren oft in einem frühen Differenzierungsstadium und weisen eine deutlich reduzierte Synthese von Interferon- γ auf²⁴⁻²⁶. Obwohl die Anzahl an T-Zellen in chronisch HCV-Infizierten in der Leber signifikant erhöht ist²⁷, sind diese T-Zellen nicht fähig, HCV zu eliminieren, da sie in der Mehrheit funktionell defizient sind. Die kontinuierliche Infiltration von Immunzellen in die infizierte Leber aufgrund des persistierenden Vorkommens viraler Antigene hat eine chronische Entzündungsreaktion zur Folge, die zur Schädigung der Leber führt. Bei der Hepatitis C liegt also eine durch die eigene Immunreaktion, hierbei vor allem durch CD8⁺ T-Zellen, verursachte Leberschädigung vor, während HCV selbst kaum zytopathogen wirkt.

Etwa 40% der Patienten mit chronischer HCV-Infektion entwickeln extrahepatische Erkrankungen, was darauf hindeutet, dass HCV nicht nur Hepatozyten infiziert²⁸. Weitere Zelltypen, von denen berichtet wurde, dass sie von HCV infiziert werden können, sind dendritische Zellen^{29, 30}, Monozyten³¹, B-Zellen^{31, 32}, T-Zellen^{33, 34} und periphere mononukleäre Blutzellen³⁵. Auch wenn HCV in diesen immunkompetenten Zellen nur in sehr geringer RNA-Kopienanzahl zu detektieren ist, könnten sie als HCV-Reservoir dienen, d.h. eine Quelle viraler Latenz nach erfolgreicher Elimination von HCV aus dem Serum durch antivirale Therapieansätze darstellen.

1.1.5 Therapie von HCV

Die derzeit übliche Therapie von chronischer Hepatitis C beinhaltet in Abhängigkeit vom Genotyp eine Kombination von pegyliertem Interferon- α (IFN α) und Ribavirin über 24 oder 48 Wochen. Diese Behandlung führt jedoch nur in 54-56% der Fälle zu einer Heilung^{36, 37}. Die Heilungschancen sind vom HCV-Genotyp abhängig: während es bei 76-80% der mit den Genotypen 2 und 3 infizierten HCV-Patienten zu einer dauerhaften Viruselimination kommt, liegt der Therapieerfolg bei dem in Deutschland am häufigsten vorkommenden Genotyp 1 nur bei 42-46%³⁸. IFN α besitzt sowohl direkte antivirale Wirkungen, die durch die Induktion von Genen wie der Proteinkinase R oder der 2', 5'-Oligoadenylatsynthetase hervorgerufen werden, als auch immunomodulatorische Wirkungen wie die Induktion der T-Zell-Proliferation, die Aktivierung von NK-Zellen, die Maturation von dendritischen Zellen oder die Verhinderung der T-Zell-Apoptose³⁹. Die genaue Wirkweise von Ribavirin ist nicht geklärt. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand wirkt es als virales Mutagen, das die Häufigkeit genomischer Mutationen der Virus RNA um ein Vielfaches erhöht und somit die Infektivität und Replikation von HCV verringert^{40, 41}. Weiterhin beeinflusst Ribavirin die Th1/Th2-Balance, indem es zu einer Verstärkung der Th1 (IFN γ und IL2)- und einer Inhibition der Th2 (IL4 und IL10)-Zytokinproduktion führt⁴².

Während die bisherige HCV-Therapie relativ unspezifisch die antivirale Immunantwort stärkt, was beträchtliche Nebenwirkungen zur Folge hat, sind zurzeit neue HCV-Wirkstoffe in der Erprobung, die spezifisch gegen HCV gerichtet sind. Man erhofft sich

eine Steigerung der Effektivität vor allem in der Behandlung von Genotyp 1, eine kürzere Behandlungsdauer und eine bessere Verträglichkeit. Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung von Inhibitoren der HCV-Protease NS3/4A, der HCV-Polymerase NS5B und von Cyclophilin B, das ein zellulärer Cofaktor von NS5B ist. Des Weiteren wird u.a. an α -Glukosidase I (involviert in die Prozessierung von Glykoproteinen)-Inhibitoren, an Antisense-Nukleotiden und siRNA gegen die HCV-RNA, an Hemmstoffen des Zusammenbaus bzw. der Freisetzung der HCV-Partikel sowie an Inhibitoren des HCV-Eintritts in die Zelle gearbeitet. Ein Impfstoff gegen HCV ist dagegen noch in weiter Ferne^{43, 44}.

1.1.6 HCV-Modellsysteme

In der HCV-Forschung sind zahlreiche *in vivo*- und *in vitro*-Modelle zur Untersuchung von Hepatitis C Virus in Gebrauch. Das Hepatitis C Virus infiziert neben dem Menschen nur den Schimpansen, dessen Verwendung teuer und ethisch umstritten ist. Deswegen wurden Mausmodelle entwickelt, in denen mehrere oder einzelne HCV-Proteine transgen exprimiert werden. Außerdem werden immundefiziente Mäuse mit humanisierten Lebern als HCV-Infektionsmodelle eingesetzt.

Als *in vitro*-Modelle werden in der Zellkultur durch Transfektion von Zelllinien erhaltene transiente Expressionssysteme sowie stabile Zelllinien mit konstitutiver oder induzierbarer Expression von HCV-Proteinen eingesetzt. Zum Studium des Eintritts von HCV in die Zelle werden u.a. HCV-Glykoproteine enthaltende retrovirale Pseudopartikel und HCV-LPs (*Hepatitis C virus like particles*) verwendet.

Ein wichtiger Schritt war die Entwicklung des Replikon-Systems, das die reproduzierbare und effiziente Replikation des HCV-Genoms in der Zellkultur ermöglichte⁴⁵. Hierfür wurde das HCV-Isolat Con1 (Genotyp 1b) verwendet, wobei die Genregion von core bis p7 durch das Gen der Neomycinphosphotransferase und die EMCV (Encephalomyokarditis-Virus)-IRES ersetzt wurde. Somit war nach Transfektion von Huh7 mit der veränderten Con1-RNA die Selektion positiver Klone mit G418 möglich. Die selektierten Klone konnten nur durch erfolgreiche Replikon-Amplifikation überleben, wofür adaptive Mutationen vor allem in der HCV NS5A-Sequenz nötig

waren⁴⁶. In den folgenden Jahren wurden weitere subgenomische bzw. vollgenomische Replikon-Zelllinien hergestellt. Da die für die effiziente HCV-Replikation nötigen adaptiven Mutationen den Zusammenbau von HCV-Partikeln inhibierten, war die Produktion infektiöser HCV-Partikel jedoch auch in Replikon-Zelllinien mit vollständigem HCV-Genom nicht möglich.

Die Herstellung infektiöser HCV-Partikel in der Zellkultur gelang erst mit Hilfe des HCV-Isolats JFH-1 (Genotyp 2a) aus einem japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis C⁴⁷. Dieses System basiert auf der Transfektion der JFH-1 RNA in hochpermissive Huh7-Zellklone und hat eine Zelllinie als Ergebnis, in der sowohl die HCV-Replikation als auch die Produktion infektiöser Viruspartikel effektiv ablaufen.

1.2 HCV NS3/4A

NS3 ist ein multifunktionelles Protein mit den enzymatischen Aktivitäten einer Serinprotease im N-terminalen ersten Drittel (189 AS) sowie einer RNA-Helikase/NTPase in den C-terminalen zwei Dritteln des Proteins (442 AS), die essentiell für die Prozessierung des HCV-Polyproteins bzw. die RNA-Replikation sind. Das leicht hydrophile Protein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa benötigt sowohl für die zelluläre Lokalisation an der ER-Membran als auch als Cofaktor der Serinproteasefunktion das 9 kDa-Protein NS4A, das mit NS3 einen heterodimeren Komplex bildet. NS4A ist mit seinem hydrophoben N-Terminus in der ER-Membran verankert, für die Aktivität als Proteasecofaktor sind 12 Aminosäuren im zentralen Bereich von NS4A entscheidend⁴⁸⁻⁵⁰.

Während die enzymatische Spaltung des HCV-Polyproteins an der NS2/3-Position autoproteolytisch durch die zinkabhängige Cysteinprotease NS2/3 erfolgt⁵¹, werden die weiteren proteolytischen Abspaltungen des HCV-Polyproteins an den Positionen NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A und NS5A/5B von der Serinprotease NS3/4A katalysiert^{52, 53}. Für die enzymatische Funktion der NS3/4A-Protease essentiell sind die Aminosäuren His57, Asp81 und Ser139. Die Konsensussequenz für die Spaltung durch NS3/4A lautet D/EXXXXC/T↓S/AXXX, d.h. an der Position P6 sollten Asparaginsäure (D) oder Glutaminsäure (E), an P1 Cystein (C) oder Threonin (T) sowie an P1' Serin (S)

oder Alanin (A) lokalisiert sein ⁵⁴. Die NS3-Helikase ist ein Mitglied der Superfamilie-2 DExH/D-Box-Helikasen. Sie entwindet doppelsträngige RNA sowie einzelsträngige RNA-Regionen mit ausgeprägten Sekundärstrukturen mit Hilfe der Hydrolyse von ATP. Die Entwindung der RNA erfolgt in hochkoordinierten Schritten von durchschnittlich 11 Basenpaaren ^{55, 56}. NS3 ist außerdem in die Modulation der Hyperphosphorylierung von NS5A ⁵⁷ sowie der Aktivität von NS5B ^{58, 59} involviert.

Eine herausragende Rolle spielt NS3/4A in der Strategie von HCV, die antivirale Wirtsantwort zu umgehen. Die wichtigsten Detektionssysteme der Zelle für HCV RNA sind der RIG (*retinoic acid inducible gene*)-I-Signalweg (zytoplasmatisches System) sowie der TLR (Toll-like-Rezeptor)3-Signalweg (endosomales System), die die Produktion von IFN α/β und somit die Aktivierung der Mechanismen der angeborenen antiviralen Immunantwort in Reaktion auf eine Virusinfektion bewirken ⁶⁰ (Abbildung 1.3). Beide Signalwege werden von NS3/4A durch enzymatische Spaltung von Adapterproteinen inhibiert, im Falle des RIG-I-Signalwegs von CARDIF (*CARD adaptor inducing IFN β*) ^{61, 62}, im Falle des TLR3-Signalweges von TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN β*) ⁶³ (Abbildung 1.3). NS3/4A blockiert neben der Produktion von Typ I-Interferonen auch die Expression von IFN λ 1/IL29 sowie die transkriptionelle Aktivierung der Genpromotoren von Chemokinen wie CCL5 und CXCL10 ^{65, 66}.

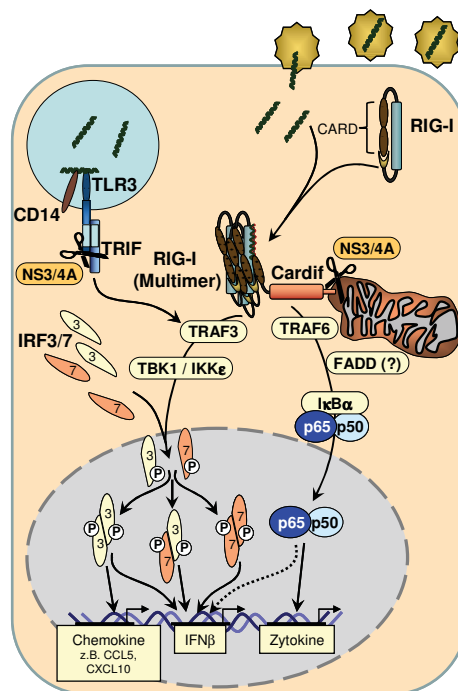


Abbildung 1.3: **Hemmung der RIG-I- und TLR3-Signalwege durch HCV NS3/4A.** Die zytoplasmatische Detektion von HCV-RNA erfolgt hauptsächlich durch RIG-I. Die Ligandenbindung an RIG-I hat die Konformationsänderung und Multimerisierung von RIG-I zur Folge und ermöglicht die Interaktion von RIG-I mit CARDIF. Diese induziert die Bildung eines Komplexes aus CARDIF und TRAF3 sowie die Rekrutierung von TBK1 und IKK ϵ , die die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 phosphorylieren. Die CARDIF-vermittelte Aktivierung von NF κ B erfolgt vor allem durch TRAF6 oder durch FADD-abhängige Spaltung der Caspasen 8 und 10. Die Relevanz des TLR3-Signalweges für die antivirale Immunantwort gegen HCV ist nicht vollständig geklärt. Die Ligandenbindung an TLR3 induziert die Rekrutierung von TRIF und nachfolgend von TRAF3, das in die Aktivierung von IRF3/7 involviert ist, sowie von TRAF6 und RIP-1 (nicht dargestellt), die die Aktivierung von NF- κ B vermitteln. Die Aktivierung von IRF3/7, NF- κ B und AP-1 (nicht dargestellt) hat die Genexpression von Typ I-Interferonen, Chemokinen und Zytokinen zur Folge. HCV blockiert sowohl den RIG-I- als auch den TLR3-Signalweg, indem NS3/4A die Adapterproteine CARDIF und TRIF proteolytisch spaltet. (abgeändert nach Brenndörfer *et al*⁵)

Damit das Hepatitis C Virus eine chronische Infektion des Wirts aufrechterhalten kann, muss es die Fähigkeit besitzen, die zelluläre antivirale Immunantwort ebenfalls zu modulieren. Auch hier kommt NS3 eine wichtige Bedeutung zu. Die NS3-vermittelte Bildung von Sauerstoffradikalen in Phagozyten führt zu der Dysfunktion von CD3⁺/56⁺ NK-, CD3⁺/56⁻ T- und CD3⁺/56⁺ NKT-Zellen⁶⁴. Das NS3-Protein ist in die Inhibierung der Differenzierung und allostimulatorischen Kapazität von dendritischen Zellen durch Erhöhung der IL10- und Erniedrigung der IL2-Spiegel involviert⁶⁵. In transgenen Mäusen mit leberspezifischer NS3/4A-Expression ist die Leberpopulation an plasmazytoiden dendritischen Zellen und CD4⁺ T-Zellen signifikant erniedrigt⁶⁶. All diese Faktoren sprechen für einen wesentlichen Einfluss von NS3/4A auf die hepatische Immunantwort.

NS3/4A scheint auch einen Beitrag zu den Komplikationen zu leisten, die bei chronisch HCV-Infizierten auftreten. NS3 besitzt das Potential zur Zelltransformation⁶⁷ wohl durch Störung der Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalprozessen. So blockiert NS3 die Aktivität des Tumorsuppressors p53^{68, 69} und reprimiert auch die antiproliferative Wirkung von TGF (*transforming growth factor*) β /Smad (*mothers against decapentaplegic (DPP) homolog*)3⁷⁰. NS3/4A transgene Mäuse sind gegenüber einer für Wildtypmäuse letalen Dosis an TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) α /D-GalN (D-Galaktosamin) resistent und sind vor TNF α /D-GalN-, LPS (Lipopolysaccharid)/

D-GalN-, und CCl₄-vermitteltem Leberschaden durch einen p38^{MAPK}-abhängigen Mechanismus geschützt⁶⁶ (Abbildung 1.4).

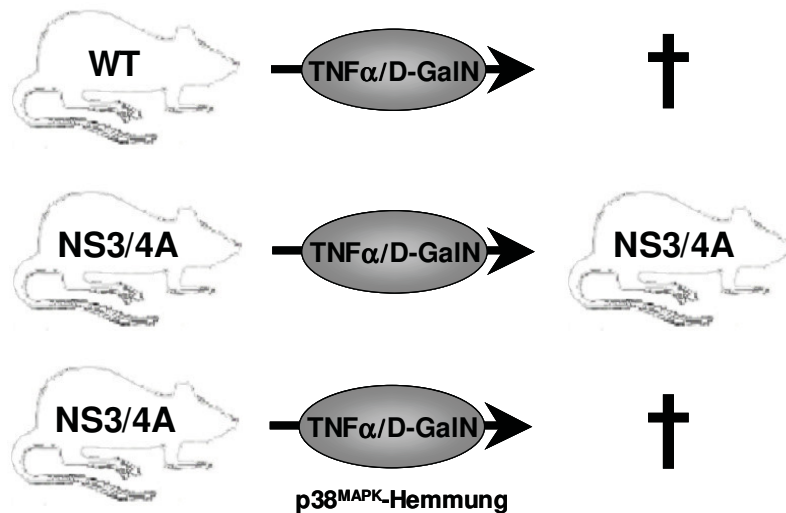


Abbildung 1.4: **NS3/4A-transgene Mäuse überleben eine für Wild-Typ-Mäuse letale Dosis TNF α /D-GalN.** Während Wildtyp-Mäuse innerhalb von 48h nach Applikation von 15 ng/g Maus TNF α und 1 mg/g Maus D-GalN an einer fulminanten Hepatitis versterben, sind NS3/4A-transgene Mäuse gegen diese Behandlung resistent. Durch Vorbehandlung mit dem p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 wird der protektive Effekt von NS3/4A wieder aufgehoben.

Viele extrahepatische Erkrankungen, die bei chronischen HCV-Patienten auftreten, sind Krankheiten, die B-Zellen betreffen, wie Kryoglobulinämie, Non-Hodgkin-Lymphom oder Sjögren-Syndrom²⁸. NS3 ist durch die Bindung von NS3/IgG-Antigenkomplexen an den B-Zell-Rezeptor ein wichtiger Initiator der klonalen B-Zell-Proliferation⁷¹.

1.3 Antivirale Immunantwort

Um ein eingedrungenes Virus erkennen und bekämpfen zu können, verfügen Zellen über spezifische Rezeptorsysteme die eine Erkennung von pathogen-spezifischen molekularen Signaturen erlauben. Die Bindung viraler Bestandteile (allg.: *pathogen-associated molecular pattern*) an diese Rezeptorsysteme (allg.: *pattern recognition receptors*) führt zur Freisetzung antiviraler Mediatoren und hierbei insbesondere von

Typl-Interferonen. Diese aktivieren einerseits in benachbarten Zellen die Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISG), die selbst eine antivirale Aktivität haben und führen andererseits zur Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunantwort. Diese rekrutieren durch die Produktion von Typl-Interferonen sowie proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen weitere Immunzellen, so dass die Infektion effektiv bekämpft werden kann.

Die zellulären Rezeptorsysteme, die für die Detektion von Bestandteilen von RNA-Viren entscheidend sind, sind die Familien der Toll-like Rezeptoren (TLR) und der RIG-I-ähnlichen Helikasen. Die TLR-Familie besteht im Menschen aus 10 Mitgliedern. Die TLRs sind Transmembranproteine mit einer leucinreichen Domäne, die für die Bindung pathogener Bestandteile verantwortlich ist und einer zytoplasmatischen Toll-IL1-Rezeptor(TIR)-Domäne, die die Signalweiterleitung bewerkstelligt. Bei TLRs, die in der Zellmembran lokalisiert sind, ragt die leucinreiche Domäne in den extrazellulären Raum, bei intrazellulären TLRs in das endosomale Lumen. Die virale Nukleinsäuren erkennenden TLRs 3, 7 und 9 sind alle intrazellulär, d.h. in der endosomalen Membran verankert. Während unmethylierte CpG-DNA die IFN-Produktion über TLR9 induziert^{72,73}, werden TLR7 und TLR3 durch Bindung von ssRNA bzw. dsRNA aktiviert^{74,75}. Viren, die zytoplasmatisch replizieren, werden jedoch nur unzureichend von TLRs erkannt. Für deren Detektion haben sich TLR-unabhängige Rezeptorsysteme entwickelt, die im Falle von DAI (*DNA-dependant activator of IFN-regulatory factors*)⁷⁶ und des Inflammasoms⁷⁷ zytoplasmatische virale DNA, im Falle der RIG-I-ähnlichen Helikasen zytoplasmatische virale RNA erkennen. Zur Familie der RIG-I-ähnlichen Helikasen gehören RIG-I, MDA (*melanoma differentiation-associated gene*)5 und LGP (*laboratory of genetics and physiology*)2, die alle in ihrem C-Terminus eine DExD/H Box-Helikase-Domäne und mit Ausnahme von LGP2 in ihrem N-Terminus zwei CARDs (*caspase recruitment domains*) aufweisen⁶⁰. Während RIG-I und MDA5 als Hauptsensoren für zytoplasmatische virale RNA gelten⁷⁸⁻⁸⁰, dient LGP2 vor allem für RIG-I als negativer Regulator^{80,81}. RIG-I und MDA5 unterscheiden sich im Spektrum der RNA-Viren und synthetischen RNAs, die sie detektieren können: RIG-I erkennt effizient RNA von Paramyxoviren, Influenza-Virus, Newcastle-Disease-Virus, Vesicular-Stomatitis-Virus, Sendai-Virus sowie positive-strängigen Einzelstrang-RNA-Viren wie dem Japanese-Encephalitis-Virus^{82,83}, aber auch *in vitro* transkribierte RNA und virale 5'-Trisphosphat-

mRNA⁸³⁻⁸⁵, MDA5 dagegen erkennt RNA von Picornaviren wie Encephalomyocarditis-Virus, Theilers-Virus oder Mengo-Virus sowie poly (I:C) (*polycytidylic:polyinosinic acid*)^{83, 86}.

Die Bindung von dsRNA an TLR3 hat die Rekrutierung des Adaptorproteins TRIF zur Folge, das mit TRAF (*TNF receptor associated protein*)3 and TRAF6 assoziiert und zusätzlich mit RIP (*receptor interacting protein*)1 und RIP3 interagiert⁸⁷⁻⁸⁹. Während TRAF6 und RIP1 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB bewirken^{90, 91}, vermittelt TRAF3 die Aktivierung von TBK (*Traf family member-associated NFκB activator (TANK)-binding kinase*)1 und IKK (*inhibitor of NFκB (IκB) kinase*)ε sowie nachfolgend von IRF (*interferon regulatory factor*)3 und IRF7⁸⁹.

Für die Erkennung von HCV und die Induktion der gegen HCV gerichteten antiviralen Signalwege ist das RIG-I-System essentiell, MDA5, TLR7/MyD (*myeloid differentiation primary response gene*)88 und TLR3/TRIF spielen hierbei jedoch keine entscheidende Rolle⁹². Während das 5'-terminale Triphosphat der HCV-RNA durch Interaktion mit der Repressor-Domäne von RIG-I die Aufhebung der Autorepression von RIG-I bewirkt, sind die Poly-U/UC-Region in der HCV 3'NTR (*nontranslated region*) und das Replikationsintermediat dieses Motivs die Sequenzen, die die PAMP-Substrate von RIG-I darstellen und die stabile Interaktion der HCV-RNA mit RIG-I vermitteln⁹².

Die Bindung von RNA an RIG-I oder MDA5 führt zur Rekrutierung des Adapterproteins CARDIF / MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) / IPS-1 (*IFNβ promoter stimulator 1*) / VISA (*virus-induced signaling adaptor*)^{61, 93-95}. Neben einer N-terminalen CARD-Domäne, die die Interaktion mit RIG-I bzw. MDA5 ermöglicht, besitzt CARDIF im C-Terminus eine Transmembrandomäne, mit der CARDIF in der äußeren mitochondrialen Membran verankert ist. Die Weiterleitung der Signalantwort erfolgt durch Komplexbildung mit TRAF3 und NEMO (*NFκB essential modulator*, auch IKKγ genannt), die durch Interaktion mit TANK (*Traf family member-associated NFκB activator*) die Rekrutierung von TBK1 und IKKε zum RIG-I/CARDIF-Komplex vermitteln⁹⁶⁻⁹⁹. TBK1 and IKKε phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7, die für die virus-induzierte Produktion von Typ I-Interferonen essentiell sind^{100, 101}. Daneben vermittelt CARDIF auch die Aktivierung von NFκB, das ein Teil des die IFNβ-Expression regulierenden Transkriptionskomplexes ist und die Expression proinflammatorischer

Zytokine bewirkt. Die CARDIF-vermittelte NF κ B-Aktivierung erfolgt größtenteils durch FADD (*Fas-associated death domain-containing protein*)-abhängige Spaltung der Caspasen 8 und 10^{102, 103}. Daneben kann CARDIF NF κ B auch über TRAF2, TRAF6 and RIP1 aktivieren^{94, 95}.

Die Produktion von IFN β , die die frühe Phase der Typ I-Interferonantwort charakterisiert, führt parakrin und autokrin zur Induktion der IFN α -Expression (späte Phase der Typ I-Interferonantwort)^{39, 104}. Sowohl IFN β als auch IFN α aktivieren durch Bindung an ein Heterodimer aus IFN α -Rezeptor 1 und 2 die Janus-Kinasen Tyk (Tyrosinkinase)2 und Jak (Janus-Kinase)1, die mit IFN α -Rezeptor 1 bzw. 2 assoziiert sind. Im aktivierten Zustand katalysieren Jak1 und Tyk2 die Phosphorylierung der beiden Rezeptoruntereinheiten, was die Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT (*signal transducer and activator of transcription*)1 und STAT2 zur Folge hat^{105, 106}. Diese bilden mit IRF9 den trimeren ISGF (*interferon-stimulated gene factor*)3-Komplex, der durch Bindung an die ISRE (*IFN-stimulated response element*)-Promotorsequenz die Expression von über 300 ISGs bewirkt, die entweder wie im Falle von IRF7 die Typ I-Interferonantwort weiter amplifizieren, an der Induktion der adaptiven Immunantwort beteiligt sind (z.B. MHC (*major histocompatibility complex*)II) oder direkt antiviral wirken (z.B. Proteinkinase R, 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase oder RNase L)¹⁰⁷.

Die Freisetzung von Typ I-Interferonen durch HCV-infizierte Hepatozyten stimuliert die leberspezifische Makrophagenpopulation, die Kupffer-Zellen, zur Sekretion von CCL2 und zur Interaktion mit dendritischen Zellen. CCL2 rekrutiert unter anderem Monozyten in die Leber, die G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*)-abhängig zu Makrophagen differenzieren. Diese rekrutieren durch Produktion von CCL3 NK-Zellen, die das Abtöten infizierter Zellen entweder direkt durch Sekretion von Perforin und Granzymen sowie durch Todesrezeptoraktivierung oder durch Verstärkung der antiviralen Immunantwort über die Aktivierung dendritischer Zellen bewerkstelligen können. Die NK-Zell-vermittelte Aktivierung von dendritischen Zellen kann sowohl durch direkten Zell-Zell-Kontakt als auch durch Sekretion von IFN γ und TNF α erfolgen. Dendritische Zellen verstärken durch Ausschüttung von IL15 die NK-Zell-Proliferation sowie durch Sekretion von IL12 die NK-Zell-vermittelte IFN γ -Produktion. Außerdem primen aktivierte dendritische Zellen naive CD4⁺ T-Zellen, wodurch die Th1- und CD8⁺

T-Zell-Antwort induziert werden, was durch Sekretion von Interferonen und IL12 weiter verstärkt wird. CD8⁺ T-Zellen schließlich können infizierte Hepatozyten durch Perforin-vermittelte Zytolyse oder Aktivierung des CD95-Rezeptor-Signalweges abtöten oder die virale Vermehrung durch die Ausschüttung von IFN γ inhibieren. Wichtig für die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber ist das Chemokin CXCL9, dessen Sekretion durch lebersinusoidale Endothelzellen (LSEC) und Hepatozyten vor allem durch von NK-Zellen produziertes IFN γ induziert wird (Abbildung 1.5) ¹⁰⁸.

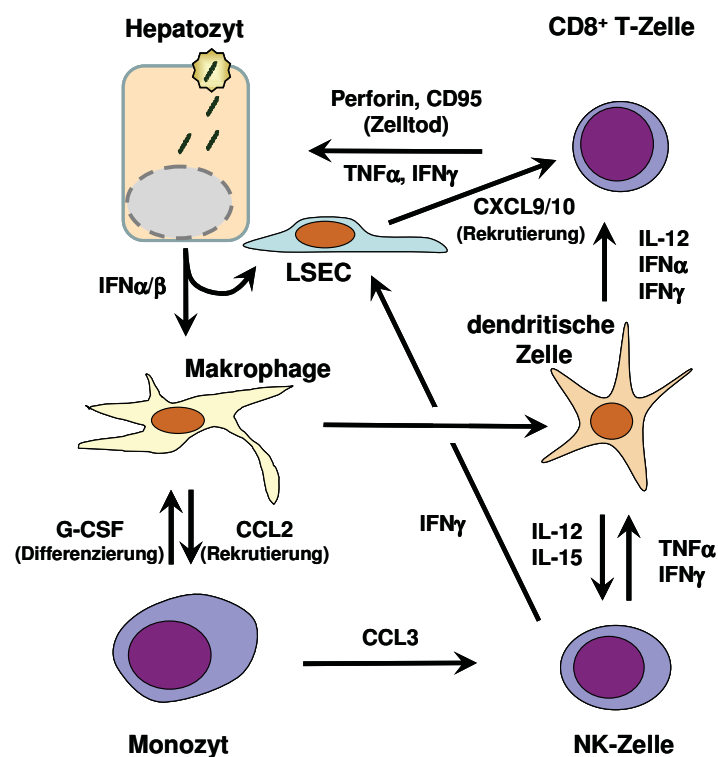


Abbildung 1.5: Zusammenfassung der zellulären Immunantwort in Reaktion auf eine Infektion mit HCV. (abgeändert nach Brenndörfer *et al*⁵)

1.4 Der EGFR-Signalweg

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), auch ErbB (*avian erythroblastosis oncogene B*)1 oder Her (*human epidermal growth factor receptor*)1 genannt, gehört zusammen mit ErbB2/Neu/Her2, ErbB3/Her3 und

ErbB4/Her4 zu der Familie der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen, die in ihrer aktiven Form als Homo- oder Heterodimere vorliegen¹⁰⁹. Die ErbB-Rezeptortyrosinkinasen werden durch eine Vielzahl an Liganden, die zur Familie der EGF-artigen Faktoren gehören, aktiviert. Diese werden als glykosylierte transmembrane Vorläuferproteine synthetisiert, durch an der Zellmembran lokalisierte Proteasen prozessiert und als reife Wachstumsfaktoren freigesetzt. Die Abspaltung und damit Freisetzung der Faktoren von der Membran, auch als *shedding* bezeichnet, wird vor allem durch die Familie der ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*)-Proteasen vermittelt¹¹⁰. Amphiregulin, EGF, Epigen und TGF (*transforming growth factor*) α binden vor allem an EGFR, während Betacellulin und HB (*heparin-binding*)-EGF über ein Heterodimer aus EGFR und ErbB4 signalisieren und Epiregulin seine Signale über EGFR, ErbB3 und ErbB4 vermittelt. Neuregulin (NRG)1 und 2 binden an ErbB3 und ErbB4, NRG3 und 4 nur an ErbB4¹¹¹. ErbB2 kann keine Liganden binden, ist aber der bevorzugte Heterodimerisierungspartner der anderen drei ErbB-Rezeptoren und dient somit vor allem als Verstärker des liganden-induzierten Signals¹¹².

Die ErbB-Rezeptortyrosinkinasen besitzen eine große, extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine Transmembrandomäne, eine zytoplasmatische Kinasedomäne und C-terminal Phosphotyrosin-Bindemotive, die als Rekrutierungsstellen für Effektorproteine dienen. Die Kinasedomäne im ErbB3-Rezeptor ist nicht funktionsfähig, so dass dieser nur als Heterodimer aktiviert werden kann¹¹².

Vor der Ligandenbindung liegt EGFR bereits in einem prä-dimerisierten Zustand vor¹¹³. Die Bindung zweier Liganden hat eine Konformationsänderung und anschließend die Autophosphorylierung des Rezeptordimers zur Folge¹¹⁴. Durch die Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste am C-Terminus des Rezeptors entstehen Bindungsstellen für SH (*src homology*)2- und PTB (*phosphotyrosine binding*)-Domänen enthaltende Proteine, die entweder als Adaptorproteine fungieren oder selbst enzymatische Aktivitäten besitzen.

Die phosphorylierten Tyrosine 992 und 1173 dienen als direkte Rekrutierungsstellen für PL(Phospholipase) $C\gamma$, die durch Phosphorylierung an Tyrosin 771 und 783 aktiviert wird¹¹⁵. Aktiviertes PLC γ katalysiert die Reaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol). IP₃ bewirkt die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER ins Zytoplasma, das im Zusammenspiel mit DAG

vor allem cPKCs (*classical protein kinase C*, z.B. PKC α , β und γ) und nPKCs (*novel protein kinase C*, z.B. PKC δ , ϵ , η und θ) aktiviert, die u.a. zur Aktivierung von ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)1/2, NF κ B, p38^{MAPK} und JNK (c-Jun N-terminale Proteinkinase) führen ¹¹⁶ (Abbildung 1.6).

Die phosphorylierten Tyrosine 1068 und 1086 dienen als Interaktionsplattformen für das Adapterprotein Gab (*growth factor receptor-bound protein (Grb)2-associated adaptor protein*)1, das PI3K (Phosphoinositol-3-kinase) an EGFR rekrutiert ¹¹⁷. PI3K katalysiert die Reaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat), das nach gegenwärtigem Kenntnisstand die Translokation von PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*)1 und Akt an die Plasmamembran bedingt. PDK und weitere Kinasen aktivieren schließlich Akt ¹¹⁸ (Abbildung 1.6).

Shc (*src homology domain c-terminal adaptor homolog*) bildet nach Bindung an die phosphorylierten Tyrosine 1148 und 1173 mit Grb2 und SOS (*son of sevenless*) einen Komplex, der in mehreren Phosphorylierungsschritten über Ras (*rat sarcoma*), Raf (*rapidly growing fibrosarcoma*) und MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*)1 die Aktivierung von ERK1/2 bewirkt ¹¹⁹ (Abbildung 1.6).

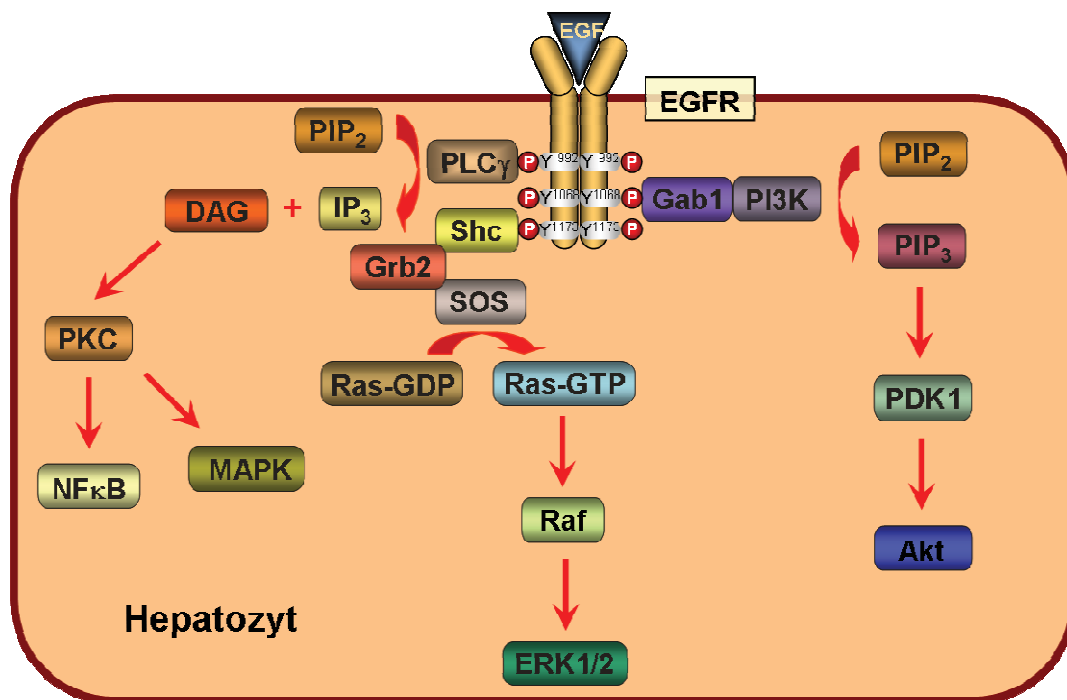


Abbildung 1.6: **Schematische Darstellung der EGF-abhängigen Signalantwort.** Die EGF-induzierte Aktivierung von EGFR hat die Aktivierung der PLC γ /PKC-, Ras/Raf- und PI3K/Akt-Signalkaskaden zur Folge.

Eps15 (*EGFR pathway substrate clone 15*), das über AP (*adaptor protein*)-2 an phosphoryliertes Tyrosin 974, und Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*), welches über phosphoryliertes Tyrosin 1045 an den EGFR-Komplex bindet, dienen als negative Regulatoren von EGFR. Während Eps15 die Internalisierung von EGFR durch *coated pit*-bedingte Endozytose vermittelt, induziert Cbl durch die enzymatische Aktivität einer E3-Ubiquitin-Proteinligase die Ubiquitylierung und Degradation von EGFR^{120, 121}.

Die Phosphorylierung der Tyrosine 845 und 1101 des EGFR-Komplexes erfolgt im Gegensatz zu den übrigen Tyrosinen nicht durch Autophosphorylierung, sondern wird durch die zytoplasmatische Tyrosinkinase c-Src (*cellular Rous sarcoma oncogene*) vermittelt¹²². Die Phosphorylierung am Tyrosinrest 845 stabilisiert den EGF-Rezeptor im aktivierten Zustand und verstärkt somit die Kinaseaktivität des Rezeptors. Das phosphorylierte Tyrosin 845 dient darüber hinaus als Rekrutierungssignal für Faktoren wie z.B. für STAT5b, das nachfolgend seinerseits phosphoryliert und hierdurch aktiviert wird¹²³.

Die Negativregulation des EGFR-Signalweges erfolgt außer über Internalisierung und Degradation des Rezeptors auch über die Dephosphorylierung von EGFR durch Phosphatasen. Neben SHP (*src-homology phosphatase*)2¹²⁴ und PTP (*protein tyrosine phosphatase*)1B¹²⁵ spielt hierbei die Tyrosinphosphatase TC-PTP (*T-cell protein tyrosine phosphatase*)^{126, 127} eine wesentliche Rolle. Über „*Negative feedback loops*“ wird die Expression weiterer Negativregulatoren wie MIG (*mitogen-inducible gene*)6, LRIG (*leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains*)1 und SPRY (*sprouty*) induziert¹⁰⁹ die ihrerseits ebenfalls inhibitorisch auf den EGFR wirken.

Die Aktivierung von EGFR ist für die Entwicklung, Proliferation und Differenzierung einer Vielzahl von Geweben unerlässlich, so dass EGFR-defiziente Mäuse je nach genetischem Hintergrund embryonal oder perinatal versterben. Es treten Abnormalitäten von Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Haut und Knochen auf. Indem EGFR mit CD95 interagiert, ist EGFR auch in die Regulation der Apoptose involviert. Der Knockout von EGFR-Liganden führt dagegen zu keinem Phänotyp oder nur zu geringen

Schädigungen, was auf eine Redundanz unter den Liganden spricht^{128, 129}. Eine Deregulation des EGFR-Signalweges führt zur Entstehung von Krebs vor allem epithelialen und glialen Ursprungs. Eine verstärkte EGFR-Aktivierung kann z.B. durch Mutation des Rezeptors^{130, 131} Überexpression von Liganden¹³² oder Genamplifikation¹³³ erfolgen.

1.5 Die Tyrosinphosphatase TC-PTP

TC-PTP (*T-cell protein tyrosine phosphatase*), auch PTPN2 (*protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2*) genannt, ist eine ubiquitär exprimierte Phosphatase, die in T-Zellen erstbeschrieben wurde¹³⁴. TC-PTP existiert in zwei Spleißvarianten mit verschiedenen C-Termini, die Unterschiede in der subzellulären Lokalisation zur Folge haben. Während die 48 kDa-Variante (TC48) aufgrund eines hydrophoben C-Terminus in der ER-Membran verankert ist, ist bei der 45 kDa-Variante (TC45) der hydrophobe C-Terminus durch eine Hexapeptidsequenz ersetzt¹³⁵. Durch die dadurch entstehende Kernlokalisationssequenz ist TC45 im Grundzustand im Kern zu finden¹³⁶, transloziert u.a. nach mitogener Stimulation oder Stress jedoch ins Zytoplasma¹³⁷.

Die Tatsache, dass TC-PTP-defiziente Mäuse 3-5 Wochen nach der Geburt aufgrund einer systemischen Entzündung versterben¹³⁸, spiegelt die bedeutende Rolle von TC-PTP als Negativregulator diverser Signaltransduktionswege wider. Als Substrate von TC-PTP sind bisher neben dem Adaptorprotein p52^{Shc}¹²⁶ und den Rezeptoren für EGF¹²⁶, PDGF (*platelet-derived growth factor*)¹³⁹ und Insulin^{140, 141} gleich mehrere Bestandteile des Jak/STAT-Signalweges beschrieben. Sowohl Jak1 und Jak3¹⁴² als auch auch STAT1¹⁴⁶, STAT3¹⁴³ und STAT5¹⁴⁸ können von TC-PTP durch Dephosphorylierung inaktiviert werden. Während TC-PTP über die Regulation des Jak/STAT-Signalweges einen wichtigen Einfluss auf die Hämatopoese und die Immunantwort ausübt, kontrolliert TC-PTP über die Regulation der EGFR- und PDGFR-Aktivität die zelluläre Proliferation sowie über die Dephosphorylierung des Insulin-Rezeptors die Glukosehomöostase.

Neben der Inhibition der Phosphatase-Aktivität durch Oxidation von TC-PTP¹⁴⁴ ist eine Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von TC-PTP an Serin 304 beschrieben¹⁵⁰, die funktionelle Relevanz der Serinphosphorylierung ist jedoch noch unklar.

1.6 Der Akt-Signalweg

Die zytoplasmatische Proteinkinase Akt, auch PKB (Proteinkinase B) genannt, kommt in drei Isoformen vor (Abbildung 1.7), wobei Akt1 ubiquitär, Akt 2 vor allem in Fettzellen, Lebergewebe und Skelettmuskel und Akt3 vorrangig im Gehirn exprimiert wird. Akt wird vor allem von Insulin und Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF, BFG (*basic fibroblast growth factor*) und IGF (*insulin-like growth factor*)I aktiviert und ist in die Kontrolle von Metabolismus, Zellwachstum, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose involviert. Während eine verstärkte Akt-Aktivierung oft in aus maligne entartetem Gewebe isolierten Zellen beobachtet wird, wird eine reduzierte Akt-Aktivierung mit Prozessen wie der Insulinresistenz und hierüber mit der Induktion von Typ-II Diabetes in Verbindung gebracht¹⁴⁵.

Akt besteht aus einer N-terminalen PH (*pleckstrin homology*)-Domäne, einer zentralen Kinasedomäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne, die ein hydrophobes Motiv enthält (Abbildung 1.7). Über die PH-Domäne interagiert Akt mit PIP₃ und Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat, so dass diese für die Membranlokalisation von Akt essentiell ist.

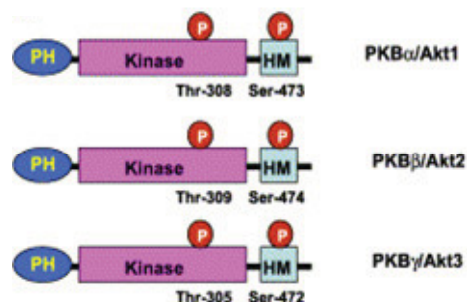


Abbildung 1.7: **Darstellung der Domänenstruktur der drei Akt-Isoformen.** Akt ist aus einer N-terminalen PH-Domäne, einer zentralen Kinasedomäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne, die ein hydrophobes Motiv enthält, zusammengesetzt. Die Aktivierung von Akt erfolgt vor allem über die Phosphorylierung einer in der Kinasedomäne lokalisierten Threoninstelle sowie einer im hydrophoben Motiv befindlichen Serinstelle. (übernommen aus ¹⁴⁶)

Die Aktivierung von Akt erfolgt in mehreren Schritten. Die Bindung von Wachstumsfaktoren wie EGF oder von Insulin an die entsprechenden Rezeptoren hat die Rekrutierung der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) zur Folge. PI3-Kinasen sind heterodimere Enzyme, die aus einer katalytischen (p110 α , β oder γ) und einer regulatorischen (p50 α , p55 α , p55 γ , p85 α , p85 β oder p101) Untereinheit zusammengesetzt sind. PI3K katalysiert die Reaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat), welches die Translokation von PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*)1 und Akt an die Plasmamembran bewirkt ¹¹⁸.

Für die volle Aktivierung von Akt ist die Phosphorylierung von Threonin 308 und Serin 473 nötig (Abbildung 1.7). Während PDK1 als für die Phosphorylierung an Threonin 308 verantwortliche Kinase identifiziert wurde ^{147, 148}, sind für die Phosphorylierung an Serin 473 mehrere Kandidaten beschrieben. PDK1 wurde auch hier als verantwortliche Kinase benannt ¹⁴⁹, weiterhin wurden Akt selber ^{150, 151}, MAPKAP-K2 (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*) ¹⁵², ILK (*integrin-linked kinase*)1 ¹⁵³, PKC α ¹⁵⁴, PKC β II ¹⁵⁵ und DNA-PK (*double-stranded DNA-dependent protein kinase*) ¹⁵⁶ als Kinasen beschrieben, die Akt am Serinrest 473 phosphorylieren. MTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*), ein Komplex aus mTOR, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase*) und mLST (*mammalian lethal with sec-13*)8, gilt heute als wichtigste Ser473-Kinase ¹⁵⁷. Daneben wird Akt auch über die Phosphorylierung an Tyr315 und Tyr326 reguliert, die über c-Src vermittelt wird ¹⁵⁸.

Die Negativregulation des PI3K/Akt-Signalweges erfolgt vor allem über PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), PP (Proteinphosphatase)2A und PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*). Während PTEN durch die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat inhibierend wirkt, können PP2A

und PHLPP Akt direkt dephosphorylieren^{159, 160}. Hierbei dephosphoryliert PP2A Akt hauptsächlich am Threoninrest 308 während PHLPP überwiegend den Serinrest 473 dephosphoryliert.

Die Vielzahl zellulärer Prozesse, die von Akt reguliert werden, ist eine Folge der großen Anzahl an Substraten, die von Akt in Abhängigkeit vom Stimulus und vom Kontext phosphoryliert werden. Akt übt einen anti-apoptotischen Effekt u.a. über die Phosphorylierung von Bad, Procaspase-9, IKK α , YAP (*Yes-associated protein*) und Forkhead-Transkriptionsfaktoren aus. Die Phosphorylierung von Bad durch Akt verhindert die Interaktion von Bad mit Bcl-xL und dadurch die Inaktivierung von Bcl-xL, so dass Bcl-xL seine anti-apoptotische Wirkung ausüben kann^{161, 162}. Die Akt-abhängige Phosphorylierung der Procaspase-9 an Ser196 hat eine Hemmung der Caspase-Kaskade zur Folge¹⁶³, während die Phosphorylierung der IKK α die NF κ B-abhängige Transkription von Genen anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2, Mcl (*myeloid cell leukemia protein*)-1, BCL2A1 (*Bcl2-related protein A1*), Bcl-xL oder Survivin steigert^{164, 165}. Die Phosphorylierung von YAP bzw. der Forkhead-Transkriptionsfaktoren FOXO1, 2, 3a und 4 verhindert die Aktivierung pro-apoptotischer Gene wie p53 bzw. Fas-Ligand, TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), Bim oder Bcl-6^{166, 167}.

Der Einfluss von Akt auf den Zellzyklus ist auf die Inaktivierung der Zellzyklus-Inhibitoren p21^{Cip1}¹⁶⁸ und p27^{Kip1}¹⁶⁹⁻¹⁷¹ zurückzuführen. Außerdem induziert die Phosphorylierung durch Akt die Kerntranslokation von MDM (*mouse double minute*)2 und hierdurch die MDM2-vermittelte Degradation von p53¹⁷².

Die Akt-vermittelte Steigerung der Proteinsynthese wird durch die phosphorylierungsabhängige Induktion von Initiations- und Elongationsschritten der Proteintranslation hervorgerufen. Ursächlich dafür ist Aktivierung von mTORC1, eines aus mTOR, raptor und mLST8 bestehenden Komplexes, durch Akt. mTORC1 reguliert durch Phosphorylierung von S6K1 (*S6 ribosomal kinase 1*) und 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1*)^{173, 174} vor allem die Bildung des Präinitiationskomplexes¹⁷⁵. Die metabolischen Effekte von Akt werden durch die Beeinflussung des Glukose- und Lipidstoffwechsels induziert. Akt aktiviert die Glykogensynthese durch Phosphorylierung und Inaktivierung der GSK3 (*glycogen synthase kinase*) α und β , wodurch die inhibitorische Wirkung von GSK3 α/β auf die Glykogensynthese verhindert wird¹⁷⁶.

Weiterhin spielt Akt bei der Induktion der Translokation des Glukosetransporters GLUT4 an die Zytoplasmamembran eine wichtige Rolle, worin die Akt-Substrate AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*)¹⁷⁷, PIKfyve (*phosphoinositide kinase for five position containing a Fyve finger*)¹⁷⁸ und Synip (*Syntaxin 4-interacting protein*)¹⁷⁹ involviert sind. Akt2 inhibiert die Fettsäureoxidation und die Glukoneogenese durch Phosphorylierung von PGC (*peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator*)1 α ¹⁸⁰, wodurch die Rekrutierung von PGC1 α an die Promotoren von Genen wie Glukose-6-phosphatase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase nicht mehr möglich ist.

Wie groß der Anteil der unterschiedlichen Akt-Isoformen an den durch Akt vermittelten Effekten ist, wurde durch die Untersuchung von KO-Mäusen ermittelt. Akt1-KO-Mäuse zeigen Defizite sowohl im fötalen als auch im postnatalen Wachstum, aber keine Veränderungen im Glukosemetabolismus¹⁸¹. Akt2-KO-Mäuse dagegen leiden unter Insulinresistenz und schwerem Diabetes, was auf eine wesentliche Rolle von Akt2 im Glukosemetabolismus hinweist¹⁸¹. Akt3-KO-Mäuse schließlich weisen weder Veränderungen von Wachstum noch von Glukosemetabolismus auf, besitzen jedoch eine reduzierte Gehirngröße¹⁸².

1.7 Zielsetzung

Eine Infektion mit Hepatitis C Virus führt bei etwa 80% der Infizierten zu einer persistierenden Infektion. Dies legt nahe, dass das Hepatitis C Virus über Mechanismen verfügt, die ihm einen wirkungsvollen Schutz vor der antiviralen Immunantwort des Wirts bieten und ihm ermöglichen, in der Wirtszelle zu replizieren, ohne essentielle zelluläre Funktionen so sehr zu stören, dass die Überlebensfähigkeit der Wirtszelle deutlich vermindert ist.

Ziel dieser Arbeit war die weitere Aufklärung der molekularen Mechanismen, über die die NS3/4A Protease/Helikase des Hepatitis C Virus:

- A) die hepatische inflammatorische Antwort auf hepatotoxische Noxen wie LPS/D-GalN und TNF α /D-GalN inhibiert

sowie

- B) mit der hepatozytären Signalübertragung von EGFR und Akt interferiert und inwieweit es hierdurch seine eigene Replikation beeinflusst.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien, Substanzen und Lösungen

Materialien für die Zellkultur

75 cm ² Gewebekulturflaschen	Greiner; Solingen, Deutschland
175 cm ² Gewebekulturflaschen	Greiner; Solingen, Deutschland
6 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
10 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
6 Well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
24 Well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
96 Well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
Minisart Plus Sterilfilter	0,2 µm Sartorius; Göttingen, Deutschland

Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (4500 mg/l Glukose)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMEM/Nutrient Mix F-12	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma; München, Deutschland
Doxyzyklin	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FCS	Perbio; Bonn, Deutschland
G418 (Geneticin)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B	Roche; Mannheim, Deutschland
OptiMEM	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
PBS	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Cytogen; Sinn-Fleisbach, Deutschland
Zeocin	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland

Reagenzien und Feinchemikalien

AG1478	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Ampicillin	Sigma; München, Deutschland
Aprotinin	Sigma; München, Deutschland
Benzamidin	Sigma; München, Deutschland
β -Glycerolphosphat	Sigma; München, Deutschland
Bradford Protein-Assay	BioRad; Hercules, USA
BSA	PAA-Laboratories; Linz, Österreich
D-Galaktosamin	Sigma; München, Deutschland
DTT	Sigma; München, Deutschland
EGF, human	Roche; Mannheim, Deutschland
HCV NS3/4A Protease	Anaspec; San Jose, USA
HCV NS3/4A Protease (A156S)	Anaspec; San Jose, USA
IFN α , human	R&D Systems; Minneapolis, USA
IFN α , murin	Chemicon; Temecula, USA
IFN β , human	R&D Systems; Minneapolis, USA
IFN γ , human	Roche; Mannheim, Deutschland
IFN γ , murin	Roche; Mannheim, Deutschland
IL-6, human	Roche; Mannheim, Deutschland
Kanamycin	Sigma; München, Deutschland
Leupeptin	Sigma; München, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
LPS	Sigma; München, Deutschland
LY294002	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Na-Pyrophosphat	Sigma; München, Deutschland
Pefabloc	Fluka; St. Gallen, Schweiz
PMSF	Roche; Mannheim, Deutschland
Polybren	Sigma; München, Deutschland
SB203580	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Superfect	Qiagen; Hilden, Deutschland
TNF α , murin	Roche; Mannheim, Deutschland

Triciribine	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Triton X-100	Merck; Darmstadt, Deutschland
WL Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer; Rodgau-Jügesheim, DE

Kits

DNeasy Tissue Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Mouse IFN γ ELISA Set (BD OptEIA)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraktion-Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAshredder Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
VenorGeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland

PCR und Klonierung

dNTP Mix	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
IPTG	Promega; Madison, USA
<i>JM109</i> kompetente Zellen	Promega; Madison, USA
Oligonukleotide	MWG; Ebersberg, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs; Ipswich, USA
Sequenzierreaktionen	MWG; Ebersberg, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec; Köln, Deutschland
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
T4-DNA Ligase	Promega; Madison, USA
TaqMan PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Taq</i> Polymerase	Roche; Mannheim, Deutschland
X-Gal	Promega; Madison, USA

Plasmide

p3xFlag CMV 7.1	Sigma; Taufkirchen, Deutschland
pGEM T Easy	Promega; Madison, USA
pRevTetOff-IN	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
pRevTRE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Primärantikörper

Akt	Cell Signaling; Danvers, USA
Akt Ser473	Cell Signaling; Danvers, USA
Akt pThr308	Cell Signaling; Danvers, USA
Akt pTyr326	Abcam; Cambridge, UK
β-Aktin	Abcam; Cambridge, UK
ATF2	Abcam; Cambridge, UK
ATF2 pThr71	Cell Signaling; Danvers, USA
EGFR	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
EGFR pTyr845	Cell Signaling; Danvers, USA
EGFR pTyr992	Cell Signaling; Danvers, USA
EGFR pTyr1045	Cell Signaling; Danvers, USA
EGFR pTyr1068	Cell Signaling; Danvers, USA
EGFR pTyr1173	Cell Signaling; Danvers, USA
GAPDH	Biodesign; Saco, USA
HCV NS3	Abcam; Cambridge, UK
Histon H2B	Cell Signaling; Danvers, USA
Lamin A/C	Cell Signaling; Danvers, USA
p38	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
p38 pThr180 pTyr182	Cell Signaling; Danvers, USA
p65	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
PIAS1	Abcam; Cambridge, UK
PLCγ	Cell Signaling; Danvers, USA
PLCγ pTyr771	Cell Signaling; Danvers, USA

PP2A	Upstate; Charlottesville, USA
PP2A pTyr307	Epitomics; Burlingame, USA
PTEN	Cell Signaling; Danvers, USA
PTEN pSer380 pThr382/383	Cell Signaling; Danvers, USA
PTP1B	Abcam; Cambridge, UK
SHP2	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
SOCS1	Imgenex; San Diego, USA
SOCS3	IBL; Hamburg, Deutschland
Src	Cell Signaling; Danvers, USA
Src pTyr418	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Src pTyr529	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
STAT1	BD Transduction Lab., Lexington, USA
STAT1 pTyr701	Upstate; Charlottesville, USA
STAT2	Upstate; Charlottesville, USA
STAT2 pTyr689	Upstate; Charlottesville, USA
STAT3 pTyr705	Cell Signaling; Danvers, USA
STAT3	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
TC-PTP	R&D Systems; Minneapolis, USA

Sekundärantikörper

HRP Anti-Kaninchen	DAKO; Hercules, USA
HRP Anti-Maus	DAKO; Hercules, USA

Nicht aufgeführte Chemikalien zur Herstellung der Pufferlösungen wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Taufkirchen, Deutschland) oder Fluka (St. Gallen, Schweiz) bezogen und wiesen den Substanz-Reinheitsgrad *pro analysi* auf.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der humanen Hepatomazelllinien HepG2 und Huh7 erfolgte in DMEM/Nutrient Mix F-12 (supplementiert mit 10 % komplement-inaktiviertem FCS) in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C. Die das HCV-Replikon exprimierende Zelllinie Huh 9-13 wurde in DMEM/Nutrient Mix F-12 + 10 % FCS, das zusätzlich mit 1 mg/ml G418 versetzt wurde, kultiviert. HepG2 NS3/4A TetOff-IN wurden in DMEM/Nutrient Mix F-12 + 10 % FCS mit 800 µg/ml G418 zur Selektion und 4 µg/ml Doxyzyklin zur Unterdrückung der Transgenexpression gehalten. HepG2 NS3/4A mit konstitutiver NS3/4A-Expression wurden in DMEM/Nutrient Mix F-12 + 10 % FCS und 350 µg/ml Zeocin kultiviert. Für die Kultivierung der Nierenfibroblastenzelllinie CV1 (isoliert aus der Grünen Meerkatze) sowie der humanen Osteosarkomazelllinie 143 tk wurde DMEM mit 4500 mg/l Glukose + 10 % FCS eingesetzt. Die Verpackerzelllinien Phönix-Ampho und PT67 wurden ebenfalls in DMEM mit 4500 mg/l Glucose + 10 % FCS kultiviert.

Alle verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig mittels PCR (VenorGeM Mycoplasma Detection Kit, Minerva Biolabs) auf Mykoplasmen getestet. In den Versuchen wurden nur Mykoplasmen-freie Zellen verwendet. Zur Konservierung wurden Zellen in Einfriermedium (DMEM/Nutrient Mix F-12, 10 % DMSO, 20 % FCS) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Transfektion von DNA

Für die Transfektion der Zellen mit Lipofectamine 2000 wurden je Ansatz 2,5 µg DNA eingesetzt, die mit OptiMEM auf 50 µl aufgefüllt wurden. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 4 µl Lipofectamine 2000 mit 246 µl OptiMEM versetzt. Um die Bildung von Komplexen zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-

Moleküle und der positiv geladenen Oberfläche der Liposomen zu ermöglichen, wurden beide Ansätze gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen (75 cm² Zellkulturflasche, 70-80 % Konfluenz) trypsiniert und nach der Zentrifugation (1000 rpm, 4 °C, 5 min) in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Jedem DNA/Lipofectamine 2000-Ansatz wurden nun zügig 400 µl der Zellsuspension sowie weitere 900 µl des Kulturmediums zugesetzt, so dass in jede Gewebekulturschale (Durchmesser 6 cm) jeweils 1,6 ml des Transfektionsansatzes gegeben werden konnten. Anschließend wurden die Ansätze für vier Stunden bei 37 °C inkubiert, damit die Zellen adhären können und die DNA (vermutlich durch Endocytose oder durch das Verschmelzen der Liposomen mit der Zellmembran) in die Zellen aufgenommen werden kann. Danach wurden die Zellen mit 2 ml frischem Kulturmedium pro 6 cm Gewebekulturschale versetzt und es folgte eine weitere Inkubation der Zellen für ca. 48h, während der sie wie in den entsprechenden Versuchen angegeben stimuliert wurden. Anschließend wurden die Zellen lysiert und wie in den folgenden Abschnitten ausgeführt weiterverarbeitet.

Transfektion von siRNA

Die Transfektion der Zellen mit siRNA (bezogen von MWG) wurde mit Lipofectamine 2000 und 2,5 µg DNA pro Ansatz als Carrier durchgeführt. Deswegen wurde bei der Transfektion mit siRNA analog der Transfektion mit DNA verfahren, mit der Ausnahme, dass zu dem DNA-OptiMEM-Gemisch 50 pg siRNA/Ansatz hinzugefügt wurden, was einer Endkonzentration von 25 nM siRNA entspricht. Gegen Akt bzw. TC-PTP wurde ein Gemisch aus zwei siRNAs eingesetzt, um die Effizienz des *Knockdowns* zu erhöhen. Als Kontroll-siRNA wurde GFP siRNA verwendet, da durch diese Kontrolle unspezifische siRNA-Effekte ausgeschlossen werden können.

Verwendete siRNAs (Sequenzangaben von 5' → 3')	
GFP siRNA	AGCAGAAGAACGGCAUCAA
Akt siRNA 1	GCUACUACGCCAUGAAGAUGCCU
Akt siRNA 2	GAUCCGCUUCCCGCGCACGCU
TC-PTP siRNA 1	AAGAUGUGAAGUCGUUUUAUA
TC-PTP siRNA 2	AAGGAGUUACAUCUUAACACA

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Bakterienstämme und ihre Kultivierung

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden transformationskompetente *Escherichia coli* Bakterien des Stammes *JM109* von Invitrogen verwendet. Als Nährmedium für die Bakterien diente LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5). Für Agarplatten wurde dem Medium 18 g/l Agar zugesetzt. Selektionsmedien enthielten zusätzlich 50 mg/l Ampicillin bzw. 25 mg/l Kanamycin. Als Transformationsmedium wurde SOC-Medium eingesetzt (0,5 g/l Hefeextrakt, 2,0 g/l Trypton, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose, pH 7,0). Die Konservierung transformierter *E. coli*-Stämme erfolgte in Einfriermedium (LB-Medium mit 25 % Glycerin) bei -80 °C.

Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Von der gefrorenen Ursprungskultur (*JM109 Bacterial Strain Glycerol Stock*, Promega) wurde mit der Impföse ein Verdünnungsausstrich auf eine LB-Agarplatte ausgebracht. Der Verdünnungsausstrich dient der Anzucht von aus einzelnen Bakterienzellen herangewachsenen Einzelkolonien. Nach 12-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurde mit einer Einzelkolonie LB-Flüssignährmedium beimpft und über Nacht vorkultiviert. Die Vorkultur wurde nachfolgend in 250 ml LB-Medium, das mit 20 nM MgSO₄ supplementiert wurde, überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 5 min) geerntet und mit

TFB-1 Puffer (30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei 4 °C folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt und die Resuspension des Zellpellets mit TFB-2 Puffer (100 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 6,5). Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 15 bis 60 Minuten konnten die Zellen aliquotiert und bei -80 °C gelagert werden.

Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen

Die Transformation von Bakterien bezeichnet das Einbringen genetischen Materials in Form bakterieller Plasmide. Zur Durchführung wurden kompetente *JM109* Zellen (100 µl) auf Eis aufgetaut, mit der gewünschten DNA (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) gemischt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 45 Sekunden auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock) und sofort wieder für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Nach Überführung der Bakterien in 900 µl SOC-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C im Bakterenschüttler kultiviert und im Anschluss daran auf festem Selektionsmedium ausgestrichen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde je nach benötigter DNA-Menge das QIAprep Spin Miniprep Kit oder das QIAprep Spin Maxiprep Kit von Qiagen verwendet. Die Nukleinsäurekonzentration der gewonnenen DNA wurde mittels spektralphotometrischer Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt.

Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für den Verdau von Plasmid-DNA werden Restriktionsendonucleasen vom Typ II eingesetzt, die doppelsträngige DNA spezifisch an für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristischen palindromischen Sequenzen schneiden. Für analytische Ansätze wurden 0,5-2,5 µg DNA, 10-20 U Enzym und der entsprechende Puffer in einem

Endvolumen von 10 µl eingesetzt und für 1-2 h bei der vorgegebenen Temperatur inkubiert. Bei präparativen Ansätzen wurden 5-10 µg Plasmid-DNA, 30-40 U Endonuklease sowie der entsprechende Puffer in einem Endvolumen von 50 µl für 3-4 h inkubiert. Die verwendeten Restriktionsendonucleasen sowie die jeweiligen Reaktionspuffer stammten von New England Biolabs.

Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte je nach den zu trennenden Nukleotid-Fragmentgrößen in 0,5 % - 1,5 %-igen Agarosegelen, welche mit 2 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt wurden. Als Lauf- und Gelpuffer wurde TAE-Puffer verwendet (242 g/l Tris, 100 ml/l 0,5 M EDTA (pH 8,0), 57,1 ml/l Essigsäure). Vor dem Probenauftrag wurden die DNA-Proben im Verhältnis 1:5 mit einem Bromphenolblau-Ladepuffer (25 mg/100 ml Bromphenolblau, 25 mg/100 ml Xylen Cyanol FF, 30 ml 50-fach TAE-Puffer) versetzt. Zur Durchführung wurde eine Flachbett-Elektrophoresekammer der Firma Peqlab verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 120 Volt über einen Zeitraum von 60 Minuten. Als DNA-Längenstandard wurde Smart Ladder (Eurogentec) eingesetzt. Die Auswertung und Dokumentation des DNA-Gels erfolgte mittels des Doc-Print-Geldokumentations-systems der Firma Peqlab.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach Ethidiumbromidfärbung auf einem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion-Kits von Qiagen gemäß der Anleitung des Herstellers.

Ligation von DNA-Fragmenten

Verwendet wurde die T4-DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (Promega). Diese katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente. Vektor- und

Fragment-DNA wurden in der Ligationsreaktion in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 4 °C über Nacht.

PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte mittels spezifischer Primer. Während der PCR katalysiert eine thermostabile Polymerase nach einem Denaturierungsschritt und der Hybridisierung der Primer an das DNA-Template (*annealing*) die Verlängerung der Primersequenz (*extension*). Durch die zyklische Wiederholung dieser Schritte gelingt die Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes. Als thermostabile DNA-Polymerase wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* verwendet. Jeder Ansatz enthielt 1 ng Template, 5 µl dNTP Mix (2,5 mM), 25 pmol *sense* Primer, 25 pmol *antisense* Primer und 1 µl *Taq*-Polymerase. Dieser Ansatz wurde mit Mg²⁺-haltigem PCR-Puffer versetzt und mit sterilem H₂O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe des PTC-200 Thermocyclers der Firma MJ-Research durchgeführt. Die Aufreinigung des PCR-Produktes wurde mit Hilfe des PCR Purification Kits von Qiagen durchgeführt.

Oligonukleotide für die PCR (Sequenzangaben von 5' → 3')		
pRevTRE NS3/4A	sense	ATGGCGCCCATCACGGCGTACG
	antisense	TTAGCACTCTTCCATCTCATCG
pCFG5-IEGZ NS3/4A	sense	AATCGATGGAGGAGCGCCTATTACGG
	antisense	AGTTAACTTAGCACTCTTCCATCTC
tk sense/ antisense	sense	AACGATAATAGATACGGAACGGGA
	antisense	CACACAGCAGTTAGTTTTACCACCA
p3xFlag hnTC- PTP	sense	GAGGTGCGGCCGCAGGTCCCACCACCATCGAGCGG
	antisense	GCCACCAGATCTGCCTTAGGTGTCTGTCAATCTTGG

Klonierung von PCR-Fragmenten in den pGEM T Easy Vektor

PCR-Produkte, die durch eine abschließende Extensionsreaktion mit überhängenden Adenin-Resten versehen wurden, konnten direkt in den pGEM T Easy Vektor (Promega) kloniert werden. Dieser Vektor wird vom Hersteller in linearisierter Form bereitgestellt und trägt an beiden freien 3'-Enden Überhänge aus Thymidin-Resten. Für die Klonierungsreaktion wurden 0,5 - 2 µl PCR-Produkt, 1 µl pGEM T Easy Vektor, 1 µl T4-DNA-Ligase und steriles Wasser in einem Endvolumen von 10 µl vorsichtig gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser Ligationsansatz wird in kompetente Bakterien transformiert und auf ampicillinhaltige LB-Agar-Platten ausgestrichen, die zuvor mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) sowie 6 µl IPTG (100 mM) versetzt worden waren. Die Klonierungsregion des pGEM T Easy Vektors befindet sich im *lacZα*-Gen, dessen Transkription normalerweise durch das *lacIq*-Repressor-Gen gehemmt wird. Bei einfacher Religation des Vektors lässt sich die Expression des *lacZα*-Gens mit IPTG induzieren, so dass die mit diesem Konstrukt transfizierten *E. coli*-Bakterien das Enzym β-Galactosidase produzieren und X-Gal in einen blauen Farbstoff umwandeln. Wird das PCR-Fragment erfolgreich in den pGEM T Easy Vektor eingebracht, verhindert es die Transkription des *lacZα*-Gens, so dass diese Bakterienkolonien weiß erscheinen. Nach 8-12 h Inkubation bei 37 °C konnten plasmidhaltige und daher weiße Bakterienkulturen mit einer Pipettenspitze gepickt werden und als Flüssigkultur in ampicillinhaltigem Selektionsmedium weiter vermehrt und nach Isolation der Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau bzw. Sequenzierung überprüft werden.

Isolierung von RNA

Die auf 6 cm Gewebekulturschalen kultivierten Zellen wurden mit 350 µl RLT-Puffer (versetzt mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol) lysiert und mittels eines Zellschabers abgeerntet. Die Homogenisierung erfolgte mittels des QIAshredder Kits von Qiagen, die weiteren Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen durchgeführt.

cDNA-Synthese

Für die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde 1 µg RNA verwendet. Diese wurde mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers angesetzt, der RT-Reaktion vorgeschaltet ist eine DNase-Reaktion, die der Elimination genomischer DNA dient.

Real-Time-PCR

Nach der Umschreibung der RNA in cDNA wurde die Quantifizierung der zu untersuchenden cDNA relativ zu einer Referenz mit Hilfe der Real-Time-PCR durchgeführt. Die Real-Time-PCR-Methode beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch durch die Verwendung des DNA-Farbstoffes SYBR Green, der die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet, die kontinuierliche Messung der DNA-Menge, da die Fluoreszenz proportional zu der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Für die Quantifizierung wurde die Δ CT-Methode verwendet¹⁸³. Der CT-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals einen Schwellenwert, der signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt, überschreitet. Als Referenz wurde bei der Untersuchung der TC-PTP- bzw. HCV NS3-Expression in Zelllinien humanes SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A) eingesetzt. Die eingesetzten Primer besaßen eine Schmelztemperatur von ca. 59 °C, ≤ 3 G/C-Basen im Bereich der letzten 5 Basen des Primers und führten zu einem Amplifikat von 100-250 Basenpaaren. 5 µl der 1:5 verdünnten cDNA wurden als Template zu 50 µl SYBR Green PCR Master Mix nach den Angaben des Herstellers zugesetzt (Applied Biosystems). Die quantitative Analyse der Chemokinexpression wurde nach der TaqMan-Methode in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Homey (Düsseldorf) durchgeführt. Jeweils 25 ng cDNA wurden mit 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,625 µl genspezifischer TaqMan-Sonde, 0,5 µl genspezifischen sense bzw. antisense Primern und 0,5 µl Wasser versetzt (bezogen von Applied Biosystems). Als interne Positivkontrolle wurde 18S RNA eingesetzt. Dazu wurden zu jedem Ansatz 0,125 µl 18S RNA-spezifische TaqMan-Sonde und 0,125 µl der 18S RNA-spezifischen Primer gegeben. Die Spezifität der Real-

Time-PCR wurde durch bei der cDNA-Synthese-Reaktion ausgeführte Kontrollen ohne cDNA bzw. ohne Reverse Transkriptase überprüft.

Oligonukleotide für die Real-Time-PCR (Sequenzangaben von 5' → 3')		
humanes SDHA	sense	TCTGGAGATCCGAGAAGGAA
	antisense	AGCGAAGATCATGGCTGTCT
humanes TC-PTP	sense	CACAGGGTCCACTTCCTAACA
	antisense	TTCAGCATGACAAGTGGCTTTG
HCV NS3	sense	TTGGCTGCATCATCACTAGC
	antisense	GTCGCCAGGAAAGATTGTGT
Chemokine	sense	Applied Biosystems
	antisense	

Plasmide und Klonierung

Die Klonierung der Plasmide erfolgte analog Sambrook *et al*¹⁸⁴. Die generierten Plasmide wurden durch Sequenzierung (MWG) und Vergleich mit den entsprechenden Referenzsequenzen überprüft.

- Zur Herstellung von pRevTRE NS3/4A wurde NS3/4A aus pcZeo HCV ORF I (AG Wands, Providence) durch PCR amplifiziert, in den pGEM T Easy Vektor ligiert und in pRevTRE von Clontech umklontiert.
- Zur Herstellung von pCFG5-IEGZ NS3/4A wurde die für HCV NS3/4A kodierende Sequenz aus pFK\i341\iPiLucNS3-3'_ET (AG Bartenschlager, Heidelberg) über PCR amplifiziert, in den pGEM T Easy Vektor ligiert und in den pCFG5-IEGZ-Vektor (AG Ludwig, Münster) umklontiert (von Patricia Cebula durchgeführt).
- Zur Herstellung von p3xFlag hnTC-PTP wurde humane TC-PTP-mRNA (der 45 kDa-Isoform) aus Huh7-Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben, über PCR amplifiziert, in den pGEM T Easy Vektor ligiert und in den p3xFlag-CMV-7.1 Expressionsvektor von Sigma umklontiert.

- Zur Herstellung von p7.5k-131A NS3/4A func wurde NS3/4A aus pVAX1 MUP-NS3/4A-BGHpa (AG Sällberg, Stockholm) in p7.5k-131A (AG Hengel, Düsseldorf) umklontiert.
- Zur Herstellung von p7.5k-131A NS3/4A mut wurde NS3/4A (Ile46Ala) aus pVAX1 MUP-NS3/4A mut-BGHpa (AG Sällberg, Stockholm) in p7.5k-131A (AG Hengel, Düsseldorf) umklontiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit Hilfe des Protein-Assays von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wird das Prinzip genutzt, dass sich das Absorptionsmaximum des blauen Säurefarbstoffes Coomassie-Brilliantblau G 250 in Gegenwart von Proteinen (in saurem Milieu) von 465 zu 595 nm verschiebt. Die Messung der Extinktion erfolgte in einem Ultrospec Photometer (2100pro) der Firma Amersham.

SDS-PAGE und Western Blotting

Die auf 6 cm Gewebekulturschalen kultivierten Zellen wurden mit PBS (supplementiert mit 0,1 mM Na_3VO_4) gewaschen, anschließend mit 100-200 μl Protein-Lysepuffer (1 % Triton X-100, 20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 5 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 4 mM Benzamidin, 2 mM EDTA, 10 % Glycerol, 50 mM β -Glycerolphosphat, 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 136 mM NaCl, 20 mM Natrium-Pyrophosphat, 1 mM Na_3VO_4 , 0,2 mM Pefabloc, 0,2 % SDS) versetzt und mittels eines Zellschabers abgeerntet. Die Proben wurden dann für zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall (2 x 20 s) behandelt, um auch membranständige Proteine vollständig in Lösung zu bringen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem Prinzip von Bradford mit Hilfe des Protein-Assays von Bio-Rad. Für die SDS-PAGE wurde jeweils die gleiche Proteinmenge/Spur eingesetzt. Vor dem Probenauftrag wurden die Proteinlysate mit 4-fach SDS-Auftragspuffer nach Lämmli

(250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 40 % Glycerol, 5 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau, kurz vor Gebrauch Zugabe von 8 % β -Mercaptoethanol) versetzt und bei 95 °C für fünf Minuten hitzedenaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen mit Trenngelen unterschiedlicher PAA-Konzentration (8 % bis 12 %). Zur Durchführung wurde das Gelelektrophoresesystem der Firma Biometra verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte je nach Gelgröße bei 120 Volt über einen Zeitraum von drei bis fünf Stunden oder bei 65 Volt über Nacht. Als Proteinstandard wurde der Rainbow Molecular Weight Marker von Amersham eingesetzt. Nach der Auftrennung wurden die Gele nach dem Semidry-Blotting-Prinzip in einer Elektrobloiting-Apparatur (Biometra) auf PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran der Firma Amersham transferiert. Für den Proteintransfer vom Gel auf die Membran wurde eine Stromstärke von 1 mA/cm² für 60-90 Minuten abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine angelegt, wobei der Stromfluss zwischen den Elektroden durch die Flüssigkeitssättigung von Whatman-Papier (Schleicher-Schuell) mit Puffersystemen unterschiedlicher Ionenstärke sichergestellt wurde (Anodenpuffer I: 0,3 M Tris, 20 % Methanol; Anodenpuffer II: 0,025 M Tris, 20 % Methanol; Kathodenpuffer: 0,04 M 6-Amino-capronsäure, 20 % Methanol).

Für die Immundetektion wurde die Membran mit 3 % BSA oder 5 % Milchpulver in TBS-T (20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 137 mM NaCl, 0,1 % Tween) für eine Stunde bei RT abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 – 1:5000 in 3 % BSA bzw. 5 % Milchpulver bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit einem HRP-konjugierten Zweitantikörper in einer Verdünnung zwischen 1:4000 – 1:10000 in TBS-T inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte die Detektion der Immunkomplexe mittels des Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus Kits von Perkin Elmer. Dabei wurde die Lichtemission der Chemilumineszenz von Luminol mit Hilfe von ECL-Filmen (GE Healthcare) festgehalten, für deren Entwicklung die Entwicklermaschine von Kodak verwendet wurde.

Um die gleiche Membran für mehrere Detektionen einsetzen zu können, wurden die Immunkomplexe der vorherigen Detektion durch 15-20-minütige Inkubation der Membran in Stripping-Puffer (67 mM Tris (pH 6,7), 2 % SDS) bei 70 °C entfernt.

Herstellung von Kernextrakten

Die Präparation der Kernextrakte erfolgte nach der bei Andrews und Faller¹⁸⁵ beschriebenen Methode. Auf 6 cm Gewebekulturschalen kultivierte Hepatozyten wurden mit PBS (supplementiert mit 0,1 mM Na₃VO₄) gewaschen, mittels eines Zellschabers abgeerntet und abzentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 2 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 400 µl des hypoosmolaren Puffers A (10 mM HEPES-KOH (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄) resuspendiert und etwa 10 Minuten auf Eis inkubiert, um die Lyse der Zellen zu gewährleisten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die pelletierten Zellbestandteile mit 50-100 µl (abhängig von der Größe des Pellets) Puffer C (20 mM HEPES-KOH (pH 7,9), 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA (pH 8,0), 25 % Glycerol, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄) versetzt. Durch eine 30-minütige Inkubation mit diesem Hochsalzpuffer wurden Kernproteine extrahiert. Danach wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford erfolgte mit Hilfe des Protein-Assays von Bio-Rad.

In vitro-Cleavage Assay

Im *in vitro*-Cleavage Assay für die Spaltung von TC-PTP durch NS3/4A wurden Lysate aus mit p3xFlag hnTC-PTP transfizierten Huh7-Zellen verwendet. Huh7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 120 µl Protein-Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Abschnitt „SDS-PAGE und Western Blotting“) lysiert. 50 µg Protein wurden mit Proteaseassay-Puffer (20 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM KCl, 3 mM NaCl, 1 mM DTT and 0,2 µM CaCl₂) auf 60 µl aufgefüllt und mit rekombinanter HCV NS3/4A Protease oder mutierter HCV NS3/4A Protease (A156S) von Anaspec versetzt (0,1 bzw. 0,5 µg). Nach dem Starten der Reaktion durch Zugabe von NS3/4A wurde 3 h bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl 4-fach SDS-Auftragspuffer nach Lämmli (Zusammensetzung siehe Abschnitt „SDS-PAGE und Western Blotting“) und Denaturierung der Proteine bei 95 °C für 5 Minuten wurde die Reaktion beendet.

2.2.4 Virologische Methoden

Retroviraler Gentransfer

Für die Herstellung stabiler Zelllinien macht man sich die Eigenschaft von Retroviren zunutze, sich nach einer Infektion stabil ins zelluläre Genom zu integrieren. Zur Generierung viraler Partikel wurden die Verpackerzelllinien Phoenix-Ampho (ϕ NX) bzw. PT67 eingesetzt, bei denen es sich um von 293T-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) abstammende MoMLV Verpackerzelllinien mit stabil integrierten Genen für die amphotropen Hüllproteine handelt. Dadurch, dass für die Herstellung retroviraler Partikel essentielle virale Gene auf das Genom der Verpackerzelllinie sowie auf Expressionsplasmide, die durch Transfektion in die Verpackerzellen eingebracht werden, aufgeteilt sind, werden zwar infektiöse aber replikations-inkompetente Viren freigesetzt.

Zur Herstellung von HepG2 MOC- bzw. HepG2 NS3/4A-Zellen (durchgeführt in Zusammenarbeit mit Patricia Cebula) wurden ϕ NX-Zellen in einer Dichte von 1×10^6 / 10 cm Gewebekulturschale ausgesät und unter Verwendung von Lipofectamine 2000 mit 7 μ g pCFG5-IEGZ oder pCFG5-IEGZ NS3/4A transfiziert. Da der zur Generierung der stabilen HepG2-Zelllinien verwendete retrovirale Vektor (pCFG5-IEGZ) auch GFP exprimiert, ist die Überprüfung der Transfektionseffizienz durch Analyse der GFP-Expression möglich. Durch Zugabe von 1 mg/ml Zeocin ins Zellkulturmedium wurde ca. 2 Wochen selektioniert, bis alle Zellen GFP-positiv waren. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände der ϕ NX-Zellen durch einen 0,45 μ m Filter gefiltert und mit 5 μ g/ml Polybren versetzt. Damit wurden in 6 Well-Gewebekulturplatten ausgesäte HepG2-Zellen infiziert. Dazu wurden die Zellen jedes Wells mit 2 ml des entsprechenden Filtrats überschichtet und die 6 Well-Gewebekulturplatten wurden bei 1000 x g für 3 h zentrifugiert. Danach wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, und die Zellen wurden in Zeocin-haltigem (1 mg/ml) Medium so lange kultiviert, bis alle Zellen GFP-positiv waren.

Zur Herstellung von HepG2 MOC TetOff- bzw. HepG2 NS3/4A TetOff-Zellen wurden PT67-Verpackerzellen eingesetzt und entweder mit 7 μ g pRevTRE bzw. pRevTRE NS3/4A transfiziert und 400 μ g/ml Hygromycin B selektioniert oder mit pRevTetOff-IN

transfiziert und 1 mg/ml G418 selektioniert. Zur Herstellung von HepG2 MOC TetOff- - Zellen wurden Zellkulturüberstände von mit pRevTetOff-IN sowie mit pRevTRE transfizierten PT67-Zellen gemischt und auf HepG2-Zellen gegeben. Die Herstellung von HepG2 NS3/4A TetOff-Zellen erfolgte durch Infektion von HepG2-Zellen mit Zellkulturüberständen von mit pRevTetOff-IN sowie mit pRevTRE NS3/4A transfizierten PT67-Zellen. Die Selektion der stabilen HepG2-Zellen wurde in G418 (1 mg/ml)- und Hygromycin B (400 µg/ml)-haltigem Medium durchgeführt. Zur Unterdrückung der Expression von NS3/4A wurde dem Zellkulturmedium 4 µg/ml Doxyzyklin zugegeben.

Präparation rekombinanter Vaccinia-Viren

In den Vektor p7.5k-131A einklonierte Gene (in diesem Fall NS3/4A mit funktioneller (func) bzw. mit mutierter (mut) Proteaseaktivität) werden in das Vaccinia-Virus (VV)-Genom durch homologe Rekombination, die zur Zerstörung des Thymidinkinase (tk)-Gens führt, transferiert. Dies ermöglicht die Selektion rekombinanter Viren in Thymidinkinase-negativen Zellen durch Applikation von Bromdesoxyuridin (BrdU). Da durch Transfektion mit p7.5k-131A NS3/4A func bzw. mut keine Viruspartikel gebildet werden können, müssen auf p7.5k-131A nicht kodierte virale Gene durch Infektion mit einer niedrigen MOI des Wildtyp-VV in die Zelle eingebracht werden.

Dazu wurden CV1-Zellen in 6 Well-Gewebekulturplatten bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert und mit 0,01 MOI des Wildtyp-VV infiziert. Die Zellen wurden infiziert, indem sie erst für 30 min bei RT mit 500 µl Medium, das das Wildtyp-VV enthielt, und anschließend nach Zugabe von 2 ml Medium für weitere 90 min bei 37 °C inkubiert wurden. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit 2,5 µg des p7.5k-131A-Plasmids und 10 µl Superfect von Qiagen transfiziert. Nach einem erneuten Mediumwechsel und 48-stündiger Kultivierung der Zellen sollten durch VV hervorgerufene Plaques sichtbar sein. Die Isolation der Viren erfolgte durch Aufschluss der Zellen nach der *Freeze and Thaw*-Methode, Suspension der Zellen im Medium und einer Ultraschallbehandlung für 3 x 10 s. Nach Infektion von 143 tk⁻-Zellen mit der isolierten VV-Suspension überleben nach Behandlung mit BrdU nur die mit dem rekombinierten VV infizierten Zellen und können somit selektioniert werden. Deswegen wurden 143 tk⁻-Zellen in 6 Well-Gewebekulturplatten bis zu einer Konfluenz von

60-70 % kultiviert und mit 50 µl Virussuspension in einer 1:10 Verdünnungsreihe (3-4 Schritte) mit 100 µg BrdU/ml bzw. ohne BrdU zur Kontrolle 2-3 Tage bis zur Ausbildung von Plaques inkubiert. 3 isolierte Plaques pro Rekombination wurden gepickt, für 3 x 10 s sonifiziert und einer erneuten Selektion über 2-3 Tage unterworfen. Für die Herstellung eines VV-Stocks wurde eine 175 cm² Gewebekulturflasche mit 100 % konfluenten CV1-Zellen mit dem VV-Isolat der 2. Selektion infiziert und für 2-4 Tage bei 37 °C bis zu einem zytopathischen Effekt von 100 % kultiviert. Anschließend wurden Zellen und Medium abgenommen und 3 x 10 s sonifiziert.

Die Überprüfung der rekombinanten VV kann mittels PCR oder SDS-PAGE erfolgen. Zur Isolierung der viralen DNA wurden 200 µl des VV-Stocks mit 20 µl 10 mg/ml Proteinase K, 100 µl Proteinase K-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 2 % SDS) und 80 µl sterilem H₂O bei 56 °C über Nacht inkubiert und mit 800 µl Phenol/Chloroform (6:1) versetzt. Eine 3-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm führte zur Extraktion der DNA in die wässrige Phase. Diese wurde abgenommen, mit 1 ml eiskaltem, absolutem Ethanol und 33 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt, 30 min bei -20 °C inkubiert und 30 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das die DNA enthaltende Präzipitat wurde in 15 µl sterilem H₂O resuspendiert und durch PCR analysiert. Die bei der PCR-Analyse eingesetzten Oligonukleotide (tk sense und tk antisense) sind im Abschnitt „PCR“ aufgeführt. Zur Überprüfung durch SDS-PAGE wurden CV1-Zellen mit dem VV-Stock infiziert, 24 h kultiviert und nach der im Abschnitt „SDS-PAGE und Western Blotting“ beschriebenen Vorgehensweise lysiert und analysiert.

Um in Infektionsversuchen mit rekombinantem VV eine definierte MOI einsetzen zu können, muss der VV-Stock titriert werden. Dazu werden CV1-Zellen in 24 Well-Gewebekulturplatten bis zu einer Konfluenz von 60-70 % kultiviert und mit Verdünnungen von 10⁻⁵ bis 10⁻¹⁰ µl VV-Stock / ml Medium in 1:10-Schritten infiziert. Die Auszählung der Plaques erfolgt 36-48 h nach der VV-Infektion. Der Titer wird als PFU (*plaque forming units*) / ml angegeben.

2.2.5 Tierexperimentelle Methoden

Tierstämme

Eingesetzt wurden entweder C57BL/6 x CBA F1 Mäuse mit leberspezifischer NS3/4A-Expression (Frelin et al, Gut 2006, 55, 1475) oder die entsprechenden Kontrollmäuse ohne Transgen. Um eine Hepatozyten-spezifische Expression von NS3/4A zu gewährleisten, wurde die Expression des Transgens unter die Kontrolle des MU (*mouse major urinary*)-Promotors gestellt. Das Vorhandensein des Transgens wurde vor Versuchsbeginn überprüft, indem aus der Schwanzspitze der Tiere mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits von Qiagen die DNA isoliert und mittels PCR gegen das NS3/4A-Transgen analysiert wurde. Die tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten unter Einhaltung des schwedischen Tierschutzgesetzes und standen im Einklang mit den Richtlinien für Tierversuche des Karolinska-Institutes, Stockholm, Schweden.

Analyse muriner Leberproben

Männliche 6-12 Wochen alte Mäuse wurden je nach Versuchsansatz mit 10 ng/g Maus LPS und 1 mg/g Maus D-GalN, 15 ng/g Maus TNF α und 1 mg/g Maus D-GalN, 1000 U/g Maus IFN α oder 400 ng/g Maus IFN γ gelöst jeweils in 100 μ l PBS intraperitoneal gespritzt. Die Vorstimulation mit dem p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 erfolgte durch intraorale Applikation des Inhibitors. Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und die Bauchdecke wurde geöffnet. Nach Entnahme von Blut durch die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) wurde die Leber durch die Pfortader (*Vena portae*) mit PBS (pH 7,4, 4 °C) + 1 mM Na₃VO₄ perfundiert, bis sie blutleer war. Anschließend wurde die Leber entnommen und davon 100-125 mg Gewebe für das Western Blotting eingesetzt.

Zur Herstellung von Vollzelllysaten wurden die Leberproben mit PBS (pH 7,4, 4 °C) + 1 mM Na₃VO₄ gewaschen, mit RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 % Triton-X 100, 1 % Natriumdesoxycholat, 0,2 % SDS, 5 μ g/ml Aprotinin, 5 μ g/ml Leupeptin, 0,2 mM Pefabloc, 0,5 mM DTT und 1 mM Na₃VO₄) versetzt, homogenisiert und sonifiziert.

Zur Herstellung von Zytoplasma- und Kernextrakten wurden die Leberproben erst mit PBS (pH 7,4, 4 °C) + 1 mM Na₃VO₄ gewaschen und anschließend analog dem Abschnitt „Herstellung von Kernextrakten“ weiterverarbeitet, wobei 1 ml Puffer A und 250 µl Puffer C verwendet wurden. Der Überstand, der nach Inkubation der Leberproben in Puffer A sowie der darauf folgenden Zentrifugation erhalten wird, ist ein Zytoplasmaextrakt.

Analyse von Serumproben

Durch Zentrifugation des entnommenen Blutes für 5 min bei 6000 rpm und Abnahme des Überstandes erhält man das Serum der Mäuse. Zur Detektion von murinem IFN γ wurde das Mouse IFN γ ELISA Set (BD OptEIA) von BD Biosciences eingesetzt. Das Vorgehen erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers.

2.2.6 Analyse humaner Leberproben

Humanes Lebergewebe wurde zum Zeitpunkt einer Hemihepatektomie/Lobektomie entnommen, die zur Tumorresektion durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde Lebergewebe, das im Rahmen einer diagnostischen Leberpunktion gewonnen wurde, verwendet. Die Probenentnahme erfolgte nach schriftlicher Einwilligung der Patienten gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie der Deklaration von Helsinki. Die in dieser Arbeit eingesetzten Leberproben wurden aus tumorfreiem Gewebe entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Die Proben 1 und 2 der Kontrollgruppe stammen von erwachsenen Organspendern, deren Lebern nicht vollständig zur Transplantation verwendet wurden und wurden von Professor Martin Burdelski (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung von Vollzelllysaten erfolgte analog dem Abschnitt „Analyse muriner Leberproben“.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die densitometrische Auswertung der durch Western Blotting erhaltenen Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Molecular Imaging Software (Version 4.0.3) von Kodak. Der Quotient der Intensität der phosphorylierten Proteinbande sowie der Bande des entsprechenden unphosphorylierten Proteins wurde berechnet. Der Quotient der Kontrolle wurde 1 gesetzt und der zweite Wert wurde relativ zur Kontrolle angegeben. Standardabweichungen der Kontrollen wurden berechnet, indem die Abweichung der Kontrollen gegenüber dem Mittelwert, der 1 gesetzt wurde, bestimmt wurde. Die Signifikanzen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des Student's t-Tests oder des Tests von Wilcoxon berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 HCV NS3/4A beeinflusst die intrahepatische Signalvermittlung durch Modulation der Zytokin- und Chemokinsekretion

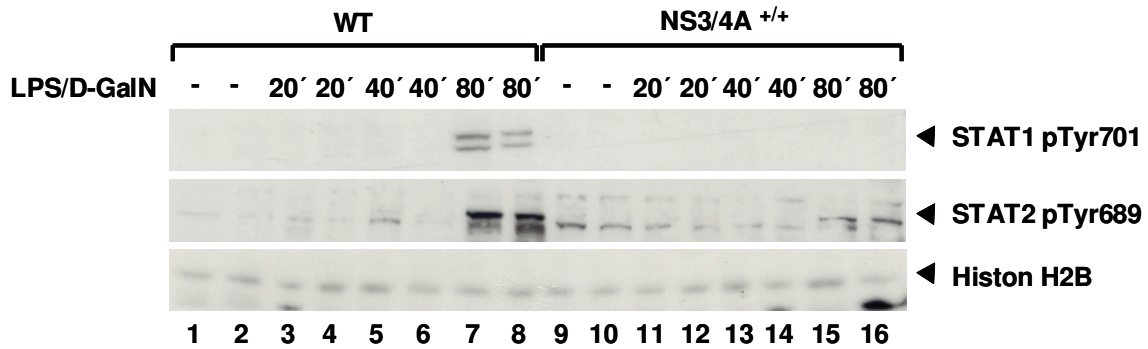
3.1.1 In NS3/4A-transgenen Tieren ist die LPS- bzw. TNF α -induzierte STAT1-Aktivierung unterdrückt

Wie einleitend bereits ausgeführt, ist in Mäusen mit leberspezifischer Expression von NS3/4A im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren der hepatotoxische Effekt einer Behandlung mit LPS/D-GalN oder TNF α /D-GalN deutlich reduziert. Auch weisen Tiere mit leberspezifischer Expression von NS3/4A eine geringere Letalität gegenüber einer für Wild-Typ-Tiere tödlichen Dosis an TNF α /D-GalN auf. Dieser „protektive“ Effekt von NS3/4A war zumindest im Falle der Behandlung mit TNF α /D-GalN von einer Aktivierung der p38^{MAPK} abhängig, da er durch Vorbehandlung der Tiere mit dem p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 aufgehoben wurde ⁶⁶.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an STAT1-defizienten Tieren legen nahe, dass die Aktivierung von STAT1 für die Vermittlung der hepatotoxischen Effekte von LPS verantwortlich ist ^{186, 187}. Eigene Untersuchungen belegen nun, dass in Tieren mit leberspezifischer Expression von NS3/4A die Aktivierung von STAT1 und im Falle von LPS auch von STAT2 nach intraperitonealer Injektion von LPS/D-GalN (Abbildung 3.1A) bzw. von TNF α /D-GalN (Abbildung 3.1B) im Lebergewebe nahezu vollständig gehemmt wird. Diese Experimente legen nahe, dass NS3/4A mit der LPS/TNF α -induzierten Aktivierung von STAT1/2 interferiert und dass diese Hemmung der Aktivierung von STAT1 und eventuell auch von STAT2 für die „protektiven Effekte“ von NS3/4A mitverantwortlich ist. Diese Überlegung wird auch durch die eigene Beobachtung gestützt, dass es analog zu der von Frelin *et al* ⁶⁶ berichteten Aufhebung der protektiven Effekte von NS3/4A durch Hemmung der p38^{MAPK} unter Vorbehandlung der Tiere mit

einem Inhibitor der $p38^{\text{MAPK}}$ auch zur Wiederherstellung der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten STAT1-Aktivierung kommt (Abbildung 3.1B).

A



B

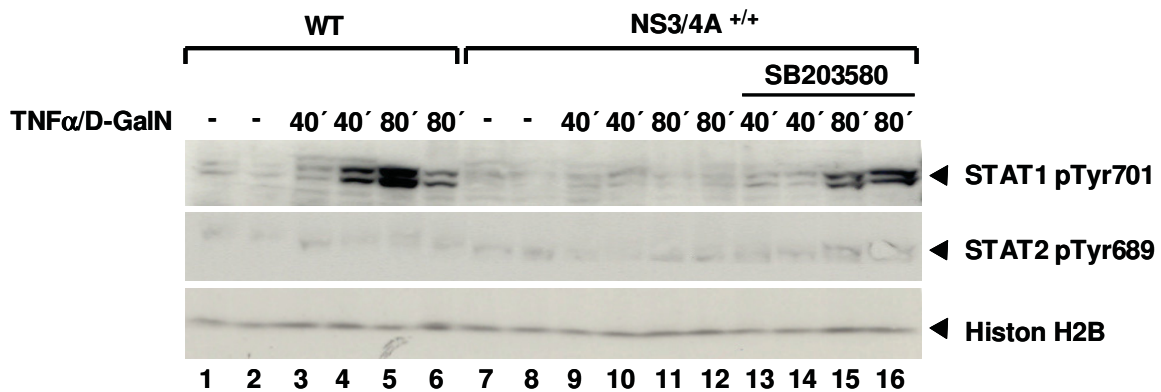


Abbildung 3.1: **Hemmung der LPS/D-GalN- bzw. $\text{TNF}\alpha$ /D-GalN-vermittelten STAT-Aktivierung in NS3/4A-transgenen Mäusen.** Wildtyp-Mäuse bzw. NS3/4A-transgene Mäuse wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 10 ng/g Maus LPS und 1 mg/g Maus D-GalN (A) bzw. 15 ng/g Maus $\text{TNF}\alpha$ und 1 mg/g Maus D-GalN (B) behandelt. Den Tieren 13-16 (B) wurden 30' vor der Applikation von $\text{TNF}\alpha$ /D-GalN 25 $\mu\text{g/g}$ Maus SB203580 gegeben. Aus den Lebern der Tiere wurden Kernextrakte hergestellt, wovon jeweils 80 μg Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert wurden. Mittels spezifischer Antikörper wurden STAT1 pTyr, STAT2 pTyr und Histon H2B (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

3.1.2 In NS3/4A-transgenen Tieren liegt keine Hemmung der interferon-induzierten STAT1-Aktivierung vor

Weder LPS noch $\text{TNF}\alpha$ können direkt die Aktivierung von STAT1 induzieren. Dem gegenwärtigen Kenntnisstand zur Folge spielt *in vivo* sowohl im Falle von LPS als auch von $\text{TNF}\alpha$ die Freisetzung von Interferonen und hierbei insbesondere von $\text{IFN}\gamma$ für die Vermittlung STAT1-abhängiger Effekte eine wesentliche Rolle^{186, 188}. Die beobachtete Hemmung der LPS/ $\text{TNF}\alpha$ -induzierten STAT1-Aktivierung in Lebergewebe von Tieren mit leberspezifischer Expression von NS3/4A wäre somit entweder durch eine direkte Interferenz von NS3/4A mit der IFN-induzierten Aktivierung von STAT1 im Hepatozyten erklärbar oder durch eine Hemmung der LPS/ $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Freisetzung von Interferonen. Ein möglicher molekularer Mechanismus, über den NS3/4A einen direkten inhibitorischen Effekt auf die intrazelluläre Signalvermittlung von Interferonen in Hepatozyten ausüben könnte, wäre insbesondere die Induktion der Expression bzw. Aktivierung von endogenen Inhibitoren der Jak/STAT-vermittelten Signalübertragung wie z.B. Mitgliedern der SOCS-Familie oder von inaktivierenden Phosphatasen wie z.B. SHP2 oder PP2A. Die Tatsache, dass weder die $\text{IFN}\alpha$ - noch die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Signalvermittlung durch die leberspezifische Expression von NS3/4A beeinflusst wird (Abbildung 3.2), legt nahe, dass NS3/4A nicht direkt mit der intrazellulären Signalvermittlung dieser Zytokine interferiert. Dementsprechend findet sich in Leberlysaten NS3/4A-transgener Tiere auch keine signifikant differentielle Regulation endogener Inhibitoren der Jak/STAT-Signalübertragung wie PIAS1, PP2A, SOCS1, SOCS3 oder SHP2 (Daten nicht gezeigt). Die Annahme, dass NS3/4A nicht direkt mit der intrazellulären STAT1-abhängigen Signalübertragung von Interferonen in Hepatozyten interferiert, wird auch durch die Beobachtung bestätigt, dass die STAT1-Aktivierung durch $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$ oder $\text{IFN}\gamma$ in Zelllinien, die das subgenomische HCV-Replikon exprimieren, nicht beeinträchtigt wird (Daten nicht gezeigt).

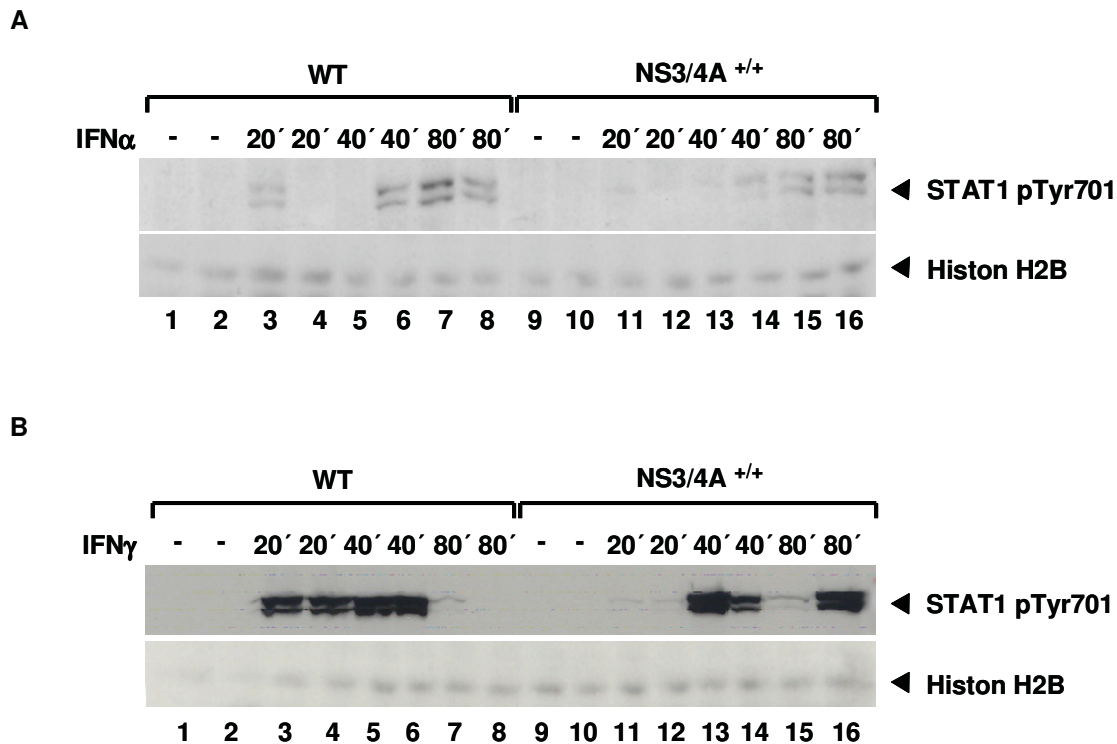


Abbildung 3.2: **Die IFN α - bzw. IFN γ -vermittelte STAT1-Aktivierung ist in NS3/4A-transgenen Mäusen nicht gehemmt.** Wildtyp-Mäuse bzw. NS3/4A-transgene Mäuse wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 1000 U/g Maus IFN α (A) bzw. 400 ng/g Maus IFN γ (B) behandelt. Aus den Lebern der Tiere wurden Kernextrakte hergestellt, wovon jeweils 80 μ g Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert wurden. Mittels spezifischer Antikörper wurden STAT1 pTyr und Histon H2B (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

3.1.3 In NS3/4A-transgenen Tieren ist die Expression von IFN γ gehemmt, es treten jedoch keine Unterschiede bei der IFN α -Expression auf

Der Befund, dass NS3/4A nicht mit der intrazellulären Signalübertragung von Interferonen interferiert, legt nahe, dass NS3/4A in Lebern mit leberspezifischer Expression von NS3/4A mit der TNF α /LPS-induzierten Freisetzung von Faktoren interferiert, die in Hepatozyten zu einer Aktivierung von STAT1 führen. Diese Überlegung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Expression von NS3/4A zu einer signifikanten Änderung der Zusammensetzung der Immunzellpopulation in der Leber führt⁶⁶. Die in Abbildung 3.3 wiedergegebenen Befunde lassen annehmen, dass

die NS3/4A-Expression tatsächlich die Synthese von IFN γ in den Lebern der Tiere nahezu vollständig unterdrückt, während die Expression von IFN α nicht signifikant beeinflusst wird. Die Detektion der IFN γ -Expression erfolgte mittels Western Blot in Leberlysaten, da ein systemischer Anstieg der IFN γ -Spiegel im Serum der Tiere unter den gewählten Versuchsbedingungen mittels ELISA nicht ausreichend zuverlässig bestimmbar war.

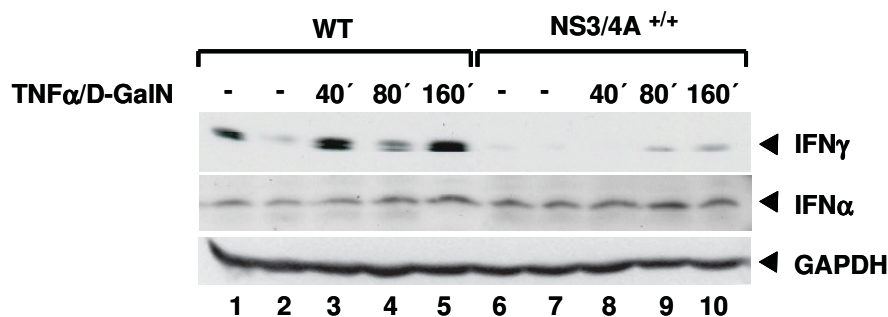


Abbildung 3.3: **Hemmung der IFN γ -Expression in NS3/4A-transgenen Mäusen.** Wildtyp-Mäuse bzw. NS3/4A-transgene Mäuse wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 15 ng/g Maus TNF α und 1 mg/g Maus D-GalN behandelt. Aus den Lebern der Tiere wurden Vollzellextrakte hergestellt, wovon jeweils 80 μ g Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert wurden. Mittels spezifischer Antikörper wurden IFN α , IFN γ und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

3.1.4 Die mCXCL9-Expression ist in NS3/4A-transgenen Mäusen erniedrigt, während mCCL2 und mCCL17 verstärkt exprimiert werden

Da NS3/4A in den eingesetzten transgenen Mäusen ausschließlich in Hepatozyten hergestellt wird, IFN γ typischerweise aber nicht von Hepatozyten exprimiert wird¹⁸⁹, ist davon auszugehen, dass NS3/4A die Freisetzung von Mediatoren, die die Zusammensetzung der Immunzellpopulation in der Leber regulieren, moduliert. Hierbei wären insbesondere die Chemokine CCL2 (MCP1, *monocyte chemo-attractant protein 1*), CCL17 (TARC, *thymus and activation regulated chemokine*) und CXCL9 (Mig, *monokine induced by IFN γ*) zu nennen.

Während CXCL9 in die Rekrutierung von Th1-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen involviert ist, bewirken CCL2 und CCL17 die Rekrutierung von Monozyten und Th2-Zellen in die Leber und die Verstärkung der Th2-Antwort (humorale Immunität) gegenüber der Th1-Antwort (zelluläre Immunität). Vorläufige Befunde legen nahe, dass die Expression von mCXCL9 in der Leber NS3/4A-transgener Tiere verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren erniedrigt ist, während die Expression der Chemokine mCCL2 und mCCL17 erhöht ist (Abbildung 3.4). Über die genannten Chemokine hinaus wurde die intrahepatische Expression der Chemokine mCCL20, mCCL22, mCXCL10, mCXCL11 und mCXCL12 sowie der Chemokinrezeptoren mCCR4, mCCR6, mCXCR3 und mCXCR4 untersucht, hier traten jedoch zwischen NS3/4A-transgenen und Wild-Typ-Mäusen keinen signifikanten Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt).

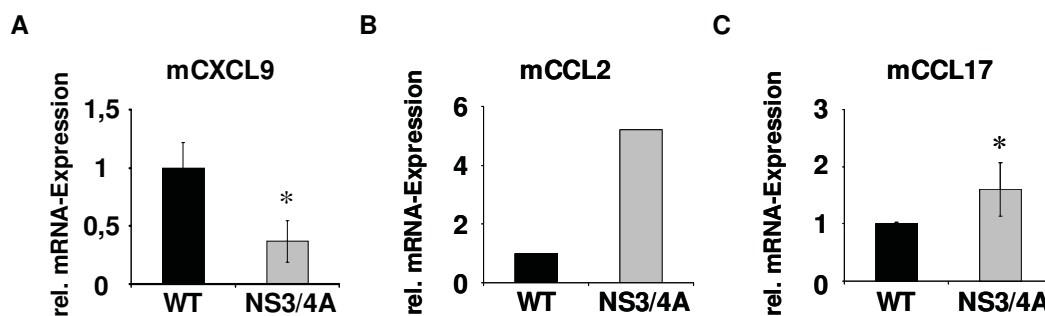


Abbildung 3.4: **Differentielle Expression von mCXCL9, mCCL2 und mCCL17 in NS3/4A-transgenen und Wild-Typ-Mäusen.** Aus den Lebern von Wildtyp-Mäusen bzw. NS3/4A-transgenen Mäusen wurde RNA isoliert und durch Real-Time-PCR auf die Expression von mCXCL9 (A), mCCL17 (B) und mCCL2 (C) analysiert.

Sollten sich diese Daten bei der Analyse einer größeren Anzahl an Mäusen weiter bestätigen, würde NS3/4A einen deutlichen Effekt auf die Expression von mCCL2, mCCL17 und mCXCL9 ausüben. Die veränderte Freisetzung dieser Chemokine hätte somit einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Immunzellpopulation in der Leber und wäre für die Verringerung der IFN γ -Freisetzung und die Hemmung der STAT1-Aktivierung in NS3/4A-transgenen Tieren verantwortlich. Dies würde zu einer Abschwächung der durch Immunzellen vermittelten Hepatitis beitragen und somit auch

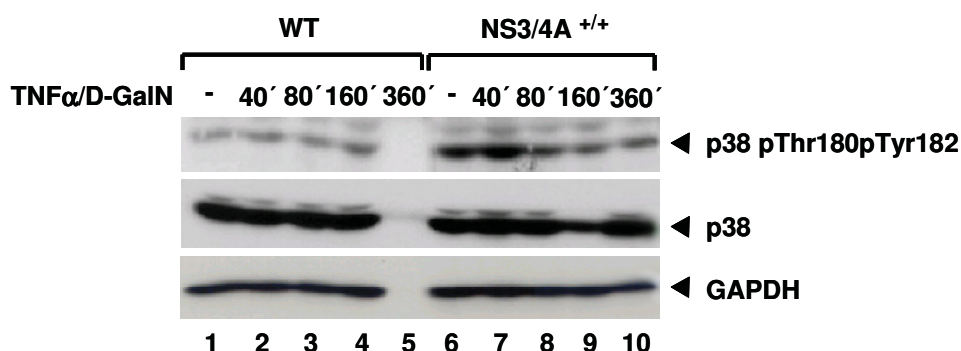
die geringere Hepatotoxizität von LPS/D-GalN und TNF α /D-GalN in NS3/4A-transgenen Mäusen verglichen mit Wild-Typ-Mäusen erklären.

3.1.5 In NS3/4A-transgenen Tieren sowie Huh 9-13-Zellen ist der p38^{MAPK}-Signalweg konstitutiv aktiviert

Da die Hemmung der TNF α -vermittelten STAT1-Aktivierung in NS3/4A-transgenen Tieren nach Vorbehandlung der Tiere mit dem p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 wiederhergestellt werden kann (Abbildung 3.1B), wurde untersucht, ob der p38^{MAPK}-Signalweg in NS3/4A-transgenen-Tieren im Vergleich zu Wild-Typ-Tieren differentiell aktiviert ist.

Wie in Abbildung 3.5A wiedergegeben, fand sich, dass die p38^{MAPK} in NS3/4A-transgenen Mäusen im Gegensatz zu den entsprechenden Kontrollmäusen konstitutiv aktiviert vorliegt. Dieser Befund wird durch die Beobachtung gestützt, dass auch in Zelllinien, die das subgenomische Replikon exprimieren, eine konstitutive Aktivierung der p38^{MAPK} beobachtet werden kann (Abbildung 3.5B). Hiermit übereinstimmend lässt sich in diesen Zellen auch eine konstitutive Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF2 nachweisen (Abbildung 3.6B), der ein direktes Substrat der p38^{MAPK} ist – ein Befund, der sich jedoch in nukleären Extrakten aus Lebern NS3/4A-transgener Mäuse nicht mit Sicherheit belegen lässt, da hier deutliche Varianzen hinsichtlich des Expressionslevels von ATF2 auffallen (Abbildung 3.6A). Dieser Befund ist von Interesse, da p38^{MAPK} in die Expressionsregulation zahlreicher Zytokine und Chemokine involviert ist.

A



B

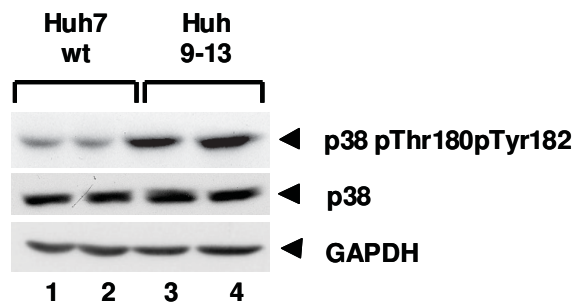
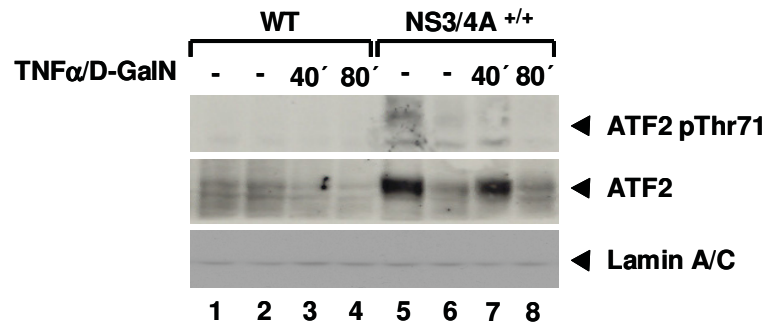


Abbildung 3.5: Konstitutive p38^{MAPK}-Aktivierung in NS3/4A-transgenen Mäusen und in der das subgenomische HCV-Replikon exprimierenden Zelllinie Huh 9-13. **A)** Wildtyp-Mäuse bzw. NS3/4A-transgene Mäuse wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 15 ng/g Maus TNF α und 1 mg/g Maus D-GalN behandelt. Aus den Lebern der Tiere wurden Vollzellextrakte hergestellt, wovon jeweils 80 μ g Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert wurden. **B)** Huh7 wt und Huh 9-13-Zellen wurden lysiert und durch Auftragung von jeweils 30 μ g Protein/Spur durch Western Blot analysiert. **A)** und **B)** Mittels spezifischer Antikörper wurden p38 pThr180pTyr182, p38 und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

A



B

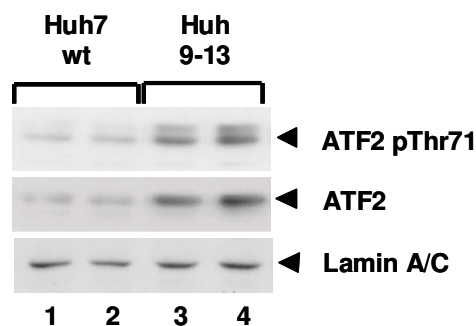


Abbildung 3.6: **Analyse der ATF2-Aktivierung in NS3/4A-transgenen Mäusen und Huh 9-13 Zellen.** **A)** Wildtyp-Mäuse bzw. NS3/4A-transgene Mäuse wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 15 ng/g Maus TNF α und 1 mg/g Maus D-GalN behandelt. Aus den Lebern der Tiere wurden Kernextrakte hergestellt, wovon jeweils 80 μ g Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert wurden. **B)** Aus Huh7 wt und Huh 9-13-Zellen wurden Kernextrakte hergestellt. Diese wurden durch Auftragung von jeweils 20 μ g Protein/Spur durch Western Blot analysiert. **A)** und **B)** Mittels spezifischer Antikörper wurden Phospho-ATF2, ATF2 und Lamin A/C (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

3.1.6 In NS3/4A-transgenen Tieren ist die Aktivierung von NF κ B und STAT3 verstärkt

Der NF κ B- und der STAT3-Signalweg sind weitere Signalwege, die in die Regulation von Apoptose und Zellproliferation involviert sind und zu dem NS3/4A-vermittelten „protektiven“ Effekt beitragen könnten.

Die NF κ B-Untereinheit p65 ist in NS3/4A-transgenen Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen vermehrt exprimiert (Abbildung 3.7). Weiterhin ist in nukleären Extrakten aus Lebern NS3/4A-transgener Mäuse p65 verstärkt vorhanden, was für eine gesteigerte intrahepatische Aktivierung von NF κ B in NS3/4A-transgenen Mäusen spricht (Abbildung 3.8). STAT3 ist in NS3/4A-transgenen Tieren ebenfalls sowohl basal als auch TNF α /D-GalN-bedingt im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren verstärkt aktiviert (Abbildung 3.8).

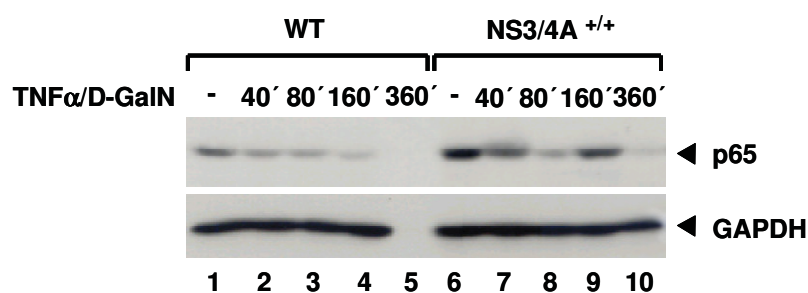


Abbildung 3.7: **Erhöhte NF κ B-Expression in NS3/4A-transgenen Mäusen.** Wildtyp-Mäuse bzw. NS3/4A-transgene Mäuse wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 15 ng/g Maus TNF α und 1 mg/g Maus D-GalN behandelt. Aus den Lebern der Tiere wurden vollständige Zellextrakte hergestellt, wovon jeweils 80 μ g Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert wurden. Mittels spezifischer Antikörper wurden NF κ B p65 und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

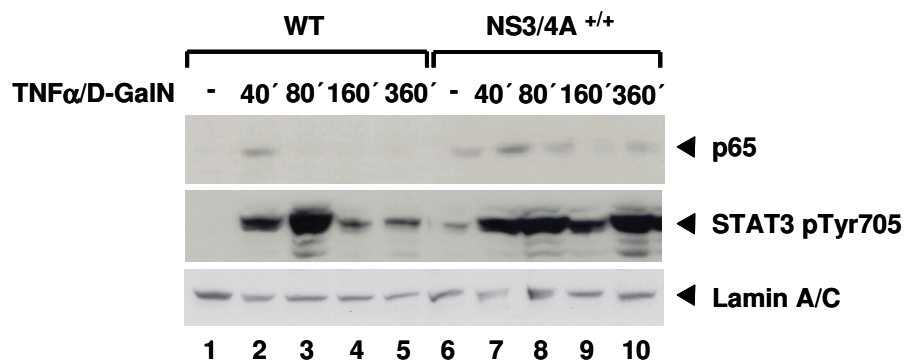


Abbildung 3.8: **Verstärkte NF κ B- und STAT3-Aktivierung in NS3/4A-transgenen Mäusen.** Wildtyp-Mäuse bzw. NS3/4A-transgene Mäuse wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 15 ng/g Maus TNF α und 1 mg/g Maus D-GalN behandelt. Aus den Lebern der Tiere wurden Kernextrakte hergestellt, wovon jeweils 80 μ g Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert wurden. Mittels spezifischer Antikörper wurden NF κ B p65, STAT3 pTyr705 und Lamin A/C (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

Diese Daten sprechen dafür, dass NS3/4A nicht nur die Aktivierung des STAT1-Signalweges hemmt, sondern durch verstärkte Aktivierung von NF κ B und STAT3, die funktionell Gegenspieler von STAT1 sind, antiapoptotische Wirkungen vermittelt, die zur Protektion NS3/4A-exprimierender Hepatozyten beitragen.

3.2 HCV NS3/4A interferiert mit der EGF-induzierten Signalantwort durch Spaltung von TC-PTP

Viren wie das Hepatitis C Virus (HCV), die chronische Infektionen verursachen, müssen Strategien entwickelt haben, in ihren Wirtszellen zu verbleiben und zu replizieren, ohne die essentiellen zellulären Funktionen in einer Art und Weise zu stören, die nicht mehr mit dem Überleben der Wirtszelle vereinbar sind. Im Gegensatz zu Viren, die lytische Infektionen verursachen, muss HCV die in der Zelle vorliegenden Bedingungen erkennen können und sein Verhalten darauf einstellen können. In diesem Zusammenhang sollte z.B. die virale Replikation, so lange die Wirtszelle vital ist, auf niedrigem Niveau ablaufen, aber gesteigert werden können, wenn das Überleben der Wirtszelle nicht mehr gesichert ist. Da einige zelluläre Funktionen für die virale Existenz essentiell sind, sollte HCV also die Fähigkeit besitzen, die entsprechenden Signalwege zu seinem eigenen Vorteil zu beeinflussen. Ein Signalweg, bei dem die Vermutung groß war, dass er den Lebenszyklus von HCV modulieren und gleichzeitig von HCV beeinflusst werden könnte, war der EGF (*epidermal growth factor*)-Signalweg.

EGF ist ein wichtiger Regulator der Proliferation, Differenzierung, Migration sowie des Überlebens epithelialer Zellen, zu denen auch Hepatozyten zählen¹⁰⁹. EGF vermittelt über eine Reihe nachgeschalteter Signalwege entscheidende Schritte der Zellproliferation wie die Kontrolle des Zellzyklus und der Proteinsynthese, die auch für die virale Replikation wichtig sein könnten.

Die Analyse der Wechselbeziehung zwischen HCV und der Signalvermittlung von EGF ist zweiter und Kernteil der vorliegenden Dissertation.

3.2.1 EGF stimuliert die Replikation von HCV

Um zu überprüfen, ob die HCV-Replikation von Wachstumsfaktoren wie EGF beeinflusst wird, wurden Huh 9-13-Zellen mit EGF stimuliert und auf RNA- und Proteinebene analysiert. Huh 9-13-Zellen beruhen auf der Hepatomazelllinie Huh7 und enthalten den HCV-Replikationskomplex bestehend aus den nichtstrukturellen Proteinen NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B⁴⁵. Wie in Abbildung 3.9 zu sehen, führt die Stimulation dieser

Zellen mit EGF zu einer gesteigerten Replikation des subgenomischen Replikons, was durch Real-Time-PCR mit Hilfe von spezifischen Primern gegen virale RNA (HCV NS3) gezeigt wurde. Neben der Steigerung der viralen RNA konnte auch eine erhöhte Expression viraler Proteine wie NS3 beobachtet werden (Abbildung 3.9).

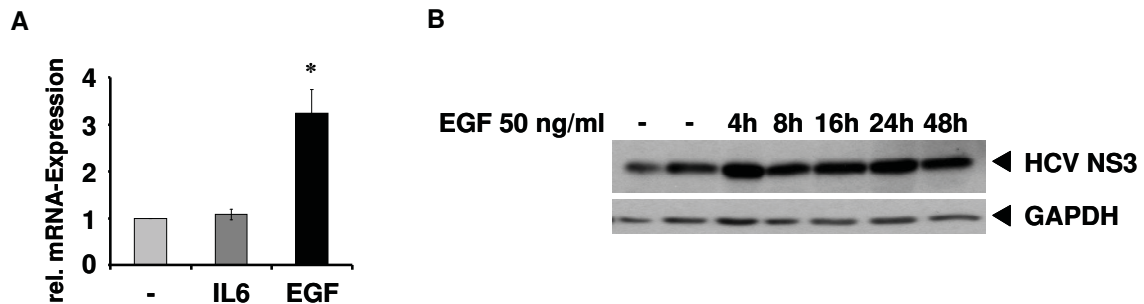


Abbildung 3.9: **EGF verstärkt die Replikation eines subgenomischen HCV-Replikons.**

A) Huh 9-13-Zellen wurden mit IL6 (200 U/ml) oder EGF (50 ng/ml) für 24 Stunden stimuliert. Danach wurde die RNA isoliert und durch Real-Time-PCR wurde die Expression von NS3 bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Der Wert der Kontrolle wurde 1 gesetzt und die weiteren Werte wurden darauf bezogen. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage dreier unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests berechnet ($p < 0.05$). **B)** Huh 9-13-Zellen wurden mit EGF stimuliert und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Jeweils 30 μ g Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden HCV NS3 und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

EGF induziert somit zelluläre Signalkaskaden, die eine Steigerung der viralen Replikation zur Folge haben. Es stellte sich nun die Frage, ob HCV umgekehrt die Fähigkeit entwickelt hat, die EGF-Signalantwort zu manipulieren, um entweder EGF-vermittelte Effekte auf die HCV-Replikation zu verstärken oder für die virale Replikation essentielle Bestandteile der EGF-Signalkaskade konstitutiv zu aktivieren.

3.2.2 HCV sensitiviert Zellen für die EGF-Signalantwort

Neben der Aktivierung von MAP(*mitogen-activated protein*)-Kinasen und STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Molekülen vermittelt EGF seine zellulären Effekte vor allem über das Anschalten zweier Signalkaskaden. Erstens wird durch

Phosphorylierung der Tyrosinstellen 992 und 1173 im zytoplasmatischen Bereich des EGF-Rezeptors die PLC (Phospholipase C) γ -Signalkaskade aktiviert, zweitens durch Phosphorylierung der Tyrosine 1068 und 1086 der PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase)/Akt-Signalweg. Die Phosphorylierung des Tyrosinmotivs 845 in der Kinasedomäne von EGFR stabilisiert den Rezeptor im aktivierten Zustand und hat eine Steigerung der Kinaseaktivität von EGFR zur Folge¹⁹⁰.

In den das HCV-Replikon enthaltenden Huh 9-13-Zellen war im Vergleich zur Kontrollzelllinie Huh7 die EGF-induzierte Phosphorylierung der Tyrosinstellen 845, 992, 1068 und 1173 verstärkt, während sich bei der Aktivierung der Tyrosinstelle 1045 kein Unterschied ergab (Abbildung 3.10). Die Phosphorylierung dieses Tyrosinmotivs hat Cbl-abhängig die Ubiquitinylierung und Degradation von EGFR zur Folge.

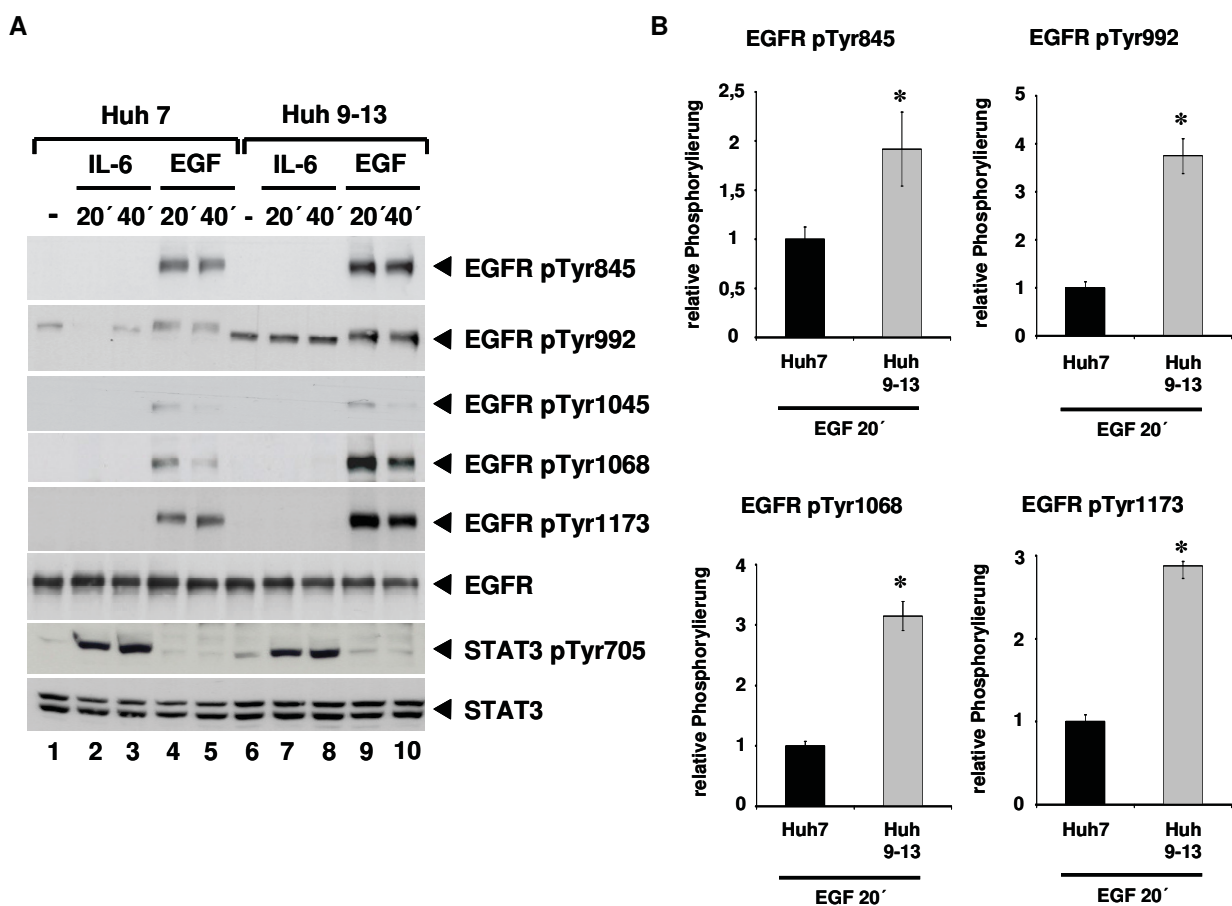


Abbildung 3.10: **HCV sensitiviert Zellen für die EGF-Signalantwort.** **A)** Huh7 und Huh 9-13-Zellen wurden mit 200 U/ml IL6 oder 100 ng/ml EGF für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert, jeweils 30 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurde die Phosphorylierung von EGFR an den Tyrosinstellen 845, 992, 1045, 1068 und 1173 sowie die Phosphorylierung von STAT3 an Tyrosin 705 nachgewiesen. Als Beladungskontrolle wurden Antikörper gegen EGFR und STAT3 eingesetzt. **B)** Die densitometrische Auswertung der EGFR-Phosphorylierung nach 20minütiger Stimulation mit 100 ng/ml EGF wurde auf die entsprechenden Werte für EGFR bezogen. Die Ergebnisse werden relativ zur auf 1 gesetzten Kontrolle dargestellt. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage dreier unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests berechnet ($p < 0.05$).

Die EGF-abhängige Aktivierung von PLC γ , dargestellt durch Phosphorylierung an Tyrosin 771, war in Huh 9-13 ebenfalls verstärkt (Abbildung 3.11). Die Aktivierung von Akt an Serin 473 war in Huh 9-13-Zellen gegenüber Huh7 bereits basal erhöht, ein Effekt, der durch EGF-Stimulation eine weitere Steigerung erfuhr (Abbildung 3.12).

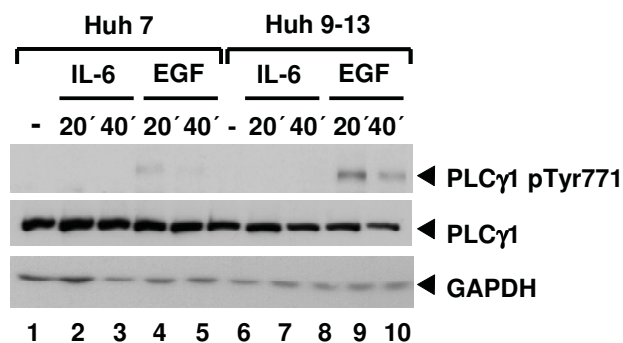


Abbildung 3.11: **HCV verstärkt die EGF-induzierte PLC γ -Aktivierung.** Huh7 und Huh 9-13-Zellen wurden mit 200 U/ml IL6 oder 100 ng/ml EGF für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Danach wurden Vollzellextrakte hergestellt, jeweils 30 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden an Tyrosin 771 phosphoryliertes PLC γ 1 sowie als Beladungskontrolle PLC γ 1 und GAPDH nachgewiesen.

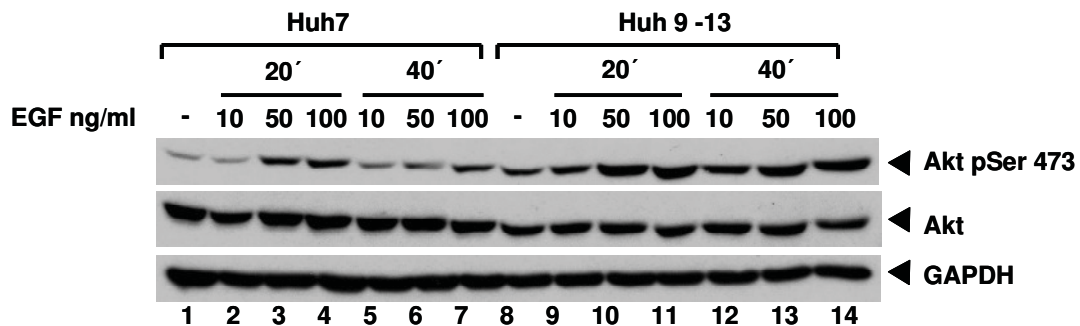


Abbildung 3.12: **HCV verstärkt die basale sowie die EGF-induzierte Akt-Aktivierung.** Huh7 und Huh 9-13-Zellen wurden mit 10-100 ng/ml EGF für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Danach wurden Vollzellextrakte hergestellt, jeweils 30 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden an Serin 473 phosphoryliertes Akt sowie als Beladungskontrolle Akt und GAPDH nachgewiesen.

Die Hemmung der EGFR-Kinaseaktivität durch AG1478 führt zu einer vollständigen Inhibierung der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors an Tyr845 und Tyr1068 sowie der EGF-bedingten Phosphorylierung von Akt an Ser473 (Abbildung 3.13). Die Tatsache, dass die Hemmung der EGFR-Kinaseaktivität durch AG1478 keinen Einfluss auf die in Huh 9-13-Zellen verstärkte Akt-Phosphorylierung an Ser473 ausübt, deutet darauf hin, dass diese von der Aktivität des EGF-Rezeptors unabhängig ist.

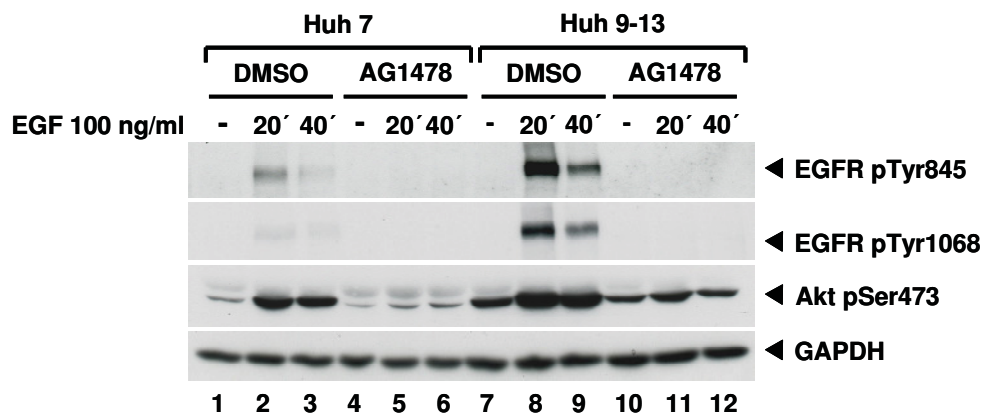


Abbildung 3.13: **Die HCV-bedingte Verstärkung der basalen Akt-Aktivierung ist unabhängig von der Aktivität der EGFR-Kinase.** Huh7 und Huh 9-13-Zellen wurden mit 10 µM AG1478 oder DMSO als Kontrolle für 16 h vorbehandelt und mit 100 ng/ml EGF für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Danach wurden Vollzellextrakte hergestellt, jeweils 40 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden an Tyrosin 845 bzw. 1068 phosphorylierter EGFR, an Serin 473 phosphoryliertes Akt und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

Die Präsenz des HCV-Replikationskomplexes sensitiviert somit die Wirtszelle für den EGF-Signalweg und führt zu einer verstärkten EGF-induzierten Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Zusätzlich dazu tritt HCV-bedingt eine konstitutive Aktivierung der Kinase Akt auf.

3.2.3 HCV supprimiert NS3/4A-abhängig die Expression von TC-PTP

Die erhöhte EGF-induzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors kann einerseits durch verstärkte Aktivierung des Rezeptors andererseits durch Supprimierung von Negativregulatoren erreicht werden. Neben der Inhibierung der EGFR-Signalantwort durch Internalisierung spielt die Negativregulation durch endogene Inhibitoren wie zelluläre Phosphatasen eine wichtige Rolle. Außer für SHP(*src-homology phosphatase*)2¹²⁴ und PTP(*protein tyrosine phosphatase*)1B¹²⁵ konnte für die Tyrosinphosphatase TC-PTP (*T-cell protein tyrosine phosphatase*) belegt werden, dass sie EGFR dephosphoryliert^{126, 127}. Wie in Abbildung 3.14 gezeigt, sind die Proteinlevel von TC-PTP in Zellen, die das subgenomische Replikon exprimieren, deutlich herabreguliert, während die Expression von SHP2 und PTP1B in diesen Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen nicht signifikant verändert ist.

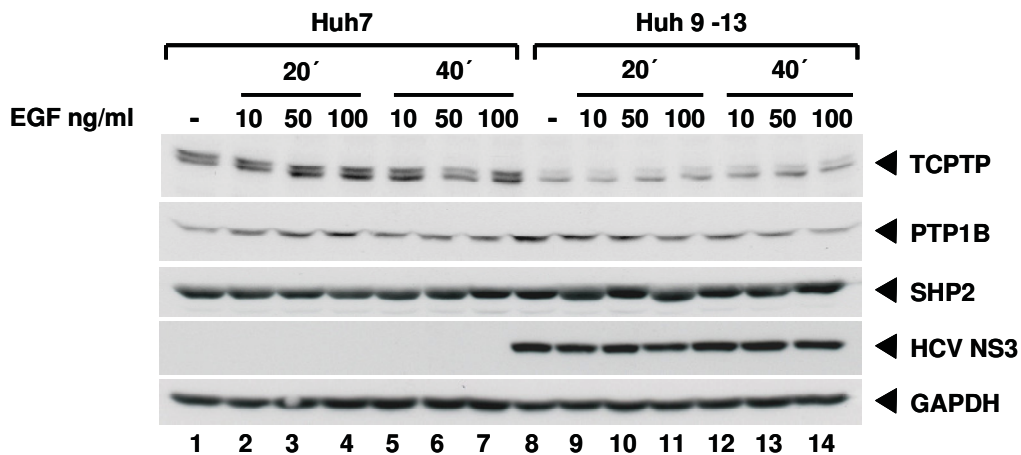


Abbildung 3.14: **Verringerung der TC-PTP-Proteinmenge durch das HCV-Replikon.** Huh7 und Huh 9-13-Zellen wurden mit 10-100 ng/ml EGF für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Danach wurden Vollzellextrakte hergestellt, jeweils 30 μ g Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden PTP1B, SHP2, TC-PTP und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

Die Tatsache, dass durch Behandlung der Huh 9-13-Zellen mit $\text{IFN}\alpha$, die die Entfernung des HCV-Replikons aus diesen Zellen bewirkt, die Proteinlevel von TC-PTP vollständig wiederhergestellt werden können, belegt, dass das HCV-Replikon für die Hemmung der TC-PTP-Expression verantwortlich ist (Abbildung 3.15).

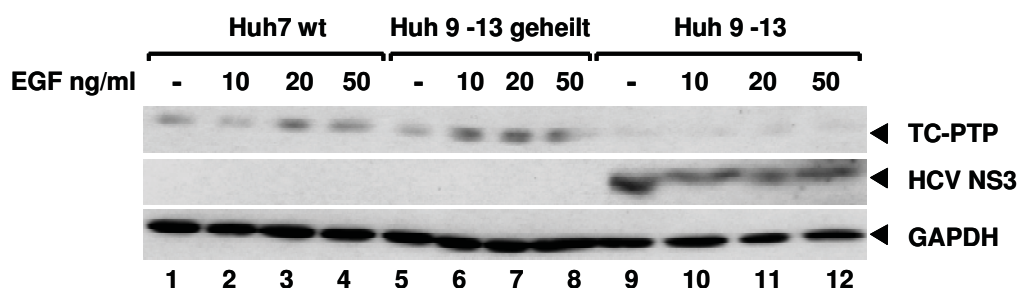


Abbildung 3.15: **Wiederherstellung der TC-PTP-Expression durch Heilung der Huh 9-13-Zellen vom HCV-Replikon.** Huh 9-13-Zellen wurden durch Behandlung mit $\text{IFN}\alpha$ vom HCV-Replikon geheilt und mit unbehandelten Huh 9-13-Zellen und der entsprechenden Kontrollzelllinie (Huh7) verglichen. Die Zellen wurden unstimuliert belassen oder mit 10-50 ng/ml EGF für 20' inkubiert. Danach wurden Vollzellextrakte hergestellt, jeweils 30 μ g Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden HCV NS3, TC-PTP und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

Da die TC-PTP-mRNA-Spiegel in Huh 9-13-Zellen und den entsprechenden Kontrollzellen gleich hoch sind, ist davon auszugehen, dass eine Änderung der Genexpression nicht für die Herabregulation der Proteinlevel von TC-PTP verantwortlich ist (Abbildung 3.16A). Es ist daher wahrscheinlich, dass HCV die TC-PTP-Expression auf posttranskriptioneller Ebene beeinflusst.

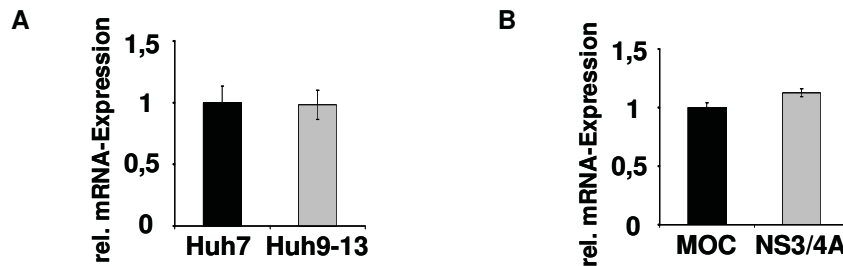


Abbildung 3.16: **HCV hemmt TC-PTP nicht auf Transkriptionsebene.** Aus Huh7 und Huh 9-13-Zellen (**A**) bzw. HepG2 MOC und HepG2 NS3/4A Zellen (**B**) wurde die RNA isoliert und durch Real-Time-PCR wurde die Expression von TC-PTP bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Der Wert der Kontrolle wurde 1 gesetzt und der zweite Wert wurde relativ dazu angegeben. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage dreier unabhängiger Experimente erstellt.

Ein durch HCV kodierte Protein, von dem vermutet wurde, dass es in die Regulation der TC-PTP-Expression involviert sein könnte, ist die NS3/4A Protease/Helikase. So ist belegt, dass HCV über eine NS3/4A-abhängige proteolytische Spaltung die Proteinspiegel anderer zellulärer Proteine wie CARDIF und TRIF in der Wirtszelle direkt beeinflusst und hierdurch Mechanismen der angeborenen antiviralen Immunität hemmt⁶¹⁻⁶³. Für die Untersuchung, ob NS3/4A in die Supprimierung der TC-PTP-Expression durch HCV involviert ist, wurden stabil NS3/4A exprimierende Zellen eingesetzt, wobei als Zelllinie HepG2 gewählt wurde, da diese verglichen mit Huh7 eine hepatozytenspezifischere Zellmorphologie und Genexpression aufweist. Hierbei wurde zunächst versucht, Zelllinien zu etablieren, die NS3/4A konditional Tetrazyklin-abhängig exprimieren, wobei in keinem der analysierten Klone eine vollständige Suppression des Transgens über Tetrazyklin erreicht werden konnte. Es wurden im weiteren Verlauf daher HepG2-Zellen mit konstitutiver NS3/4A-Expression eingesetzt, in die NS3/4A über retroviralen Gentransfer eingebracht worden war. Die an diesen Zellen erhobenen Befunde entsprechen den Beobachtungen, die an Zellen gemacht wurden, die das

HCV-Replikon exprimieren. So ist die TC-PTP-Expression auch in stabil NS3/4A exprimierenden HepG2-Zellen nachhaltig erniedrigt und dies korreliert mit einer verstärkten basalen Aktivierung von Akt sowie einer Verstärkung der EGF-induzierten Aktivierung von Akt- und PLC γ (Abbildung 3.17). Wie in Huh 9-13-Zellen ist auch in HepG2 NS3/4A-Zellen die Menge an TC-PTP-mRNA verglichen mit den Kontrollzellen nicht erniedrigt, so dass auch hier eher von einer Regulation der TC-PTP Expression auf posttranskriptioneller Ebene auszugehen ist (Abbildung 3.16B).

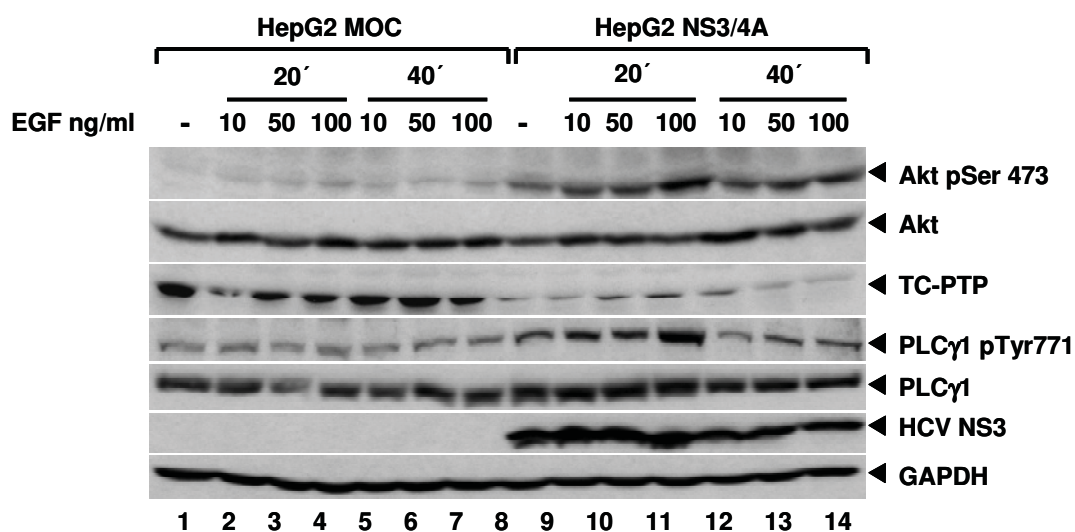


Abbildung 3.17: **HCV NS3/4A reguliert die TC-PTP-Proteinmenge herunter, verstärkt die basale Akt-Aktivierung und sensitiviert Zellen für EGF.** HepG2 MOC und HepG2 NS3/4A Zellen wurden mit 10-100 ng/ml EGF für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Danach wurden Vollzellextrakte hergestellt, jeweils 30 μ g Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden an Serin 473 phosphoryliertes Akt, an Tyrosin 771 phosphoryliertes PLC γ 1, HCV NS3, TC-PTP sowie als Beladungskontrolle Akt, PLC γ 1 und GAPDH nachgewiesen.

Diese Daten konnten durch die Analyse von Lebergewebe aus transgenen Mäusen mit leberspezifischer NS3/4A-Expression bestätigt werden. Auch in NS3/4A-transgenen Mäusen tritt im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollmäusen eine starke Reduktion der TC-PTP-Expression auf (Abbildung 3.18). Der EGF-Rezeptor ist in diesen Tieren bereits basal an den Tyrosinstellen 845, 992, 1068 und 1173 phosphoryliert, daneben ist auch Akt konstitutiv aktiviert (Abbildung 3.18).

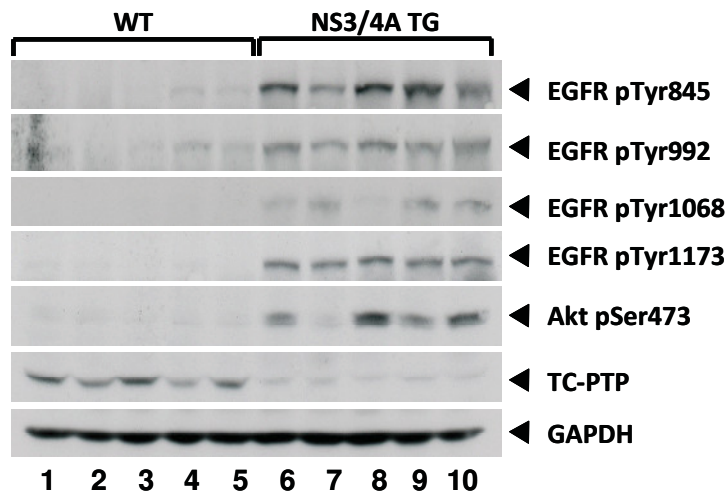


Abbildung 3.18: **Herunterregulation der TC-PTP-Proteinmenge sowie verstärkte Akt- und EGFR-Aktivierung in Mäusen mit leberspezifischer NS3/4A-Expression.** Aus Lebern NS3/4A-transgener Mäuse sowie der entsprechenden Kontrollmäuse wurden Vollzelllysate hergestellt, davon wurden 100 µg Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden die Phosphorylierung von EGFR an den Tyrosinstellen 845, 992, 1068 und 1173, die Phosphorylierung von Akt an Serin 473, TC-PTP und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

Dass die TC-PTP-Expression in der Gegenwart von HCV eine deutliche Verringerung erfährt, konnte weiterhin durch die Analyse von Proben aus HCV-infizierten Patienten belegt werden (Tabelle 3.1). In Proteinextrakten aus Lebergewebe von fünf chronisch HCV-infizierten Patientien war die TC-PTP-Expression gegenüber den entsprechenden Kontrollen um ein Vielfaches erniedrigt (Abbildung 3.19.A). Die densitometrische Analyse zeigte, dass die TC-PTP-Proteinmenge HCV-bedingt nur noch 1,5% des in den Kontrollen erhaltenen Wertes betrug (Abbildung 3.19.B). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass die TC-PTP-Expression in den Lebern von Patienten mit chronischer HCV-Infektion substanziell erniedrigt ist.

Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose	Histologie	ALT	Bilirubin	Quick
3	weiblich	63	NASH, HCC	IV	13	0,6	89
4	männlich	64	C2-Abusus, HCC	0	15	0,4	84
5	weiblich	69	HCC	0	40	0,5	104
6	weiblich	29	HBV, HCC	II	84	0,4	95
7	männlich	58	HCV (1b)	IV	132	0,7	107
8	weiblich	42	HCV (1b)	0	28	0,4	101
9	weiblich	51	HCV (1b)	0	24	0,7	101
10	männlich	44	HCV (1b)	II	18	0,8	104
11	weiblich	64	HCV (1b), HCC	IV	95	0,9	103

Tabelle 3.1: **Patientendaten zu den in Abbildung 3.27 eingesetzten humanen Leberproben.** Durch histologische Analyse der Leberproben konnte keine (0), eine minimale (I), eine mittlere (II) oder eine schwere (III) Fibrose bzw. gar eine Zirrhose (IV) nachgewiesen werden. Abkürzungen: C2, Alkohol; HBV, Infektion mit Hepatitis B Virus; NASH, nichtalkoholische Steatohepatitis; ALT, Alanin-Aminotransferase. Die Normwerte lauten: Bilirubin < 1.1 mg/dl, ALT < 23 U/l und Quick 70% - 110%. Die Proben 1 und 2 werden im Material und Methoden-Abschnitt beschrieben.

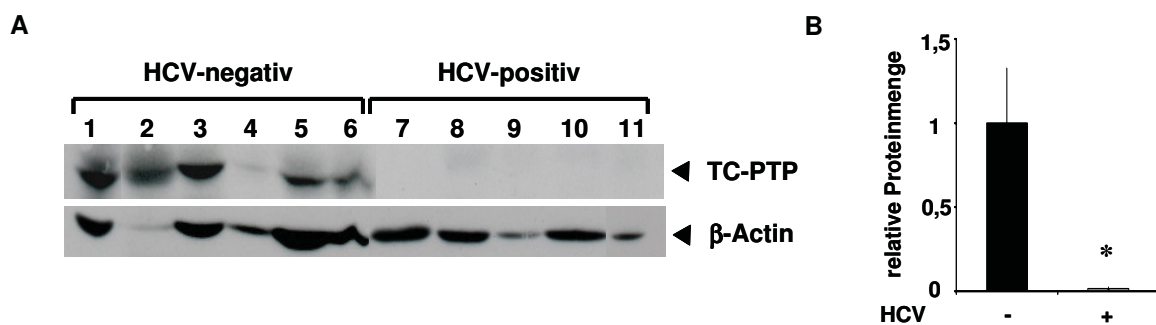


Abbildung 3.19: **Verringerte TC-PTP-Proteinmenge in Patienten mit chronischer HCV-Infektion.** **A)** Aus Lebergewebe von HCV-infizierten Patienten sowie den entsprechenden Kontrollen wurden Vollzelllysate hergestellt, davon wurden 30 µg Protein/Spur aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden TC-PTP und β-Actin (Beladungskontrolle) nachgewiesen. **B)** Densitometrische Auswertung der TC-PTP-Banden bezogen auf die entsprechenden β-Actin-Banden. Der Wert der Kontrolle wurde 1 gesetzt und der zweite Wert wurde relativ dazu angegeben. Die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests berechnet ($p < 0.05$).

Zur Klärung, ob TC-PTP ein Substrat der NS3/4A-Protease ist, wurde ein *in vitro*-Assay mit rekombinanter funktioneller und mutierter NS3/4A ohne Proteaseaktivität durchgeführt. Um ausreichende TC-PTP-Mengen zur Verfügung zu haben, wurden Lysate aus mit einem TC-PTP exprimierenden Vektor transfizierten Huh7-Zellen eingesetzt. Abbildung 3.20 zeigt, dass die TC-PTP-Proteinmenge

konzentrationsabhängig abnimmt, wenn die Zellysate mit unterschiedlichen NS3/4A-Konzentrationen inkubiert werden, aber keine Änderung erfährt, wenn die mutierte NS3/4A ohne Proteasaktivität verwendet wird. Parallel zur Abnahme der TC-PTP-Proteinmenge erscheint auf einer Höhe von etwa 22 kD eine Bande, die vom TC-PTP-Antikörper erkannt wird und somit wahrscheinlich einem TC-PTP-Spaltprodukt entspricht. Diese Bande ist jedoch nur im *in vitro* Experiment und nicht in den durchgeführten Zellkulturexperimenten zu sehen, da die endogenen TC-PTP-Proteinmengen dafür scheinbar zu gering sind.

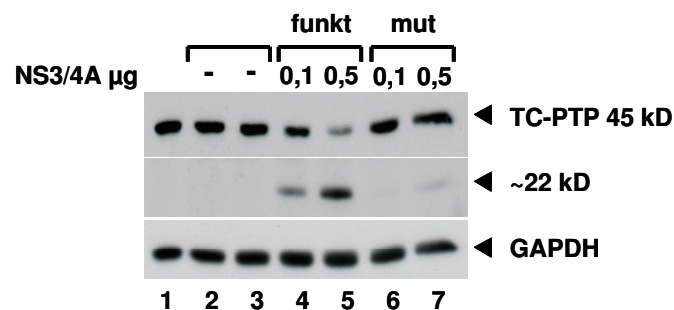


Abbildung 3.20: **Spaltung von TC-PTP in einem *in vitro*-Cleavage-Assay mit rekombinalem NS3/4A.** Huh7 Zellen wurden mit 2,5 µg des Expressionsvektors p3XFlag-hnTC-PTP transfiziert. 48h danach wurden Vollzellysate hergestellt und in einem Proteaseassay mit den angegebenen Mengen an funktionellem NS3/4A (funkt) oder mutiertem NS3/4A mit gestörter Proteaseaktivität (mut) versetzt. Nach 3h wurde die Reaktion gestoppt und 50 µg Protein/Spur wurden durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden TC-PTP und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

3.2.4 Der Knockdown von TC-PTP führt zu verstärkter EGF-induzierter Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und zu erhöhter basaler und EGF-induzierter Akt-Aktivierung

Bisherige Publikationen berichten, dass TC-PTP die EGF-induzierte EGFR-Phosphorylierung und die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege wie dem PI3K/Akt-Weg in Cos1-Zellen, HeLa-Zellen und murinen Fibroblasten hemmt^{126, 127, 191}. Um zu untersuchen, ob die Hemmung der TC-PTP-Expression auch in Hepatoma-Zelllinien die EGF-Signalkaskade verstärkt, wurden Huh7-Zellen mit spezifisch gegen humanes TC-

PTP gerichteter siRNA transfiziert, die Transfektion mit GFP siRNA diene als Kontrolle. Der spezifische Knockdown von TC-PTP hatte eine erhöhte EGF-induzierte Phosphorylierung des EGFR-Rezeptors an den Tyrosinstellen 845, 992, 1068 und 1173 zur Folge, jedoch keine konstitutive Phosphorylierung von EGFR unter basalen Bedingungen (Abbildung 3.21). Daneben führte die Behandlung von Huh7 mit TC-PTP siRNA zu einer verstärkten EGF-induzierten Akt-Aktivierung. Die Supprimierung der TC-PTP-Expression resultierte zusätzlich zur Erhöhung der EGF-induzierten Akt-Aktivierung auch in einer gesteigerten basalen Akt-Phosphorylierung (Abbildung 3.21). TC-PTP ist also in der Lage, Akt auch in Abwesenheit von EGF durch einen EGFR-unabhängigen Mechanismus zu aktivieren.

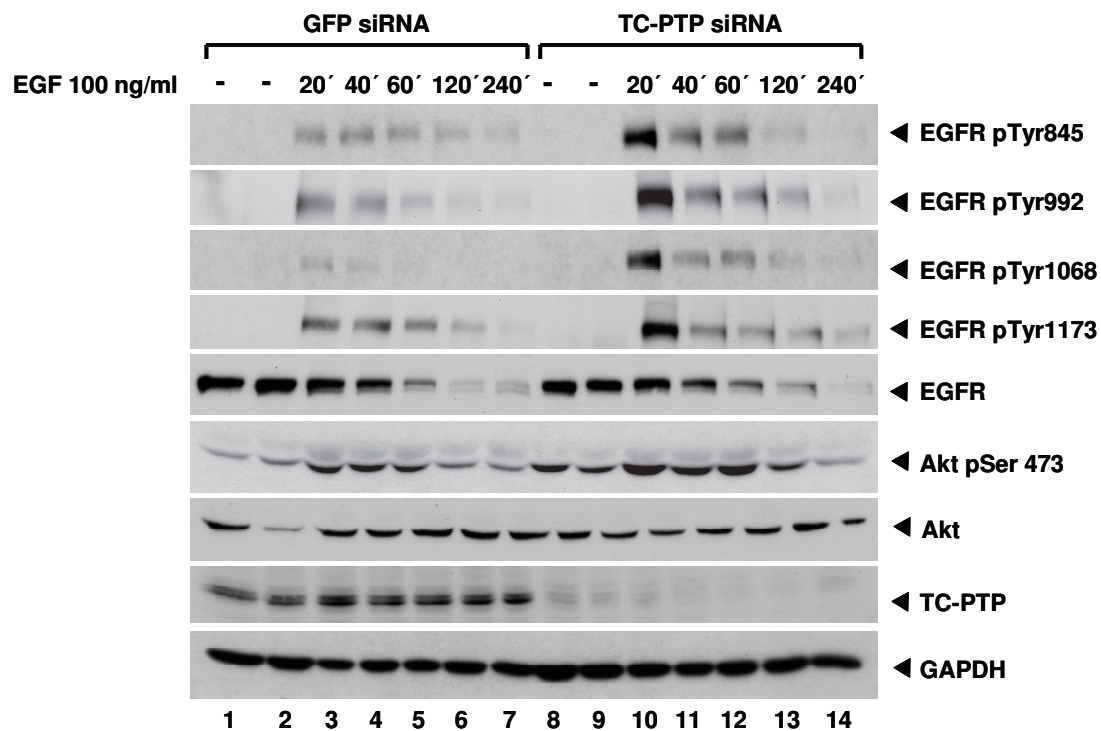


Abbildung 3.21: **TC-PTP hemmt die EGF-abhängige Signalantwort und die basale Akt-Aktivierung.** Huh7 Zellen wurden mit für TC-PTP spezifischen siRNA oder als Kontrolle mit GFP siRNA transfiziert und mit 100 ng/ml EGF für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert, jeweils 30 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurde die Phosphorylierung von EGFR an den Tyrosinstellen 845, 992, 1068 und 1173, die Phosphorylierung von Akt an Serin 473, TC-PTP, EGFR, Akt und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

3.2.5 TC-PTP reguliert die Akt-Aktivierung durch Dephosphorylierung von PP2A

Die basale Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 ist in mit TC-PTP siRNA transfizierten Huh7 gegenüber der Kontrolle erhöht (Abbildung 3.21 und 3.22) und tritt in den das HCV-Replikon enthaltenden Huh 9-13-Zellen verglichen mit Huh7 ebenfalls verstärkt auf (Abbildung 3.12, 3.13 und 3.23).

Ein Signalweg, der für die EGF-unabhängige Aktivierung von Akt in Frage kommen könnte, ist der c-Src-Signalweg. C-Src wird in murinen embryonalen Fibroblasten von TC-PTP an Tyrosin 418 dephosphoryliert¹⁹² und verstärkt die Akt-Aktivität durch Phosphorylierung spezifischer Tyrosinmotive, z.B. Tyrosin 326¹⁵⁸. Weder die c-Src-Phosphorylierung an Tyrosin 418 noch die Akt-Phosphorylierung an Tyrosin 326 sind jedoch im Vergleich der mit TC-PTP siRNA mit den mit GFP siRNA transfizierten Huh7 differentiell reguliert (Abbildung 3.22). Auch die das HCV-Replikon exprimierenden Huh 9-13-Zellen zeigen gegenüber Huh7 keinen Unterschied in der Phosphorylierung von Src Tyr418 oder Akt Tyr326 (Abbildung 3.23). Neben der Aktivierung durch Phosphorylierung an Tyrosin 418, kann c-Src durch Phosphorylierung an Tyrosin 529 inhibiert werden. Diese war ebenfalls weder durch TC-PTP siRNA noch durch Expression des HCV-Replikons verändert (Abbildung 3.22 und 3.23). Dies weist darauf hin, dass c-Src für die konstitutive Aktivierung von Akt nicht relevant ist.

Ein weiterer Mechanismus, der für die konstitutive Akt-Aktivierung verantwortlich sein könnte, ist die Störung der negativen Feedback-Kontrolle. Einer der wichtigsten negativen Regulatoren des Akt-Signalweges ist PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*). PTEN wird durch Phosphorylierung an Serin 380 sowie Threonin 382 und 383 stabilisiert, was zu einer Erhöhung der Phosphatase-Aktivität von PTEN führt. Um zu untersuchen, ob die PTEN-Aktivität in Abwesenheit von TC-PTP oder in Anwesenheit von HCV-Proteinen erniedrigt ist, wurde die Phosphorylierung von PTEN an Serin 380 sowie Threonin 382 und 383 in Zellen, in denen die TC-PTP-Expression durch spezifische siRNA supprimiert wurde oder in Zellen, die das HCV-Replikon exprimieren, analysiert. In beiden Experimenten war die PTEN-Phosphorylierung gegenüber den Kontrollen nicht verändert (Abbildung 3.22 und 3.23). Die Steigerung der Akt-Aktivierung ist somit auch nicht eine Folge der Inhibierung der PTEN-Aktivität.

Eine weitere Phosphatase, die den Akt-Signalweg negativ beeinflusst, ist PP (*protein phosphatase*)2A. PP2A inaktiviert Akt, indem es Akt vor allem an Threonin 308 dephosphoryliert¹⁵⁹. PP2A selber wird durch Phosphorylierung an der Tyrosinstelle 307 inaktiviert^{193, 194}. Eine verstärkte Phosphorylierung von PP2A an Tyrosin 307 würde somit die PP2A-Aktivität verringern und in einer erhöhten Akt-Aktivierung resultieren. Diese PP2A-Phosphorylierung an Tyrosin 307 ist in mit TC-PTP transfizierten Huh7 gegenüber der Kontrolle erhöht (Abbildung 3.22) und tritt in den das HCV-Replikon enthaltenden Huh 9-13-Zellen verglichen mit Huh7 ebenfalls verstärkt auf (Abbildung 3.23). Die Supprimierung der TC-PTP-Expression hat demzufolge eine Erhöhung der PP2A-Phosphorylierung an Tyrosin 307 zur Folge, die zumindest zum Teil eine Erklärung für die Verstärkung der basalen Akt-Aktivierung bei verringerter TC-PTP-Expression bietet.

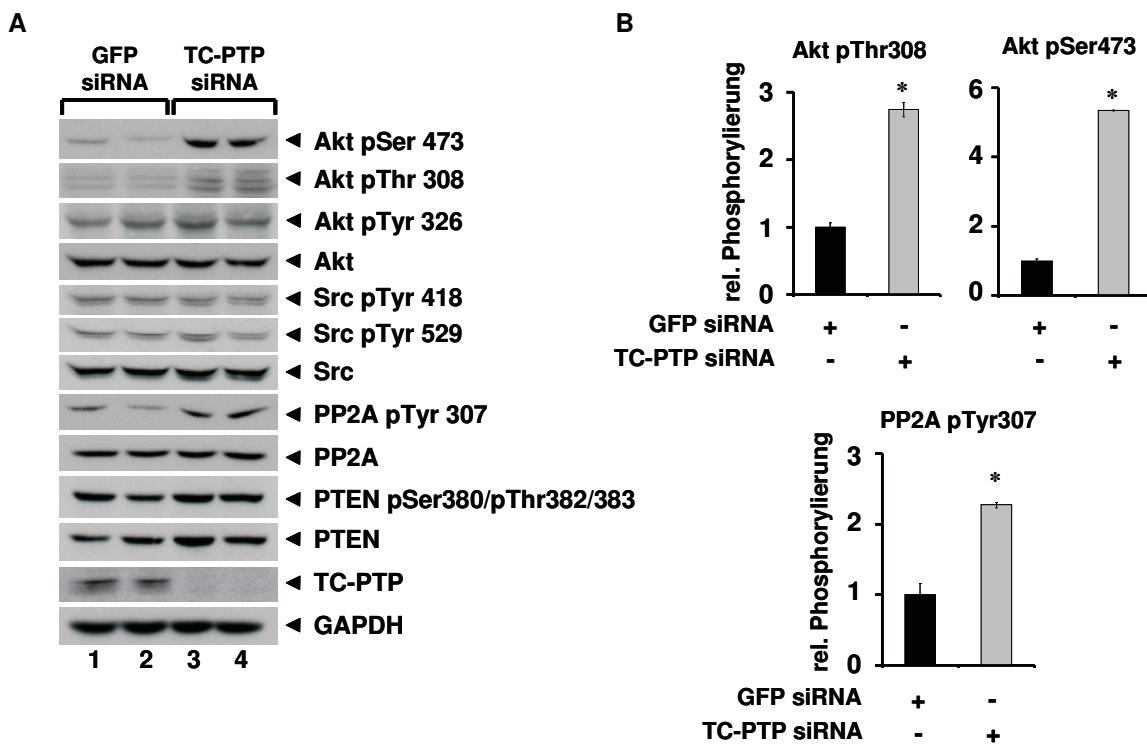


Abbildung 3.22: **TC-PTP ist ein negativer Regulator der basalen Aktivierung von Akt an Thr308 und Ser473 sowie der Phosphorylierung von PP2A an Tyr307.** **A)** Huh7 Zellen wurden mit für TC-PTP spezifischen siRNA oder als Kontrolle mit GFP siRNA transfiziert und für 48 h kultiviert. Danach wurden die Zellen lysiert, jeweils 30 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden die Phosphorylierung von Akt an Serin 473, Threonin 308 und Tyrosin 326, die Phosphorylierung von Src an den Tyrosinstellen 418 und 529, die Phosphorylierung von

PP2A an Tyrosin 307, die Phosphorylierung von PTEN an Serin 380 sowie den Threoninstellen 382 und 383, Akt, Src, PP2A, PTEN, TC-PTP und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. **B)** In der densitometrischen Auswertung wurde die Phosphorylierung jedes Proteins auf die Intensität des Wertes des entsprechenden unphosphorylierten Proteins bezogen (z.B. Akt pSer473/Akt). Die Ergebnisse werden relativ zur auf 1 gesetzten Kontrolle dargestellt. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von vier unabhängigen Experimenten erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests berechnet ($p < 0.05$). Alle Phosphorylierungen wurden analysiert, jedoch nur bei signifikanten Unterschieden graphisch dargestellt.

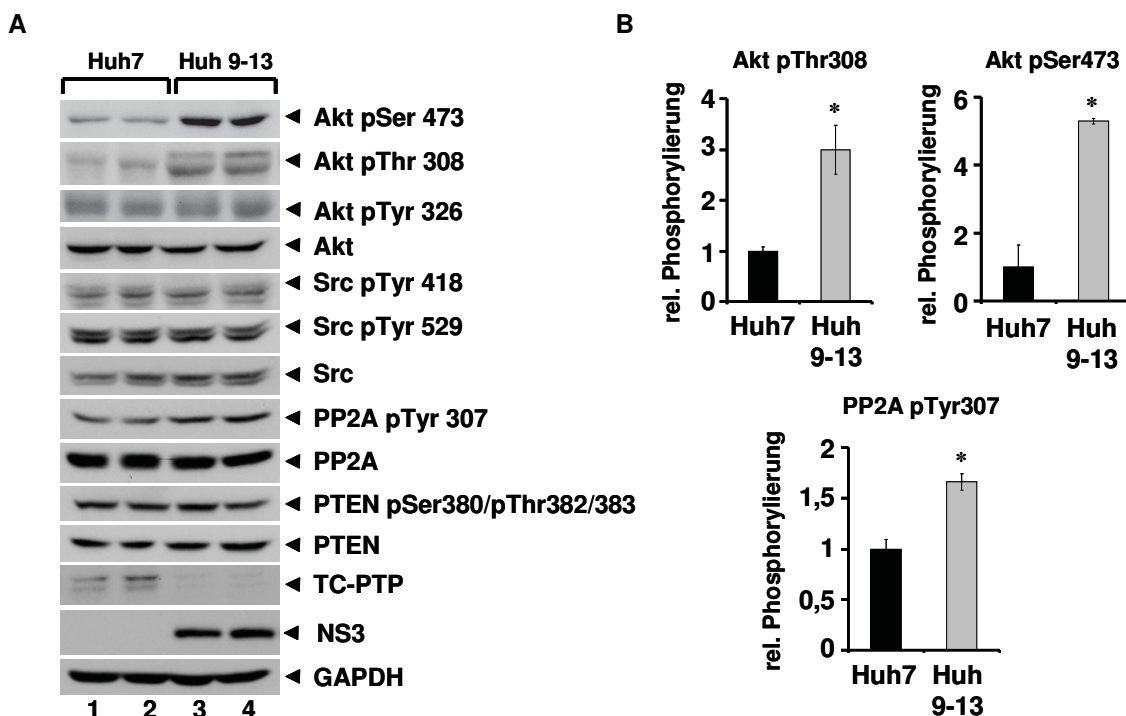


Abbildung 3.23: **Das HCV-Replikon ist ein negativer Regulator der basalen Aktivierung von Akt an Thr308 und Ser473 sowie der Phosphorylierung von PP2A an Tyr307.** Huh7 und Huh 9-13-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert. Danach wurden die Zellen lysiert, jeweils 30 μ g Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden die Phosphorylierung von Akt an Serin 473, Threonin 308 und Tyrosin 326, die Phosphorylierung von Src an den Tyrosinstellen 418 und 529, die Phosphorylierung von PP2A an Tyrosin 307, die Phosphorylierung von PTEN an Serin 380 sowie den Threoninstellen 382 und 383, Akt, Src, PP2A, PTEN, TC-PTP und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. **B)** In der densitometrischen Auswertung wurde die Phosphorylierung jedes Proteins auf die Intensität des Wertes des entsprechenden unphosphorylierten Proteins bezogen (z.B. Akt pSer473/Akt). Die Ergebnisse werden relativ zur auf 1 gesetzten Kontrolle dargestellt. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von vier unabhängigen

Experimenten erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests berechnet ($p < 0.05$). Alle Phosphorylierungen wurden analysiert, jedoch nur bei signifikanten Unterschieden graphisch dargestellt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Herabregulation der TC-PTP-Expression sowohl durch die NS3/4A-Protease von HCV als auch durch spezifischen TC-PTP-Knockdown durch siRNA erstens zu einer Verstärkung der EGFR-Signalkaskade in Hepatozyten und zweitens zu einer gesteigerten basalen sowie erhöhten EGF-induzierten Akt-Aktivierung führt. Außerdem hat die Erniedrigung der TC-PTP-Expression eine Erhöhung der basalen Phosphorylierung von PP2A an Tyrosin 307 zur Folge, die durch Inhibierung der PP2A-Aktivität zur konstitutiven Aktivierung von Akt beitragen könnte.

3.2.6 Die Akt-Aktivität ist essentiell für die HCV-Replikation

Die bisher erbrachten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation mit EGF die HCV-Replikation steigert und dass HCV durch NS3/4A-bedingte TC-PTP-Suppression sowohl zu einer Verstärkung der EGFR-Signalkaskade als auch zu konstitutiver Akt-Aktivierung führt. Um die Rolle von Akt für die virale Replikation näher zu bestimmen, wurde der Einfluss von gegen Akt gerichteter siRNA sowie des Inhibitors Triciribine, der spezifisch die Akt-Aktivität hemmt, aber auf die enzymatische Aktivität von PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*)¹ und PI3K nicht inhibierend wirkt¹⁹⁵, untersucht.

Obwohl die Hemmung der Akt-Expression durch die Transfektion von Huh 9-13 mit Akt siRNA nicht vollständig war (Abbildung 3.24.A), hatte der Akt-Knockdown sowohl in unstimulierten als auch in EGF-stimulierten Huh 9-13-Zellen eine deutliche Verringerung der Menge an viraler mRNA zur Folge (Abbildung 3.24.B und C). Die Behandlung von Huh 9-13 mit dem Akt-Inhibitor Triciribine resultierte in einer sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängigen Reduktion von basaler wie auch EGF-induzierter HCV-Replikation (Abbildung 3.25.A und B).

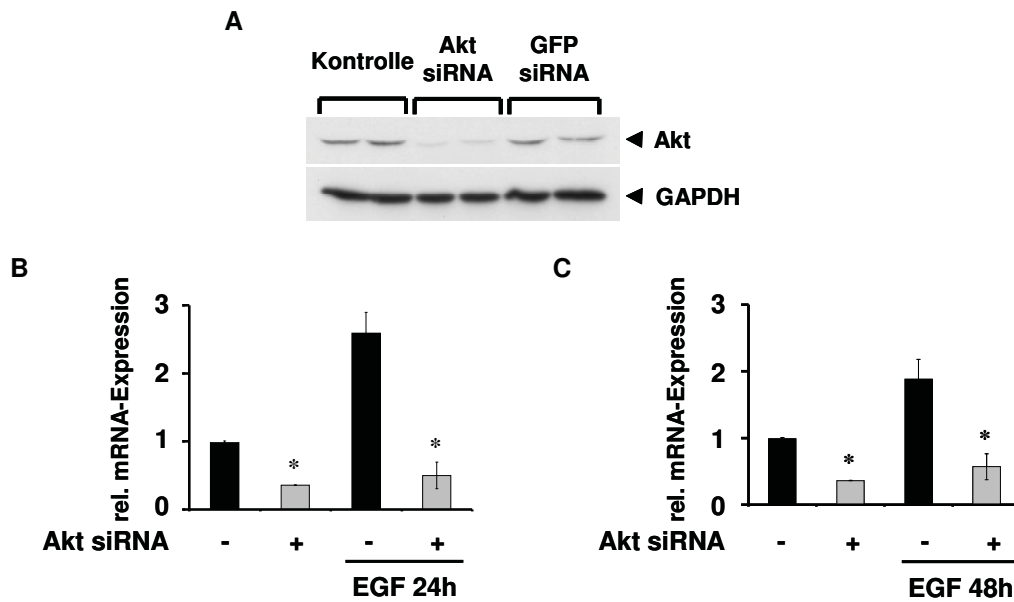


Abbildung 3.24: **Reduktion von basaler und EGF-induzierter HCV-Replikation durch spezifisch gegen Akt gerichtete siRNA.** **A)** Huh 9-13-Zellen wurden mit Akt siRNA oder als Kontrolle mit GFP siRNA transfiziert und für 52 h kultiviert. Danach wurden die Zellen lysiert und jeweils 30 μ g Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden Akt und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. **B)** und **C)** Huh 9-13-Zellen wurden mit Akt siRNA oder als Kontrolle mit GFP siRNA transfiziert und für 52 h kultiviert. 24 h (**B**) bzw. 48 h (**C**) vor der Lyse wurden die Zellen mit 50 ng/ml EGF stimuliert, danach wurde die RNA isoliert und durch Real-Time-PCR die Expression von NS3 bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Der Wert der Kontrolle wurde 1 gesetzt und die weiteren Werte wurden darauf bezogen. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage dreier unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests berechnet ($p < 0.05$).

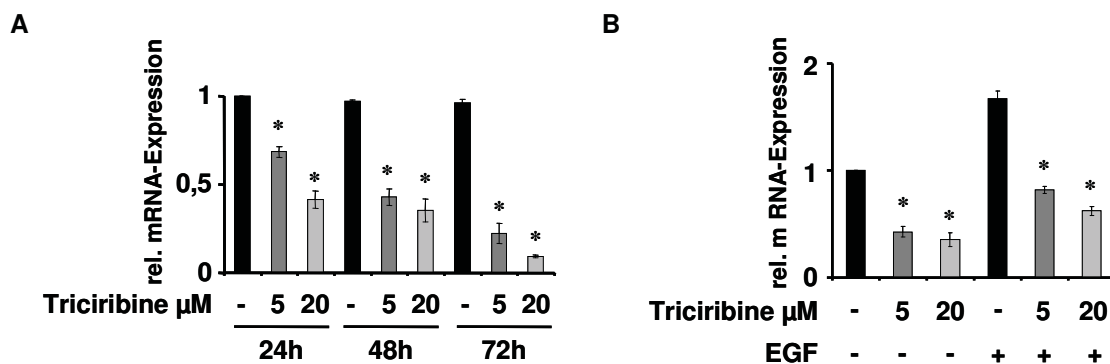


Abbildung 3.25: **Reduktion von basaler und EGF-induzierter HCV-Replikation durch Hemmung der Akt-Aktivität.** Huh 9-13-Zellen wurden mit 5 bzw. 20 μ M Triciribine für 24, 48 bzw. 72 h (**A**) oder 48 h (**B**) bzw. mit DMSO als Kontrolle mit oder ohne 50 ng/ml EGF wie angegeben stimuliert. Danach wurde die

RNA isoliert und durch Real-Time-PCR die Expression von NS3 bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Der Wert der Kontrolle wurde 1 gesetzt und die weiteren Werte wurden darauf bezogen. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage dreier unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests berechnet ($p < 0.05$).

Die Aktivierung von Akt scheint somit einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Bedingungen zu leisten, die für ein effektives Ablaufen der HCV-Replikation nötig sind.

3.2.7 Die EGFR-Aktivität ist für die HCV-Replikation nicht essentiell, aber für die die HCV-Replikation verstärkenden Effekte von EGF notwendig

Nachdem der entscheidende Beitrag der konstitutiven Aktivierung von Akt für die HCV-Replikation gezeigt werden konnte, war der nächste Schritt, die Rolle der EGFR-Aktivierung für die HCV-Replikation zu analysieren. Dazu wurden die Effekte von Inhibitoren, die spezifisch die Aktivierung von EGFR (AG1478) und PI3K (LY294002) hemmen, untersucht. Die Inhibition der EGFR-Aktivität durch AG 1478 (Abbildung 3.26.A) sowie der PI3K-Aktivität durch LY294002 (Abbildung 3.26.B) jeweils in Konzentrationen von 1 und 10 μ M führte zu einem vollständigen Verlust der verstärkenden Wirkung von EGF auf die HCV-Replikation, hatte jedoch keinen Einfluss auf die virale Replikation in Abwesenheit von EGF.

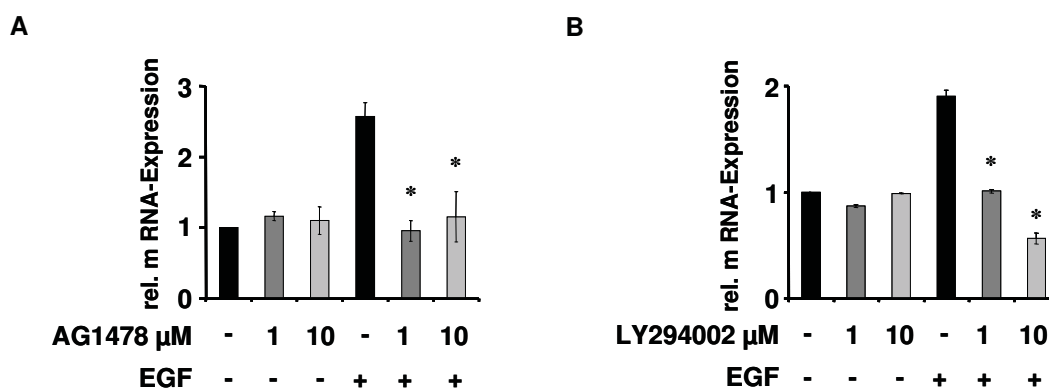


Abbildung 3.26: **Reduktion der EGF-induzierten aber nicht der basalen HCV-Replikation durch Hemmung der EGFR- bzw. PI3K-Aktivität.** Huh 9-13-Zellen wurden mit 1 bzw. 10 μ M AG1478 für 24 h (A) oder 1 bzw. 10 μ M LY294002 für 48 h (B) bzw. mit DMSO als Kontrolle mit oder ohne 50 ng/ml EGF

wie angegeben stimuliert. Danach wurde die RNA isoliert und durch Real-Time-PCR die Expression von NS3 bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Der Wert der Kontrolle wurde 1 gesetzt und die weiteren Werte wurden darauf bezogen. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage dreier unabhängiger Experimente erstellt, die Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des Student's t-Tests berechnet ($p < 0.05$).

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors führt somit zu einer Verstärkung der HCV-Replikation, ist aber für die virale Replikation nicht essentiell.

4 DISKUSSION

4.1 HCV NS3/4A beeinflusst die intrahepatische Signalvermittlung durch Modulation der Zytokin- und Chemokinsekretion

Transgene Tiere mit leberspezifischer Expression von NS3/4A weisen eine erhöhte Toleranz gegenüber hepatotoxischen Stimuli wie LPS (Lipopolysaccharid)/D-GalN (D-Galaktosamin), TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) α /D-GalN oder Tetrachlorkohlenstoff auf⁶⁶. Die molekularen Mechanismen, über die die hepatozytenspezifische Expression von NS3/4A die Hepatotoxizität von LPS/D-GalN bzw. TNF α /D-GalN unterdrückt, sind ungeklärt. Die Beobachtung, dass Lebern NS3/4A-transgener Tiere eine reduzierte Population an murinen plasmazytoiden dendritischen Zellen (CD11c⁺/CD11b⁻/MHC-II^{int}/Ly6C/G⁺) und CD4⁺ T-Zellen aufweisen, legt jedoch nahe, dass möglicherweise ein kausaler Zusammenhang zwischen der Änderung der Zusammensetzung immunkompetenter Zellen und dem protektiven Effekt von NS3/4A besteht. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Aufklärung der molekularen Mechanismen, über die NS3/4A die hepatotoxischen Effekte von TNF α /D-GalN und LPS/D-GalN supprimiert.

Eigene Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT (*signal transducer and activator of transcription*)¹ in Lebern NS3/4A-transgener Mäuse in Reaktion auf LPS/D-GalN bzw. TNF α /D-GalN gestört ist (Abbildung 3.1), während die IFN (Interferon)-induzierte STAT1-Aktivierung unverändert abläuft (Abbildung 3.2). Diese Befunde legen nahe, dass die NS3/4A-bedingte Hemmung der STAT1-Aktivierung indirekt verläuft. Dafür spricht auch, dass die intrahepatische IFN γ -Expression NS3/4A-transgener Tiere verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren deutlich erniedrigt ist (Abbildung 3.3). Da IFN γ nicht von Hepatozyten freigesetzt wird, muss NS3/4A im Hepatozyten die Freisetzung von Faktoren modulieren, die die Rekrutierung oder Aktivierung immunkompetenter Zellen bewirken. In Frage kämen hierbei vor allem Chemokine wie z.B. CXCL9, CCL2 und CCL17. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass NS3/4A die CXCL9-Expression in der

Leber hemmt (Abbildung 3.4A). Die NS3/4A-bedingte Hemmung der CXCL9-Expression könnte die Rekrutierung von Immunzellen wie aktivierten Th1-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen in die Leber inhibieren. Weiterhin weisen erste Befunde auf eine NS3/4A-vermittelte Steigerung der Expression der Chemokine CCL2 und CCL17 hin (Abbildung 3.4B/C), die dem gegenwärtigen Stand der Literatur zur Folge für die Rekrutierung von Monozyten und Th2-Zellen in die Leber und die Verstärkung der Th2-Antwort gegenüber der Th1-Antwort verantwortlich sind. Außerdem wurden weitere Signalwege wie die p38^{MAPK}-, NF (*nuclear factor*) κ B- und STAT3-Signalkaskaden charakterisiert, die in NS3/4A-transgenen Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren in ihrer Aktivierung oder Expression Unterschiede aufweisen (Abbildung 3.5, 3.6, 3.7 und 3.8) und zur erhöhten Toleranz NS3/4A-transgener Mäuse gegenüber LPS und TNF α beitragen könnten, da alle drei Signalwege eine zentrale Rolle in der Regulation der Expression von Zytokinen und Chemokinen spielen.

Die Applikation von LPS/D-GalN bzw. TNF α /D-GalN zur Induktion eines Leberschadens dient als *in vivo*-Modell für durch Immunzellen vermittelte Hepatitiden^{106, 107}. Die Gabe von D-GalN hat die Depletion von UTP (Uridintriphosphat) und anderen Nukleotiden zur Folge und verursacht somit einen Block der RNA- und Proteinsynthese. TNF α spielt für die Pathogenese des LPS/D-GalN-induzierten Leberschadens eine entscheidende Rolle, da ein Anstieg des TNF α -Spiegels dem Leberversagen vorhergeht und TNFR1 für die Induktion des Leberschadens essentiell ist¹⁰⁸. Außerdem verhindert die Gabe neutralisierender Antikörper gegen TNF α den Tod durch endotoxischen Schock in mit LPS behandelten Mäusen¹⁹⁶ sowie mit *Escherichia coli* infizierten Pavianen¹⁹⁷. TNF α ist für die Rekrutierung von Immunzellen in die Leber und die Ausbildung von Infektionsherden entscheidend, wirkt aber auch direkt auf Hepatozyten. Da D-GalN die Transkription antiapoptotischer Faktoren über die Aktivierung von NF κ B in Hepatozyten verhindert, induziert die Gabe von LPS/D-GalN bzw. TNF α /D-GalN FADD- und Caspase 8-abhängig vor allem das Auftreten von Apoptose und nachfolgend Nekrose in der Leber.

Die indirekten Effekte von TNF α auf Hepatozyten werden dadurch erklärt, dass TNF α die Akkumulation von Immunzellen in der Leber vermittelt. Nach intraperitonealer

Applikation von LPS wird LPS in der Leber von Kupffer-Zellen über TLR4 spezifisch erkannt. Diese schütten als Reaktion darauf proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ aus, das die Infiltration von Neutrophilen in die Leber bewirkt und in sinusoidalen Endothelzellen und Hepatozyten die Expression von VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) und ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) transkriptionell aktiviert¹¹¹⁻¹¹⁴. Weiterhin sezernieren Kupffer-Zellen das Chemokin CCL2, das die Infiltration von Monozyten und nachfolgend NK-Zellen in die Leber induziert. NK-Zellen stimulieren über die Ausschüttung von $\text{IFN}\gamma$ in sinusoidalen Endothelzellen und Hepatozyten die Produktion der Chemokine CXCL9 und CXCL10, die die Rekrutierung von dendritischen Zellen und Th1-Zellen in die Leber bewirken. VCAM-1 und ICAM-1 vermitteln die transendotheliale Migration von Neutrophilen und T-Zellen sowie deren direkte Adhäsion an Hepatozyten, die die Apoptose von Hepatozyten zur Folge hat^{114, 115}. T-Zellen sind neben NK-Zellen die Hauptproduzenten von $\text{IFN}\gamma$. Die T-Zell-bedingte Ausschüttung von $\text{IFN}\gamma$ hat eine erneute Induktion der Expression von CXCL9 und CXCL10 zur Folge, was zu einer Amplifikation der Entzündungsantwort führt.

Die deutliche Reduktion der $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten intrahepatischen $\text{IFN}\gamma$ -Expression (Abbildung 3.3) sowie die vollständige Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten STAT1-Aktivierung (Abbildung 3.1) in NS3/4A-transgenen Tieren verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren lassen auf eine bedeutende Rolle von $\text{IFN}\gamma$ und der STAT1-bedingten Genexpression bei der Resistenz NS3/4A-transgener Tiere gegenüber LPS/D-GalN bzw. $\text{TNF}\alpha$ /D-GalN-vermitteltem Leberschaden schließen. Befunde anderer Arbeitsgruppen weisen ebenfalls in diese Richtung. Nach Gabe von LPS erfolgt zunächst ein Anstieg des $\text{TNF}\alpha$ -Spiegels im Serum der behandelten Mäuse, gefolgt von einer Erhöhung des $\text{IFN}\gamma$ -Spiegels¹⁸⁸. Die Gabe neutralisierender Antikörper gegen $\text{IFN}\gamma$ vermag es die letale Wirkung hoher Dosen von LPS bzw. $\text{TNF}\alpha$ vollständig aufzuheben¹⁸⁸. Dabei ist die Aktivierung von STAT1 als Signalelement der $\text{IFN}\gamma$ -induzierten Signalkaskade essentiell für die Vermittlung der LPS/D-GalN-induzierten Leberschädigung sowie Apoptose von Hepatozyten^{117, 118}. Eine chronische HCV-Infektion ist ebenfalls mit erhöhten $\text{IFN}\gamma$ -Spiegeln in Serum und Leber assoziiert, die mit der Schwere des Leberschadens korrelieren^{119, 120}.

IFN γ vermittelt über STAT1 eine Vielzahl antiproliferativer und proapoptotischer Effekte. STAT1 hemmt das Zellwachstum durch Induktion des CdK (*cyclin-dependent kinase*)-Inhibitors p21^{waf1} ¹²¹, während gleichzeitig proapoptotische Faktoren wie die Caspasen 1, 3 und 8 ^{122, 123}, Bak ¹⁹⁸, iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) ^{125, 126}, TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*) ¹²⁷ und Fas bzw. FasL ¹²⁸ in ihrer Expression gesteigert werden. Weiterhin wirkt STAT1 auch durch transkriptionsunabhängige Mechanismen proapoptotisch, indem es mit p53 ¹²⁹ oder TRADD (*tumor necrosis factor-receptor 1-associated death domain protein*) ¹³⁰ interagiert. Die Hemmung der TNF α -vermittelten IFN γ -Expression sowie STAT1-Aktivierung in den Lebern NS3/4A-transgener Tiere sollte somit eine entscheidende Rolle bei deren Resistenz gegenüber LPS/D-GalN bzw. TNF α /D-GalN-vermitteltem Leberschaden spielen.

Die erzielten Befunde lassen darauf schließen, dass die NS3/4A-bedingte Hemmung der LPS- bzw. TNF α -induzierten STAT1-Aktivierung in der Leber keine intrazelluläre Inhibition der interferon-induzierten STAT1-Aktivierung zur Ursache hat, sondern dass dafür die Inhibition der Sekretion von IFN γ verantwortlich ist. Weder SOCS1, SOCS3 oder SHP2 noch PIAS1 oder PP2A, die wichtige Negativregulatoren der STAT1-vermittelten Genexpression sind, waren in ihrer Expression in NS3/4A-transgenen Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren nach Applikation von LPS/D-GalN- bzw. TNF α /D-GalN signifikant verändert. Weiterhin hatte die Behandlung NS3/4A-transgener Tieren mit IFN α (Abbildung 3.2A) bzw. IFN γ (Abbildung 3.2B) keine Hemmung der STAT1-Aktivierung zur Folge. In NS3/4A-transgenen Tieren trat gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren nur eine etwas verspätete Aktivierung von STAT1 auf, die nicht die Erklärung für die vollständige Inhibition der STAT1-Aktivierung in NS3/4A-transgenen Mäusen verglichen mit Wild-Typ-Mäusen nach Gabe von LPS/D-GalN- bzw. TNF α /D-GalN bietet.

In NS3/4A-transgenen Tieren konnte in vorläufigen Befunden eine verstärkte intrahepatische Expression von CCL2 festgestellt werden (Abbildung 3.4B). Dies könnte zu einer Erhöhung der Rekrutierung von Monozyten in die Leber führen, die wiederum eine verstärkte Aktivierung von NK-Zellen bewirken könnten. Die NK-Zell-vermittelte Induktion der CXCL9-Ausschüttung durch Hepatozyten, die für die Rekrutierung von

dendritischen Zellen und T-Zellen benötigt wird, könnte dagegen durch die NS3/4A-bedingte Hemmung der CXCL9-Expression (Abbildung 3.4A) herabgesetzt sein. Die Inhibition der CXCL9-Expression durch NS3/4A könnte die Erklärung dafür bieten, dass in NS3/4A-transgenen Mäusen die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen deutlich verringert ist ⁶⁶. CXCL9 ist nicht nur in die Rekrutierung von Th1-Zellen sondern auch in die von plasmazytoiden dendritischen Zellen involviert, besitzt jedoch keine chemotaktische Aktivität gegenüber anderen Typen dendritischer Zellen wie myeloiden dendritischen Zellen ¹³¹⁻¹³³. Die NS3/4A-bedingte Hemmung der CXCL9-Expression könnte damit auch zur Verringerung der Anzahl an murinen plasmazytoiden dendritischen Zellen (CD11c⁺/CD11b⁻/MHC-II^{int}/Ly6C/G⁺ dendritische Zellen) in den Lebern NS3/4A-transgener Tiere beitragen ⁶⁶. Die Erniedrigung der mCXCL9-Expression in den Lebern NS3/4A-transgener Tiere im Vergleich zu Wild-Typ-Tieren könnte somit durch die Verringerung der Rekrutierung von Th1-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen eine Abschwächung der Th1-vermittelten Immunantwort zur Folge haben. Da diese bei der Entstehung des LPS/D-GalN- bzw. TNF α /D-GalN-induzierten Leberschadens eine entscheidende Rolle spielt, könnte die Inhibition der CXCL9-Expression die deutlich geringere Sensitivität NS3/4A-transgener Tiere verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren gegenüber LPS/D-GalN- bzw. TNF α /D-GalN bewirken.

Durch CCL2 rekrutierte Monozyten sezernieren TNF α , das der Leberschädigung entgegenwirken könnte, indem es die Proliferation der Hepatozyten steigert und die Leberregeneration fördert ¹⁹⁹. Weiterhin stimuliert CCL2 die Reifung von T-Zellen zu Th2-Zellen und vermindert das Potential von Th1-Zellen, IFN γ zu produzieren ²⁰⁰. CCL2 führt dadurch zur Verschiebung des Th2/Th1-Quotienten in Richtung der Th2-Antwort (humorale Immunität) ²⁰¹. Dies wird durch CCL17 weiter verstärkt, das zur Rekrutierung von Th2-Zellen in die Leber beiträgt. Die Expression von mCCL17 scheint in der Leber NS3/4A-transgener Mäuse wie die von mCCL2 erhöht zu sein (Abbildung 3.4C). Die Erhöhung der mCCL2- bzw. mCCL17-Spiegel in den Lebern NS3/4A-transgener Tiere verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren könnte somit durch die Abschwächung der Th1-Antwort, die bei der Entstehung des LPS/D-GalN- bzw. TNF α /D-GalN-induzierten Leberschadens eine entscheidende Rolle spielt, einen wichtigen Beitrag zur Resistenzbildung NS3/4A-transgener Tiere gegenüber den hepatotoxischen Effekten von LPS/D-GalN- bzw. TNF α /D-GalN leisten.

Die Expression eines vollständigen HCV-Genoms in HeLa-, HepG2- und Huh7-Zellen hatte die Induktion von CCL2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zur Folge²⁰². In Patienten mit chronischer HCV-Infektion wurde ebenfalls eine Erhöhung der hepatischen CCL2-Expression festgestellt²⁰³. Dies spricht dafür, dass die durch CCL2 vermittelten Effekte auch in mit HCV infizierten Patienten eine Rolle spielen. Eine HCV-bedingte Veränderung der Expression von CCL17 wurde bisher noch nicht beschrieben. In Patienten mit chronischer Hepatitis C wurden sowohl peripher als auch intrahepatisch erhöhte CXCL9-Spiegel gemessen¹³⁹⁻¹⁴¹. Da HCV von einer Steigerung der antiviralen T-Zell-Antwort in der Leber keinen Vorteil hat, könnte man spekulieren, dass HCV durch die NS3/4A-bedingte Hemmung der CXCL9-Expression in Hepatozyten die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber zu vermindern versucht. Ohne die Inhibition der CXCL9-Expression durch NS3/4A wäre der T-Zell-vermittelte Leberschaden während einer chronischen HCV-Infektion wahrscheinlich noch höher. Außerdem wäre ohne die NS3/4A-bedingte Hemmung der CXCL9-Expression auch die Bekämpfung des Hepatitis C Virus durch T-Zellen eventuell erfolgreicher. Eine Erklärung für die erhöhten CXCL9-Spiegel bei chronisch mit HCV infizierten Patienten bietet sicherlich die Tatsache, dass CXCL9 nicht nur von Hepatozyten sondern auch von weiteren in der Leber vorkommenden Zelltypen wie z.B. sinusoidalen Endothelzellen exprimiert wird, die nicht von HCV infiziert werden und somit in ihrer CXCL9-Produktion auch nicht durch NS3/4A beeinflusst werden.

Neben einer Hemmung der STAT1-Aktivierung liegt in NS3/4A-transgenen Tieren eine verstärkte Aktivierung von STAT3 vor (Abbildung 3.8). STAT3 ist ein bedeutender Gegenspieler von STAT1, indem STAT3 durch Steigerung der Expression wichtiger Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren wie Bcl-X, c-Myc, Mcl-1, Survivin oder Zyklin D1 antiapoptotische und proliferative Effekte vermittelt und daneben durch die Aktivierung der Genexpression von Häm-Oxygenase-1, Bcl3 oder IL1-Rezeptor-Antagonist bzw. die Hemmung der Genexpression von IL1 β , IL6 oder TNF α anti-inflammatorische Funktionen ausübt¹⁴²⁻¹⁴⁴. STAT3 inhibiert auch auf direktem Wege die STAT1-vermittelte Expression von Genen wie CXCL9 und CXCL10, indem es STAT1 bindet und die Bildung von STAT1-Homodimeren sowie deren DNA-Bindung verhindert²⁰⁴. Weiterhin kann STAT3 die Aktivierung von STAT1 durch Konkurrenz um Rezeptorbindungsstellen hemmen²⁰⁵. Eine Erhöhung der STAT3-Expression führt auch

zu einer Verringerung des TNF α -induzierten Leberschadens. So schützt eine Verstärkung der STAT3-Aktivierung durch Deletion des Negativregulators SOCS3 vor Concanavalin A-induziertem Leberschaden¹⁴⁷.

Die verstärkte Aktivierung des p38^{MAPK}-Signalweges in den Lebern NS3/4A-transgener Tiere (Abbildung 3.5 und 3.6) ist für deren Resistenz gegenüber LPS/D-GalN- bzw. TNF α /D-GalN-vermitteltem Leberschaden essentiell, da die Vorbehandlung der Tiere mit dem p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 den protektiven Effekt von NS3/4A gegenüber TNF α /D-GalN vollständig aufhebt⁶⁶. Der von p38^{MAPK} aktivierte Transkriptionsfaktor ATF2 ist in die Modulation von Zellproliferation und -migration involviert, indem ATF2 Gene von Proteinen, die den Zellzyklus (Zykin A, Zykin D1), die Apoptose (Bcl-2) oder die Zellmigration (E-Selektin, MMP (*matrix metalloproteinase*)-2, uPA (*urokinase-type plasminogen activator*)) regulieren, in ihrer Expression steigert²⁰⁶. Deswegen ist es nicht verwunderlich, dass ATF2 in diversen humanen Tumoren^{149, 150} und Krebszelllinien¹⁵¹⁻¹⁵⁴ überexprimiert ist und an der Zelltransformation beteiligt ist. Die gesteigerte Expression bzw. Aktivierung von ATF2 in den Lebern NS3/4A-transgener Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen könnte somit für die Resistenz NS3/4A-transgener Tiere gegenüber TNF α -vermitteltem Leberschaden eine große Rolle spielen und für die Abhängigkeit der NS3/4A-bedingten Protektion von der Aktivität der p38^{MAPK} verantwortlich sein.

Sowohl der NF κ B- als auch der p38^{MAPK}-Signalweg, die beide in NS3/4A-transgenen Mäusen verglichen mit Wild-Typ-Mäusen in ihrer Aktivierung verstärkt sind (Abbildung 3.5-3.8) können unter gewissen Umständen den JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)-Signalweg hemmen¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. NS3/4A-transgene Tieren weisen in ihren Lebern verglichen mit Wild-Typ-Tieren sowohl basal als auch nach Stimulation mit TNF α /D-GalN eine verringerte Aktivierung von MKK (*MAPK kinase kinase*)7 sowie AP (*activator protein*)1 (*c-fos/c-jun*) auf. Die Inhibierung von p38^{MAPK} hebt diesen Effekt zu einem großen Teil auf (Lars Frelin, unpublizierte Befunde). Somit könnte die NS3/4A-bedingte Hemmung des JNK-Signalweges für die Resistenz NS3/4A-transgener Tiere gegenüber TNF α /D-GalN eine große Rolle zu spielen. Der JNK-Signalweg ist ein zentraler Regulator von Apoptoseprozessen und zellulärer Stressantwort. Er wird vor allem von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL1 β sowie Stressstimuli wie UV-

Strahlung, pH-Änderung, Temperaturänderung, Hypoxie, genotoxischem und oxidativem Stress aktiviert. Während eine transiente Aktivierung des JNK-Signalweges auch mit proliferations- und differenzierungsfördernden Effekten auf die Zelle assoziiert sein kann, führt eine länger andauernde oder persistente Aktivierung des JNK-Signalweges zum Zelltod^{159, 160}. Die verstärkte Aktivierung des JNK-Signalweges ist ein wichtiger Faktor der TNF α -induzierten Apoptose und des TNF α -vermittelten Leberschadens²⁰⁷. JNK1 bewirkt durch Aktivierung der E3-Ubiquitin-Ligase Itch die Ubiquitylierung und Degradation des Caspase8-Inhibitors c-Flip (*cellular FLICE-inhibitory protein*)¹⁶². Die Untersuchung der funktionellen Signifikanz des JNK-Signalweges für die TNF α -bedingte Apoptose in der Leber mit Hilfe des LPS/D-GalN-Leberschädigungsmodells führte weiterhin zu der Entdeckung des entscheidenden Einflusses von JNK2, das eine direkte Aktivierung von Caspase 8 vermittelt¹⁶³. JNK1 und JNK2 haben somit beide wichtige proapoptotische Funktionen beim TNF α -induzierten Leberschaden.

Der Transkriptionsfaktor NF κ B ist ein wichtiger Gegenspieler der JNK-vermittelten Apoptose, indem NF κ B die Expression antiapoptotisch wirksamer Faktoren wie A20, FHC (*ferritin heavy chain*), Gadd (*growth arrest and DNA damage-inducible*)45 β , MnSOD (*Mn²⁺ superoxide dismutase*) und XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) hochreguliert²⁰⁸. Die wichtige Rolle von NF κ B für die Regulation des TNF α -vermittelten Leberschadens wird dadurch deutlich, dass Mäuse mit einem konditionalen IKK (*I κ B kinase*) β -Knockout nach Gabe von Concanavalin A eine verstärkte Aktivierung von JNK aufweisen, die mit dem Grad des Leberschadens korreliert¹⁶⁴.

Die in NS3/4A-transgenen Tieren verstärkte Aktivierung der p38^{MAPK}- und NF κ B-Signalwege könnte auch einen Einfluss auf Transkription oder RNA-Stabilität von CCL2, CCL17 oder CXCL9 haben. Die Genexpression von CCL2 ist abhängig von der Aktivität des aus c-Jun und ATF2 zusammengesetzten AP1-Komplexes, dessen Bildung durch p38^{MAPK} und JNK induziert werden kann. Der positive Effekt von p38^{MAPK} und JNK auf die CCL2-Expression wurde in Monozyten¹⁶⁵, endothelialen Zellen¹⁶⁶, hepatischen Sternzellen¹⁶⁷ und eosinophilen Granulozyten¹⁶⁸ gefunden. In eosinophilen Granulozyten wurde zusätzlich von einer Rolle von NF κ B für die Expression von CCL2 berichtet¹⁶⁸. Bei Untersuchungen in Epithelzellen der Atemwege sowie B-Zellen wurde

entdeckt, dass die Expression von CCL17 in B-Zellen von NF κ B und p38^{MAPK} 209 und in Epithelzellen der Atemwege von ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)1/2 und p38^{MAPK} 170 reguliert wird. Die Expression von CXCL9 ist streng IFN γ -abhängig, d.h. die Hauptrolle spielt der Transkriptionsfaktor STAT1 210. Weder im Falle von CCL2 noch von CCL17 oder CXCL9 scheint p38^{MAPK} einen Einfluss auf die mRNA-Stabilität wie z.B. bei CXCL10 zu haben 172, 173.

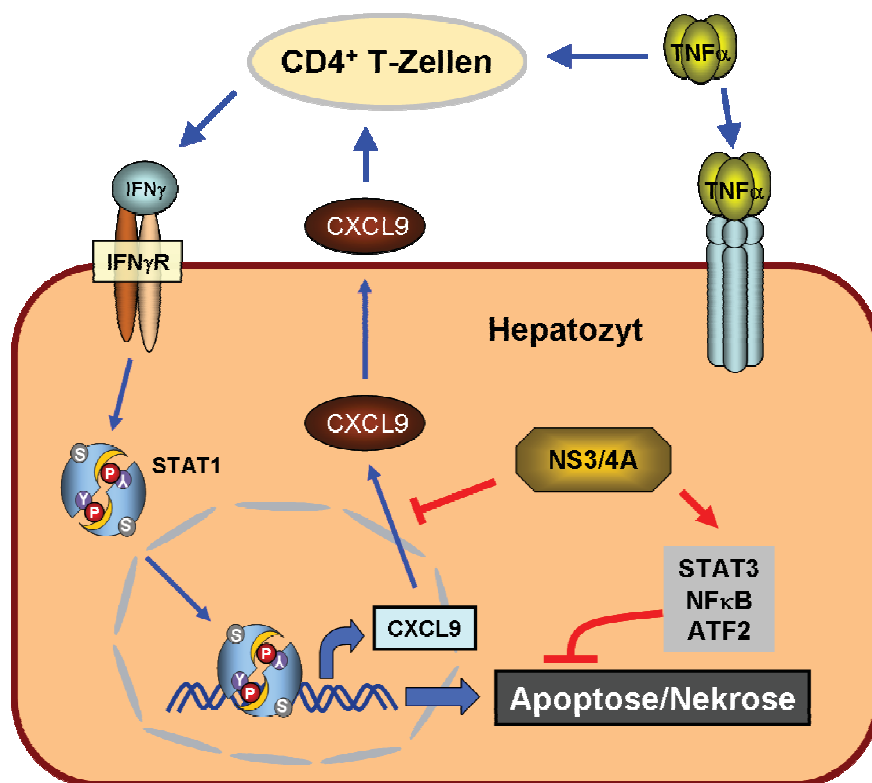


Abbildung 4.1: **Hypothetischer Mechanismus der NS3/4A-bedingten Resistenz gegenüber TNF α -vermitteltem Leberschaden.** NS3/4A hemmt die Expression des Chemokins CXCL9, das die Rekrutierung von Immunzellen wie CD4⁺ T-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen (nicht dargestellt) in die Leber bewirkt. Die reduzierte Anzahl der entsprechenden Immunzellen in der Leber NS3/4A-transgener Mäuse hat zur Folge, dass die Applikation von LPS/D-GalN bzw. TNF α /D-GalN bei NS3/4A-transgenen Tieren verglichen mit Wild-Typ-Tieren zu einer erniedrigten IFN γ -Expression führt. Dadurch ist in NS3/4A-transgenen-Mäusen die LPS- bzw. TNF α -induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 vollständig unterdrückt, der die Expression einer Reihe proapoptotischer Gene vermittelt. Weiterhin verstärkt NS3/4A die Aktivierung der p38^{MAPK}-, NF κ B- und STAT3-Signalwege, die antiapoptotische Funktionen haben können. Der Einfluss von NS3/4A auf die Expression der Chemokine CCL2 und CCL17 ist nicht aufgeführt.

Die im ersten Teil der Arbeit vorgestellten Daten zeigen mehrere Mechanismen auf, die für die erhöhte Toleranz NS3/4A-transgener Mäuse gegenüber LPS/D-GalN und TNF α /D-GalN verantwortlich sein könnten (siehe auch Abbildung 4.1). Die erzielten Befunde legen nahe, dass in NS3/4A-transgenen-Mäusen die LPS- bzw. TNF α -induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 vollständig unterdrückt ist. Für die NS3/4A-bedingte Hemmung der STAT1-Aktivierung in der Leber ist jedoch keine intrazelluläre Inhibition der interferon-induzierten STAT1-Aktivierung sondern eine Verringerung der intrahepatischen IFN γ -Spiegel verantwortlich. Weiterhin weisen erste Befunde darauf hin, dass in NS3/4A-transgenen Tieren verglichen mit Wild-Typ-Tieren die Chemokine CCL2 und CCL17 in ihrer Expression verstärkt sind, während die Expression von CXCL9 erniedrigt ist. Dies könnte für die Reduktion der Anzahl an CD4⁺ T-Zellen sowie murinen dendritischen Zellen in der Leber NS3/4A-transgener Tiere verantwortlich sein und möglicherweise auch eine verstärkte Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten bzw. Makrophagen sowie eine Verschiebung des Th2/Th1-Quotienten in Richtung der Th2-Antwort begünstigen. Es ist ferner denkbar, dass die verstärkte Aktivierung der NF κ B-, p38^{MAPK}- und STAT3-Signalwege hemmende Effekte auf die proapoptischen STAT1- und JNK-Signalwege ausübt und hierdurch ebenfalls zur Resistenz NS3/4A-transgener Mäuse gegenüber LPS/D-GalN- und TNF α /D-GalN-vermitteltem Leberschaden beiträgt. Eine Inhibierung der NS3/4A-Protease würde somit nicht nur die Hemmung der HCV-Replikation zur Folge haben sondern auch den NS3/4A-bedingten Schutz HCV-infizierter Zellen vor der intrahepatischen Immunantwort aufheben.

4.2 HCV NS3/4A interferiert mit der EGF-induzierten Signalantwort und der Akt-Aktivierung durch Spaltung von TC-PTP

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Relevanz von EGF und der durch EGF induzierten Signalwege für die HCV-Replikation und die Fähigkeit von HCV, diese Signalkaskaden zu modulieren, untersucht. Es konnte belegt werden, dass HCV die Expression der Tyrosinphosphatase TC-PTP *in vitro* und *in vivo* supprimiert und dass dies eine Verstärkung der EGF-Signalantwort und eine Erhöhung der basalen Akt-Aktivierung zur Folge hat. Während die Sensitivierung des EGF-Signalweges die HCV-Replikation verstärkt, ist die basale Aktivierung von Akt für ein optimales Ablaufen der viralen Replikation essentiell. Die beschriebene Suppression von TC-PTP geschieht durch NS3/4A-vermittelte proteolytische Spaltung. Durch *in vitro*-Experimente konnte gezeigt werden, dass die NS3/4A Protease/Helikase von HCV protease-abhängig TC-PTP spaltet. Diese enzymatische Reaktion führt zu einem Spaltprodukt von etwa 22 kD, so dass die potentielle Spaltsequenz ermittelt werden konnte. NS3/4A ist somit nicht nur für die Hemmung der antiviralen Immunantwort des Wirtes durch Spaltung von CARDIF (*CARD adaptor inducing IFN- β*)⁶¹ und TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*)⁶³ verantwortlich, sondern interferiert auch mit Signalereignissen, die von TC-PTP reguliert werden.

NS3/4A ist eine Serinprotease, die die posttranslationale Prozessierung des HCV-Polyproteins an den Positionen NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A und NS5A/5B durchführt. Die Spaltung erfolgt in *trans* an Cys-(Ser/Ala)-Peptidbindungen²¹¹. Sowohl die 45 kD als auch die 48 kD große Isoform von TC-PTP enthalten in ihrer Peptidsequenz zwei Cys-(Ser/Ala)-Peptidbindungen an den Positionen AA 123/124 (Cys/Ala) und AA 226/227 (Cys/Ser). Auch wenn im Vergleich zu bekannten NS3/4A-Schnittstellen größere Unterschiede in der Umgebung der Cys-(Ser/Ala)-Peptidbindung bestehen, stellen diese beiden Sequenzen potentielle NS3/4A-Schnittstellen dar (Abbildung 4.2). Da die NS3/4A-vermittelte Spaltung von TC-PTP zum Auftreten eines TC-PTP-Fragmentes von etwa 22 kD Größe führt und dies der Größe des Spaltproduktes bei Spaltung von TC-PTP an Position AA 226/227 entspricht, kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass NS3/4A TC-PTP an dieser Stelle spaltet.

NS4A/4B:	YQEFDEEMEE CA SHL P YIEQG	
NS4B/5A:	W I NE D CS T P CS GS W LR D VWD	
NS5A/5B:	EEASED VV CSMSY T WT G AL	
TCPTP:	R I V E K ES V K CA Q Y W P T D D Q E	123C/124A
	P DH G PA V I H CS A G I GR S G T F	226C/227S
TRIF:	P PP P S S T P CS A HL T P S S L E	
CARDIF:	R K F Q E RE V P CH RP S P G AL W L	

Abbildung 4.2: Homologie der zwei potentiellen NS3/4A-Schnittstellen von TC-PTP mit denen anderer bekannter NS3/4A-Substrate.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Reduktion der TC-PTP-Expression die Verstärkung der EGF-induzierten EGFR-Aktivierung sowie nachgeschalteter Signalwege wie dem PI3K/Akt- und dem PLC γ -Signalweg zur Folge hat. Diese Daten ergänzen bereits publizierte Berichte, die zeigen, dass TC-PTP den EGF-Rezeptor und das Adapterprotein p52^{shc} dephosphoryliert¹⁷⁵, wodurch die Rekrutierung der PI3K-Untereinheit p85 zum EGF-Rezeptor verhindert und die Signalweiterleitung über die Aktivierung von PI3K/Akt oder JNK inhibiert wird¹⁷⁶.

Zusätzlich zur Verstärkung der EGFR-Aktivierung führt die Supprimierung der TC-PTP-Expression durch siRNA oder NS3/4A zu einer erhöhten basalen Phosphorylierung von Akt an Serin 473 und Threonin 308. TC-PTP ist somit nicht nur ein wichtiger Negativregulator des EGFR-Signalweges, sondern verhindert auch die ligandenunabhängige Aktivierung von Akt.

Die Akt-Aktivität wird hauptsächlich durch Phosphorylierung an Threonin 308 in der Kinasedomäne und Serin 473 im C-terminalen hydrophoben Motiv reguliert. Durch Bindung an Phospholipide wie Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat wird Akt an die Zytoplasmamembran rekrutiert und durch PDK1 phosphoryliert¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Als wichtige Ser473-Kinase gilt auch mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*), ein Komplex aus mTOR, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase*) und mLST (*mammalian lethal with sec-13*)¹⁸⁰.

Da TC-PTP eine Tyrosinphosphatase ist, d.h. Threonin- oder Serinstellen nicht direkt dephosphorylieren kann, muss die TC-PTP-abhängige Regulation der basalen Akt-Aktivität indirekt verlaufen. Vorstellbar wäre die Aktivierung einer Serin/Threonin-Kinase oder die Inhibierung einer Serin/Threonin-Phosphatase, die über eine Tyrosinphosphorylierung reguliert werden müssten. Weder die Phosphatase PTEN, die den PI3K/Akt-Signalweg durch Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat inhibiert, noch die Akt-Kinase mTOR werden jedoch durch Tyrosinphosphorylierung reguliert. Sowohl PTEN als auch mTOR kommen somit nicht als Substrate von TC-PTP in Betracht.

Die Kinase c-Src und die Phosphatase PP2A sind dagegen Proteine, die durch Tyrosinphosphorylierung reguliert werden und in die Aktivierung¹⁵⁸ bzw. Inhibierung¹⁸² von Akt involviert sind. C-Src besitzt eine aktivierende Tyrosinstelle an Position 418 sowie eine inhibierende Tyrosinstelle an Position 529 und kann die Aktivität von Akt durch Phosphorylierung von z.B. Tyrosin 326 steigern¹⁵⁸. Obwohl c-Src in COS1-Zellen, HEK293-Zellen und murinen embryonalen Fibroblasten als Substrat von TC-PTP beschrieben ist¹⁸³, konnte in Zellen hepatozytären Ursprungs keine Veränderung der c-Src-Phosphorylierung durch Suppression von TC-PTP beobachtet werden.

PP2A wird durch Phosphorylierung an Tyrosin 307 negativ reguliert^{184, 185}, d.h. es kommt als direktes Substrat von TC-PTP in Betracht. Die Reduktion der TC-PTP-Expression sowohl durch siRNA als auch NS3/4A-bedingt hatte eine verstärkte basale Phosphorylierung von PP2A an Tyrosin 307 zur Folge, so dass davon auszugehen ist, dass PP2A in Hepatozyten ein Substrat von TC-PTP ist. Da die verstärkte Phosphorylierung von PP2A an Tyrosin 307 die Phosphataseaktivität von PP2A inhibiert, kann PP2A Akt an Threonin 308 nicht mehr dephosphorylieren, so dass bei Supprimierung der TC-PTP-Expression eine erhöhte basale Akt-Aktivierung auftritt.

Diese Ergebnisse werden durch Publikationen bestätigt, die zeigen, dass HCV die Aktivierung des PI3K-Signalweges induziert und nachgeschaltete Kinasen wie Akt, GSK3 β , mTOR und S6K1 aktiviert^{186, 187}. Der zugrundeliegende Mechanismus, durch den HCV die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges bewirkt, war bisher jedoch nicht bekannt. Weiterhin wurde berichtet, dass die HCV-abhängige Akt-Aktivierung gegenüber der Behandlung mit dem Antioxidans Pyrrolidindithiocarbamat sensitiv ist, so dass das Auftreten von oxidativem Stress involviert zu sein scheint^{186, 188}. Experimente

mit NS5A-exprimierenden Zelllinien zeigten, dass NS5A die PI3-Kinase durch Interaktion mit deren p85-Untereinheit aktiviert, was zur Inhibition der Apoptose durch NS5A führt und die Überlebensfähigkeit von NS5A-exprimierenden Zellen erhöht¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Die NS3/4A-bedingte TC-PTP-Suppression könnte somit durch das Fehlen der Negativregulation der EGF- und Akt-vermittelten Signalwege diese sensitiver für die Aktivierung durch oxidativen Stress und/oder NS5A machen.

Die pathophysiologischen Folgen der HCV-bedingten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges sind zwiespältig. Einerseits bewirkt die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges den Schutz infizierter Zellen vor Apoptose und die Steigerung der Vitalität HCV-infizierter Zellen andererseits ist sie in die Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms^{187, 189} und des HCV-assoziierten B-Zell-Lymphoms¹⁹² involviert.

Es konnte gezeigt werden, dass die direkte Hemmung der Akt-Aktivierung durch den Inhibitor Triciribine oder spezifisch gegen Akt gerichtete siRNA sowohl die Reduktion der basalen als auch der EGF-vermittelten HCV-Replikation zur Folge hat. Die EGF-induzierte aber nicht die basale HCV-Replikation war außerdem gegenüber dem EGFR-Kinase-Inhibitor AG1478 sowie dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 sensitiv. Diese Daten lassen darauf schließen, dass Akt die verstärkenden Effekte von EGF auf die HCV-Replikation vermittelt, aber auch notwendig ist, um die virale Replikation unabhängig von der Aktivierung des EGF-Rezeptors zu gewährleisten.

Es gibt Publikationen, die von einer HCV-bedingten Aktivierung von mTORC1, das eines der zahlreichen Akt-Substrate ist, berichten. Hierbei führt die Inhibierung von mTOR und seines Substrates S6K1 zu einer verstärkten HCV-Replikation^{187, 193}. Die Aktivierung von mTOR wurde mit einer HCV-vermittelten Aktivierung von nRas und/oder Pak1 in Verbindung gebracht. Die HCV-induzierte Aktivierung von mTOR würde somit repressive Effekte auf die HCV-Replikation ausüben, während die Aktivierung von Akt für das Ablaufen der HCV-Replikation notwendig ist und die verstärkenden Effekte von EGF vermittelt. Da die Aktivierung des Komplexes mTORC1 Akt nachgeschaltet ist, scheinen sich diese Ergebnisse zu widersprechen. Es sollte jedoch beachtet werden, dass Akt neben der Aktivierung des mTOR/S6K1-Signalweges in die Regulation einer Vielzahl anderer Signalwege involviert ist, die so unterschiedliche zelluläre Prozesse wie Apoptose, Zellzyklus, Glykogensynthese, Glukosetransport und Lipidstoffwechsel kontrollieren¹⁴⁵. Auch wenn die HCV-bedingte Aktivierung von mTOR Akt

nachgeschaltet und nicht von Akt unabhängig sein sollte, zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass Akt zusätzliche Signalwege aktiviert, die für die Aufrechterhaltung der HCV-Replikation wichtiger als die von mTOR vermittelten inhibierenden Effekte sind. Eine weitere Charakterisierung des Einflusses der zahlreichen Akt nachgeschalteten Signalkaskaden und des Cross-Talks zwischen diesen sowie auch zwischen Akt-abhängigen und -unabhängigen Signalwegen auf die virale Replikation wird nötig sein, um das komplexe Zusammenspiel zwischen dem Hepatitis C Virus und seinem Wirt besser zu verstehen.

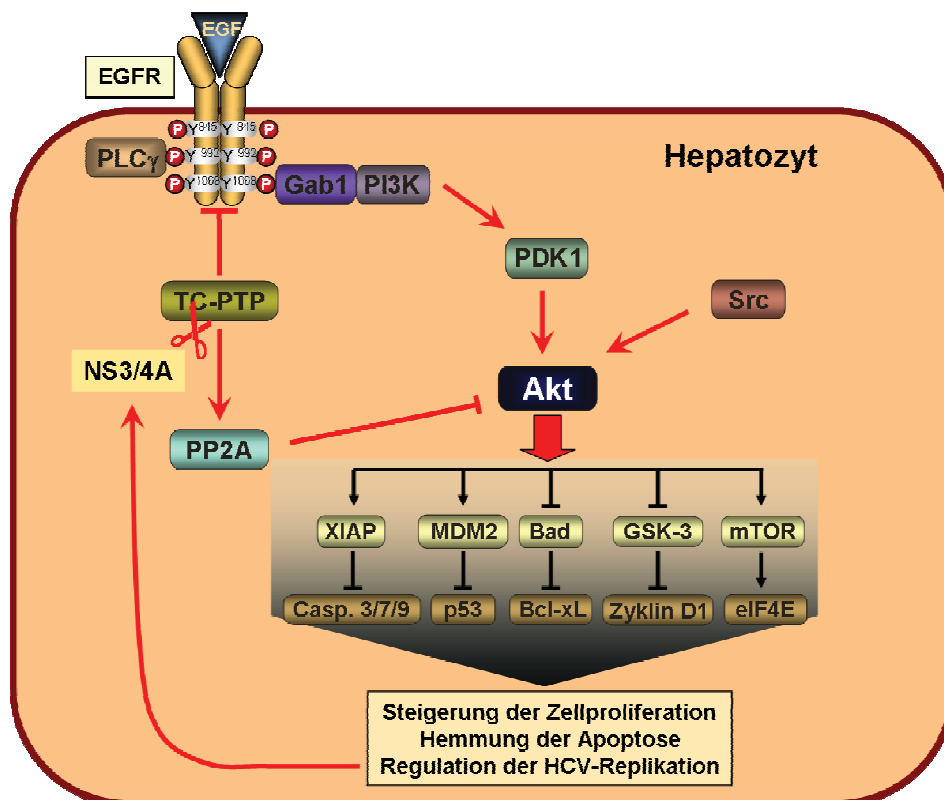


Abbildung 4.3: **Mechanismus der NS3/4A-bedingten Effekte auf die EGF-Signalantwort und die Akt-Aktivierung.** Die Hemmung von TC-PTP durch NS3/4A-abhängige proteolytische Spaltung hat den Verlust der Negativregulation des EGF-Rezeptors und die Erniedrigung der Aktivität der Serin/Threonin-Phosphatase PP2A aufgrund verstärkter Phosphorylierung der Tyrosinstelle 307 der katalytischen Untereinheit zur Folge. Die Verringerung der PP2A-Aktivität resultiert in einer verstärkten Phosphorylierung von Substraten von PP2A wie der Threoninstelle 308 von Akt.

Die im zweiten Teil der Arbeit vorgestellten Daten identifizieren die Phosphatase TC-PTP als Substrat der NS3/4A-Protease von HCV. Es konnte belegt werden, dass die TC-PTP-Expression in NS3/4A- bzw. das HCV-Replikon exprimierenden Zelllinien sowie in Lebergewebe aus HCV-Patienten und transgenen Mäusen mit leberspezifischer NS3/4A-Expression reduziert ist. Weiterhin konnte in einem *in vitro*-Assay die direkte Spaltung von TC-PTP durch NS3/4A demonstriert werden. Die NS3/4A-vermittelte Supprimierung der TC-PTP-Expression führt zu einer konstitutiven Aktivierung von Akt sowie einer Sensitivierung des EGF-Signalweges. Die Aktivierung von Akt ist für die Aufrechterhaltung der viralen Replikation sowie die verstärkenden Effekte von EGF auf die HCV-Replikation notwendig (Abbildung 4.3). Die Inhibierung der NS3/4A-Protease in der Therapie HCV-infizierter würde somit nicht nur die virale Replikation durch Hemmung der Prozessierung des HCV-Polyproteins stören sondern dem Virus auch die Möglichkeit nehmen, die Signaltransduktion des Wirtes zur Optimierung der viralen Replikation zu modulieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Aufrechterhalten einer persistierenden viralen Infektion erfordert, dass Viren wie das Hepatitis C Virus Strategien entwickelt haben, um zum einen die antivirale Immunantwort zu umgehen und zum anderen die Infrastruktur der Wirtszelle für die eigene Replikation zu verwenden. Die hierfür verantwortlichen Mechanismen sind jedoch nur unzureichend verstanden. Kürzlich veröffentlichte Befunde belegen, dass HCV NS3/4A Protease-abhängig die antivirale Immunantwort des Wirts durch proteolytische Spaltung der für die Virus-induzierte Interferonantwort wichtigen Adapterproteine CARDIF und TRIF blockiert. Darüber hinaus legen *in vivo*-Befunde nahe, dass NS3/4A-transgene Tiere eine verminderte Sensitivität gegenüber der hepatotoxischen Wirkung von LPS und TNF α aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass NS3/4A mit der LPS/TNF α -induzierten Entzündungsantwort interferiert.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass NS3/4A zu einer reduzierten Expression von IFN γ im Lebergewebe NS3/4A-transgener Tiere führt und dass dies sehr wahrscheinlich für die ebenfalls nachgewiesene Hemmung der STAT1-Aktivierung durch LPS/D-Galaktosamin bzw. TNF α /D-Galaktosamin verantwortlich ist. Die reduzierte IFN γ -Expression steht hierbei möglicherweise in Zusammenhang mit einer verminderten Expression des Chemokins CXCL9 und einer vermehrten Expression der Chemokine CCL2 und CCL17, die ihrerseits für die in NS3/4A-transgenen Tieren vorliegende Abnahme der Populationen an CD4⁺ T-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen mitverantwortlich sein dürften. Bezeichnenderweise konnte im Lebergewebe NS3/4A-transgener Tiere gleichfalls eine nachhaltig verstärkte Aktivierung der p38^{MAPK}-, der NF κ B- und der STAT3-Signalkaskaden nachgewiesen werden, die eine zentrale Rolle in der Kontrolle der hepatischen Entzündungsantwort spielen.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte im Zellmodell, an Lebern NS3/4A-transgener Tiere sowie an Leberproben von chronisch HCV-infizierten Patienten belegt werden, dass NS3/4A die Tyrosinphosphatase TC-PTP proteolytisch spaltet. Die hieraus resultierende Herabregulation der zellulären Expression von TC-PTP führt zu einer Sensitivierung der

EGF-induzierten Signalvermittlung und zu einer Steigerung der basalen Aktivierung von Akt. Letztere beruht auf einer Verstärkung der inhibitorischen Phosphorylierung der Proteinphosphatase PP2A am Tyrosinrest 307, welche ihrerseits ein wichtiger Negativregulator der Akt-Aktivität ist. Inhibitor- sowie siRNA-basierte Studien in Zellen, die das subgenomische HCV-Replikon exprimieren, belegen ferner, dass die enzymatische Aktivität von Akt nicht nur für eine effiziente Replikation von HCV essentiell ist sondern auch die verstärkende Wirkung von EGF auf die virale Replikation kontrolliert.

6 SUMMARY

In order to maintain a persistent viral infection viruses as the hepatitis C virus have evolved strategies to both circumvent the antiviral immune response and to use the infrastructure of the host cell for their own replication. However, the responsible mechanisms are still incompletely understood. Recently published data show that HCV NS3/4A blocks the antiviral immune response of the host through proteolytical cleavage of the adapter proteins CARDIF and TRIF which are important components of the virus-induced interferon response. Furthermore, *in vivo* experiments in NS3/4A transgenic animals revealed that these mice are less sensitive against the hepatotoxic effects of LPS and TNF α . This implicates that NS3/4A interferes with the LPS/TNF α -induced inflammatory response.

In the first part of the thesis it could be shown that NS3/4A leads to a reduced IFN γ expression in the liver tissue of NS3/4A transgenic mice and that this is most probably responsible for the impairment of the LPS/D-galactosamine- or TNF α /D-galactosamine-mediated STAT1 activation also observed in these animals. The reduced IFN γ expression is possibly connected with a decreased expression of the chemokine CXCL9 and an enhanced expression of the chemokines CCL2 and CCL17 which themselves may play a role in the reduction of the populations of CD4⁺ T cells and murine plasmacytoid dendritic cells found in NS3/4A transgenic animals. Interestingly, in liver tissue of NS3/4A transgenic mice an enhanced activation of the p38^{MAPK}, NF κ B and STAT3 signaling cascades is also observable which play a central role in the control of the hepatic inflammatory response.

In the second part of the thesis it could be shown in cell culture models, in liver tissue from NS3/4A transgenic mice and in liver samples from chronically with HCV infected patients that the tyrosine phosphatase TC-PTP is proteolytically cleaved by the NS3/4A protease of HCV. The subsequent downregulation of the TC-PTP expression results in a sensitivation of the EGF-induced signaling and in an enhancement of the basal Akt activation. The latter is based on an increase of the inhibitory phosphorylation of the protein phosphatase PP2A at tyrosine 307 being itself an important negative

regulator of Akt activity. Furthermore, inhibitor and siRNA based studies in cell lines expressing the subgenomic HCV replicon show that the enzymatic activity of Akt is essential for both an efficient replication of HCV and the enhancing effects of EGF on the viral replication.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
2. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
3. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453-63.
4. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39:5-19.
5. Bode JG, Brenndorfer E, Haussinger D. Hepatitis C Virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol Chem* 2008.
6. Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 2005;19:111-22.
7. Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* 2006;25:5015-25.
8. Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 2003;38:1282-8.
9. Ishii N, Watashi K, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, Shimotohno K. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J Virol* 2006;80:4510-20.
10. Nakagawa S, Umehara T, Matsuda C, Kuge S, Sudoh M, Kohara M. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:882-8.
11. Kawano M, Kumagai K, Nishijima M, Hanada K. Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem* 2006;281:30279-88.
12. Tu H, Gao L, Shi ST, Taylor DR, Yang T, Mircheff AK, Wen Y, Gorbalenya AE, Hwang SB, Lai MM. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 1999;263:30-41.
13. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 2005;79:13473-82.
14. Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, Yoshida H, Iwai T, Matsushita Y, Shimamura H, Araki H, Shimotohno K. Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology* 2004;320:135-43.

15. Kapadia SB, Chisari FV. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2561-6.
16. Ye J, Wang C, Sumpter R, Jr., Brown MS, Goldstein JL, Gale M, Jr. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15865-70.
17. Wang C, Gale M, Jr., Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* 2005;18:425-34.
18. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007;9:1089-97.
19. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut WW, Schirren CA, Waechter M, Backmund M, Pape GR. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003;125:80-8.
20. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999;10:439-49.
21. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-512.
22. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000;132:296-305.
23. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
24. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001;75:5550-8.
25. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002;8:379-85.
26. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-58.
27. He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, Wedemeyer H, Berenguer M, Wright TL, Davis MM, Greenberg HB. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5692-7.
28. Mayo MJ. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *Am J Med Sci* 2003;325:135-48.
29. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G, Bain C. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003;187:1951-8.
30. Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, Rodriguez I, Mayer KH, Chung RT. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and

- peripheral-blood mononuclear cells from HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfected persons. *J Infect Dis* 2005;192:258-65.
31. Ducoulombier D, Roque-Afonso AM, Di Liberto G, Penin F, Kara R, Richard Y, Dussaix E, Feray C. Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* 2004;39:817-25.
 32. Pal S, Sullivan DG, Kim S, Lai KK, Kae J, Cotler SJ, Carithers RL, Jr., Wood BL, Perkins JD, Gretch DR. Productive replication of hepatitis C virus in perihepatic lymph nodes in vivo: implications of HCV lymphotropism. *Gastroenterology* 2006;130:1107-16.
 33. MacParland SA, Pham TN, Gujar SA, Michalak TI. De novo infection and propagation of wild-type Hepatitis C virus in human T lymphocytes in vitro. *J Gen Virol* 2006;87:3577-86.
 34. Kondo Y, Sung VM, Machida K, Liu M, Lai MM. Hepatitis C virus infects T cells and affects interferon-gamma signaling in T cell lines. *Virology* 2007;361:161-73.
 35. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Wang TH, Chen DS. Positive and negative strand of hepatitis C virus RNA sequences in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C: no correlation with viral genotypes 1b, 2a, and 2b. *J Med Virol* 1997;52:270-4.
 36. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-65.
 37. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-82.
 38. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H, Jr., Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-55.
 39. Pitha PM, Kunzi MS. Type I interferon: the ever unfolding story. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;316:41-70.
 40. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 2000;6:1375-9.
 41. Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6895-900.
 42. Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, Phan UT, Milovanovic T. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol* 1999;30:376-82.
 43. Parfieniuk A, Jaroszewicz J, Flisiak R. Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2007;13:5673-81.
 44. Harrison SA. Small molecule and novel treatments for chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2332-8.
 45. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-3.

46. Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001;75:1437-49.
47. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-6.
48. Failla C, Tomei L, De Francesco R. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 1994;68:3753-60.
49. Bartenschlager R, Lohmann V, Wilkinson T, Koch JO. Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol* 1995;69:7519-28.
50. Lin C, Thomson JA, Rice CM. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J Virol* 1995;69:4373-80.
51. Reed KE, Grakoui A, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded NS2-3 protease: cleavage-site mutagenesis and requirements for bimolecular cleavage. *J Virol* 1995;69:4127-36.
52. Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993;67:4665-75.
53. Tomei L, Failla C, Santolini E, De Francesco R, La Monica N. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* 1993;67:4017-26.
54. Kolykhalov AA, Agapov EV, Rice CM. Specificity of the hepatitis C virus NS3 serine protease: effects of substitutions at the 3/4A, 4A/4B, 4B/5A, and 5A/5B cleavage sites on polyprotein processing. *J Virol* 1994;68:7525-33.
55. Serebrov V, Pyle AM. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 2004;430:476-80.
56. Dumont S, Cheng W, Serebrov V, Beran RK, Tinoco I, Jr., Pyle AM, Bustamante C. RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature* 2006;439:105-8.
57. Neddermann P, Clementi A, De Francesco R. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J Virol* 1999;73:9984-91.
58. Lam AM, Keeney D, Eckert PQ, Frick DN. Hepatitis C virus NS3 ATPases/helicases from different genotypes exhibit variations in enzymatic properties. *J Virol* 2003;77:3950-61.
59. Shimakami T, Hijikata M, Luo H, Ma YY, Kaneko S, Shimotohno K, Murakami S. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 2004;78:2738-48.
60. Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity* 2007;27:370-83.
61. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167-72.

62. Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17717-22.
63. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Jr., Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2992-7.
64. Thoren F, Romero A, Lindh M, Dahlgren C, Hellstrand K. A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. *J Leukoc Biol* 2004;76:1180-6.
65. Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L, Jr., Mandrekar P, Zapp M, Szabo G. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2003;170:5615-24.
66. Frelin L, Brenndorfer ED, Ahlen G, Weiland M, Hultgren C, Alheim M, Glaumann H, Rozell B, Milich DR, Bode JG, Sallberg M. The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumour necrosis factor alpha mediated liver disease. *Gut* 2006;55:1475-83.
67. Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3893-6.
68. Ishido S, Muramatsu S, Fujita T, Iwanaga Y, Tong WY, Katayama Y, Itoh M, Hotta H. Wild-type, but not mutant-type, p53 enhances nuclear accumulation of the NS3 protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:431-6.
69. Tanaka M, Nagano-Fujii M, Deng L, Ishido S, Sada K, Hotta H. Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that impair p53 interaction and anti-apoptotic activity of NS3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:792-9.
70. Cheng PL, Chang MH, Chao CH, Lee YH. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 2004;23:7821-38.
71. De Re V, Sansonno D, Simula MP, Caggiari L, Gasparotto D, Fabris M, Tucci FA, Racanelli V, Talamini R, Campagnolo M, Geremia S, Dammacco F, De Vita S. HCV-NS3 and IgG-Fc crossreactive IgM in patients with type II mixed cryoglobulinemia and B-cell clonal proliferations. *Leukemia* 2006;20:1145-54.
72. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198:513-20.
73. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004;103:1433-7.
74. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.
75. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-31.

76. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007;448:501-5.
77. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 2008;452:103-7.
78. Kang DC, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:637-42.
79. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.
80. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Jr., Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005;175:2851-8.
81. Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, Iwakura Y, Barber GN. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* 2007;178:6444-55.
82. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005;23:19-28.
83. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101-5.
84. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994-7.
85. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006;314:997-1001.
86. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8459-64.
87. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003;171:4304-10.
88. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004;5:503-7.

89. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006;439:208-11.
90. Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem* 2003;278:16713-9.
91. Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* 2005;280:36560-6.
92. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 2008;454:523-7.
93. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005;122:669-82.
94. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005;6:981-8.
95. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 2005;19:727-40.
96. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003;300:1148-51.
97. Matsui K, Kumagai Y, Kato H, Sato S, Kawagoe T, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. Cutting edge: Role of TANK-binding kinase 1 and inducible IkappaB kinase in IFN responses against viruses in innate immune cells. *J Immunol* 2006;177:5785-9.
98. Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, Shahangian A, Zarnegar B, Shiba TL, Wang Y, Cheng G. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* 2006;25:3257-63.
99. Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, Lin R. The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol* 2007;8:592-600.
100. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 2000;13:539-48.
101. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005;434:772-7.
102. Balachandran S, Thomas E, Barber GN. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* 2004;432:401-5.

103. Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, Akira S. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol* 2006;176:4520-4.
104. Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 2006;8:907-22.
105. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-21.
106. Horvath CM, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE, Jr. Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol* 1996;16:6957-64.
107. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:778-809, table of contents.
108. Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007;25:71-99.
109. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:505-16.
110. Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:32-43.
111. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2003;284:2-13.
112. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003;284:54-65.
113. Gadella TW, Jr., Jovin TM. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol* 1995;129:1543-58.
114. Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* 2001;311:1011-26.
115. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 2001;70:281-312.
116. Oliva JL, Griner EM, Kazanietz MG. PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors. *Growth Factors* 2005;23:245-52.
117. Rodrigues GA, Falasca M, Zhang Z, Ong SH, Schlessinger J. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* 2000;20:1448-59.
118. Wymann MP, Marone R. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:141-9.
119. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1161-76.
120. Sorkin A, Mazzotti M, Sorkina T, Scotto L, Beguinot L. Epidermal growth factor receptor interaction with clathrin adaptors is mediated by the Tyr974-containing internalization motif. *J Biol Chem* 1996;271:13377-84.
121. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y. Ubiquitin ligase activity

- and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 1999;4:1029-40.
122. Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 1999;274:8335-43.
 123. Kloth MT, Laughlin KK, Biscardi JS, Boerner JL, Parsons SJ, Silva CM. STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem* 2003;278:1671-9.
 124. Agazie YM, Hayman MJ. Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* 2003;23:7875-86.
 125. Haj FG, Verveer PJ, Squire A, Neel BG, Bastiaens PI. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* 2002;295:1708-11.
 126. Tiganis T, Bennett AM, Ravichandran KS, Tonks NK. Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 1998;18:1622-34.
 127. Mattila E, Pellinen T, Nevo J, Vuoriluoto K, Arjonen A, Ivaska J. Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat Cell Biol* 2005;7:78-85.
 128. Reinehr R, Haussinger D. CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signaling. *Arch Biochem Biophys* 2007;462:124-31.
 129. Sibilica M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 2007;75:770-87.
 130. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4207-11.
 131. Tang CK, Gong XQ, Moscatello DK, Wong AJ, Lippman ME. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:3081-7.
 132. Sizeland AM, Burgess AW. Anti-sense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line. *Mol Biol Cell* 1992;3:1235-43.
 133. Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6899-903.
 134. Cool DE, Tonks NK, Charbonneau H, Walsh KA, Fischer EH, Krebs EG. cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5257-61.
 135. Lorenzen JA, Dadabay CY, Fischer EH. COOH-terminal sequence motifs target the T cell protein tyrosine phosphatase to the ER and nucleus. *J Cell Biol* 1995;131:631-43.
 136. Tiganis T, Flint AJ, Adam SA, Tonks NK. Association of the T-cell protein tyrosine phosphatase with nuclear import factor p97. *J Biol Chem* 1997;272:21548-57.

137. Lam MH, Michell BJ, Fodero-Tavoletti MT, Kemp BE, Tonks NK, Tiganis T. Cellular stress regulates the nucleocytoplasmic distribution of the protein-tyrosine phosphatase TCPTP. *J Biol Chem* 2001;276:37700-7.
138. Heinonen KM, Nestel FP, Newell EW, Charette G, Seemayer TA, Tremblay ML, Lapp WS. T-cell protein tyrosine phosphatase deletion results in progressive systemic inflammatory disease. *Blood* 2004;103:3457-64.
139. Persson C, Savenhed C, Bourdeau A, Tremblay ML, Markova B, Bohmer FD, Haj FG, Neel BG, Elson A, Heldin CH, Ronnstrand L, Ostman A, Hellberg C. Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 2004;24:2190-201.
140. Walchli S, Curchod ML, Gobert RP, Arkinstall S, Hooft van Huijsduijnen R. Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on "substrate-trapping" mutants. *J Biol Chem* 2000;275:9792-6.
141. Galic S, Klingler-Hoffmann M, Fodero-Tavoletti MT, Puryer MA, Meng TC, Tonks NK, Tiganis T. Regulation of insulin receptor signaling by the protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Mol Cell Biol* 2003;23:2096-108.
142. Simoncic PD, Lee-Loy A, Barber DL, Tremblay ML, McGlade CJ. The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol* 2002;12:446-53.
143. Yamamoto T, Sekine Y, Kashima K, Kubota A, Sato N, Aoki N, Matsuda T. The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:811-7.
144. Meng TC, Buckley DA, Galic S, Tiganis T, Tonks NK. Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *J Biol Chem* 2004;279:37716-25.
145. Sale EM, Sale GJ. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:113-27.
146. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004;1697:3-16.
147. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 1997;7:261-9.
148. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 1998;279:710-4.
149. Balendran A, Casamayor A, Deak M, Paterson A, Gaffney P, Currie R, Downes CP, Alessi DR. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol* 1999;9:393-404.
150. Laine J, Kunstle G, Obata T, Sha M, Noguchi M. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell* 2000;6:395-407.
151. Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 2000;275:8271-4.

152. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996;15:6541-51.
153. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11211-6.
154. Partovian C, Simons M. Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells. *Cell Signal* 2004;16:951-7.
155. Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, Maeda-Yamamoto M, Kato RM, Littman DR, Leitges M, Rawlings DJ, Kawakami T. Protein kinase C beta11 regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem* 2004;279:47720-5.
156. Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2004;279:41189-96.
157. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307:1098-101.
158. Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2001;276:31858-62.
159. Andjelkovic M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5699-704.
160. Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 2005;18:13-24.
161. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997;278:687-9.
162. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-41.
163. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318-21.
164. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999;401:82-5.
165. Kane LP, Mollenauer MN, Xu Z, Turck CW, Weiss A. Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 2002;22:5962-74.
166. Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2003;11:11-23.

167. Burgering BM, Medema RH. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* 2003;73:689-701.
168. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001;3:245-52.
169. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002;8:1153-60.
170. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002;8:1145-52.
171. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tsihchlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002;8:1136-44.
172. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001;3:973-82.
173. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163-75.
174. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002;110:177-89.
175. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 2005;123:569-80.
176. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 1995;376:599-602.
177. Kane S, Sano H, Liu SC, Asara JM, Lane WS, Garner CC, Lienhard GE. A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem* 2002;277:22115-8.
178. Berwick DC, Dell GC, Welsh GI, Heesom KJ, Hers I, Fletcher LM, Cooke FT, Tavaré JM. Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J Cell Sci* 2004;117:5985-93.
179. Yamada E, Okada S, Saito T, Ohshima K, Sato M, Tsuchiya T, Uehara Y, Shimizu H, Mori M. Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles. *J Cell Biol* 2005;168:921-8.
180. Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* 2007;447:1012-6.
181. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 2001;292:1728-31.

182. Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, Ludwig T, Efstratiadis A, Birnbaum MJ. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* 2005;25:1869-78.
183. Lang R, Heeg K. Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR. *Inflammopharmacology* 1998;6:297-309.
184. Sambrook J, Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000
185. Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1991;19:2499.
186. Kim WH, Hong F, Radaeva S, Jaruga B, Fan S, Gao B. STAT1 plays an essential role in LPS/D-galactosamine-induced liver apoptosis and injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G761-8.
187. Lee HJ, Oh YK, Rhee M, Lim JY, Hwang JY, Park YS, Kwon Y, Choi KH, Jo I, Park SI, Gao B, Kim WH. The role of STAT1/IRF-1 on synergistic ROS production and loss of mitochondrial transmembrane potential during hepatic cell death induced by LPS/d-GalN. *J Mol Biol* 2007;369:967-84.
188. Doherty GM, Lange JR, Langstein HN, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Evidence for IFN-gamma as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1992;149:1666-70.
189. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007;96:41-101.
190. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;12:541-52.
191. Tiganis T, Kemp BE, Tonks NK. The protein-tyrosine phosphatase TCPTP regulates epidermal growth factor receptor-mediated and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem* 1999;274:27768-75.
192. van Vliet C, Bukczynska PE, Puryer MA, Sadek CM, Shields BJ, Tremblay ML, Tiganis T. Selective regulation of tumor necrosis factor-induced Erk signaling by Src family kinases and the T cell protein tyrosine phosphatase. *Nat Immunol* 2005;6:253-60.
193. Chen J, Martin BL, Brautigan DL. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science* 1992;257:1261-4.
194. Chen J, Parsons S, Brautigan DL. Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 1994;269:7957-62.
195. Yang L, Dan HC, Sun M, Liu Q, Sun XM, Feldman RI, Hamilton AD, Polokoff M, Nicosia SV, Herlyn M, Sefti SM, Cheng JQ. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res* 2004;64:4394-9.
196. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985;229:869-71.

197. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987;330:662-4.
198. Ossina NK, Cannas A, Powers VC, Fitzpatrick PA, Knight JD, Gilbert JR, Shekhtman EM, Tomei LD, Umansky SR, Kiefer MC. Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J Biol Chem* 1997;272:16351-7.
199. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745-56.
200. Vitiello PF, Shainheit MG, Allison EM, Adler EP, Kurt RA. Impact of tumor-derived CCL2 on T cell effector function. *Immunol Lett* 2004;91:239-45.
201. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000;404:407-11.
202. Soo HM, Garzino-Demo A, Hong W, Tan YH, Tan YJ, Goh PY, Lim SG, Lim SP. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of CC chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology* 2002;303:253-77.
203. Muhlbauer M, Bosserhoff AK, Hartmann A, Thasler WE, Weiss TS, Herfarth H, Lock G, Scholmerich J, Hellerbrand C. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* 2003;125:1085-93.
204. Ho HH, Ivashkiv LB. Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation. *J Biol Chem* 2006;281:14111-8.
205. Qing Y, Stark GR. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* 2004;279:41679-85.
206. Vlahopoulos SA, Logotheti S, Mikas D, Giarika A, Gorgoulis V, Zoumpourlis V. The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays* 2008;30:314-27.
207. Liedtke C, Trautwein C. The role of JNK2 in toxic liver injury. *J Hepatol* 2006;45:762-4.
208. Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histol Histopathol* 2006;21:69-80.
209. Nakayama T, Hieshima K, Nagakubo D, Sato E, Nakayama M, Kawa K, Yoshie O. Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J Virol* 2004;78:1665-74.
210. Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997;61:246-57.
211. Steinkuhler C, Urbani A, Tomei L, Biasiol G, Sardana M, Bianchi E, Pessi A, De Francesco R. Activity of purified hepatitis C virus protease NS3 on peptide substrates. *J Virol* 1996;70:6694-700.

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Johannes G. Bode, unter dessen Leitung und Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde, für seine kontinuierliche Unterstützung, seine große Bereitschaft zur Diskussion der erhobenen Ergebnisse, seine stets wertvollen Anregungen und die Einführung in das Verfassen wissenschaftlicher Publikationen.

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

Herrn Professor Dr. med. Dieter Häussinger danke ich für die tatkräftige Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe sowie für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in den Laboratorien seiner Klinik an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. Matti Sällberg vom Karolinska-Institut in Stockholm, Schweden danke ich für die fruchtbare Kooperation und nette Gastfreundschaft während meiner drei Forschungsaufenthalte in seinem Labor.

Herrn Professor Dr. Hartmut Hengel und Herrn Professor Dr. Stephan Ludwig (Universität Münster) danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung von S2-Arbeiten zur Herstellung von Vaccinia-Viren bzw. zur Generierung stabiler Zelllinien in ihren Laboratorien.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Experimentellen Hepatologie für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken, hierbei gilt mein besonderer Dank Ute Albrecht, Christian Ehling, Juliane Karthe und Verena Keitel für ihre große Unterstützung und ihre stete Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit der Promotion. Bei den medizinischen Doktoranden Christoph Seifert und Tim Weitz bedanke ich mich für ihre Mitwirkung an den Abbildungen 3.3 bzw. 3.26.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit selbstlos unterstützt haben.

9 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Erwin Daniel Brenndörfer
Geburtstag	06.12.1977
Geburtsort	Kronstadt
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1984-1988	Grundschule Kronstadt
1988-1990	Allgemeinschule Kronstadt
1990-1992	Eckenberg-Gymnasium Adelsheim
1992-1997	Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium Heilbronn
1997-1998	Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund Heilbronn

Studium

1998-2004	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
davon 2001/2002	Praktikumsjahr an den Max-Planck-Instituten für Biochemie und Neurobiologie und dem Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in Martinsried/München
davon 2003/2004	Diplomarbeit zum Thema „RNA-Interferenz in endogenen und viralen Genexpressionssystemen“ an dem Physiologisch-chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und in der Medizinischen Klinik (Abt. I) des Universitätsklinikums Tübingen

Promotion

2004-2008

Promotion zum Thema „Modulation der intrahepatischen Signalvermittlung durch die NS3/4A Protease/Helikase des Hepatitis C Virus“ in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 08.09.2008

Erwin Daniel Brenndörfer