



**Interaktion von c-Src mit der viralen Polymerase
NS5B des Hepatitis C Virus und
Generierung NS5B-spezifischer humaner
Antikörperfragmente**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Katrin Büther

aus Ochtrup

Oktober 2009

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 G. Bode

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.10

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht

in Originalarbeiten

Büther, K., A. Pfannkuche, J. Karthe, R. Bartenschlager, D. Häussinger, and J. G. Bode. 2009. *The tyrosine kinase c-Src is crucial for replication of the hepatitis C virus*. (manuscript in preparation)

als Posterbeiträge

Büther, K., K. Tessmann, D. Häussinger, and T. Heintges. *Cloning, characterization and intracellular binding of human recombinant antibody fragments against HCV-Core*. 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oktober 2004, Heidelberg.

Büther, K., D. Häussinger, and J. G. Bode. *Inhibitory antibodies against Hepatitis C Virus (HCV) nonstructural protein 5B (NS5B)*. 4th International Conference of the Collaborative Research Center SFB 575 “Experimental Hepatology” – Regenerative Hepatology, November 2008, Düsseldorf.

Pfannkuche, A., K. Büther, D. Häussinger, and J. G. Bode. *Influence of c-Src on viral replication of HCV. Modulation of the host cell signaling by the NS2 protease of HCV*. 4th International Conference of the Collaborative Research Center SFB 575 “Experimental Hepatology” – Regenerative Hepatology, November 2008, Düsseldorf.

Pfannkuche, A., K. Büther, J. Karthe, E. Brenndörfer, D. Häussinger, and J. G. Bode. *c-Src is required for HCV replication*. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oktober 2009, Nizza, Frankreich.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	
1.1 Das Hepatitis C Virus	1
1.1.1 Erkrankung und Therapie	1
1.1.2 Molekulare Organisation des Hepatitis C Virus	2
1.1.3 HCV-Lebenszyklus	5
1.1.4 Modellsysteme für die Erforschung des Hepatitis C Virus in Zellkultur	7
1.1.5 Zelluläre Kofaktoren der HCV-Replikation	8
1.2 Zelluläre Hydratation	10
1.2.1 Dynamik der Zellhydratation	10
1.2.2 Zelluläre Hydratation und virale Replikation	12
1.3 Die Src-Protein-Tyrosin-Kinasen	13
1.3.1 Expression und Aufbau der Src-Kinasen	13
1.3.2 Regulation der Src-Kinasen	15
1.3.3 Die Src-Kinase c-Src	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Materialien, Substanzen und Lösungen	20
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden	25
2.2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	27
2.2.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	35
2.2.4 Phagen-Display	39
3. ERGEBNISSE	
3.1 Einfluss von Anisoosmolarität auf die Replikation von HCV	47
3.1.1 Hypoosmolarität supprimiert die virale Replikation	47
3.1.2 Osmolaritätsabhängigkeit der viralen Replikation	49
3.1.3 Effekt von Raffinose auf die virale Replikation	50
3.1.4 Pharmakologische Charakterisierung der hypoosmotisch induzierten Hemmung der viralen Replikation	51

3.2	c-Src beeinflusst die Replikation von HCV	53
3.2.1	Inhibitoren der Src-Kinase-Familie supprimieren die HCV-Replikation	54
3.2.2	Eine konstitutiv aktive Src steigert die Expression von NS5A	55
3.2.3	siRNA- <i>Silencing</i> von c-Src inhibiert die virale Replikation	56
3.2.4	c-Src interagiert mit NS5B	58
3.2.5	c-Src beeinflusst die subzelluläre Organisation der viralen Proteine	63
3.3	Generierung NS5B-spezifischer humaner Antikörperfragmente	65
3.3.1	Affinitätsselektion	66
3.3.2	Immunoblot-Analysen	68
3.3.3	Sequenzierung und Klassifizierung der variablen Domänen	69
3.3.4	Expression von rekombinantem NS5B und His-Pulldown-Experimente	71
3.3.5	Polymerase-Aktivitäts-Assay	72
3.3.6	Generierung und Testung von YFP- und CFP-Fusionsproteinen	73
4.	DISKUSSION	
4.1	Anisoosmolarität beeinflusst die HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell	75
4.2	c-Src beeinflusst die HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell	78
4.3	Generierung NS5B-spezifischer humaner Antikörperfragmente	83
5.	ZUSAMMENFASSUNG	88
6.	SUMMARY	89
7.	LITERATURVERZEICHNIS	90
8.	DANKSAGUNG	105
9.	LEBENS LAUF	106

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
ATF-1	<i>activating transcription factor 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
c-Src	<i>cellular sarcoma</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
CH	<i>constant heavy</i>
CHK	CSK-homologe Kinase
CL	<i>constant light</i>
CSK	C-terminale Src-Kinase
Cy3	Cyanin 3
CyPB	Cyclophilin B
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DENV	Denguevirus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMCV	Encephalomyokarditis-Virus
ER	endoplasmatisches Retikulum
erbB2	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>

Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FR	<i>framework region</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gly	Glycin
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Herbimycin A
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstelle
Jak 1	<i>Janus kinase 1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria-broth</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LMP2A	<i>latent membrane protein 2A</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mio	Million
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
Nef	<i>negative factor</i>
neo	Neomycinphosphotransferase
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
nm	Nanometer

NS	nicht-strukturell
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTR	nicht-translatierte Region
OA	Okadainsäure
OD	optische Dichte
P	Prolin
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
<i>pe/B</i>	<i>pectate lyase B</i>
PEP	<i>proline-enriched phosphatase</i>
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PI-3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenyl Phosphat
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PRK2	Proteinkinase-C-ähnliche Kinase 2
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RVD	<i>regulatory volume decrease</i>
RVI	<i>regulatory volume increase</i>
scFv	<i>single-chain variable fragment</i>
sec	Sekunde
Ser	Serin
SD	<i>standard deviation</i>
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	Src-Homologie
SHP-1	<i>src homology phosphatase-1</i>
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SR-BI	<i>scavenger receptor class B type I</i>
TAE	Tris-Acetat
TBS	<i>tris buffered saline</i>

TC-PTP	<i>T-cell protein tyrosine phosphatase</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TLP	Triton-Lysispuffer
Tris	Trishydroxy-Aminoethan
Tyr	Tyrosin
U	unit(s)
UTP	Uraciltriphosphat
UV	ultraviolett
v-Src	<i>viral sarcoma</i>
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VH	<i>variable heavy</i>
VL	<i>variable light</i>
Vrk1	<i>vaccinia related kinase 1</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WNV	West-Nil-Virus
X	beliebige Aminosäure
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1. EINLEITUNG

1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist weltweit eine führende Ursache chronischer Hepatitiden und ihrer Folgezustände wie Leberzirrhose und Hepatozelluläres Karzinom. Vor der Identifikation des verursachenden Agens in 1989 wurde die virale Hepatitis C als parenteral übertragene Non-A-/Non-B-Hepatitis bezeichnet ^{1, 2}. Heute, 20 Jahre nach der Identifikation des Virus, schätzt die Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass etwa 180 Mio. Menschen, was etwa 3% der Weltbevölkerung entspricht, mit HCV chronisch infiziert sind und dass sich jedes Jahr etwa 3 bis 4 Mio. Menschen neu infizieren. Somit stellt HCV ein globales gesundheitspolitisches Problem dar ³.

Die Übertragung des Hepatitis C Virus erfolgt durch parenteralen oder permukosalen Kontakt mit infiziertem Blut oder Körperflüssigkeiten ⁴. Übertragungen durch Organtransplantationen und nicht auf HCV-Infektion getestete Bluttransfusionen, durch Wiederverwendung von inadäquat sterilisierten Nadeln, Spritzen oder anderer medizinischen Ausrüstung oder durch gemeinsame Benutzung einer Nadel unter Drogenabhängigen sind gut dokumentiert ⁵. Sexuelle und perinatale Übertragungen werden beschrieben, sind jedoch als Übertragungsweg weniger gut evaluiert.

1.1.1 Erkrankung und Therapie

Primäre Infektionen mit HCV sind überwiegend asymptomatisch und führen in etwa 80% der Fälle zu persistierenden Infektionen ⁶. Individuen mit chronischer Infektion entwickeln eine progressive hepatische Fibrose, die mit fortschreitender Dauer der Infektion zu einem erhöhten Risiko einer Zirrhose, Leberversagen und Hepatozellulärem Karzinom (HCC) führt ⁷. Nur 15-30% der HCV-Infektionen heilen selbständig aus, in den meisten Fällen (70-85%) entwickelt sich eine persistierende Virämie und eine chronische Hepatitis ⁴. Bei etwa 10-20% der chronisch infizierten Patienten findet eine Progression zur Leberzirrhose statt, und in 1-4% dieser Fälle pro Jahr entsteht ein Hepatozelluläres Karzinom.

Obwohl die Leber das Hauptorgan der HCV-Replikation zu sein scheint, existieren Hinweise auf extrahepatische Reservoirs wie periphere Blutlymphozyten, Darmepithelzellen ⁸ und das zentrale Nervensystem ⁹. Der klinische Nachweis einer HCV-Infektion erfolgt durch die Detektion von HCV-spezifischen Antikörpern im Blut durch ELISA oder der viralen RNA

durch RT-PCR¹⁰. Ein direkter Nachweis von Virus-Antigenen ist aufgrund der geringen Level in infizierten Zellen *in vivo* schwer¹¹.

Die gegenwärtige Standardtherapie von Patienten mit chronischer HCV-Infektion ist eine Kombination von pegyliertem Interferon- α (IFN- α) und Ribavirin^{12, 13}. Bei Interferonen handelt es sich um eine Gruppe von natürlich vorkommenden Zytokinen, die eine Vielzahl von immunmodulatorischen, antiproliferativen und antiviralen Effekten aufweisen. Ribavirin ist ein Purin-Nukleosid, welches nur antivirale Effekte zeigt, wenn es mit IFN- α kombiniert wird. Die Kombinationstherapie erreicht eine Effektivität von 42-46% bei Patienten mit Genotyp-1-Infektionen und ca. 80% bei denen mit Genotyp 2 oder 3. Über 60% der chronischen HCV-Infektionen in Europa und Asien und ca. 70-80% in den USA werden vom Genotyp 1 verursacht¹⁴, daher ist die Entwicklung von neuen antiviralen Strategien gegen HCV dringend notwendig.

1.1.2 Molekulare Organisation des Hepatitis C Virus

Genetische Diversität

Das Hepatitis C Virus ist ein umhülltes Positiv-Strang-RNA-Virus, das zum Genus *Hepacivirus* der Familie der *Flaviviridae* gehört. Basierend auf Sequenzanalysen können HCV-Genome in 6 Genotypen klassifiziert werden, die sich durchschnittlich in 30-33% ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden¹⁵. Jeder Genotyp umfasst eine Serie von enger verwandten Subtypen, die eine Nukleotidsequenz-Heterogenität von etwa 20-25% aufweisen. Als Resultat der fehlenden *proof-reading*-Aktivität der viralen RNA-Polymerase NS5B und der damit einhergehenden fehlerbehafteten RNA-Replikation mit hoher Frequenz an neu aufgetretenen Mutationen, kommt es innerhalb eines infizierten Patienten zu einer Vielzahl von in der genetischen Sequenz divergierenden Spezies, die auch als Quasispezies bezeichnet werden¹⁶⁻¹⁸.

Die meist verbreiteten Varianten in den westlichen Ländern sind Genotyp 1 und 2. Diese wurden während der letzten 50 bis 70 Jahre aufgrund von Übertragungen durch Bluttransfusionen und anderen medizinischen Prozeduren weit verbreitet. Gleichwohl deutet die weit verbreitete Verteilung der Genotypen 1-6 in humanen Populationen an, dass alle gleich erfolgreich sind in der Aufrechterhaltung einer Infektion¹⁹.

Genomorganisation und Funktion der viralen Proteine

Das Hepatitis C Virus Partikel ist etwa 50-60 nm im Durchmesser groß. Das einzelne Positiv-Strang-RNA-Genom hat eine Länge von ca. 9,6 kb. Das Genom kodiert ein großes Polyprotein von ungefähr 3000 Aminosäuren und ist am Amino- und Carboxyterminus von

hochgradig strukturierten nicht-translatierten Regionen (NTR) flankiert (Abbildung 1.1). Die 5'-NTR umfasst 341 Nukleotide und enthält eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES), die die cap-unabhängige Expression des Polyproteins vermittelt^{20, 21}. Dieser Prozess wird zusätzlich reguliert durch eine RNA-Pseudoknoten-Struktur *upstream* des Startcodons, die entscheidend ist für die Translationsinitiation²². Es konnte gezeigt werden, dass die ersten 125 Nukleotide essentiell für die RNA-Replikation sind, aber dass die vollständige 5'-NTR für eine maximale Replikationseffizienz erforderlich ist^{23, 24}. Die 3'-NTR der Positiv-Strang-RNA besitzt eine dreiteilige Struktur: eine variable Region, die zum Teil entbehrlich ist für die Replikation *in vivo*²⁵ und *in vitro*, aber wichtig für eine effiziente RNA-Replikation zu sein scheint^{26, 27}, ein poly(U)-Abschnitt mit variabler Länge und eine hoch konservierte Sequenz aus 98 Nukleotiden, die essentiell für die Replikation *in vitro* und *in vivo* ist²⁵⁻²⁷. Weitere wichtige cis-agierende RNA-Elemente sind in der kodierenden Region von NS5B lokalisiert²⁸.

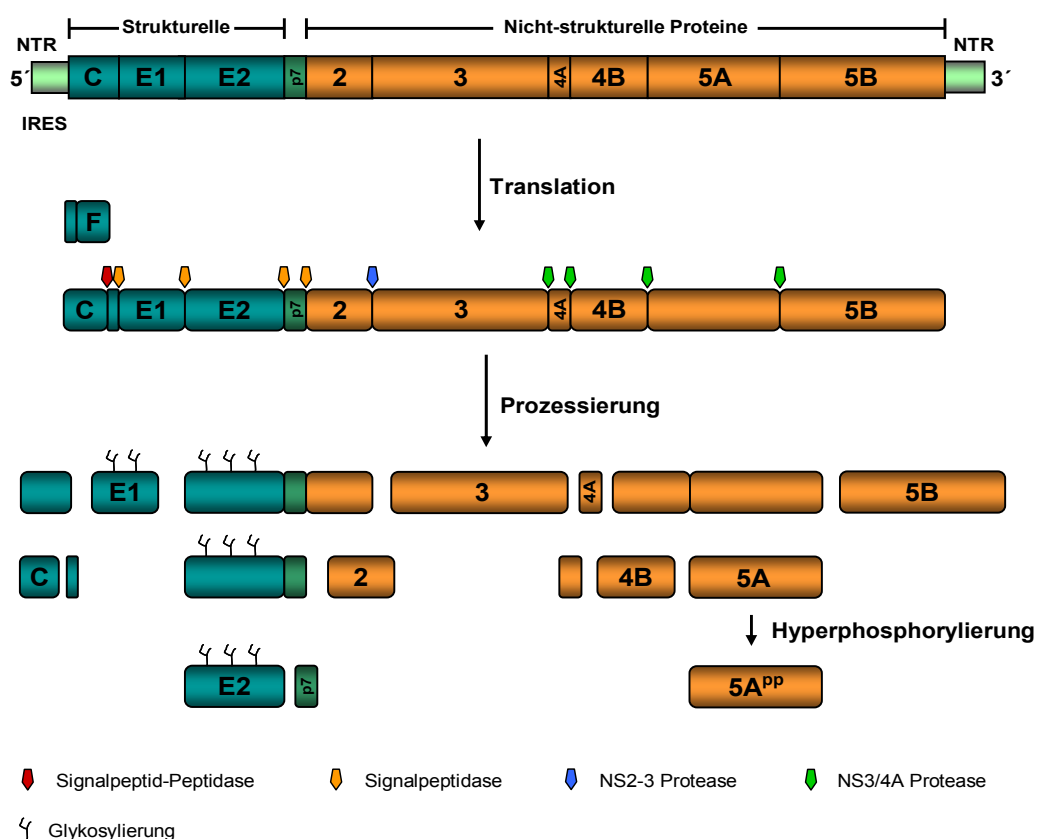


Abbildung 1.1: **Genomische Organisation und Prozessierung des Polyproteins von HCV**

Das HCV-Genom besitzt einen einzelnen offenen Leseraster, der 5' und 3' von nicht-translatierten Regionen (NTR) flankiert wird. Das translatierte, etwa 3000 Aminosäuren große Polyprotein wird anschließend durch wirtseigene und virale Proteasen in 10 funktionelle Proteine gespalten (verändert nach Bartenschlager et al²⁹).

Das Polyprotein wird ko- und posttranslationell durch zelluläre und virale Proteasen in wenigstens 10 verschiedene Proteine prozessiert: die strukturellen Proteine Core, E1 und

E2, die das Virus-Partikel bilden, das p7-Protein, das als Ionenkanal fungiert, sowie die nicht-strukturellen Proteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B, die in die HCV-Replikation involviert sind. Zudem wurde die Expression eines neuen HCV-Proteins beschrieben³⁰⁻³². Die Translation dieses zusätzlichen Genprodukts beginnt am gleichen Startkodon wie Core, doch durch eine Leserasterverschiebung wird das sogenannte Frameshift (F)-Protein (~17 kDa) gebildet³³, dessen Rolle im HCV-Lebenszyklus gegenwärtig noch unbekannt ist. Die individuellen funktionellen Produkte des Polyproteins werden durch verschiedene Spaltungsereignisse freigesetzt (Abbildung 1.1). Die Core- bis NS2-Region wird durch die zelluläre Signalpeptidase und die Signalpeptid-Peptidase prozessiert, der Carboxyterminus von NS2 wird von NS3 durch die NS2-3 Protease freigesetzt, und alle anderen Spaltungen werden durch den NS3/4A-Komplex vermittelt.

Core (~21 kDa) fungiert primär beim Aufbau der viralen Capsidhülle³⁴ und interagiert mit dem Hüllprotein E1^{35, 36}.

Die glykosylierten Hüllproteine E1 (30-35 kDa) und E2 (70-72 kDa)^{37, 38} sind vermutlich verantwortlich für die Anhaftung an die Zelle durch die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren wie beispielsweise CD81, SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) und LDL (*low-density lipoprotein*)-Rezeptor³⁹⁻⁴¹.

Das integrale Membranprotein p7 ist ein kleines hydrophobes Protein (~7 kDa) mit unbekannter Funktion, das zwischen den strukturellen und nicht-strukturellen Regionen des Polyproteins lokalisiert ist^{42, 43}. Es wird angenommen, dass p7 zur Familie der Viroporine gehört, da es die Membranpermeabilität verändern kann^{44, 45}. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass p7 essentiell für die Produktion von infektiösen Virionen ist^{46, 47}.

NS2 (~23 kDa) ist ein hydrophobes Membranprotein⁴⁸, das als Cysteinprotease fungiert^{49, 50}. Zusammen mit dem aminoterminalen Drittel von NS3 bildet es die NS2-3 Protease, die verantwortlich ist für die autokatalytische Spaltung zwischen NS2 und NS3^{48, 51, 52}. Die präzise biologische Funktion von NS2 muss noch aufgeklärt werden; vor kurzem erschienene Arbeiten deuten darauf hin, dass es eine Rolle bei der Produktion von infektiösen Viren spielt^{46, 53, 54}.

NS3 (~70 kDa) ist ein hauptsächlich cytosolisch lokalisiertes, multifunktionelles Protein⁵⁵. Neben seiner Rolle als Bestandteil der NS2-3 Protease beinhaltet NS3 eine Serinprotease-Domäne in den aminoterminalen 180 Aminosäuren des Proteins⁵⁶⁻⁵⁹ und eine NTPase/Helikase-Domäne im carboxyterminalen Bereich^{60, 61}, die essentiell ist für die virale Replikation⁶².

Bei NS4A (~8 kDa) handelt es sich um einen Kofaktor der NS3-Protease, der erforderlich ist für eine effiziente proteolytische Prozessierung *downstream* von NS3⁶³⁻⁶⁶.

NS4B (~27 kDa) ist ein hydrophobes Protein, das vermutlich eine strukturelle Rolle bei der RNA-Replikation spielt, als Gerüst für die Assemblierung des Replikationskomplexes^{67, 68}.

NS5A (56 kDa bzw. 58 kDa) ist ein überwiegend hydrophiles, RNA-bindendes⁶⁹ Phosphoprotein, das über eine aminoterminal amphipathische α -Helix mit der ER-Membran assoziiert ist^{70, 71} und essentiell für die virale Replikation ist^{72, 73}. NS5A liegt in der Zelle bereits basal phosphoryliert vor und kann durch zelluläre Kinasen in einen hyperphosphorylierten Zustand überführt werden, welcher in der elektrophoretischen Auftrennung durch einen Größenshift zu Ausdruck kommt. Die Regulation und Funktion der Hyperphosphorylierung, sowie die hierfür verantwortlichen zellulären Kinasen sind nur partiell geklärt. Eine Kinase, die hierfür jedoch von wesentlicher Bedeutung zu sein scheint, ist die Casein-Kinase I⁷⁴⁻⁷⁶. Die Tatsache, dass die hyperphosphorylierte Form von NS5A eine kürzere Halbwertszeit aufweist⁷⁷, deutet an, dass beide NS5A-Formen verschiedene Funktionen in der Regulation der viralen Replikation inne haben, die bislang jedoch ungeklärt sind.

NS5B (~68 kDa) ist die viruskodierte RNA-abhängige RNA-Polymerase und damit das Schlüsselenzym des viralen RNA-Replikationskomplexes. Sie gehört zu einer relativ kleinen Klasse von Membranproteinen, den sogenannten *tail-anchored*-Proteinen^{78, 79}. NS5B kann die RNA-Synthese *de novo* oder Primer-abhängig initiieren; vermutlich erfolgt die *de novo*-Initiation auch *in vivo*⁸⁰⁻⁸².

Die viralen NTRs enthalten spezifische Signale, die wichtig sind für die effiziente Initiation der Positiv- und Negativ-Strang-RNA-Synthese und durch die HCV-Polymerase erkannt werden⁸³.

1.1.3 HCV-Lebenszyklus

Das derzeitige Verständnis des Replikationszyklus von HCV basiert zum Teil noch immer auf Annahmen, die partiell von verwandten Viren/Virengruppen abgeleitet wurden, da vollständig permissive Zellkultursysteme, die eine effiziente Virusvermehrung erlauben, erst seit kurzem verfügbar sind. Trotzdem konnten durch die Verfügbarkeit von anderen *in vitro*-Systemen einige Details herausgearbeitet werden. Von größter Bedeutung waren Replikons, die die intrazellulären Schritte der RNA-Replikation rekapitulieren. Bevor im Jahr 2005 die Produktion von infektiösen HCV-Partikeln in Zellkultur möglich wurde⁸⁴⁻⁸⁶, waren HCV-Pseudopartikel (basierend auf Retroviren, die HCV-Glykoproteine in ihrer Hülle enthalten^{87, 88}) hilfreich bei der Analyse der frühen Ereignisse des Infektionsprozesses. Eine allgemeine Übersicht des Replikationszyklus von HCV ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

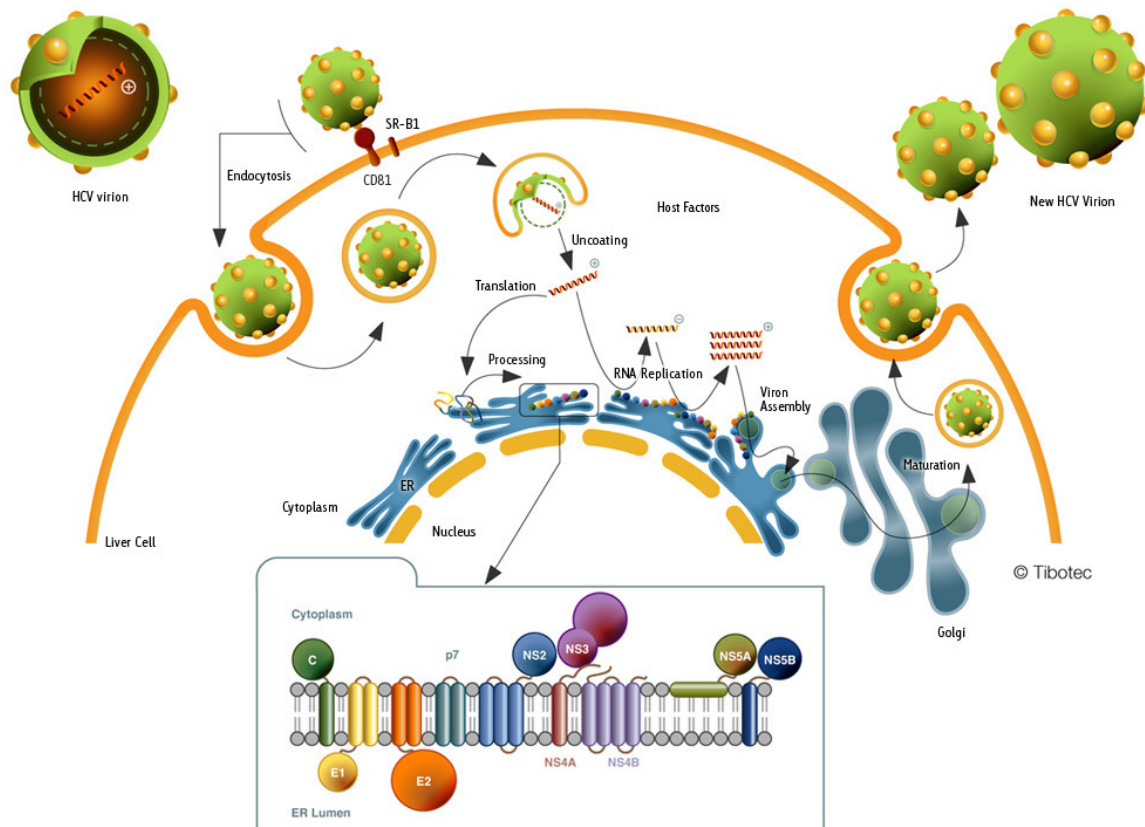


Abbildung 1.2: **Der Lebenszyklus des Hepatitis C Virus**

HCV bindet an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und wird dort endozytotisch internalisiert. Durch Verschmelzung der Vesikelmembran und der Virushülle kommt es zur Freisetzung des viralen Genoms. Nach der Translation und der Prozessierung der Virusproteine kommt es an speziellen Membranstrukturen des ER zur Ausbildung von Replikationskomplexen in Form eines membranösen Netzes. Über den Golgi-Apparat erfolgt die Assemblierung, Reifung und Freisetzung neu produzierter Virionen durch den konstitutiv sekretorischen Weg (Quelle: Tibotec Pharmaceuticals Ltd.; <http://www.tibotec.com/>).

Nach gegenwärtigem Kenntnisstand interagiert das Hepatitis C Virus mit spezifischen Oberflächenrezeptoren wie CD81, SR-BI und Claudin 1^{40, 41, 89} und wird in der Folge internalisiert. Die Fusion der viralen und der zellulären Membranen, vermutlich getriggert durch den niedrigen pH-Wert des endozytotischen Kompartiments^{88, 90, 91}, führt zum Abbau der Virushülle und der nachfolgenden Freisetzung der Positiv-Strang-RNA in das Zytoplasma der infizierten Zelle. Diese RNA fungiert zuerst als *messenger*-RNA (mRNA) für die virale Proteinsynthese am rauen ER. Zusammen mit der viralen RNA bilden dann die nicht-strukturellen Proteine den Replikationskomplex, der sich in vesikulären Membranstrukturen, dem sogenannten membranösen Netz, befindet⁹². Die Replikationskomplexe sind verantwortlich für die Amplifikation des HCV-Genoms. Die Positiv-Strang-RNA wird in einen Negativ-Strang transkribiert, der dann als Matrize die Synthese neuer Positiv-Strang-RNAs ermöglicht. Die HCV RNA-Genome können für die Translation, Synthese neuer Negativ-Strang-RNAs oder für die Verpackung in neue Viruspartikel verwendet werden. Neu synthetisierte Virionen verlassen die Zelle durch den konstitutiven Sekretionsweg²⁹.

1.1.4 Modellsysteme für die Erforschung des Hepatitis C Virus in Zellkultur

Trotz der zahlreich unternommenen Versuche stellte sich die Vermehrung von HCV in Zellkultur überraschenderweise als schwierig heraus. Die meisten Experimente basierten auf der Kultivierung von primären Zellen, die aus Gewebe von persistierend infizierten Patienten isoliert wurden oder der Infektion von primären Zellkulturen oder Zelllinien mit HCV ⁹³. Allerdings war die Reproduzierbarkeit dieser Systeme gering und die niedrigen Level der HCV-Replikation forderten den Einsatz von höchst sensitiven RT-PCR-basierten Methoden ⁹⁴⁻⁹⁶.

Ein Durchbruch kam mit der Einführung des Replikon-Systems durch Lohmann et al. in 1999 ⁹⁷. Dieses System basiert auf der autonomen Replikation von selektierbaren subgenomischen HCV-RNAs, den sogenannten Replikons (Abbildung 1.3). Diese RNAs leiten sich von einem Konsensus-Genom des Genotyps 1b ab, und zwar durch die Deletion der kodierenden Region für Core bis NS2 und die Insertion eines Selektionsmarkers (Neomycinphosphotransferase (*neo*), verleiht Resistenz gegen das Cytostatikum G418). Die Einführung einer zweiten IRES vom Encephalomyokarditis-Virus (EMCV) erlaubt die Translation der nicht-strukturellen HCV-Proteine NS3 bis NS5B. Nach der Transfektion der RNAs in die humane Hepatom-Zelllinie Huh7 ⁹⁸ konnten einige wenige G418-resistente Kolonien erhalten werden, die hohe Mengen an autonom replizierenden HCV-RNAs enthielten ⁹⁹. Diese Zellen sind ein geeignetes Hilfsmittel für die Erforschung der HCV-Replikation. Werden die Replikon-Zellen unter kontinuierlichem Selektionsdruck passagiert, zeigen die RNAs eine stabile Replikation und Translationslevel für viele Jahre ¹⁰⁰.

Bei den Huh9-13-Zellen, die in der Arbeit verwendet wurden, handelt es sich um den Zellklon 9-13 einer Huh7-Zelllinie, die stabil mit dem HCV-Replikon I₃₇₇/NS3-3' transfiziert wurden.



Abbildung 1.3: **Struktur des subgenomischen HCV-Replikons I₃₇₇/NS3-3'**

Das Replikon enthält die 5' HCV-IRES (Nukleotide 1-377), eine EMCV-IRES und die HCV-Sequenzen von NS3 bis zum 3'-Ende. Zusätzlich besitzt es ein Neomycinphosphotransferase-Gen (*neo*), welches als Selektionsmarker dient.

Die ursprünglich generierten HCV-Replikons zeigten in Zellkultur nur niedrige Replikationsraten. Durch Zellkultur-adaptive Mutationen, die in fast allen nicht-strukturellen Proteinen auftreten und z. T. künstlich erzeugt werden, kommt es zu einer enorm verstärkten Replikationsrate in Huh7-Zellen ^{72, 98, 101}.

Zusätzlich zu den subgenomischen Replikons wurden inzwischen auch Vollängen-Replikons erzeugt, die in Huh7-Zellen effizient replizieren und es erlauben, alle Abschnitte des HCV-Lebenszyklus zu erforschen ¹⁰²⁻¹⁰⁵.

1.1.5 Zelluläre Kofaktoren der HCV-Replikation

Viren sind obligatorisch intrazelluläre Parasiten, die beständig auf Wirtszell-Ressourcen zurückgreifen: neben der Verwendung von generellen zellulären Mechanismen wie Translation, Energieversorgung und Sekretion rekrutieren viele Viren spezifische Wirtszell-Faktoren für besondere Zwecke. Diese Faktoren könnten als Ziel von antiviralen Therapeutika dienen und werden demzufolge intensiv untersucht. Einige zelluläre Proteine, die wichtig für die RNA-Replikation von HCV sind, konnten bereits durch Proteom-Analysen, wie das *Yeast Two-Hybrid*-System identifiziert werden. Eine Klasse sind RNA-bindende Proteine. Neben den ribosomalen Proteinen sind auch andere Wirtszell-Faktoren in virale Translationsprozesse involviert. So konnte belegt werden, dass PTB (*polypyrimidine tract-binding protein*) mit NS3 und NS5B interagiert und durch Blockierung der Bindung von NS5B an die 3'-NTR die virale Replikation hemmt, aber eine aktive Rolle als Enhancer der HCV-Translation spielt ¹⁰⁶. NS5A hingegen interagiert mit dem RNA-bindenden Protein La ¹⁰⁷, und Untersuchungen, in denen die La-Expression durch spezifische siRNA unterdrückt wurde, legen nahe, dass La für eine effiziente HCV-Replikation erforderlich ist ¹⁰⁶. Durch die Verwendung von siRNA konnte auch nachgewiesen werden, dass Nucleolin ein Wirtsfaktor ist, der mit NS5B interagiert ¹⁰⁸ und unabdingbar für die HCV-Replikation ist ¹⁰⁹.

Andere zelluläre Proteine, die als Kofaktoren der viralen Replikation agieren, sind unter anderem Amphiphysin II, VAP-A, VAP-B, Cyclophilin B, α -Actinin, und PRK2.

Bei Amphiphysin II handelt es sich um ein multifunktionelles Adapterprotein, das in der Clathrin-vermittelten Endozytose impliziert ist. NS5A interagiert mit Amphiphysin II ¹¹⁰ und diese Interaktion resultiert in der Reduktion der Phosphorylierung von NS5A ¹¹¹.

Sowohl NS5A als auch NS5B interagieren mit hVAP-A (*human vesicle-associated-membrane-protein associated protein A*) ¹¹². hVAP-A, ein tSNARE-Protein (*target-membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*), ist überwiegend mit dem ER, dem Golgi und prälysosomalen Membranen assoziiert und spielt wahrscheinlich eine Rolle beim intrazellulären Vesikeltransport. Die Interaktionen mit NS5A und NS5B sind daher möglicherweise verantwortlich für die Assoziation der HCV-Replikationskomplexe an Cholesterin-reiche *Lipid rafts* ¹¹³. Des Weiteren führt der *Knockdown* von hVAP-A durch siRNA zur Inhibition der viralen RNA-Replikation ¹¹⁴. Im Jahr 2005 konnte auch eine Interaktion zwischen VAP-B mit NS5A und NS5B beschrieben werden ¹¹⁵. So spielen beide

Proteine, VAP-B zusätzlich zu hVAP-A, eine wichtige Rolle bei der Replikation des HCV-Genoms.

Cyclophilin B (CyPB) ist ein Cyclosporin A-bindendes Chaperon mit einer Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität. CyPB gehört zur Familie der Immunophilinen und ist am ER lokalisiert. Es konnte belegt werden, dass CyPB direkt mit NS5B interagiert und erforderlich für eine effiziente Replikation ist ¹¹⁶. Es stimuliert die RNA-Synthese durch Modulation der RNA-Bindungsaktivität von NS5B. Cyclosporin A beeinträchtigt diese Regulation der NS5B-RNA-Bindung durch CyPB und inhibiert so die Replikation ¹¹⁷.

α -Actinin ist ein Mitglied der Superfamilie der Aktin-bindenden Proteine und interagiert direkt mit NS5B. Befunde legen nahe, dass α -Actinin eine Komponente des HCV-Replikationskomplexes ist und durch Modulation der Polymerase-Aktivität von NS5B eine Rolle bei der viralen Replikation spielt ¹¹⁸. NS5B interagiert durch α -Actinin eventuell auch mit Aktin.

Bei PRK2 handelt es sich um die Proteinkinase-C-ähnliche Kinase 2, die den Befunden von Kim et al. zufolge mit der NS5B-Polymerase interagiert und diese phosphoryliert ¹¹⁹. Die HCV-Replikation wird durch die Phosphorylierung von NS5B durch PRK2 reguliert; so wird durch PRK2-spezifische siRNA nicht nur die NS5B-Phosphorylierung supprimiert, sondern auch die virale Replikation gehemmt. Eine Überexpression von PRK2 hingegen verstärkt die Replikation signifikant, was auf einen positiven Effekt der NS5B-Phosphorylierung auf die virale Replikation hindeutet.

Durch Screening einer siRNA-Bibliothek, die gegen humane Proteinkinasen gerichtet ist, konnten 3 weitere Kinasen identifiziert werden, durch deren *Silencing* die viralen RNA- und Protein-Level im HCV-Replikon-System reduziert wurden. Diese Kinasen, die in die HCV-Replikation involviert zu sein scheinen, sind CSK, Jak 1 und Vrk1 ¹²⁰.

Trotz der zahlreichen mittlerweile identifizierten zellulären Kofaktoren der HCV-Replikation ist der Mechanismus der viralen RNA-Synthese immer noch größtenteils unklar. Die Interaktion von zellulären und viralen Proteinen ist in vielen Fällen erwiesen und ein Effekt auf die virale Replikation nachgewiesen, doch die Funktionen und das Zusammenspiel der verschiedenen zellulären und viralen Faktoren sind noch weit davon entfernt, verstanden zu sein.

1.2 Zelluläre Hydratation

1.2.1 Dynamik der Zellhydratation

Der zelluläre Hydratationszustand ist dynamisch und kann sich innerhalb von Minuten durch den Einfluss von Anisoosmolarität, Hormonen, Nährstoffen und oxidativen Stress ändern (siehe Abbildung 1.4) ¹²¹⁻¹²³.

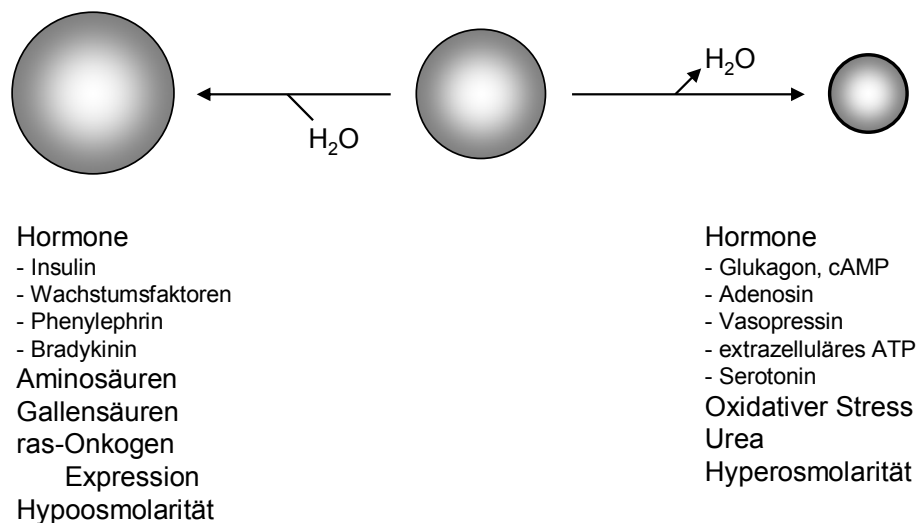


Abbildung 1.4: **Modulatoren des Zellvolumens**

Die genannten Effektoren beeinflussen die Aktivität von Ionen- und Substrattransportsystemen und bewirken durch Schaffung oder Dissipation eines osmotisch wirksamen Gradienten Zellschwellung bzw. Zellschrumpfung (verändert nach Häussinger & Schliess ¹²¹, Häussinger ¹²²).

Bereits geringe Änderungen der zellulären Hydratation agieren als separates und potentes Signal für die Regulation des zellulären Metabolismus und der Genexpression ¹²²⁻¹²⁶. Dieses Regulationsprinzip wurde in erster Linie an Leberzellen erarbeitet; es gilt aber auch für eine Vielzahl anderer Zellen wie Makrophagen, Astrozyten, Fibroblasten und Muskelzellen ^{122, 127}. Hepatozyten reagieren innerhalb von Sekunden nach hypo- oder hyperosmotischer Exposition mit einer Zellvolumenzunahme bzw. Zellvolumenabnahme wie nahezu perfekte Osmometer bevor sie regulatorische Volumenabnahme-Mechanismen (*regulatory volume decrease*; RVD) bzw. Volumenzunahme-Mechanismen (*regulatory volume increase*; RVI) aktivieren ^{122, 128-133}.

Die meisten hypoosmotisch geschwollenen Zellen vollziehen eine RVD durch die Freisetzung von anorganischen Ionen, wie K^+ , Na^+ , Cl^- und Bicarbonat, sowie durch die Freisetzung organischer Osmolyte wie Taurin und Betain (Abbildung 1.5) ^{130, 133}.

Die hyperosmotisch induzierte Volumenzunahme (RVI) wird kurzzeitig durch die Aktivierung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - und Na^+/H^+ -Austauschers und des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters reguliert^{130, 131, 134}. Ein isoosmotischer Austausch von anorganischen Ionen gegen kompatible organische Osmolyte wie Taurin und Betain erlaubt eine Langzeit-Adaption an dehydrierende Bedingungen (Abbildung 1.5)¹³³⁻¹³⁶.

Weder RVD noch RVI stellen das initiale Zellvolumen vollständig wieder her. Die Zellen verbleiben in leicht geschwollenen bzw. geschrumpften Zustand, der als Signal für die Modifikation der zellulären Funktionen agiert^{124, 136, 137}.

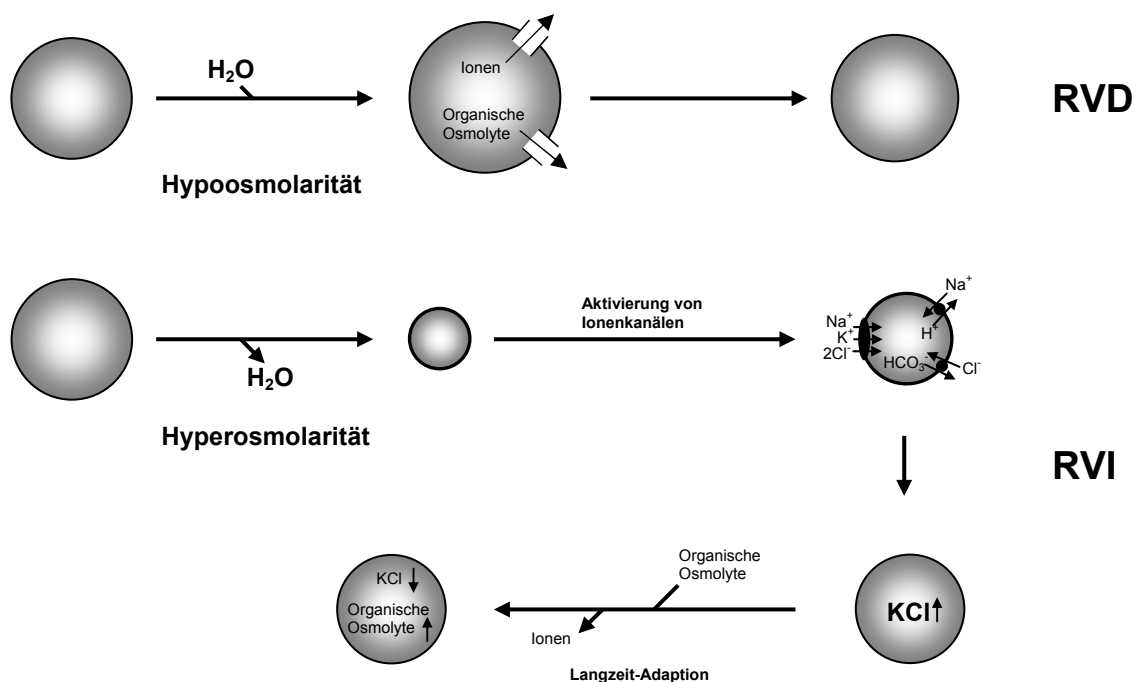


Abbildung 1.5: **Zellvolumenregulation**

Hypoosmotisches Schwellen induziert eine regulatorische Volumenabnahme (*regulatory volume decrease*; RVD), während hyperosmotisches Schrumpfen eine regulatorische Volumenzunahme (*regulatory volume increase*; RVI) verursacht. Die RVI wird kurzfristig durch Elektrolytaufnahme reguliert, bevor durch isoosmotischen Austausch von Elektrolyten gegen kompatible organische Osmolyte eine Langzeit-Adaption an dehydrierende Bedingungen geregelt wird (verändert nach Schliess & Häussinger^{135, 136}).

Die Transportsysteme, die an RVD und RVI beteiligt sind, können auch durch Wachstumsfaktoren und apoptotische Stimuli aktiviert werden, was somit zu Volumenveränderungen und Aktivierung von Volumen-abhängig regulierten, intrazellulären Signalübertragungs-Mechanismen unter isoosmotischen Bedingungen führt und so eine Art „*second transmitter*“-Funktion übernimmt^{133, 136}.

Verallgemeinernd lässt sich sagen, dass eine Volumenzunahme im Hepatozyten anabole Stoffwechselprozesse und die Proliferation fördert, wohingegen eine Zellvolumenabnahme

eine katabole Stoffwechselsituation im Hepatozyten induziert, Insulinresistenz vermittelt, sowie die Zellen für apoptotische Signale sensitiviert^{122, 124-126, 130, 133, 135, 136, 138}.

Der Einfluss der Zellhydratation auf die Zellfunktion erfordert Strukturen, die die Volumenveränderungen registrieren (*Osmosensing*) und intrazelluläre Signalwege in Richtung der Effektoren aktivieren (*Omosignaling*)^{133, 139-141}.

Eine Vielzahl an zellulären Signaltransduktionskomponenten, die durch anisoosmotische Zellvolumenveränderung beeinflusst werden, wurde bereits charakterisiert^{139, 141}. So führt die Leberschwellung beispielsweise zur Aktivierung von MAP-Kinasen und der PI-3-Kinase^{122, 139, 140} und eine Schrumpfung zur Aktivierung des CD95-Systems und zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)^{133, 142}.

Die Mechanismen des *Osmosensing*s dagegen sind bisher nur unvollständig verstanden. Neuere Studien deuten aber darauf hin, dass das Integrinsystem eine bedeutende Rolle als Osmosensor bei der Hepatozytenschwellung spielt^{133, 141, 143-145}. Bei den Integrinen handelt es sich um eine Familie von extrazellulären Matrix-Adhäsions-Molekülen, die in die Mechanotransduktion und in Wachstumsfaktor-induzierte Signalwege involviert sind^{146, 147}.

Inwieweit Integrine und andere Osmosensoren eine Rolle bei der Registrierung der Zellschrumpfung spielen, ist noch weitgehend unbekannt¹³³. Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass eine hyperosmotisch-induzierte Zellschrumpfung von Hepatozyten möglicherweise durch endosomale Kompartimente registriert wird¹⁴⁸.

1.2.2 Zelluläre Hydratation und virale Replikation

Der Hydratationszustand der Zelle ist nicht nur für die Expressionskontrolle von zellspezifischen Genen wichtig, sondern beeinflusst auch die virale Replikation^{121, 132}.

Bereits in den 1960er und 70er Jahren konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der extrazellulären NaCl-Konzentration zur Inhibition der Poliovirus-^{149, 150} und der Friend-Murine-Leukemia-Virus-Produktion¹⁵¹, sowie zur Abnahme der Replikation des Reticuloendotheliose-Virus¹⁵², des Sindbis-Virus^{153, 154} und des Influenza Virus¹⁵⁵ führt. Des Weiteren ist die Infektion von MDCK-Zellen mit dem Vesikular-Stomatitis-Virus durch Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration auf Kosten der Na⁺-Konzentration beeinträchtigt¹⁵⁶, ein Schritt der Zellschwellung induziert¹³². In einer U1-Zelllinie, die zwei Kopien des HIV-Genoms enthält, führt eine Erhöhung der Osmolarität durch NaCl zu einer Hochregulation der HIV-Produktion¹⁵⁷.

Der hepatozelluläre Hydratationszustand beeinflusst auch die Replikation des Hepatitis B Virus¹³⁷. Im Entenhepatitis-Modell steigert die hyperosmotische Zellschrumpfung die Synthese der viralen DNA, RNA und der viralen Proteine, wohingegen die hypoosmotische

Zellschwellung die virale Replikation hemmt ¹⁵⁸. In Übereinstimmung mit der Kontrolle der viralen Replikation durch die zelluläre Hydratation, führt auch Insulin, was bekanntermaßen eine Zellschwellung induziert, zur Abnahme der Genexpression des Hepatitis B Oberflächen-Antigens in humanen Hepatomazellen ^{159, 160}.

Inwieweit die Replikation von HCV durch den Hydratationszustand der Zelle beeinflusst wird, ist bislang noch unbekannt.

1.3 Die Src-Protein-Tyrosin-Kinasen

1.3.1 Expression und Aufbau der Src-Kinasen

Bei der Familie der Src-Protein-Tyrosin-Kinasen handelt es sich um Nicht-Rezeptor-Phosphotyrosin-Kinasen, die in vielen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen und an der Regulation der Proliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose und anderer Vorgänge in der Zelle beteiligt sind ¹⁶¹. Die Familie umfasst acht gut charakterisierte Mitglieder: c-Src, Fyn, Yes, Fgr, Hck, Lyn, Blk und Lck, die in zwei Subfamilien gruppiert werden können, die Src-verwandten (c-Src, Fyn, Yes und Fgr) und die Lyn-verwandten (Lyn, Hck, Lck und Blk). Des Weiteren gibt es drei Src-Kinasen-ähnliche Kinasen Brk, Frk und Srm ¹⁶². Das Expressionsmuster der Src-Kinasen ist in Tabelle 1.1 wiedergegeben.

Tabelle 1.1: **Expression der Src-Kinasen** (nach Thomas & Brugge ¹⁶¹)

c-Src	Ubiquitär, zwei Neuron-spezifische Isoformen
Fyn	Ubiquitär, T-Zell-spezifische Isoform (FynT)
Yes	Ubiquitär
Fgr	myeloide Zellen, B-Zellen
Hck	myeloide Zellen (zwei verschiedene Translationsstarts)
Lyn	ZNS, B-Zellen, myeloide Zellen; zwei alternative Spliceformen
Blk	B-Zellen
Lck	T-Zellen, NK-Zellen, ZNS

Die Mitglieder der Src-Kinase-Familie weisen eine konservierte Domänen-Organisation auf (Abbildung 1.6) ¹⁶³. Am aminoterminalen Ende befindet sich die Src-Homologie (SH)-Domäne 4, daran schließt sich die „unique“-Domäne an und dann die Protein-

Interaktionsdomänen SH3 und SH2. Am carboxyterminalen Ende befindet sich eine katalytische Domäne (SH1) und ein regulatorisches Segment ^{164, 165}.

Die SH4-Domäne enthält eine Myristylierungsstelle, die verantwortlich für die Lokalisierung der Src-Kinase an die Membran ist ¹⁶⁶. Neben der irreversiblen Myristylierung des Glycins an Position 2, die allein nicht ausreichend für eine Membranassoziation scheint, können bei fast allen Src-Kinasen Cysteine in der SH4-Domäne palmitoyliert werden ¹⁶⁵. Die Bindung des Palmitats ist reversibel und kann über eine intrazelluläre Relokalisation der Src-Kinasen die Interaktion mit unterschiedlichen Signalwegen steuern ¹⁶⁴.

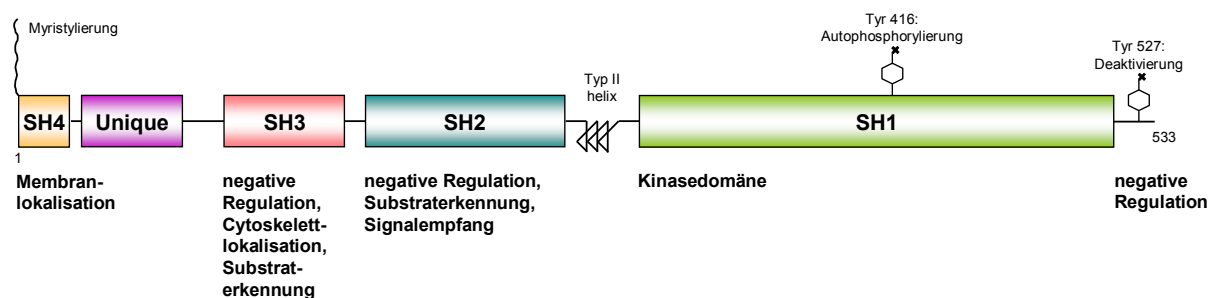


Abbildung 1.6: **Struktur der Src-Kinasen am Beispiel von c-Src**

Die Src-Kinase besitzt vier Src-Homologie (SH)-Domänen und eine einzelne aminoterminal Unique-Domäne mit unbekannter Funktion. Die bisher bekannten Funktionen der verschiedenen Domänen sind angegeben. Die SH1-Domäne enthält die Kinasedomäne und einen konservierten Tyrosinrest, der in Autophosphorylierung involviert ist (verändert nach Boggon & Eck ¹⁶⁷).

Die „unique“-Domäne ist spezifisch für jede Src-Kinase. Die Sequenz variiert in hohem Maße zwischen den verschiedenen Familien-Mitgliedern ¹⁶⁸, und es wird angenommen, dass diese Region wichtig ist für die Vermittlung von Interaktionen mit Rezeptoren oder Proteinen, die spezifisch sind für jede Src-Kinase ¹⁶¹.

Bei der SH3-Domäne und der SH2-Domäne handelt es sich um Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Die SH3-Domäne bindet prolinreiche Regionen mit der Konsensus-Sequenz PXXP, wobei umgebende Aminosäuren zusätzliche Affinität und Spezifität verleihen ¹⁶¹. Die SH2-Domäne interagiert mit Liganden, die phosphorylierte Tyrosinreste enthalten ¹⁶⁸.

Die letzte Domäne ist die Kinase- oder SH1-Domäne, die aus zwei Einheiten besteht und für die enzymatische Aktivität und die Substratspezifität verantwortlich ist ^{162, 164}. Bestimmte Aminosäuren innerhalb dieser Domäne sind stark konserviert unter allen Kinasen und wichtig für die ATP-Bindung und die Phosphotransfer-Reaktion. Innerhalb der Kinase-Domäne befindet sich eine Autophosphorylierungsstelle (Tyrosin 416) in einer Region, die als Aktivierungsloop bezeichnet wird ¹⁶⁸.

Das carboxyterminale regulatorische Segment spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation der Kinase-Aktivität und enthält eine autoinhibitorische Phosphorylierungsstelle (Tyrosin 527) ¹⁶⁹.

1.3.2 Regulation der Src-Kinasen

Die Aktivität von Src-Kinasen wird durch komplexe intramolekulare Interaktionen reguliert, sowie durch den Phosphorylierungsstatus der beiden wichtigen Phosphorylierungsstellen Tyrosin 416 und Tyrosin 527^{162, 170}. In der inaktiven Konformation ist das carboxyterminale Tyr527 phosphoryliert und interagiert mit der SH2-Domäne. Die SH3-Domäne interagiert mit der Linker-Region zwischen der SH2-Domäne und der aminoterminalen Kinase-Einheit, die eine PPII-Helixstruktur ausbildet (Abbildung 1.7). Diese intramolekularen Interaktionen supprimieren die Kinase-Aktivität um mehr als 98% durch Konformationsänderung der Kinase-Domäne¹⁶⁹ und konnten durch Aufklärung der Kristallstrukturen von Src¹⁷¹ und Hck¹⁷² bestätigt werden. Die Src-Kinasen können nicht nur durch Dephosphorylierung von Tyr527 aktiviert werden, sondern auch durch Bindung der SH2-Domäne an spezifische Phosphotyrosine in Liganden oder durch Bindung der SH3-Domäne an prolinreiche Motive in Zielproteinen. Dies resultiert in Autophosphorylierung in *trans* des konservierten Tyr416 und zur Stabilisierung der aktiven Konformation^{173, 174}. Durch den Konformationswechsel öffnet sich die Kinase und erreicht ihre maximale Aktivität.

Die Inaktivierung der Src-Kinasen durch Phosphorylierung des carboxyterminalen Tyrosins erfolgt durch die C-terminale Src-Kinase (CSK) oder die CSK-homologe Kinase (CHK)¹⁷⁵. Die Aktivität dieser Kinasen ist somit kritisch für die negative Regulation der Src-Kinasen¹⁷⁶. Über die Phosphatasen, die für die Dephosphorylierung der konservierten Tyrosine verantwortlich sind, ist nur wenig bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass Phosphatasen wie PEP, TC-PTP, SHP-1 und CD45 an der Regulation der Aktivität von Src-Kinasen beteiligt sind¹⁶².

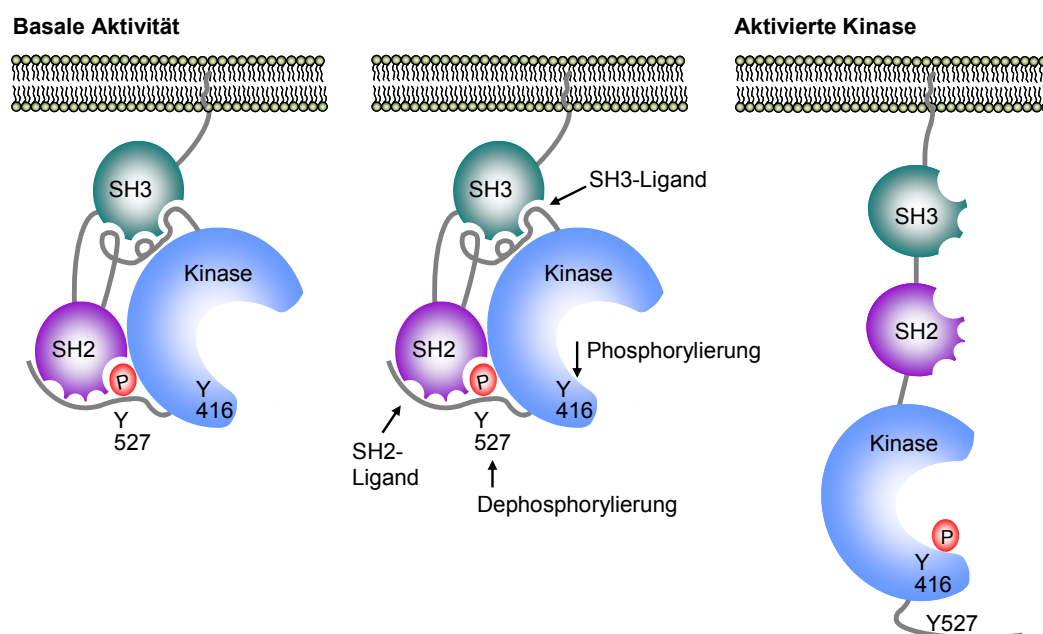


Abbildung 1.7: Aktivierung der Src-Kinase

Die linke Seite zeigt die inaktive Konformation von Src, in der das phosphorylierte Tyrosin 527 mit der SH2-Domäne interagiert und die SH3-Domäne mit dem Linker zwischen der SH2- und der Kinase-Domäne. Der mittlere Teil veranschaulicht verschiedene Mechanismen, die in die Aktivierung von Src involviert sind. Rechts dargestellt ist die aktive Konformation mit dem phosphorylierten Tyrosin 416 (verändert nach Martin ¹⁷⁷).

1.3.3 Die Src-Kinase c-Src

Der Prototyp der Src-Kinase-Familie c-Src ist Gegenstand ausgedehnten Interesses, entweder in Form von v-Src, einer aktivierten Form, die durch ein transformierendes Gen (v-Src) des Rous-Sarkom-Virus (RSV) kodiert wird, oder in Form von c-Src, kodiert durch das c-Src-Gen von multizellulären Organismen ¹⁷⁰. Vor beinahe einem Jahrhundert beschrieb Peyton Rous erstmals ein Virus, welches das Wachstum von Tumoren in Hühnern verursacht, und erkannte, dass die Injektion von zellfreien Extrakten dieser Tumore in naiven Tieren erneut Tumore auslöst ^{163, 178}. Das v-Src-Gen, welches für die Transformation durch das Rous-Sarkom-Virus verantwortlich ist, wurde in den 1970er Jahren im viralen Genom identifiziert und sequenziert ^{166, 179}. Die v-Src Sequenz ist konserviert im Vertebraten-Genom, was andeutet, dass v-Src von einem humanen Gen abstammt, welches durch Rekombination in das virale Genom inkorporiert wurde ¹⁸⁰. Es differiert in der Sequenz zu c-Src in der Deletion der negativ-regulatorischen carboxyterminalen Domäne und Punktmutationen im gesamten Gen ^{166, 181}. Im Gegensatz zu v-Src ist c-Src kaum transformierend, in Übereinstimmung mit seiner Rolle als Proto-Onkogen, welches nach Aktivierung oder Mutation als Onkogen fungieren kann ¹⁶⁶.

Wie bereits erwähnt, wird c-Src ubiquitär exprimiert; allerdings exprimieren Neuronen, Osteoklasten und Thrombozyten 5-200-fach höhere Level des Proteins ¹⁶⁴. In Neuronen werden zudem zwei alternativ gespleiste Formen von c-Src exprimiert, die 6- oder 11-Aminosäure-Insertionen in der SH3-Domäne enthalten ¹⁶⁵.

Der Proteinlevel und der Level der Aktivität von c-Src werden durch eine Reihe von Mechanismen reguliert. Inaktivierung von c-Src erfolgt durch die CSK, die das konservierte carboxyterminale Tyrosin (Tyr527) phosphoryliert. Dies wird aufgehoben durch Phosphatasen wie die Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B), was zur Aktivierung von c-Src führt. Die Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie EGFR, führt zu deren Assoziation mit der SH2-Domäne von c-Src, was die inhibitorischen intramolekularen Interaktionen stört und die Aktivierung von c-Src fördert. Andere Proteine, wie das Crk-assoziierte Substrat (CAS) und FAK, binden die SH2- und SH3-Domäne und fördern die Aktivierung von c-Src durch einen ähnlichen Mechanismus. Der Proteinlevel von c-Src wird durch die E3-Ubiquitin-Ligase CBL über Ubiquitylierung und nachfolgende proteasomale Degradation negativ reguliert. Die Funktion von c-Src kann zudem durch die Regulation

seiner zellulären Lokalisation moduliert werden; so ist inaktives c-Src in perinuklearen Regionen lokalisiert, aktiviertes c-Src dagegen wird zur Zell-Peripherie an die Plasmamembran transloziert, wo es mit membrangebundenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder Integrinen interagieren kann ¹⁶⁶.

c-Src ist ein wichtiges Molekül in einem komplexen Netzwerk von interagierenden Proteinen. Eine große Anzahl von c-Src-Substraten konnte bisher identifiziert werden, zu denen fokale Adhäsionsproteine, Adaptorproteine und Transkriptionsfaktoren zählen ¹⁶⁶. In Abbildung 1.8 sind einige vereinfachte Beispiele der c-Src-regulierten Signalwege dargestellt. Diese beinhalten den Ras-Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (Ras-MAPK)-Signalweg, der die fos-Expression durch Phosphorylierung von Mitgliedern der Ets-Familie von Transkriptionsfaktoren reguliert, den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt (PI3K-Akt)-Signalweg, der die Translationsinitiation und das Zell-Überleben reguliert, und der Stat3-Signalweg, der die Expression von myc und cyclin D1 reguliert ¹⁷⁷.

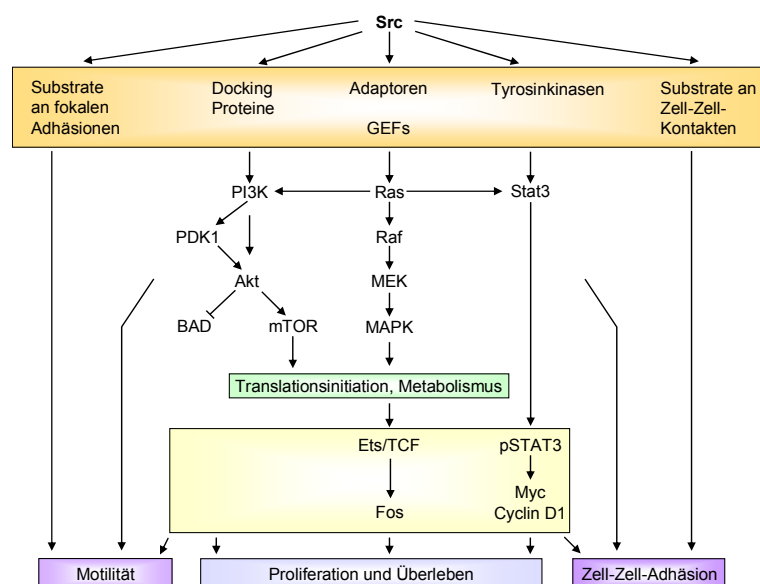


Abbildung 1.8: **Src-regulierte Signalwege**

Src phosphoryliert Substrate im Cytosol, an der inneren Plasmamembran, an Zell-Matrix- oder Zell-Zell-Adhäsionen. Tyrosin-Phosphorylierung kann die Funktion dieser Proteine direkt beeinflussen. Alternativ dienen die Phosphotyrosyl-Reste als Bindestelle für Proteine mit SH2-Domänen. Diese *Signaling*-Komplexe initiieren Signalwege, die Proteinsynthese, Genexpression, Zytoskelettanordnung und viele andere Aspekte der Zellfunktion regulieren (verändert nach Martin ¹⁷⁷).

Die Überexpression des c-Src-Proteins und eine Zunahme seiner spezifischen Aktivität konnte in zahlreichen Krebsarten beobachtet werden, wobei es in die Entwicklung, Wachstum, Progression und Metastasierung der Tumore verwickelt ist ¹⁸². In zwei Veröffentlichungen konnten seltene, aber möglicherweise bedeutende Punktmutationen identifiziert werden, die c-Src genau carboxyterminal des regulatorischen Tyrosin 527 trunkieren, was in die Aktivierung von c-Src in Colon- ¹⁸³ und endometrialen Tumoren

resultiert ¹⁸⁴. In anderen Tumoren konnte diese Mutation bisher aber noch nicht identifiziert werden. Da c-Src in einer großen Anzahl von humanen Tumoren häufig aktiviert ist, ist es ein Ziel der Arzneimittel-Therapie. Zahlreiche Inhibitoren werden bereits in frühen Phase I- oder präklinischen Studien getestet ¹⁶⁶.

In Anbetracht der schweren Konsequenzen der hyperaktiven Form sind die Konsequenzen eines defekten c-Src-Gens überraschend mild ¹⁸⁵. Mäuse mit c-Src -/- Null-Mutationen sind lebensfähig, und das einzige Defizit in diesen Mäusen ist Osteopetrosis, eine Erkrankung, die aus einer mangelnden Knochenresorption durch Osteoklasten resultiert ^{165, 186}. Dieser Phänotyp kann dadurch erklärt werden, dass Fyn und Yes, die eine ähnliche ubiquitäre Verteilung besitzen wie c-Src, das Fehlen von c-Src in allen Geweben bis auf die Osteoklasten kompensieren können ^{177, 187}.

Src-Kinasen sind ein verbreitetes Target für virale Interferenz mit zellulären Signalwegen, vor allem im Fall von Viren die chronische Infektionen etablieren ¹⁸⁸. So ist bereits dokumentiert, dass c-Src in den Replikationsprozess einiger Viren wie HBV ¹⁸⁹, HIV ¹⁹⁰ und HSV ¹⁹¹ involviert ist.

Auch für die Replikation der Familie der *Flaviviridae* scheinen Src-Kinasen notwendig. Bei dem Denguevirus (DENV) handelt es sich um ein durch Moskitos übertragenes Flavivirus. 2007 konnten Chu & Yang zeigen, dass Inhibitoren von c-Src einen starken inhibitorischen Effekt auf das Denguevirus aufweisen. So blockiert der Src-Inhibitor Dasatinib die DENV-Infektion primär durch Inhibition der Bildung von infektiösen Virus-Partikeln innerhalb der virusinduzierten membranösen Replikationskomplexe ¹⁹². Die virale RNA-Synthese oder die virale Genexpression dagegen scheinen nicht beeinflusst zu werden.

Auch im Fall des West-Nil-Virus (WNV) konnte gezeigt werden, dass die Aktivität einer Src-Kinase (Yes) notwendig ist für den viralen Replikationszyklus ¹⁹³. Die erhöhte Aktivität von Yes während einer WNV-Infektion beeinflusst nicht die Synthese der viralen RNA oder der viralen Proteine, sondern spielt vielmehr eine Rolle bei der Migration der Virionen vom ER durch den sekretorischen Weg. So führt die Inhibition von Yes zu einer Reduktion der Produktion von infektiösen Viren.

Für das Hepatitis C Virus wurde beschrieben, dass NS5A einige Mitglieder der Src-Kinase-Familie bindet und deren Kinaseaktivität reguliert ¹⁹⁴. So interagiert NS5A mit den SH3-Domänen von Hck, Lck, Lyn und Fyn, aber interessanterweise nicht mit c-Src selbst. Die Interaktionen modulieren die Kinaseaktivität der Src-Kinasen, so werden Hck, Lck und Lyn inhibiert, Fyn dagegen aber aktiviert. Dies könnte möglicherweise eine Rolle spielen entweder bei der Virus-Replikation oder der Pathogenese. Spätere Studien konnten zeigen, dass NS5A auch mit c-Src interagiert und diese aktiviert, wobei die Bindung aber über andere Regionen als die SH3-Domäne stattzufinden scheint ^{111, 195, 196}.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Wie im Vorhergehenden erläutert, erreicht die derzeitige Kombinationstherapie mit pegyliertem IFN- α und Ribavirin nur eine Effektivität von ca. 50%, so dass die Entwicklung von neuen antiviralen Strategien gegen HCV dringend notwendig ist.

Für eine Vielzahl von Viren konnte bereits gezeigt werden, dass Anisoosmolarität die virale Replikation beeinflusst. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss von Anisoosmolarität auf die HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell analysiert werden und nach Möglichkeit daran beteiligte zelluläre Faktoren charakterisiert werden.

Im zweiten Teil widmet sich die Arbeit der Frage, inwieweit c-Src einen Einfluss auf die HCV-Replikation besitzt, um so vielleicht einen Einblick in neue zelluläre Kofaktoren der viralen Replikation zu erlangen.

Die Arbeit befasst sich schließlich in einem dritten Teil mit der Generierung und Charakterisierung von rekombinanten Antikörperfragmenten gegen essentielle Motive von NS5B. Diese sollen durch einen Phagen-Display aus einer humanen HCV-spezifischen Phagenbibliothek selektiert werden. Ausgesuchte Antikörperfragmente sollen in molekularbiologischen und proteinbiochemischen Analysen näher charakterisiert werden und auf ihr mögliches inhibitorisches Potential hin untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien, Substanzen und Lösungen

Materialien für die Zellkultur

25 cm ² Gewebekulturflaschen	Greiner; Solingen, Deutschland
75 cm ² Gewebekulturflaschen	Greiner; Solingen, Deutschland
35 mm Gewebekulturplatten	Falcon; Heidelberg, Deutschland
60 mm Gewebekulturplatten	Falcon; Heidelberg, Deutschland
100 mm Gewebekulturplatten	Falcon; Heidelberg, Deutschland
24 Well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
Minisart Plus Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Minisart Plus Sterilfilter 0,45 µm	Sartorius; Göttingen, Deutschland

Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM/Nutrient Mix F-12	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMEM (ohne NaCl und Phenolrot)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma; München, Deutschland
FCS	PAA-Laboratories; Linz, Österreich
G418 (Geneticin)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
PBS	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Cytogen; Sinn-Fleisbach, Deutschland
Sf-900 II SFM	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Cytogen; Sinn-Fleisbach, Deutschland

Reagenzien und Feinchemikalien

Alpha- ³² P-dATP	MP Biomedicals; Illkirch, Frankreich
Ampicillin	Sigma; München, Deutschland
Aprotinin	Sigma; München, Deutschland
Benzamidin	Sigma; München, Deutschland
β-Glycerophosphat	Sigma; München, Deutschland
Bradford Protein-Assay	BioRad; Hercules, USA

BSA	PAA-Laboratories; Linz, Österreich
c-Src siRNA/siAb Assay Kit	Upstate; Billerica, USA
c-Src siRNA	Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
Chloramphenicol	Fluka; St. Gallen, Deutschland
DEPC	Sigma; München, Deutschland
DTT	Sigma; München, Deutschland
GFP siRNA	Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare; Freiburg, Deutschland
Glyoxal	Fluka; St. Gallen, Schweiz
Kanamycin	Sigma; München, Deutschland
Leupeptin	Sigma; München, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem; Darmstadt, Deutschland
Mounting Medium	Dako; Hercules, USA
Mounting Medium mit DAPI	Vector; Burlingame, USA
Na-Pyrophosphat	Sigma; Karlsruhe, Deutschland
Ni-NTA-Agarose	Qiagen; Hilden, Deutschland
Pefabloc	Fluka; St. Gallen, Schweiz
PMSF	Roche; Mannheim, Deutschland
Protein G PLUS-Agarose	Santa Cruz; Heidelberg, Deutschland
ReBlot mild	Chemicon; Temecula, USA
Tetrazyklin	Fluka; St. Gallen, Deutschland
Triton X-100	Merck; Darmstadt, Deutschland
Western Lightning Plus ECL	Perkin Elmer; Waltham, USA

Kits

HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAshredder	Qiagen; Hilden, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland

PCR und Klonierung

BL21	Promega; Madison, USA
dNTP Mix	Roche; Mannheim, Deutschland
IPTG	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
<i>JM109</i>	Promega; Madison, USA
Oligonukleotide	Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
<i>One Shot Top10</i> Zellen	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs; Ipswich, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs; Ipswich, USA
Sequenzierreaktionen	Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec; Köln, Deutschland
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems; Foster City, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs; Ipswich, USA
XL1-Blue	Stratagene; La Jolla, USA

Phagen-Display

ABTS Tabletten	Roche; Mannheim, Deutschland
Buffer for ABTS	Roche; Mannheim, Deutschland
Detection Module Recombinant Phage Antibody System	Amersham; Freiburg, Deutschland
HB2151	Amersham; Freiburg, Deutschland
pNPP	Sigma; München, Deutschland
RNase Inhibitor	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
Streptavidin	Fluka; St. Gallen, Deutschland

Inhibitoren

Genistein	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Herbimycin A	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
L-JNKI	Alexis; San Diego, USA
N-Acetylcystein	Sigma; München, Deutschland
Okadainsäure	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
SB202190	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland

SU6656	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
PD98059	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
PP2	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland

Primärantikörper

β-Actin, monoklonal	Abcam; Cambridge, USA
Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche; Mannheim, Deutschland
Flag M1, monoklonal	Sigma; München, Deutschland
GAPDH, monoklonal	Biodesign; Saco, USA
GFP, monoklonal	Santa Cruz; Heidelberg, Deutschland
GST, polyklonal	Cell Signaling; Danvers, USA
His (C-terminal), monoklonal	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
HisG, monoklonal	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
NS5A, monoklonal	Abcam; Cambridge, UK
NS5B (5B-3B1), monoklonal	Alexis; San Diego, USA
NS5B (5B-12B7), monoklonal	Alexis; San Diego, USA
NS3, monoklonal	Abcam; Cambridge, UK
Phosphotyrosin (4G10), monoklonal	Upstate; Billerica, USA
Src (GD11), monoklonal	Upstate; Billerica, USA
Src, polyklonal	Cell Signaling; Danvers, USA
Src (pTyr ⁴¹⁸), monoklonal	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Src (pTyr ⁵²⁹), polyklonal	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Tetra-His HRP Konjugat, monoklonal	Qiagen; Hilden, Deutschland

Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen (HRP-konjugiert)	DAKO; Hercules, USA
Anti-Maus (HRP-konjugiert)	DAKO; Hercules, USA
Anti-Maus (Cy3-konjugiert)	Jackson; West Grove, USA

Vektoren

pAK100	Prof. Dr. Plückthun; Universität Zürich, Schweiz
pAK400	Prof. Dr. Plückthun; Universität Zürich, Schweiz

pcDNA3.1+	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
pECFP-N1	Clontech; Mountain View, USA
pEYFP-C1	Clontech; Mountain View, USA
pGEX-6P-3	Amersham; Freiburg, Deutschland

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 Arbeitsmethoden

Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Zelllinie	Beschreibung
Huh7	humane, hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie ¹⁹⁷
Huh9-13	Zellklon 9-13 einer Huh7-Zelllinie, stabil transfiziert mit einem subgenomischen HCV-Genom des Genotyps 1b. HCV-Replikon: I ₃₇₇ /NS3-3' ^{97, 198} Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bartenschlager (Heidelberg).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM/Nutrient Mix-F12 (supplementiert mit 10% Komplement-inaktiviertem FCS und im Fall der Huh9-13-Zellen mit 1 mg/ml Geneticin), in einer wassergesättigten Atmosphäre im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂. Zum Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche gelöst und mit frischem Medium in neue Zellkulturflaschen überpipettiert. Für die Langzeit-Lagerung wurden die Zellen in einem Einfriermedium, bestehend aus dem Kulturmedium und 10% DMSO, bei -80 °C eingefroren. Die in der Arbeit verwendeten anisoosmotischen Medien basieren auf einem DMEM-Medium ohne NaCl. Hypoosmotisches Medium (~205 mosmol/l) wurde durch eine 2:3 Mischung dieses Mediums mit normoosmotischen DMEM/F12-Medium (~305 mosmol/l) hergestellt. Hyperosmotisches Medium wurde durch Zugabe von 1,66 g NaCl pro 100 ml DMEM-Medium ohne NaCl hergestellt und steril filtriert. Durch Mischung mit DMEM/F12-Medium im Verhältnis 2:3 erhielt man ein hyperosmotisches Medium mit etwa 405 mosmol/l.

Transfektion

Als Transfektion wird das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Bei einer transienten Genexpression wird das fremde Genmaterial nur vorübergehend exprimiert, wobei die exprimierten Proteine korrekt ko- oder posttranslational modifiziert werden. Die transiente Transfektion von Huh7- und Huh9-13-Zellen wurde mit Hilfe von Lipofectamine 2000 (Invitrogen) durchgeführt. Hierbei bilden die Liposomen mit der zu transfizierenden DNA spontan Komplexe, in denen die DNA eingeschlossen ist. Diese Komplexe können mit der Zellmembran fusionieren und so die DNA in die Zellen entlassen. Für die Transfektion

wurden die Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Hierzu wurden 4 µg Plasmid-DNA in einem Ansatz und 10 µl Lipofectamine 2000 in einem anderen Ansatz in jeweils 150 µl OptiMEM aufgenommen. Die beiden Ansätze wurden 5 min bei RT inkubiert und dann gemischt. Nach einer weiteren Inkubation für 20 min bei RT wurde das DNA/Lipofectamine-Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach etwa 4 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, und 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet.

Für die Transfektion von siRNA wurden die Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 20 bzw. 25 nM eingesetzt. Zum einen wurde eine c-src siRNA aus einem Oligomix unbekannter Zusammensetzung (Upstate) genutzt und zum anderen c-src siRNAs nach selbst ausgesuchten Sequenzen (siRNA 1: 5'-GAAGCUGAGGCAUGAGAAG-3'; siRNA 2: 5'-AGCUGGUGCAGUUGUAUGC-3'; siRNA 3: 5'-CGUGAAGCACUACAAGAUC-3'), die durch die Firma Eurofins MWG Operon hergestellt wurden. Für die Transfektion wurden die siRNA und 5 µl Lipofectamine 2000 in je 250 µl OptiMEM verdünnt. Die Ansätze wurden 5 min bei RT inkubiert, gemischt und nach einer weiteren Inkubation für 20 min bei RT auf einen Tag zuvor in 35 mm Zellkulturschalen ausgesäte Zellen gegeben. Nach 4 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, und 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet.

Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung der Verteilung von Proteinen wurden Huh7- oder Huh9-13-Zellen in 24 Well-Gewebekulturplatten auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 3 min fixiert. Nach erneutem Waschen (dreimal 10 min mit PBS) wurden unspezifische Bindungsstellen durch 30 min Inkubation mit einer 1%igen BSA-Lösung abgesättigt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit primären Antikörpern (in 1% BSA/PBS) für 1 h bei RT. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit Mounting Medium eingedeckt und mit farblosem Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Laserscanningmikroskop LSM 510 META (Zeiss, Jena).

Kultivierung von Insektenzellen

Zelllinie	Beschreibung
<i>High-Five</i>	<i>Trichoplusia ni</i> (Ovarialzellen) ¹⁹⁹
<i>Sf21</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Ovarialzellen) ²⁰⁰

Die Kultivierung der Insektenzellen erfolgte in einem Sf-900 II SFM Medium (supplementiert mit 10% Komplement-inaktiviertem FCS im Fall der *Sf21*-Zellen) bei 27 °C ohne Zugabe von

CO₂. Zum Passagieren wurden die Insektenzellen rein mechanisch durch wiederholtes Überströmen der Zellen mit Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überpipettiert. Für die Langzeit-Lagerung wurden die Insektenzellen in einer Lösung aus 40% konditioniertem altem Medium und 60% frischem Medium mit 30% FCS und 10% DMSO bei -80 °C eingefroren.

Infektion von Insektenzellen

In *Sf21*-Insektenzellen kann fremde DNA mit Hilfe von Baculovirus-Partikeln eingeführt werden. Bei Baculoviren handelt es sich um Retroviren, die bestimmte Insektenarten befallen können. Durch genetische Veränderung kann eine bestimmte DNA in das Virusgenom eingebracht werden, die nach Infektion der Zellen verstärkt exprimiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Bacmid-DNA genutzt, die für ein His-getaggt NS5B kodiert (pBac C 5B Rev 1-3; zur Verfügung gestellt von Prof. Bartenschlager, Heidelberg). Mit der Bacmid-DNA wurden *Sf21*-Zellen transfiziert, die dann das Virus exprimieren. Das Virus muss über mehrere Stufen amplifiziert werden. Zur Infektion der Insektenzellen wurde frisches Medium mit rekombinantem Virusüberstand versetzt. Nach einer Infektionsdauer von etwa 2 Tagen bei 27 °C wurde der Mediumüberstand abzentrifugiert (3.000 rpm, 5 min, RT), der Überstand sterilfiltriert (0,45 µm) und auf neue *Sf21*-Zellen gegeben. Nach zwei weiteren Infektionsrunden zur Amplifikation des viralen Titers wurde der abzentrifugierte und sterilfiltrierte Überstand auf *High-Five*-Zellen gegeben, um dort rekombinantes Protein zu gewinnen.

2.2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Bakterienstämme und ihre Kultivierung

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes *JM109* (Promega) bzw. *One Shot Top10 Chemically competent E. coli*-Zellen (Invitrogen) verwendet. Das Standardmedium für die Kultivierung der Bakterien ist LB (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5). Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Selektionsmedien enthielten zusätzlich 50 mg/l Ampicillin bzw. 25 mg/l Kanamycin. Agarplatten und auch Flüssigkulturen können bei 4 °C bis zu 6 Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Für eine längerfristige Lagerung wurden Glycerinkulturen in Einfriermedium (LB-Medium mit 20% Glycerin) angelegt und bei -80 °C kryokonserviert.

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen aus einer gefrorenen Dauerkultur (*JM109 Bacterial Strain Glycerol Stock*) wurde mit einer Impföse etwas Inokulum auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 2,5 ml LB-Medium suspendiert und erneut über Nacht und unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. Die Vorkultur wurde in 250 ml LB-Medium (supplementiert mit 20 mM MgSO₄) überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Durch Zentrifugation (4.000 rpm, 4 °C, 5 min) wurden die Bakterien geerntet, und das Zellpellet wurde in TFB-1 Puffer (30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 15% Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert und das Zellpellet in TFB-2 Puffer (100 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% Glycerin, pH 6,5) resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 15 – 60 min wurden die Zellen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen

Als Transformation wird die Aufnahme genetischen Materials in Form von freier Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Für die Transformation wurden je Ansatz 100 µl kompetente *JM109* Zellen auf Eis aufgetaut, mit einem Ligationsansatz oder Plasmid-DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C im Wasserbad. Nach einer Inkubation für 2 min auf Eis wurden den Bakterien 900 µl SOC-Medium (0,5 g/l Hefeextrakt, 2 g/l Trypton, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose, pH 7,0) zugesetzt und für 1 h bei 37 °C im Bakterieneschüttler kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien auf Selektionsagarplatten mit Hilfe eines Drigalski-Spatels ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden in 14 ml PE-Röhrchen (Falcon) überführt und in LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm im Bakterieneschüttler inkubiert.

Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden Kits der Firma Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAprep Spin Maxiprep Kit) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde mittels spektralphotometrischer Messung (Extinktion ΔE_{260}) in einem Ultrospec (2100pro) Photometer der Firma Amersham bestimmt. Eine OD = 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, wobei E = 1 einer Extinktion von 1 bei einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke entspricht. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm (E_{260}) und 280 nm (E_{280}), welches ein Maß für die Reinheit der DNA darstellt, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Das verwendete Photometer zeigt die DNA-Konzentration sowie den Reinheitsgrad der Probe direkt an.

Restriktion von Plasmid-DNA

Für die Spaltung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurden Enzyme von New England Biolabs mit den dazugehörigen Reaktionspuffern verwendet. Für eine Standardreaktion wurden ca. 1 U Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt und der Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Überprüfung der Spaltung wird der Ansatz mit einem Orange-G-Ladepuffer (3,7 g/l EDTA, 15% Ficoll 400, 0,1% Orange G) versetzt und auf ein Agarosegel geladen.

Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese von DNA wurden 0,8-1,5%ige Agarosegele verwendet, die zusätzlich mit 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt wurden. Die Agarosegele wurden mit einem TAE-Puffer (242 g/l Tris, 100 ml/l 0,5 M EDTA (pH 8,0), 57,1 ml/l Essigsäure) hergestellt, der auch als Laufpuffer verwendet wurde. Die DNA-Proben wurden vor dem Probenauftrag mit 1/5 bis 1/3 ihres Volumens mit Orange-G-Ladepuffer versetzt. Als DNA-Größenstandard wurde der Smart Ladder (Eurogentec; Köln) verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei etwa 120 Volt in einer Flachbett-Elektrophoreseapparatur der Firma Peqlab (Erlangen) und die Dokumentation des Gels mittels eines Doc-Print-Geldokumentationssystems (Peqlab).

Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente können gezielt aus dem Agarosegel isoliert werden. Hierzu wird ein schmaler Gelstreifen, der die gewünschte Bande mit dem gesuchten DNA-Fragment enthält, mit Hilfe eines Skalpells unter UV-Bestrahlung

(365 nm) ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet.

Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (NEB) verwendet. Diese katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen in doppelsträngiger DNA. Um eine Religation des Vektors möglichst zu unterbinden, wurde meist ein 3-fach molarer Überschuss an Fragment-DNA in der Ligationsreaktion eingesetzt.

Die Ansätze wurden für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt ²⁰¹. Sie ermöglicht enzymatisch bestimmte Nukleotidsequenzen *in vitro* millionenfach zu amplifizieren. Im ersten Schritt wird die Template-DNA durch thermische Denaturierung in einzelsträngige DNA überführt, an welche dann für das Template spezifische Primer hybridisieren (*annealing*). Davon ausgehend synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase die komplementären Stränge (*extension*). Durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte erfolgt eine Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes.

Als DNA-Polymerase wurde die Phusion DNA-Polymerase von NEB verwendet. Die PCR-Ansätze enthielten 10 ng Template-DNA, 1 µl dNTP Mix (10 mM), 10 pmol *sense* Primer, 10 pmol *antisense* Primer, 10 µl Phusion HF Buffer und 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase. Die Ansätze wurden mit sterilem H₂O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt, und die PCR-Reaktion erfolgte im PTC-200 Thermocycler der Firma MJ-Research (Hercules, USA).

Plasmide und Klonierung

Das Klonieren der Konstrukte wurde nach Standardprotokollen durchgeführt, die von Sambrock et al ²⁰² bereits beschrieben wurden. Die Sequenzen der hergestellten Konstrukte wurden durch Sequenzierung durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) überprüft.

- Das Plasmid pFK-I341PI-Luc/NS3-3'-ET wurde von Prof. Dr. Bartenschlager (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Es kodiert für die nicht-strukturellen Proteine NS3 bis NS5B des Hepatitis C Virus.

- Das Plasmid pGEM-T- β -Actin wurde von Prof. Dr. Bojar (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.
- Zur Erstellung des Konstruktes pcDNA3.1+newMCS-vsrc wurde v-Src mit N-terminalem His-tag aus pQE30-vsrc (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Barnekow, Münster) durch Restriktion mit EcoRI und HindIII herausgeschnitten. In pcDNA3.1+ wurde eine neue MCS eingefügt, so dass v-Src durch die EcoRI und HindIII Restriktionsschnittstellen einkloniert werden konnte.
- Zur Erstellung des pGEX-csrc-Konstruktes wurde c-Src mit Stop-Codon durch PCR amplifiziert (aus cDNA) und *in frame* an den C-Terminus des pGEX-6P-3-Expressionsvektors von Amersham kloniert. Die Einklonierung erfolgte über EcoRI und XhoI Restriktionsschnittstellen.
- Zur Erstellung des pGEX-csrc-SH1-Konstruktes wurden die AS 252-536 von c-Src mit Stop-Codon durch PCR amplifiziert (aus pGEX-csrc) und *in frame* an den C-Terminus des pGEX-6P-3-Expressionsvektors von Amersham kloniert. Die Einklonierung erfolgte über EcoRI und XhoI Restriktionsschnittstellen.
- Zur Erstellung des pGEX-csrc-SH2/1-Konstruktes wurden die AS 143-536 von c-Src mit Stop-Codon durch PCR amplifiziert (aus pGEX-src) und *in frame* an den C-Terminus des pGEX-6P-3-Expressionsvektors von Amersham kloniert. Die Einklonierung erfolgte über EcoRI und XhoI Restriktionsschnittstellen.
- Zur Erstellung des pGEX-csrc-SH3/2-Konstruktes wurden die AS 1-261 von c-Src mit Stop-Codon durch PCR amplifiziert (aus pGEX-csrc) und *in frame* an den C-Terminus des pGEX-6P-3-Expressionsvektors von Amersham kloniert. Die Einklonierung erfolgte über EcoRI und XhoI Restriktionsschnittstellen.
- Zur Erstellung des pGEX-NS5B-Konstruktes wurde NS5B mit Stop-Codon durch PCR amplifiziert (aus pFK-I341PI-Luc/NS3-3'-ET) und *in frame* an den C-Terminus des pGEX-6P-3-Expressionsvektors von Amersham kloniert. Die Einklonierung erfolgte über EcoRI und XhoI Restriktionsschnittstellen.
- Zur Erstellung des pGEX-NS5B-Motiv1-Konstruktes wurden die AS 1-382 von NS5B mit Stop-Codon durch PCR amplifiziert (aus pFK-I341PI-Luc/NS3-3'-ET) und *in frame* an den C-Terminus des pGEX-6P-3-Expressionsvektors von Amersham kloniert. Die Einklonierung erfolgte über EcoRI und XhoI Restriktionsschnittstellen.
- Zur Erstellung des pGEX-NS5B-Motiv2-Konstruktes wurden die AS 357-591 von NS5B mit Stop-Codon durch PCR amplifiziert (aus pFK-I341PI-Luc/NS3-3'-ET) und *in frame* an den C-Terminus des pGEX-6P-3-Expressionsvektors von Amersham kloniert. Die Einklonierung erfolgte über EcoRI und XhoI Restriktionsschnittstellen.

- Für die Erstellung der pAK400-scFv-Konstrukte wurden ausgesuchte scFv durch Restriktion mit SfiI aus dem pAK100-Vektor herausgeschnitten und in den pAK400-Vektor einkloniert.
- Zur Erstellung des NS5B-N-CFP-Expressionsplasmids wurde NS5B ohne Stop-Codon durch PCR amplifiziert (aus pFK-I341PI-Luc/NS3-3' _ET) und *in frame* an den N-Terminus des eCFP in den pECFP-N1-Expressionsvektor von Clontech kloniert. Die Einklonierung erfolgte über XhoI und BamHI Restriktionsschnittstellen.
- Zur Erstellung der scFv-C-YFP-Expressionsplasmide wurden ausgesuchte scFv durch PCR amplifiziert (aus pAK100-scFv) und *in frame* an den C-Terminus des eYFP in den pEYFP-C1-Expressionsvektor von Clontech kloniert. Die Einklonierung erfolgte über XhoI und EcoRI Restriktionsschnittstellen.

Tabelle 2.1: Oligonukleotide für die PCR (Sequenzangaben von 5' nach 3')

Primer		Sequenz
NS5B-N-CFP	sense	TGTCAACTCGAGTCGATGTCCTAC
	antisense	TACTGGATCCAATCGGTTGGGGAG
scFv-C-YFP	sense	GCTCGAGATATGGCGGACTACAAAGA
	antisense	AGAATTCGACTAAATTCGGCCCCCGAG
new MCS pcDNA3.1+	sense	CTAGCACCATGGTCCGCGGAGAATTCCTGCAGGTCGACAAGCTTGC
	antisense	GGCCGCAAGCTTGTCTGACCTGCAGGAATTCTCCGCGGACCATGGTG
pGEX-csrc	sense	TCACGGAATTCTATGGGTAGCAAC
	antisense	TTGACTCGAGTACTAGAGGTTCTC
pGEX-csrc SH1	sense	TCACAGAATTCTAAGCCGCAGACT
	antisense	TTGACTCGAGTACTAGAGGTTCTC
pGEX-csrc SH2/1	sense	TCACAGAATTCTTCCGACTCCATC
	antisense	TTGACTCGAGTACTAGAGGTTCTC
pGEX-csrc SH3/2	sense	TCACGGAATTCTATGGGTAGCAAC
	antisense	AGCTCGAGTATTAATCCTTGGCCA
pGEX-NS5B	sense	CATGGAATTCTTCGATGTCCTACACA
	antisense	TTGACTCGAGTACTATCGGTTGGGGA
pGEX-NS5B Motiv1	sense	CATGGAATTCTTCGATGTCCTACACA
	antisense	TTGACTCGAGTACTAGTACACCCTTT
pGEX-NS5B Motiv2	sense	TCACGGAATTCGGAATACGACTTG
	antisense	TTGACTCGAGTACTATCGGTTGGGGA

Isolierung von RNA

Beim Arbeiten mit RNA wurden alle Gefäße und die Arbeitsfläche mit RNase-Zap (Sigma, München) und verwendetes Wasser mit DEPC (Sigma) behandelt, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden. Zum Pipettieren wurden gestopfte, sterile, RNase-freie Spitzen verwendet. Die Isolierung von RNA aus Huh9-13-Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben.

Northern Blot Immundetektion

Für den Northern Blot wurde je Probe 1 µg RNA eingesetzt. Für die Denaturierung wurde pro 10 µl Probe 4,1 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7), 6 µl Glyoxal (deionisiert mit Ionenaustauscher AG-510-X8 der Firma BioRad) und 20,5 µl DMSO zugesetzt und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 7 µl Orange-G-Ladepuffer.

Nach der Denaturierung wurde die RNA zusammen mit einem 0,5-10 kb RNA-Ladder (Invitrogen) auf ein RNase-freies 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer diente ein 10 mM Natriumphosphatpuffer (3,9 mM NaH₂PO₄, 6,1 mM Na₂HPO₄; pH 7), der während des Laufs durch Magnetrührer gleichmäßig umgewälzt wurde, um ein Konstanthalten des pH-Wertes zu gewährleisten. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei etwa 100 Volt in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur der Firma Gibco für etwa 3 Stunden. Die aufgetrennte RNA wurde über die Northern Blot Methode vom Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) über Nacht in 20x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat; pH 7) transferiert. Anschließend wurde die RNA auf der Membran UV-fixiert und für 1 h bei 63 °C in Prähybridisierungslösung (10% Dextransulfat, 12,5x Denhardts-Lösung (50x: 10 mg/ml Ficoll 400, 10 mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 10 mg/ml BSA Fraktion V), 4,8x SSC, 0,1% SDS, 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA) inkubiert. Nach der Prähybridisierung erfolgte die Zugabe einer denaturierten DNA-Sonde zusammen mit 100 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml). Als Sonden dienten ein XhoI/SpeI-Insert der Replikon-Plasmid-DNA bzw. ein NcoI/NotI-Insert einer β-Actin-Plasmid-DNA, die über das Megaprime DNA Labelling System (Amersham) radioaktiv markiert wurden. Zur Entfernung freier Nukleotide wurden die Sonden über ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham) aufgereinigt. Nach der Hybridisierung über Nacht bei 63 °C wurde die Membran zweimal für 15 min bei 58 °C in Waschpuffer I (2x SSC, 0,1% SDS) und zweimal für 15 min bei 58 °C in Waschpuffer II (0,2x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte durch Exposition von ECL-Filmen (Amersham) für mehrere Stunden bei -80 °C.

cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die Umschreibung erfolgte mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Nach der Synthese wurde die cDNA 1:6 mit sterilem H₂O verdünnt.

Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) und Real-Time-PCR

Um die Expression eines Zielgens semiquantitativ zu bestimmen, wurden RT-PCRs durchgeführt. Hierbei wird die synthetisierte cDNA direkt in einer PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel analysiert.

Tabelle 2.2: **Oligonukleotide für die RT-PCR (Sequenzangaben von 5' nach 3')**

Primer		Sequenz
NS5A	sense	AAT TAT TCT AGG GCG CTG TGG
	antisense	GAG CTG TGA CCC AAC CAG GT
NS5B	sense	ATG CTA CAA CAT CTC GCA GCG CAA
	antisense	GCC ATG ATG GTG GTG TCA ATT GGT
GAPDH	sense	ACA GTC CAT GCC ATC ACT GCC
	antisense	GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG

Um das Expressionsniveau des Zielgens quantitativ zu bestimmen, wurden Real-Time-PCRs mit Hilfe der LightCycler-Technik durchgeführt. Hierbei werden die PCR-Produkte direkt während ihrer Bildung durch DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR[®] Green erfasst, wobei aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt direkt auf die Menge an eingesetztem RNA-Template geschlossen werden kann.

Die Real-Time-PCR wurde mit Hilfe des Power SYBR[®] Green PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 9,45 ng cDNA, 0,3 µM sense Primer, 0,3 µM antisense Primer, 1x Power SYBR[®] Green PCR Master Mix. Die Real-Time-PCR Reaktion erfolgte in speziellen 96-Well Real-Time-PCR Platten (Applied Biosystems) im 7500 Real Time PCR System Lightcycler der Firma Applied Biosystems. Im Anschluss daran schloss sich eine Schmelzkurven-Analyse der PCR-Produkte an. Anhand dieser kann man zwischen spezifischem PCR-Produkt und eventuell nicht spezifischem PCR-Produkt oder gebildeten Primer-Dimeren unterscheiden und somit die Reinheit des PCR-Produkts beurteilen. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ unter Verwendung eines Referenzgens (hSDHA) nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode²⁰³.

Tabelle 2.3: **Oligonukleotide für die Real-Time-PCR (Sequenzangaben von 5' nach 3')**

Primer		Sequenz
NS5A	sense	CTG TCT GCG CCT TCC TTG A
	antisense	TTG GCC TCG ATG AGG TCA G
c-Src	sense	CCA CGA AAG GTG CCT ACT GC
	antisense	GTA GTG CTT CAC GTT GAG GCC
hSDHA	sense	CCT GGA GAT AAA GTC CCT CCA A
	antisense	ACA GAT TCT TCC CCA GCG TTT

2.2.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

Herstellung von Proteinextrakten

Zellen für die Western Blot Analyse oder Immunpräzipitation wurden in Protein-Lysepuffer TLP (136 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 10% Glycerol, 2 mM EDTA, 50 mM β -Glycerophosphat, 20 mM Natrium-Pyrophosphat, 0,2 mM Pefabloc, 5 μ g/ml Aprotinin, 5 μ g/ml Leupeptin, 4 mM Benzamidin, 1 mM Natrium-Vanadat, 1% Triton X-100) mit Hilfe eines Zellschabers aufgeschlossen. Die Proben wurden kurz gevortext und anschließend für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden diese abzentrifugiert (15 min, 14.000 rpm, 4 °C) und das Pellet verworfen.

Alternativ wurden die Zellen in einem modifizierten Lysepuffer mTLP (Zugabe von 0,2% SDS) aufgeschlossen. Nach der 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben mit sechs 10 Sekunden langen Ultraschallstößen sonifiziert.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Extrakten wurde mit Hilfe des BioRad-Protein-Assays nach Herstellerangaben bestimmt. Dieser Assay, der auf der Methode von Bradford²⁰⁴ basiert, macht sich zunutze, dass sich das Absorptionsmaximum des Säurefarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 nach Bindung an Proteine in einer sauren Lösung von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Die anschließende Messung der Extinktion ΔE_{595} erfolgte in einem Ultrospec Photometer (2100pro) der Firma Amersham.

Immunoblotting und Immundetektion

Für Western Blot Analysen wurden gleiche Mengen an Protein (10-50 μ g) der verschiedenen Proben verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proteinproben mit dem gleichen Volumen

eines 2-fachen SDS-PAGE-Probenauftragspuffer (0,09 M Tris/HCl (pH 6,8), 20% Glycerol, 2% SDS, 0,02% Bromphenolblau, 0,1 M DTT) versetzt und für 5 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration (8% bis 12%). Zur Durchführung wurde das Gelelektrophoresesystem der Firma Biometra (Göttingen) verwendet. Die Proteine wurden bei etwa 140 V über mehrere Stunden aufgetrennt. Als Proteinstandard wurde der SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen) eingesetzt.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine in einer ElektrobloTTing-Apparatur (Biometra) nach dem Semi-Dry-Verfahren auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell; Dassel). Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran wurde durch das Anlegen einer Stromstärke von 1 mA/cm² für einen Zeitraum von 1,1 Stunden gewährleistet. Der Stromfluss zwischen den Elektroden wurde durch mit BloTTingpuffer (1 mM SDS, 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 20% Methanol) getränkte Whatman-Papiere (Schleicher & Schuell; Dassel) sichergestellt.

Um die Qualität der Proteinübertragung zu überprüfen, wurde die Membran nach Beendigung des Transfers für einige Minuten in einer 0,2%igen (in 3% TCA) Ponceau-Rot-Färbelösung (Serva; Heidelberg) inkubiert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Unspezifische Antikörperbindungen wurden mit 3% BSA oder 5% Milchpulver in TBS-T (20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 137 mM NaCl, 0,1% Tween) für 1 Stunde bei RT abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in 3% BSA bzw. 5% Milchpulver in TBS-T bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch weiteres Waschen mit TBS-T entfernt, so dass gebundene Immunkomplexe mit Hilfe des Western Lightning Plus ECL Substrats (Perkin Elmer) auf ECL-Filmen (GE Healthcare) nachgewiesen werden konnten.

Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation oder Koimmunpräzipitation handelt es sich um eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo*. Dabei wird ein bestimmtes Protein zusammen mit seinem Interaktionspartner mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, der an Protein G-Agarose gebunden ist, aus einem Zellextrakt präzipitiert. Protein G ist ein Zellwandprotein von Bakterien der Gattung *Streptococcus*, welches spezifisch die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG bindet. Der Nachweis der Interaktion erfolgt schließlich durch eine Western Blot Analyse mit Hilfe eines Antikörpers gegen den potentiellen Interaktionspartner.

Für die Koimmunpräzipitation wurden zunächst 4 µg eines Src Antikörpers (Upstate) an die Protein G-Agarose (Santa Cruz) in einem Volumen von 500 µl in PBS gekoppelt. Nach einer Inkubation für 2 h bei 4 °C in einem Überkopf-Rotor wurden die Präzipitate zentrifugiert (13.000 rpm, RT, 5 sec) und mehrfach mit TLP gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 600 µg Proteinextrakt. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 4 °C im Überkopf-Rotor wurden die Präzipitate erneut zentrifugiert und mehrfach mit TLP gewaschen. Danach wurden die Proben durch Zugabe von 2-fachem SDS-PAGE Probenauftragspuffer und Inkubation für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Zentrifugation für 5 sec bei 13.000 rpm wurden die Überstände für die Beladung von SDS-Gelen verwendet.

Expression und Aufarbeitung von GST-Proteinen

Für die Herstellung von GST-markierten Proteinen wurde die gewünschte Gensequenz des kodierenden Bereichs in einen pGEX-6P-3-Vektor (Amersham) kloniert. Nach Transformation in BL21 *E. coli*-Bakterien (Promega) nach Herstellerangaben wurde ein Glycerol-Stock (20% Glycerin) angelegt und bei -80 °C eingefroren. Für die Aufzucht der transformierten BL21 wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 5 ml 2YT-Medium (16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) mit 50 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden 200 ml 2YT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin mit 2 ml der Übernachtskultur beimpft, unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und das Zellwachstum durch Trübungsmessung bei einer optischen Dichte (OD) von 600 nm bestimmt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1-2 wurde zur Induktion der Expression 0,1 mM IPTG zugegeben und für weitere 4 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 10 min bei 7.700 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 10 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach Resuspendierung wurde das Gemisch mit Ultraschall sonifiziert, dabei wurden die Proben auf Eis gehalten. Anschließend wurde Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt und für 30 min bei 4 °C in einem Überkopfmischer inkubiert. Die Suspension wurde schließlich für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand, in dem sich das Fusionsprotein befindet, wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

GST-Pulldown

Die GST-Pulldown Technik ²⁰⁵ nutzt die Affinität von GST zu einer Glutathion-gekoppelten Sepharosematrix, um interagierende Proteine aus einem Zellextrakt mit nicht-interagierenden Proteinen aufzureinigen. Der Nachweis der Interaktion erfolgt über eine

Western Blot Analyse mit Hilfe eines Antikörpers, der den potentiellen Interaktionspartner erkennt.

Für den GST-Pulldown werden etwa 10 µg der aufgearbeiteten GST-Fusionsproteine mit 500 µg Huh9-13-Zellextrakt und 50 µl Glutathion-Sepharose-Beads (50% in TLP) über Nacht bei 4 °C in einem Überkopf-Rotor inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 1 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, und die Glutathion-Sepharose-Beads wurden viermal mit je 1 ml TLP gewaschen. Danach wurden die Proben durch Zugabe von 2-fachen SDS-PAGE Probenauftragspuffer und Aufkochen für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand für die Beladung von SDS-Gelen verwendet.

Expression und Aufreinigung von rekombinantem NS5B in Insektenzellen

Für die Expression des His-getaggten NS5B wurden *High-Five*-Zellen mit 500 µl Virusüberstand (3. Runde) infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 27 °C wurden die Insektenzellen durch Zentrifugation (5.000 rpm, 20 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet einer 75 cm² Zellkulturflasche wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 10 min bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Lysispuffer I (10 mM Tris/HCl (pH 7,8), 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1x Complete, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 4 µg/ml Leupeptin) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml Lysispuffer II (20 mM Tris/HCl (pH 7,8), 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100, 20% Glycerol, 1x Complete, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 4 µg/ml Leupeptin) aufgenommen. Das Zell-Lysat wurde mit sechs 10 Sekunden langen Ultraschallstößen sonifiziert und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysispuffer III (20 mM Tris/HCl (pH 7,8), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Imidazol, 2% Triton X-100, 50% Glycerol, 1x Complete, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 4 µg/ml Leupeptin) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit 500 µl Ni-NTA-Agarose (äquilibriert in Lysispuffer III) für mindestens 30 min bei 4 °C im Überkopf-Rotor inkubiert. Die Agarose wurde durch Zentrifugation (5 min, 1.000 rpm, 4 °C) pelletiert und zweimal mit 5 ml Waschpuffer (20 mM Tris/HCl (pH 7,8), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Imidazol, 2% Triton X-100, 50% Glycerol, 1x Complete, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 4 µg/ml Leupeptin) gewaschen. Zur Elution der rekombinanten Proteine wurde die Agarose in 500 µl Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl (pH 7,8), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 200 mM Imidazol, 2% Triton X-100, 50% Glycerol, 1x Complete, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 4 µg/ml Leupeptin) resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (5 min, 1.000 rpm, 4 °C). Die Elution wurde viermal durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und in

Elutionspuffer (ohne Imidazol und Triton X-100, 20% Glycerol) in Dialysierschläuchen (Roth) dialysiert.

His-Pulldown

Beim His-Pulldown wird die Affinität des His-Tags zu Ni-NTA-Agarose genutzt, um potentielle Interaktionspartner aus periplasmatischen Bakterien-Extrakten aufzureinigen. Der Nachweis der Interaktion erfolgt, wie beim GST-Pulldown, über eine Western Blot Analyse mit Hilfe eines Antikörpers, der den potentiellen Interaktionspartner erkennt.

His-getaggt NS5B wurde wie beschrieben in den Insektenzellen exprimiert und an Ni-NTA-Agarose gekoppelt. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden periplasmatische Extrakte mit der Agarose über Nacht im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde zentrifugiert (5 min, 1.000 rpm, 4 °C) und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 2-fachen SDS-PAGE Probenauftragspuffer und Aufkochen für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand für die Beladung von SDS-Gelen verwendet.

2.2.4 Phagen-Display

Beim Phagen-Display handelt es sich um eine gentechnische Methode um Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von kombinatorischen Bibliotheken zu identifizieren. Dabei werden Proteine oder Peptide (z. B. Antikörperfragmente) funktionell auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert. Aus großen, rekombinanten Phagen-Display-Bibliotheken, lassen sich geeignete Bindungspartner für einen immobilisierten Liganden isolieren und identifizieren (Abbildung 2.1).

Spezifisch bindende Phagen werden durch mehrere Waschschrte und einen Elutionsschritt selektioniert (Panning) und können durch Wiederholung des Pannings angereichert werden. Letztlich kann die Aminosäuresequenz der selektionierten Klone durch Sequenzierung der Phagemid-DNA entschlüsselt werden.

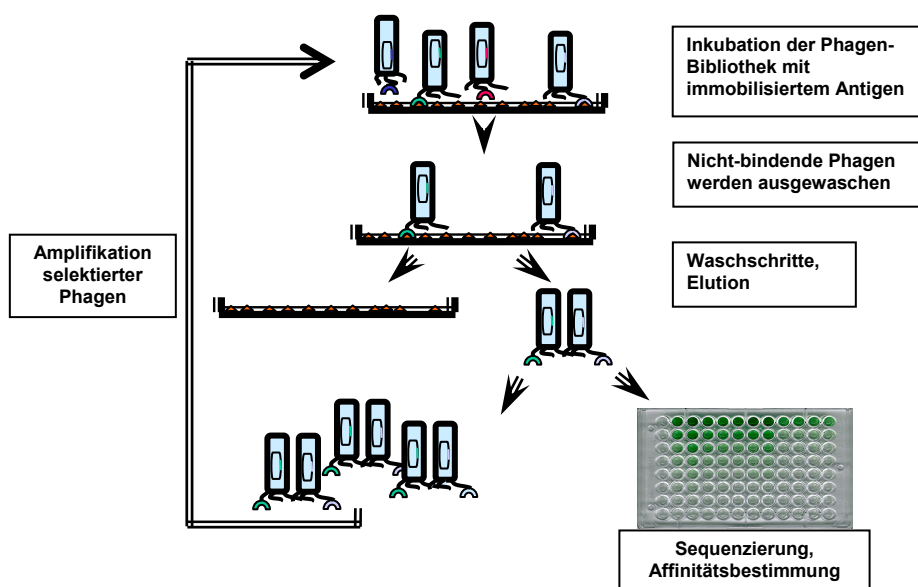


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Phagen-Display

Um Antikörperfragmente gegen NS5B zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Phagenbibliothek verwendet, die von Frau Dr. Tessmann aus Plasmazellen von HCV-infizierten Patienten hergestellt wurde²⁰⁶. Aus dem Knochenmarksaspirat der HCV-infizierten Patienten wurde die Gesamt-RNA isoliert und anhand der daraus synthetisierten cDNA die variablen Bereiche der schweren und leichten Immunglobulinketten (V_H und V_L) durch PCR amplifiziert. Die V_H -antisense und die V_L -sense Primer enthielten zusätzlich Sequenzen, die für einen flexiblen Aminosäure-Linker (Gly_4Ser)₃ kodieren. Dies erlaubte die rekombinante Hybridisierung zwischen den V_H - und V_L -Produkten in einer nachfolgenden Overlap-Extension-PCR-Reaktion. Nach Verdau mit SfiI wurden die Einkettenantikörper (scFv) in den Phagemid-Vektor pAK100 ligiert, und die resultierenden Plasmide wurden in elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue transformiert. Die Transformanten wurden gepoolt, um eine große Bibliothek von rekombinanten humanen scFv in pAK100 herzustellen.

Als Antigene wurden verschiedene Peptid-Motive von NS5B eingesetzt, die essentiell für die Polymerase-Funktion des Proteins sind^{207, 208}. Diese wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert und sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2.4: Antigene für den Phagen-Display

Motiv	Aminosäuresequenz (Position)
A	CPMGFAYDTRCFDSTVT (213-229)
B	ASGVLTTS CGNTLT CYLKA (281-299)
C	KLQDCTMLVCGDDLVI (307-323)
D	RAFTEAMTRYSA PPG (337-351)
F	KGGRKPARLIVFPDLG (151-166)

Herstellung eines Helferphagenstocks

Für die Herstellung von rekombinanten Phagen wurden Helferphagen benötigt, die zunächst in ausreichender Menge hergestellt werden mussten. Als Helferphage wurde der M13K07-Phage der Firma Amersham verwendet. Für die Amplifikation von Helferphagen wurden 8 ml LB-Medium (supplementiert mit 10 µg/ml Tetrazyklin) mit einer XL1-Blue-Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde mit 1 µl Helferphagen infiziert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 ml LB-Medium (10 µg/ml Tetrazyklin, 70 µg/ml Kanamycin) wurde die Kultur über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur für 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 3500 rpm wurde der Überstand durch Filterpapier (Schleicher & Schuell) filtriert.

Um den Titer der amplifizierten Helferphagen zu bestimmen, wurde die Plaque-Methode verwendet. Hierfür wurden je 300 µl XL1-Blue-Bakterienkulturen (+ 100 µl 1M MgSO₄, 100 µl 20% Maltose) mit 1 µl von Helferphagen-Verdünnungen (10⁻⁸, 10⁻⁹ und 10⁻¹⁰) durch eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C infiziert. Zu den Infektionsansätzen wurden 10 ml geschmolzene, 42 °C warme Topagarose (0,75% Secam-Agarose/LB-Medium) gegeben, gemischt und auf große LB-Agarplatten verteilt. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37 °C hatten die *E. coli*-Zellen einen Bakterienrasen gebildet, in dem mit Helferphagen-infizierte Bakterien als Stellen mit geringerer Zelldichte (Plaques) zu erkennen waren und ausgezählt werden konnten.

Anzucht der Phagenbibliothek

Für die Anzucht der Phagenbibliothek wurden 50 ml 2YT-Medium (10 µg/ml Tetrazyklin, 1% Glucose, 25 µg/ml Chloramphenicol) mit ~10⁹ Phagenbibliothek-enthaltenen Bakterien (Glycerinstock) angeimpft und bei 37 °C kultiviert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Kultur auf 100 ml aufgefüllt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden 10¹¹-10¹² Helferphagen, sowie 1 mM IPTG zugegeben und für 1 h bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Zur Selektion der Bakterien, bei denen eine Infektion mit dem Helferphagen stattgefunden hat, wird das Medium mit 30 µg/ml Kanamycin versetzt und über Nacht bei 26 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Kultur für 15 min bei 4.500 rpm zentrifugiert. Um die Phagen zu präzipitieren, wurde 1/5 Volumen 20% PEG/15% NaCl zum Überstand gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde 20 min bei 5.000 rpm zentrifugiert und das Phagen-Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. Die erhaltene Lösung enthielt die zur Immunselektion einzusetzende Phagenbibliothek und konnte für kurze Zeit bei 4 °C oder nach Zusatz von 20% Glycerin über längere Zeit bei -80 °C gelagert werden.

Um den Titer der Phagenpräparation zu bestimmen, wurden mit 1 µl Phagensuspension der Verdünnungsstufen 10^{-6} und 10^{-7} je 200 µl exponentiell wachsende *E. coli* XL1-Blue in 2YT-Medium infiziert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die infizierten Bakteriensuspensionen wurden auf 2YT-Agarplatten (Chloramphenicol, 1% Glucose) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch Auszählen der Bakterienkolonien konnte die Anzahl infektiöser Phagenpartikel (cfu, *colony forming units*) ermittelt werden. Da es sich bei den verwendeten Vektoren um Phagemide handelt, die sowohl die Eigenschaften eines bakteriellen Plasmids als auch die eines Phagen-Vektors besitzen²⁰⁹, konnte die cfu der pfu (*plaque forming unit*) gleich gesetzt werden.

Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagen (Panning)

Für die Immunselektion, beginnend mit dem ersten Panning wurde zum einen eine XL1-Blue-Übernachtskultur angesetzt und zum anderen eine Mikrotiterplatte (Corning) über Nacht bei 4 °C mit 50 µl/Kavität der Peptide (100 µg/ml in H₂O) beschichtet. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten fünfmal mit PBS gewaschen und anschließend die unspezifische Bindung von Phagen an die Platte durch Inkubation mit 200 µl BSA (3% in PBS) für 1 h bei RT abgesättigt. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit PBS wurden 50 µl der Phagenbibliothek (10^{11} - 10^{12}) pro Kavität auf die Mikrotiterplatte aufgebracht und für 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde fünfzehnmal mit PBS/0,1% Tween gewaschen, um nicht gebundene Phagen zu entfernen. Die gebundenen Phagen wurden mit 50 µl/Kavität Elutionspuffer (0,1 M Glycerin/HCl, pH 2,2) für 10 min eluiert und sofort mit 12 µl 1M Tris (pH 7,0) neutralisiert.

Um den Phagentiter zu bestimmen, wurden 50 µl des Phageneluats zu 2 ml einer frischen XL1-Blue-Kultur gegeben, 30 min bei 37 °C stehen gelassen und anschließend für 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Von der erhaltenen Bakteriensuspension wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und auf 2YT-Platten (25 µg/ml Chloramphenicol, 1% Glucose) ausplattiert.

Amplifikation von angereicherten Phagenpartikeln

Bevor die durch Elution gewonnenen rekombinanten Phagen einem erneuten Selektionszyklus zugeführt werden konnten, mussten sie amplifiziert werden. Dazu wurde eine exponentiell wachsende Kultur von XL1-Blue verwendet.

Für die Amplifikation wurden 2 ml XL1-Blue-Bakterienkultur mit 50 µl der eluierten Phagenlösung infiziert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C ohne Schütteln wurde die Kultur für weitere 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 8 ml 2YT

(25 µg/ml Chloramphenicol, 10 µg/ml Tetrazyklin, 1% Glukose), und nach 2 Stunden wurde die Kultur auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden 10¹¹-10¹² Helferphagen, sowie 1 mM IPTG hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µg/ml Kanamycin und eine Inkubation über Nacht schüttelnd bei 26 °C. Am nächsten Tag wurde die Kultur zentrifugiert (15 min, 4.500 rpm), und es erfolgte die Präzipitation der Phagen durch Zugabe von 1/5 Volumen 20% PEG/15% NaCl und einer 30-minütigen Inkubation auf Eis. Nach Zentrifugation für 20 min bei 5.000 rpm wurde das Pellet in 60 µl PBS aufgenommen. Für die nächste Panningrunde wurden je 50 µl der rekombinanten Phagen eingesetzt. Um den Titer der Phagen zu bestimmen, wurden 200 µl XL1-Blue mit 1 µl von Phagen-Verdünnungen (10⁻⁶ und 10⁻⁷) für 15 min bei 37 °C infiziert und anschließend auf 2YT-Platten (25 µg/ml Chloramphenicol, 1% Glucose) ausplattiert.

Monoklonaler Phagen-ELISA

Zur Isolierung und zum Nachweis einzelner, spezifisch bindender rekombinanter Phagen wurden diese, aus Einzelkolonien stammend, im Phagen-ELISA getestet. Für die Herstellung von monoklonalen Phagen wurden Phagemid enthaltende Einzelkolonien der dritten Panning-Runde in 5 ml 2YT-Medium (10 µg/ml Tetrazyklin, 25 µg/ml Chloramphenicol) angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden je 10¹¹-10¹² Helferphagen und 0,5 mM IPTG hinzugegeben und bei 26 °C inkubiert. Nach etwa 3-4 h erfolgte die Zugabe von 30 µg/ml Kanamycin und eine weitere Kultivierung über Nacht bei 26 °C. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4.500 rpm wurden die monoklonalen Phagen durch Zugabe von 1-1,5 ml 20% PEG/15% NaCl und 2-stündiger Inkubation auf Eis gefällt. Die Phagenlösung wurde erneut zentrifugiert (20 min, 5.000 rpm, 4 °C) und das Pellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert.

Für den monoklonalen Phagen-ELISA wurden Mikrotiterplatte über Nacht mit 100 µl Antigen (25 µg/ml) beschichtet und am nächsten Tag zweimal mit PBS gewaschen. Nach Absättigung der Platten mit 2% Magermilch/PBS für 1-2 h bei RT wurden je 100 µl Phagen (10⁸ in PBS) pro Kavität vorgelegt. Nach einer Inkubation für 2 h bei RT wurden die Platten fünfmal mit PBS/0,05% Tween gewaschen. Als nächstes erfolgte die Zugabe von 100 µl HRP-anti-M13-Konjugat (1:5.000 in 2% Magermilch/PBS). Nach 1 h wurden die Platten erneut sechsmal mit PBS/0,05% Tween gewaschen, bevor 100 µl einer frisch hergestellten ABTS-Lösung zugesetzt wurde. Abschließend erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader der Firma Anthos.

Produktion und Nachweis löslicher antigenbindender scFv-Antikörperfragmente

Für die Expression löslicher scFv wurden je 500 µl HB2151 Zellen mit 50 µl monoklonalen Phagen für 30 min bei 37 °C infiziert. Nach der Inkubation wurde die Kultur mit 2YT-Medium (0,1% Glukose) auf 2 ml aufgefüllt. Nach 2 h bei 37 °C wurden 25 µg/ml Chloramphenicol zugegeben und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 26 °C inkubiert und am nächsten Tag für 5 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Die erhaltenen Expressionsüberstände wurden mittels Western Blots und im ELISA analysiert.

Um zu überprüfen, ob die scFv in den periplasmatischen Raum der Bakterien sekretiert wurden, wurde das Bakterien-Pellet in 100 µl Spheroblastbuffer (200 mM Tris/HCl (pH 8), 0,5 mM EDTA (pH 8), 0,5 M Saccharose) resuspendiert. Nach Zugabe von 40 µl Lysozym (10 mg/ml) und 360 µl 50% Spheroblastpuffer erfolgte eine Inkubation für 30 min auf Eis. Die Proben wurden zentrifugiert (5 min, 10.000 rpm, 4 °C) und konnten ebenfalls über Western Blot und im ELISA analysiert werden.

Für den ELISA wurden Mikrotiterplatten mit 100 µl Antigen (25 µg/ml) bei 4 °C über Nacht beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit TBS/0,05% Tween wurden unspezifische Bindungsstellen mit 200 µl 3% BSA/TBS für 1 h bei RT abgesättigt. Die Platten wurden erneut dreimal mit TBS/0,05% Tween gewaschen und mit 100 µl des bakteriellen Zellkulturüberstandes für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit TBS/0,05% Tween gewaschen und mit einer 1:420 Verdünnung des anti-flag M1 Antikörpers (3% BSA/TBS-T) für 1 h bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (dreimal TBS/0,05% Tween) wurde ein HRP-konjugierter Maus-Antikörper (1:5.000 in 3% BSA/TBS-T) für 1 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden erneut dreimal gewaschen und abschließend mit 100 µl frisch hergestellter ABTS-Lösung im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Produktion und Aufreinigung rekombinanter scFv

Um die rekombinanten Antikörperfragmente im präparativen Maßstab zu produzieren und aufzureinigen, wurden ausgesuchte scFv in den pAK400-Vektor kloniert. Dieser Vektor erlaubt die Aufreinigung über ein fusioniertes His-tag. Mit je einer Einzelkolonie der transformierten *E. coli* wurden Vorkulturen von 5 ml 2YT-Medium (Chloramphenicol) angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml 2YT-Medium 1:50 mit der Übernachtskultur überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37 °C kultiviert. Bei Erreichen der gewünschten OD wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert und die Kultur wurde über Nacht bei 26 °C schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation

(5 min, 4.000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet in 600 µl Spheroblastbuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 240 µl Lysozym (10 mg/ml) und 2160 µl 50% Spheroplastbuffer wurde für 20 min auf Eis inkubiert, bevor für 5 min bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde.

Zur Aufreinigung der periplasmatisch exprimierten scFv wurde der periplasmatische Extrakt mit 500 µl Ni-NTA-Agarose (äquilibriert in Spheroplastbuffer) für 1,5 h bei 4 °C im Überkopprotor inkubiert. Nach Zentrifugation (3 min, 1.000 rpm, 4 °C) wurde die Agarose zweimal mit je 5 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol; pH 7,8) gewaschen und anschließend wurden die scFv dreimal mit 500 µl Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol; pH 7,8) eluiert.

Polymerase-Aktivitäts-Assay

Um ein mögliches inhibitorisches Potential von selektionierten Antikörperfragmenten abzuschätzen, wurde ein enzymatischer Polymerase-Aktivitäts-Assay in ELISA-Format entwickelt. Wie in Abbildung 2.2 dargestellt, wird in diesem Assay ein biotinylierter poly(rA)-Strang über Streptavidin an ein Well einer 96 Well-Platte immobilisiert. Rekombinantes NS5B kann nun Digoxigenin-gelabelte UTP an den poly(rA)-Strang synthetisieren. Diese Synthese kann anschließend über einen Digoxigenin-Antikörper detektiert werden. Zur Einschätzung der inhibitorischen Aktivität der scFv werden die aufgereinigten scFv mit dem rekombinanten NS5B vorinkubiert und schließlich die Polymerase-Reaktion durchgeführt.

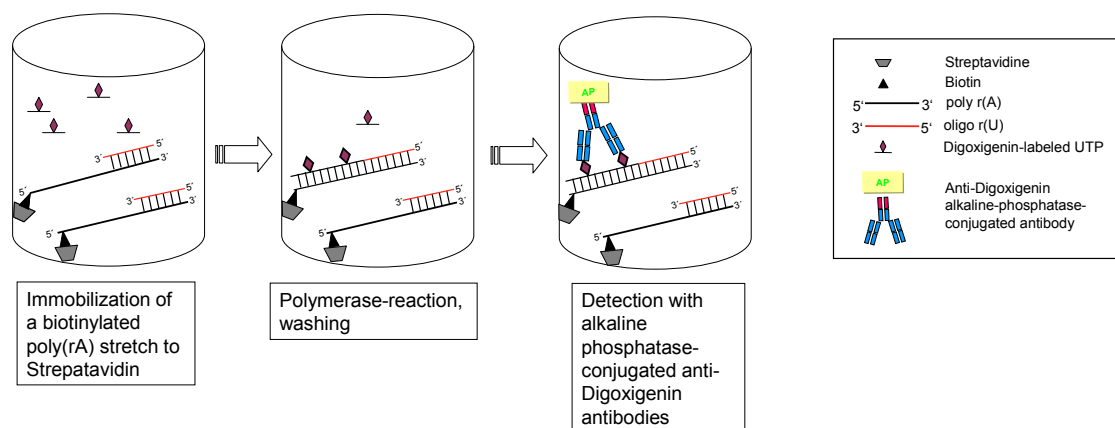


Abbildung 2.2: **Polymerase-Aktivitäts-Assay**

Für den Assay wurde als erstes eine 96 Well-Platte für 20 min unter UV-Bestrahlung sterilisiert. Die Wells wurden über Nacht bei 4 °C mit 1 µg/Well Streptavidin beschichtet und am nächsten Morgen 1 h bei RT mit 3% BSA geblockt. Pro Well wurden dann 10 pmol Biotin-5'-poly(rA) mit 10 pmol oligo₁₈(rU) in Gegenwart eines RNase-Inhibitors (Fermentas)

annealed und für 1 h bei RT in der 96 Well-Platte inkubiert. Die Wells wurden viermal mit H₂O gewaschen und die Reaktionslösung (20 U RNase-Inhibitor, 1x PA-Puffer (100 mM Tris, 100 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 125 mM KCl, 5 mM EDTA), 0,06 mM UTP, 0,03 mM Dig-UTP, 4 mM MgSO₄, 30-200 ng NS5B) für 1 h bei 32 °C inkubiert. Aufgereinigte scFv wurden für 10 min bei 4 °C mit NS5B vorinkubiert. Die Wells wurden sechsmal mit H₂O gewaschen und anschließend wurde ein AP-gekoppelter Digoxigenin-Antikörper (in 3 % BSA) für 1 h bei RT inkubiert. Die Wells wurden erneut sechsmal mit Wasser gewaschen, und 20 bzw. 40 min nach Zugabe der pNPP-Substratlösung (Sigma) wurde die OD₄₀₅ bestimmt.

3. ERGEBNISSE

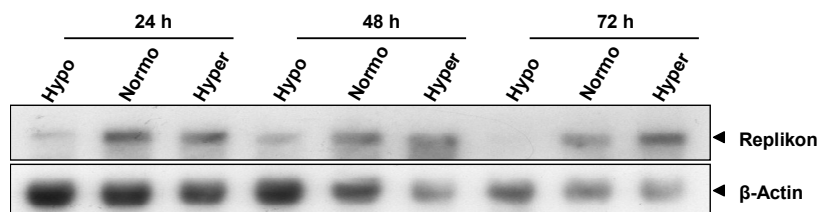
3.1 Einfluss von Anisoosmolarität auf die Replikation von HCV

Wie bereits erwähnt, beeinflusst der Hydratationszustand der Zelle auch die Replikation einer Vielzahl von Viren¹³². 1994 konnten Offensberger et al.¹⁵⁸ am Entenhepatitis-Modell zeigen, dass eine Zellschwellung (Hypoosmolarität) zu einer Hemmung der viralen Replikation des HBV führt und eine Zellschrumpfung (Hyperosmolarität) zur Stimulation der Replikation. Bisher ist noch unbekannt, inwieweit die Replikation von HCV durch den Hydratationszustand der Zelle beeinflusst wird. Aus diesem Grund sollte geklärt werden, ob Anisoosmolarität einen Einfluss auf die Replikation des subgenomischen HCV-Replikons in Huh9-13-Zellen besitzt. Zu diesem Zwecke wurden die Zellen unter anisoosmotischen Bedingungen inkubiert und anschließend deren RNA- und Protein-Gehalt analysiert.

3.1.1 Hypoosmolarität supprimiert die virale Replikation

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, kommt es unter hypoosmolaren Inkubationsbedingungen innerhalb von 24 h zu einer Hemmung der viralen RNA-Produktion, die im Verlauf von weiteren 48 h noch deutlich zunimmt und, soweit anhand der Befunde aus der Real-Time-PCR abschätzbar, zu einer Suppression der viralen RNA-Produktion um etwa 95% führt. Hier ergaben sich in den verschiedenen Nachweisverfahren für RNA wie Northern Blot, Reverse-Transkriptase (RT)-PCR und quantitativ mittels Real-Time-PCR vergleichbare Befunde. Im Gegensatz zu hypoosmotischen Inkubationsbedingungen konnte unter hyperosmotischen Inkubationsbedingungen auf RNA-Ebene kein signifikanter Effekt auf die virale Replikation nachgewiesen werden.

A



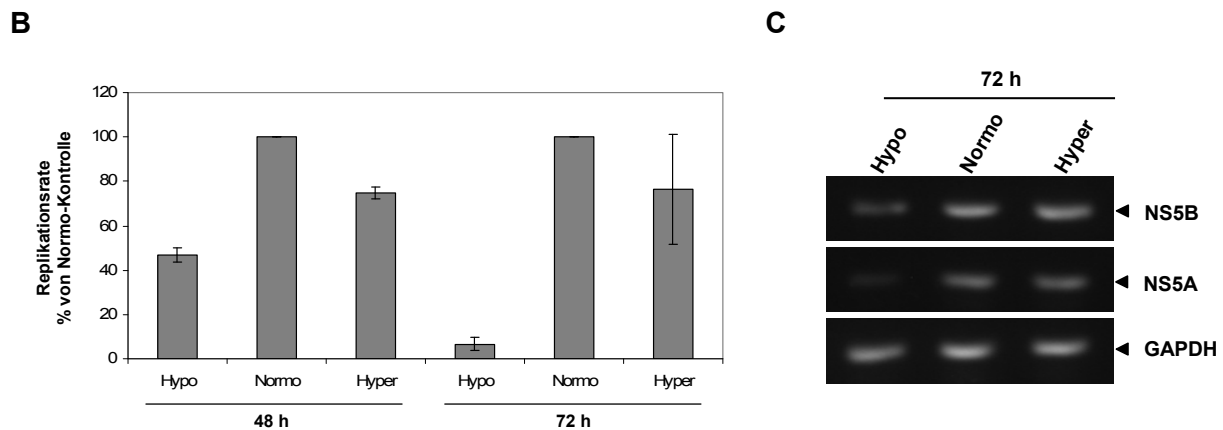


Abbildung 3.1: Einfluss von Anisoosmolarität auf die HCV-RNA

Huh9-13-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume in hypoosmotischem (205 mosmol/l), normoosmotischem (305 mosmol/l) oder hyperosmotischem (405 mosmol/l) Medium inkubiert. (A) Nach RNA-Extraktion wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proben in einem Northern Blot auf eine Membran geblottet und mit spezifischen Sonden für das HCV-Replikon und β -Actin (als endogene Kontrolle) auf ihre Replikon- bzw. β -Actin-mRNA-Werte untersucht. Die gesamte RNA wurde schließlich mit Hilfe der Realtime- (B) und der RT-PCR (C) analysiert. Hierfür wurden im NS5A-Gen und im Fall der RT-PCR zusätzlich im NS5B-Gen lokalisierte Primer verwendet. Die Ergebnisse der Realtime-PCR sind als Prozent der normoosmotischen Kontrolle dargestellt (MW $\pm$ SD). Als Kontrolle wurde in der RT-PCR GAPDH mit spezifischen Primern nachgewiesen.

Übereinstimmend mit den Befunden der viralen RNA-Expression fand sich auch auf Proteinebene eine nachhaltige Suppression der Expression der viralen Proteine NS3, NS5B und NS5A unter hypoosmolaren Bedingungen (Abbildung 3.2). Entsprechend zu den Befunden auf RNA-Ebene ließ sich hingegen unter hyperosmotischen Inkubationsbedingungen auch auf Proteinebene keine signifikante Beeinflussung der viralen Replikation nachweisen.

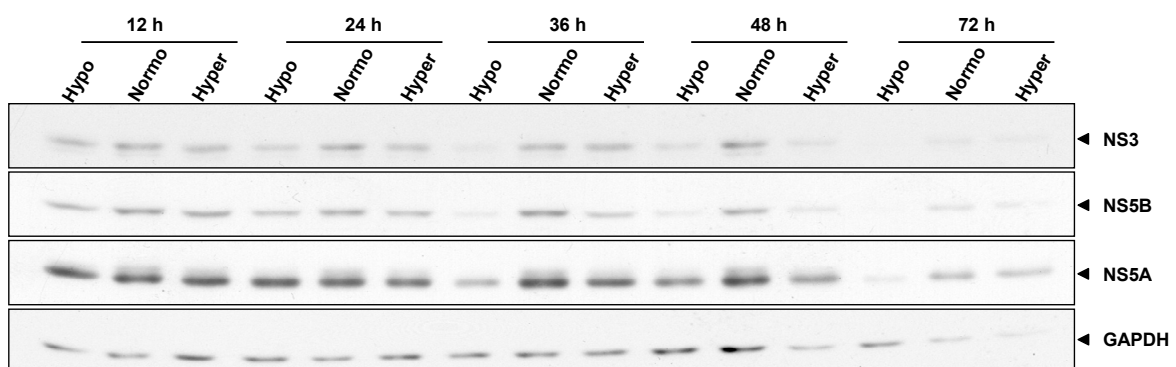


Abbildung 3.2: Einfluss von Anisoosmolarität auf die HCV-Proteine

Huh9-13-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume in hypoosmotischem (205 mosmol/l), normoosmotischem (305 mosmol/l) oder hyperosmotischem (405 mosmol/l) Medium inkubiert. Nach Versuchsende wurden Zelllysate gewonnen. Gleiche Proteinmengen (20 μ g) wurden einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Mittels spezifischer monoklonaler Antikörper wurden NS3, NS5B, NS5A und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

3.1.2 Osmolaritätsabhängigkeit der viralen Replikation

Oben ausgeführte Daten belegen, dass insbesondere hypoosmolare Bedingungen zu einer Hemmung der viralen Replikation führen. Um die Osmolaritätsabhängigkeit der viralen Replikation noch genauer aufzulösen, erfolgte die Durchführung von Osmolaritätsreihen (205 mosmol/l bis 405 mosmol/l), bei denen die Osmolarität in Schritten von etwa 25 mosmol/l erhöht wurde. Wie in Abbildung 3.3 A und B dargestellt, kommt es erst ab einer Reduktion der Osmolarität um mehr als 50 mosmol/l zu einem merklichen Abfall der viralen Replikation, die bei weiterer Absenkung der Osmolarität weiter zunimmt. Dieser Effekt kommt auf Proteinebene noch deutlicher zum Ausdruck, bei der es bereits bei einer Reduktion um 50 mosmol/l zu einer deutlich reduzierten Expression viraler Proteine wie NS3, NS5B und NS5A kommt (Abbildung 3.3 C). Im Gegensatz hierzu hat eine weitere Steigerung der Osmolarität über normoosmolare Bedingungen hinaus keinen relevanten Einfluss auf die Expression viraler RNA oder viraler Proteine.

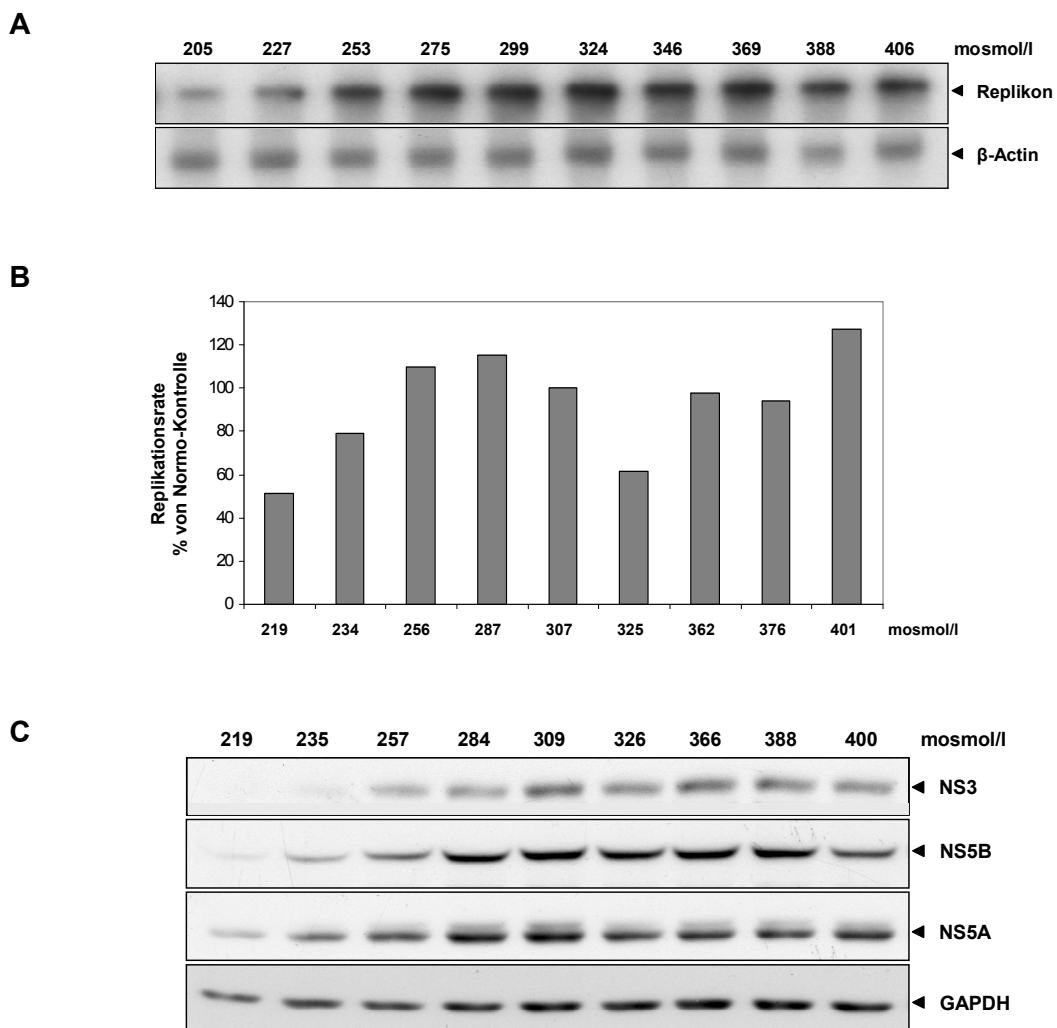


Abbildung 3.3: Osmolaritätsabhängigkeit der viralen Replikation

Huh9-13-Zellen wurden für 48 h in Medien der angegebenen Osmolaritäten inkubiert. **(A)** Der Northern Blot wurde mit spezifischen Sonden für das HCV-Replikon und β -Actin auf ihre Replikon- bzw. β -Actin-mRNA-Werte untersucht. **(B)** Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Realtime-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als Prozent der normoosmotischen Kontrolle dargestellt. **(C)** Gleiche Proteinmengen (20 μ g) wurden einer Western Blot-Analyse unterzogen. Mittels spezifischer Antikörper wurden NS3, NS5B, NS5A und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

3.1.3 Effekt von Raffinose auf die virale Replikation

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass vielmehr Änderungen der Ionenstärke und nicht Osmolaritäts- und Volumenänderungen für die Effekte auf die virale Replikation verantwortlich sind, wurden Experimente mit dem nichtpermeablen Osmolyt Raffinose anstelle von NaCl durchgeführt.

Durch Zugabe von 100 mmol/l Raffinose zum hypoosmotischen Medium (~ 205 mosmol/l) wurde normoosmotisches (~ 305 mosmol/l) und durch Zugabe von 100 mmol/l Raffinose zum normoosmotischen hyperosmotisches (~ 405 mosmol/l) Medium erzeugt.

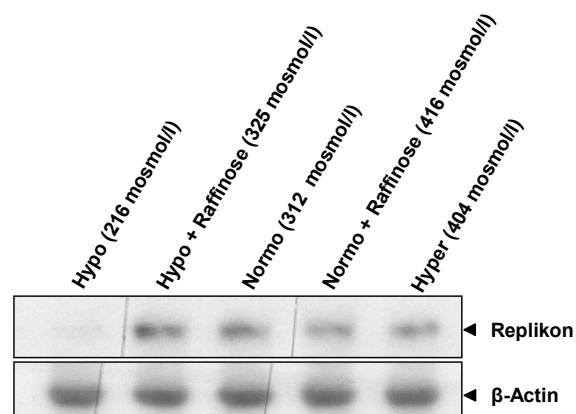


Abbildung 3.4: **Effekt von Raffinose anstelle von NaCl auf die virale Replikation**

Huh9-13-Zellen wurden für 36 h in den verschiedenen Medien inkubiert. Ausgehend vom hypoosmotischen Medium wurde durch Zugabe von 100 mM Raffinose normoosmotisches und durch Zugabe von 100 mM Raffinose zum normoosmotischen, hyperosmotisches Medium hergestellt. Der Northern Blot wurde mit spezifischen Sonden für das HCV-Replikon und β -Actin auf ihre Replikon- sowie β -Actin-RNA-Werte untersucht.

Die Northern Blot Analyse in Abbildung 3.4 zeigt, dass die Substitution von NaCl durch Raffinose zu ähnlichen Änderungen der HCV-Replikation wie NaCl führt. Diese Daten weisen darauf hin, dass die virale Replikation durch zelluläre Volumenänderungen beeinflusst wird und nicht durch Veränderungen der Ionenstärke.

3.1.4 Pharmakologische Charakterisierung der hypoosmotisch induzierten Hemmung der viralen Replikation

Um die an der hypoosmotisch induzierten Hemmung der viralen Replikation beteiligten Signalelemente zu identifizieren, wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten der Einfluss von spezifischen Inhibitoren auf den hypoosmotischen Effekt untersucht.

Wie bereits beschrieben, wird eine Schwellung von Hepatozyten durch das Integrin/Src-System registriert und führt zur Aktivierung von ERK- und p38 MAP-Kinasen ¹³⁰. Um zu klären, ob diese Signalkomponenten auch eine Rolle bei der hypoosmotisch induzierten Hemmung der viralen Replikation spielen, wurde der Effekt verschiedener Inhibitoren, unter anderem der Familie der Src-Protein-Tyrosin-Kinasen und der p38 MAP-Kinase, untersucht. In ersten Northern Blot-Analysen kamen PP2 (Inhibitor von Lck, Fyn, Hck und c-Src ²¹⁰), SU6656 (Inhibitor von Yes, Lyn, Fyn, c-Src und Lck ²¹¹), Herbimycin A (HA, Inhibitor von c-Src ²¹²) und L-JNKI (Inhibitor der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) ²¹³) zum Einsatz. Wie Abbildung 3.5 zeigt, vermochte keiner der eingesetzten Inhibitoren die hypoosmotisch induzierte Reduktion der viralen RNA zu beeinflussen. Im Fall von Herbimycin A fiel jedoch auf, dass der Inhibitor *per se* bereits zu einer deutlichen Hemmung der viralen Replikation führen kann, ein Effekt, der durch die anderen Inhibitoren nicht vermittelt wird.

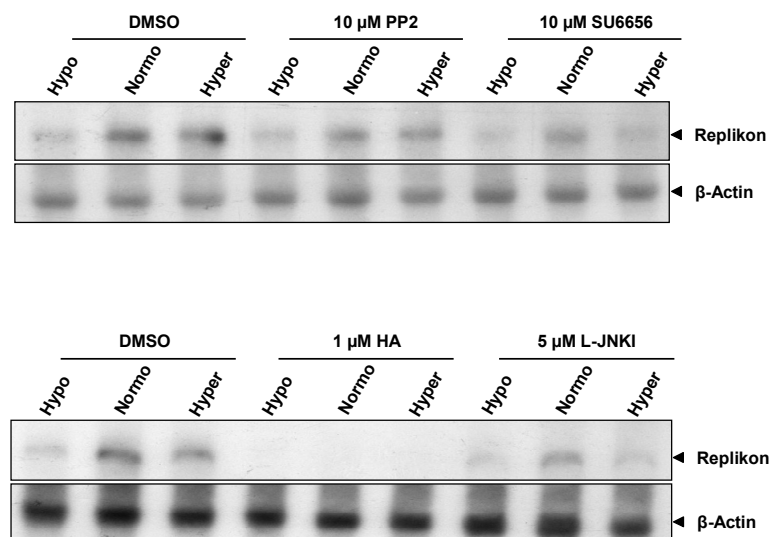


Abbildung 3.5: **Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf die hypoosmotisch induzierte Abnahme der viralen Replikon-RNA**

Huh9-13-Zellen wurden über 48 h mit hypoosmotischem (205 mosmol/l), normoosmotischem (305 mosmol/l) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/l) Medium inkubiert. Die angegebenen Inhibitoren wurden bereits 30 min vor Einstellung der Osmolarität dem Kulturmedium zugesetzt. Als Kontrolle wurde DMSO eingesetzt. Die Northern Blots wurden mit spezifischen Sonden für das HCV-Replikon und β -Actin auf ihre Replikon- sowie β -Actin-RNA-Werte untersucht.

In nachfolgenden Immunoblot-Analysen wurden darüber hinaus der Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein ²¹⁴, der p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB202190 ²¹⁵, der ERK/MAPK-Inhibitor PD98059 ²¹⁶, der Serin/Threonin-Phosphataseinhibitor Okadainsäure (OA ²¹⁷), das Antioxidans N-Acetylcystein (NAC ²¹⁸), sowie Herbimycin A und L-JNKI verwendet.

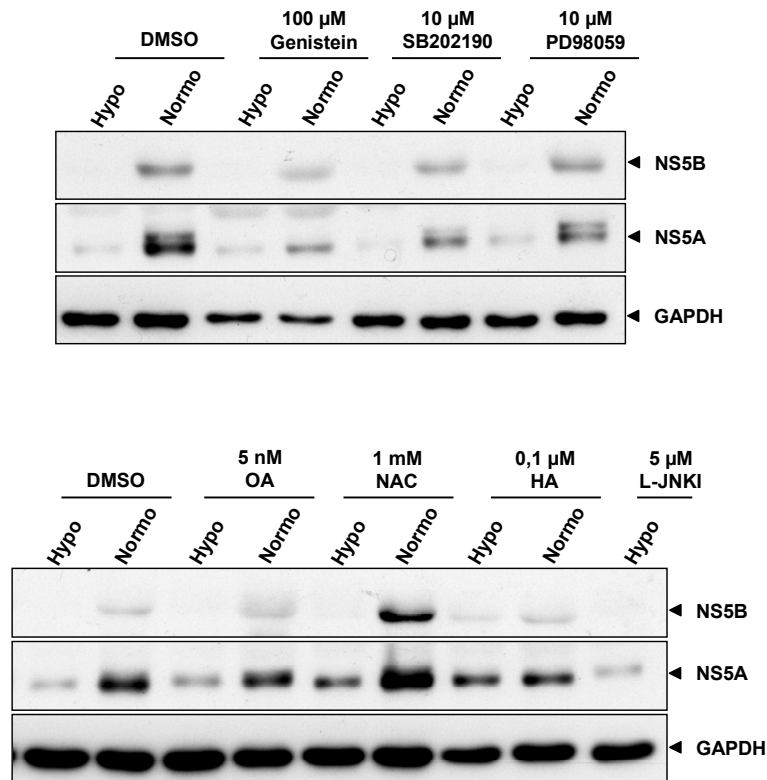


Abbildung 3.6: **Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf die hypoosmotisch induzierte Reduktion der viralen Proteine**

Huh9-13-Zellen wurden über 72 h mit hypoosmotischem (205 mosmol/l) bzw. normoosmotischem (305 mosmol/l) Medium inkubiert. Die angegebenen Inhibitoren wurden 1 h vor Einstellung der Osmolarität dem Kulturmedium zugesetzt. Als Kontrolle wurde DMSO eingesetzt. Die Western Blots mit gleichen Proteinmengen (10 µg) wurden mit spezifischen Antikörpern für NS5B, NS5A und GAPDH (Beladungskontrolle) auf ihre Expression untersucht.

Wie Abbildung 3.6 zeigt, war auch keiner dieser eingesetzten Inhibitoren in der Lage, die hypoosmotisch induzierte Abnahme der Expression der viralen Proteine zu beeinflussen.

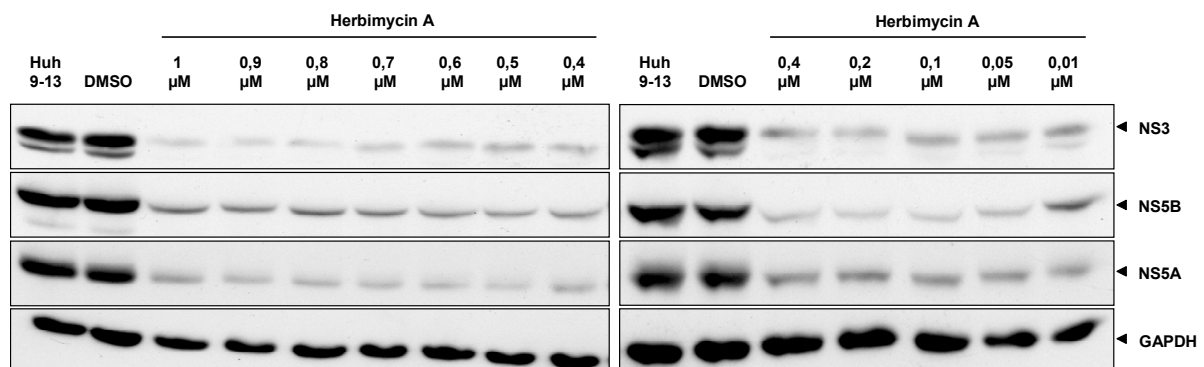
Die Ergebnisse legen nahe, dass keine der adressierten Proteinkinasen den inhibitorischen Effekt von Hypoosmolarität auf die virale Replikation vermittelt. Es ist daher davon auszugehen, dass weder Mitglieder der Src-Kinase-Familie, noch Genistein-sensitive Protein-Tyrosin-Kinasen, noch Mitglieder der MAPK-Familie wie p38-MAPK, JNK-1 oder ERK1/2 die suppressiven Effekte von Hypoosmolarität auf die virale Replikation vermitteln. Die Versuche mit dem Phosphatasen-Inhibitor Okadainsäure legen ferner nahe, dass auch Okadainsäure-sensitive Phosphatasen wie PP2A nicht an den inhibitorischen Effekten von Hypoosmolarität auf die virale Replikation beteiligt sind.

3.2 c-Src beeinflusst die Replikation von HCV

Bei der pharmakologischen Charakterisierung der hypoosmotisch induzierten Hemmung der viralen Replikation fiel auf, dass Herbimycin A *per se* und unabhängig von der Umgebungsmolarität zu einer deutlichen Reduktion der Replikon-RNA führt. Ausgehend von diesem Befund wurde der Einfluss von Herbimycin A auf die virale Replikation eingehender untersucht.

Dass Herbimycin A ein potenter Inhibitor der viralen Replikation ist, belegen die in Abbildung 3.7 dargestellten Konzentrationsreihen. Wie in der Abbildung ersichtlich, reicht bereits eine Konzentration von 10 nM Herbimycin A aus, um nach einer Stimulationsdauer von 72 h die Expression der viralen Proteine NS3, NS5B und NS5A deutlich zu supprimieren. Hiermit übereinstimmend kommt es auch auf RNA-Ebene erst bei Konzentrationen von weniger als 100 nM Herbimycin A zu einem Anstieg der viralen RNA-Expression, während die virale RNA bei Konzentrationen oberhalb von 100 nM um mehr als 90% supprimiert wird (Abbildung 3.7 B).

A



B

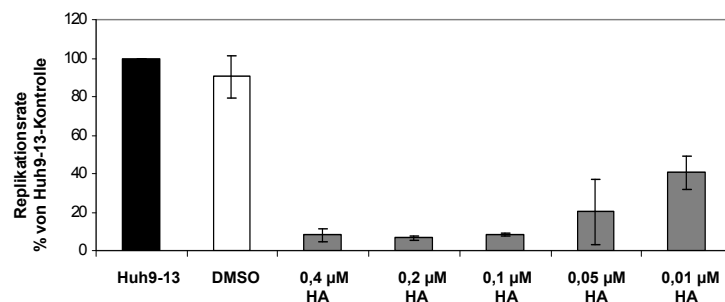


Abbildung 3.7: Herbimycin A hemmt die virale Replikation

Huh9-13-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Herbimycin A stimuliert und für einen Zeitraum von 72 h kultiviert. Als Kontrolle wurde DMSO eingesetzt. **(A)** Zelllysate wurden in gleicher Proteinmenge (20 μg) im PAA-Gel aufgetrennt. Mittels spezifischer Antikörper wurden NS3, NS5B, NS5A und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. **(B)** Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Realtime-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als Prozent der Huh9-13-Kontrolle dargestellt (MW ± SD).

Der hemmende Effekt von Herbimycin A ist hierbei nach etwa 12 h auf RNA-Ebene nachweisbar und erst nach etwa 24 h auch auf Ebene der Expression der viralen Proteine (Abbildung 3.8).

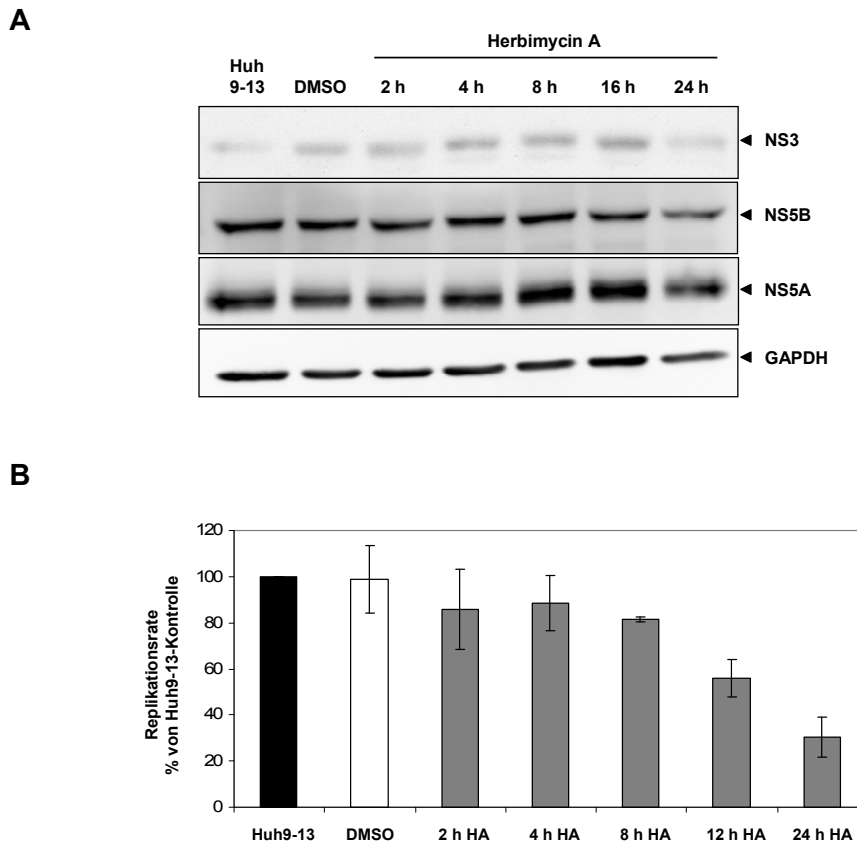


Abbildung 3.8: Zeitabhängigkeit der Hemmung der viralen Replikation durch Herbimycin A

Huh9-13-Zellen wurden mit 0,1 μ M Herbimycin A stimuliert und über die angegebenen Zeiträume kultiviert. Als Kontrolle wurde DMSO eingesetzt. **(A)** Zelllysate wurden in gleicher Proteinmenge (20 μ g) im PAA-Gel aufgetrennt. Mittels spezifischer Antikörper wurden NS3, NS5B, NS5A und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. **(B)** Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Realtime-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als Prozent der Huh9-13-Kontrolle dargestellt (MW $\pm$ SD).

3.2.1 Inhibitoren der Src-Kinase-Familie supprimieren die HCV-Replikation

Da Herbimycin A als vergleichsweise spezifischer Inhibitor von c-Src beschrieben ist ²¹², legen die Befunde nahe, dass c-Src für die virale Replikation von wichtiger Bedeutung ist. Diese Annahme wurde mit Hilfe weiterer Inhibitoren, die jeweils spezifisch Mitglieder der Src-Kinase-Familie hemmen, überprüft. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, hemmen sowohl SU6656 (inhibiert Yes, Lyn, Fyn, c-Src und Lck) als auch PP2 (inhibiert Lck, Fyn, Hck und c-Src) die virale Replikation und führen innerhalb von 24 h zu einer Suppression sowohl der Expression der Virusproteine NS3, NS5A und NS5B als auch der viralen RNA.

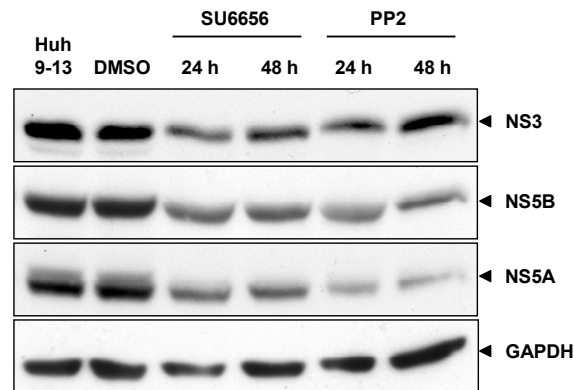
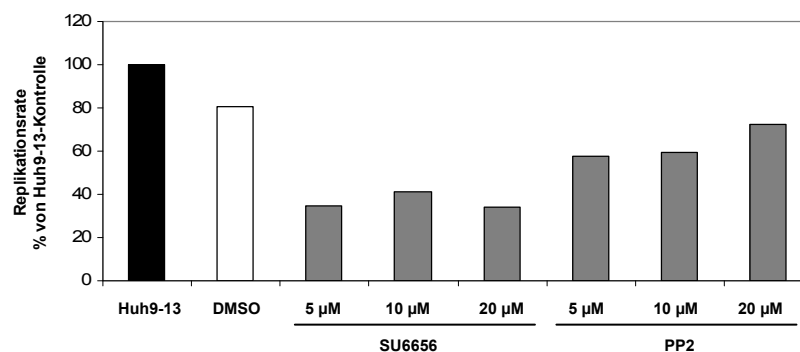
A**B**

Abbildung 3.9: **SU6656 und PP2 hemmen die Replikation von HCV**

(A) Huh9-13-Zellen wurden mit 10 μ M SU6656 bzw. PP2 stimuliert und über die angegebenen Zeiträume kultiviert. Als Kontrolle wurde DMSO eingesetzt. Zelllysate wurden hergestellt und gleiche Mengen an Protein (20 μ g) wurden im PAA-Gel aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen NS3, NS5B, NS5A und GAPDH (Beladungskontrolle). (B) Huh9-13-Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von SU6656 und PP2 kultiviert. Als Kontrolle wurde DMSO eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Realtime-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als Prozent der Huh9-13-Kontrolle dargestellt.

Die Ergebnisse mit den beiden Src-Kinase-Familie-Inhibitoren bestätigen, dass c-Src relevant für die Replikation des subgenomischen Replikons in Huh9-13-Zellen zu sein scheint. So konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von c-Src durch den spezifischen c-Src-Inhibitor Herbimycin A, aber auch durch weitere Inhibitoren der Src-Kinase-Familie wie SU6656 und PP2 zu einer deutlichen Reduktion der Virus-Replikation führt.

3.2.2 Eine konstitutiv aktive Src steigert die Expression von NS5A

Wie erwähnt, handelt es sich bei v-Src um eine konstitutiv aktive Src. Um den Einfluss dieser aktiven Form auf die virale Replikation zu untersuchen, wurde v-Src mit einem aminoterminalen HisG-Tag in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pcDNA3.1+)

kloniert. Wie Abbildung 3.10 zeigt, führt die Transfektion von Huh9-13-Zellen mit dem v-Src-Konstrukt zu einer Verstärkung der Expression von NS5A.

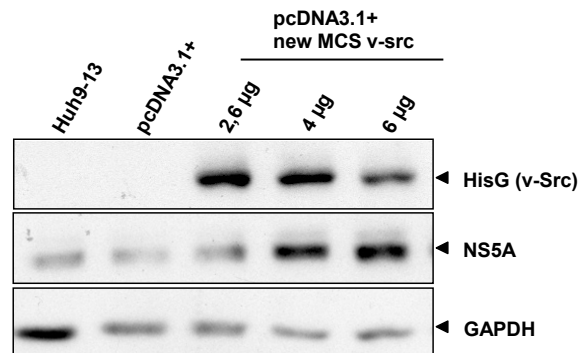


Abbildung 3.10: **Eine konstitutiv aktive Src steigert die Expression von NS5A**

Huh9-13-Zellen wurden mit einem HisG-getaggten v-Src-Konstrukt transfiziert und für 24 h kultiviert. Als Kontrolle wurde der Leervektor pcDNA3.1+ transfiziert. Zelllysate wurden in gleicher Proteinmenge (10 µg) im PAA-Gel aufgetrennt. Mittels spezifischer Antikörper wurden das HisG-Tag (v-Src), NS5A und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

3.2.3 siRNA-Silencing von c-Src inhibiert die virale Replikation

Um zu untersuchen, ob auch eine Hemmung der c-Src-Expression in der Hepatoma-Zelllinie, die das subgenomische HCV-Replikon exprimiert, die virale Replikation supprimiert, wurden Huh9-13-Zellen mit spezifisch gegen humanes c-Src gerichteter siRNA transfiziert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit einer Kontroll-siRNA.

Der spezifische *Knockdown* von c-Src durch einen siRNA-Oligomix unbekannter Zusammensetzung der Firma Upstate hatte eine deutliche Hemmung der Expression der viralen Proteine NS3, NS5B und NS5A zur Folge (Abbildung 3.11 A). Die Realtime-PCR bestätigt die Ergebnisse, und wie Abbildung 3.11 B zeigt, kommt es im Vergleich zur Transfektion mit einer Kontroll-siRNA zu einer Inhibition der viralen Replikation um etwa 30%.

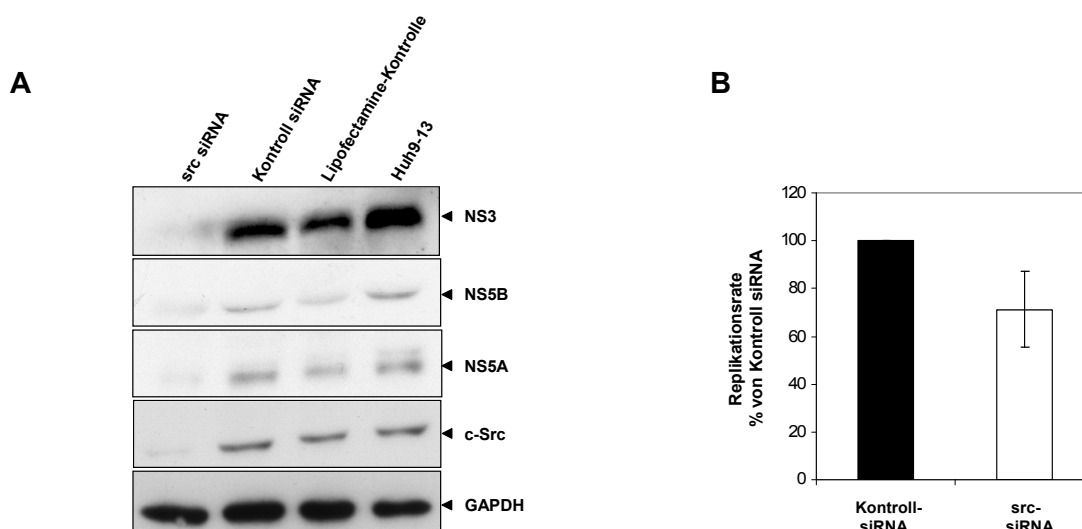


Abbildung 3.11: siRNA-Knockdown des c-Src-Proteinlevels inhibiert die virale Replikation

Huh9-13-Zellen wurden mit 20 nM von einem src-spezifischen siRNA-Pool bzw. einem Kontroll-siRNA-Pool transfiziert und für 48 h kultiviert. **(A)** Anschließend wurden Zelllysate bereitete und gleiche Mengen (10 µg) wurden per SDS/PAGE aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen NS3, NS5B, NS5A, c-Src und GAPDH. **(B)** Des Weiteren wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe der Realtime-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als Prozent der Kontroll-siRNA dargestellt (MW ± SD).

Des Weiteren wurden drei verschiedene c-Src spezifische siRNAs nach selbst ausgewählten Sequenzen der Firma Eurofins MWG Operon eingesetzt. Auch hier kommt es bei den siRNAs jeweils alleine oder in Kombination der drei zu einer effektiven Reduktion der c-Src-Expression. Durch die Unterdrückung der c-Src-Expression wird auch die Expression der viralen Proteine deutlich gehemmt (Abbildung 3.12 A). Auch auf RNA-Ebene ist der Effekt des *Knockdowns* von c-Src auf die virale Replikation zu erkennen. Obwohl die Hemmung der c-Src-Expression durch die Transfektion der Huh9-13-Zellen mit den verschiedenen c-Src siRNAs nicht vollständig war (Reduktion um durchschnittlich 40-60%), hatte der c-Src-*Knockdown* eine deutliche Verringerung der Menge an viraler mRNA um ebenfalls etwa 40-60% zur Folge.

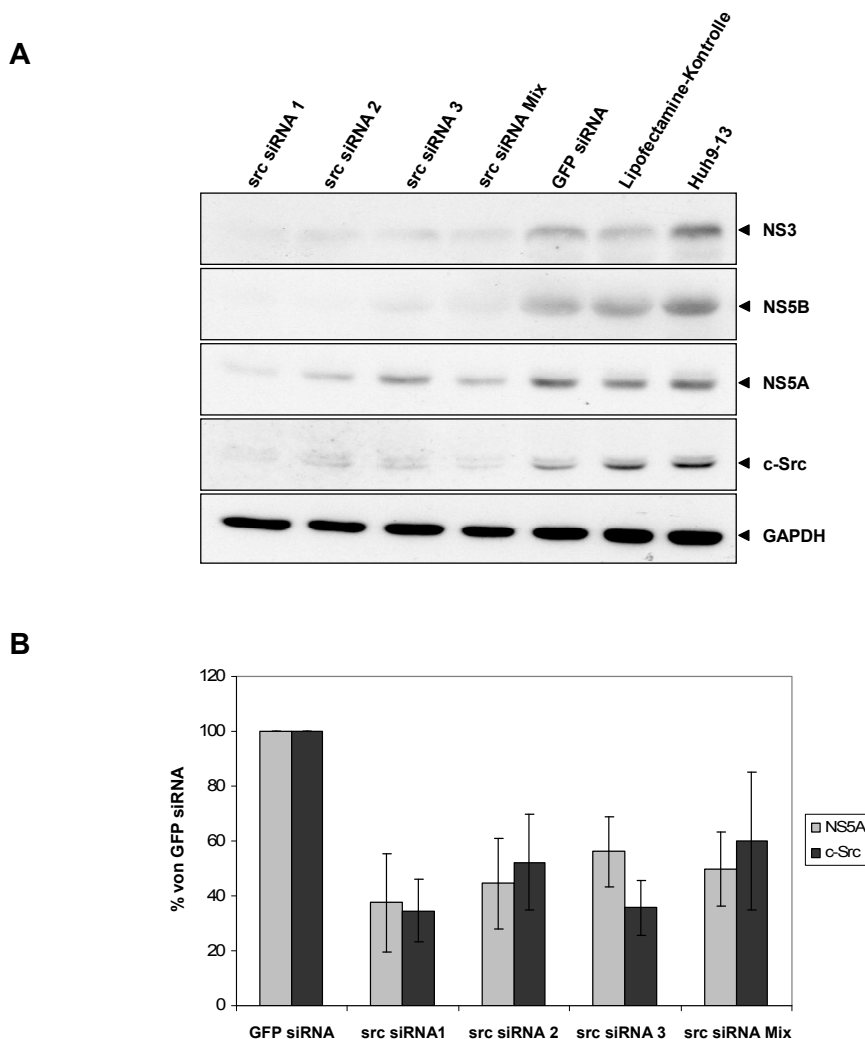


Abbildung 3.12: **siRNA-Knockdown des c-Src-Proteinlevels inhibiert die virale Replikation**

Huh9-13-Zellen wurden mit 25 nM src-spezifischen siRNAs bzw. GFP siRNA transfiziert und für 72 h kultiviert. **(A)** Anschließend wurden Zelllysate in gleicher Proteinmenge (20 µg) im PAA-Gel aufgetrennt. Mittels spezifischer Antikörper wurden NS3, NS5B, NS5A, c-Src und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. **(B)** Des Weiteren wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe der Realtime-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als Prozent der GFP siRNA (Kontroll-siRNA) dargestellt (MW ± SD).

3.2.4 c-Src interagiert mit NS5B

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass c-Src eine wichtige Bedeutung für die Replikation des subgenomischen Replikons in Huh9-13-Zellen hat. Um die Rolle von c-Src für die virale Replikation näher zu bestimmen, wurde in nachfolgenden Untersuchungen überprüft, ob c-Src möglicherweise mit einem der viralen Proteine von HCV interagiert und so seinen Einfluss auf die Replikation ausübt. Zu diesem Zweck wurden Ko-Immunpräzipitationsstudien mit einem monoklonalen c-Src Antikörper durchgeführt. Wie die nachfolgende Abbildung belegt, konnte keine Interaktion von c-Src mit NS3 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte aber ein c-Src/NS5B-Komplex identifiziert werden (Abbildung 3.13).

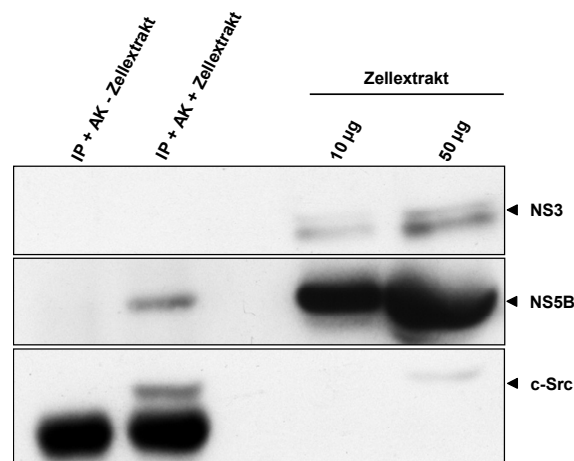


Abbildung 3.13: **c-Src interagiert mit NS5B, aber nicht mit NS3**

Für die Immunpräzipitation wurden Huh9-13-Zellextrakte mit einem Antikörper gegen c-Src inkubiert. Die Immundetektion erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen NS3 und NS5B. Als Kontrolle diente die Gegenfärbung mit c-Src.

Wie erwähnt handelt es sich bei c-Src um eine Tyrosinkinase. Es war daher von Interesse, in Immunpräzipitationsstudien zu überprüfen, ob NS5B nicht nur mit c-Src interagiert, sondern möglicherweise auch von dieser phosphoryliert wird.

Wie die nachfolgende Abbildung belegt, ist davon auszugehen, dass das präzipitierte NS5B nicht tyrosinphosphoryliert vorliegt (Abbildung 3.14).

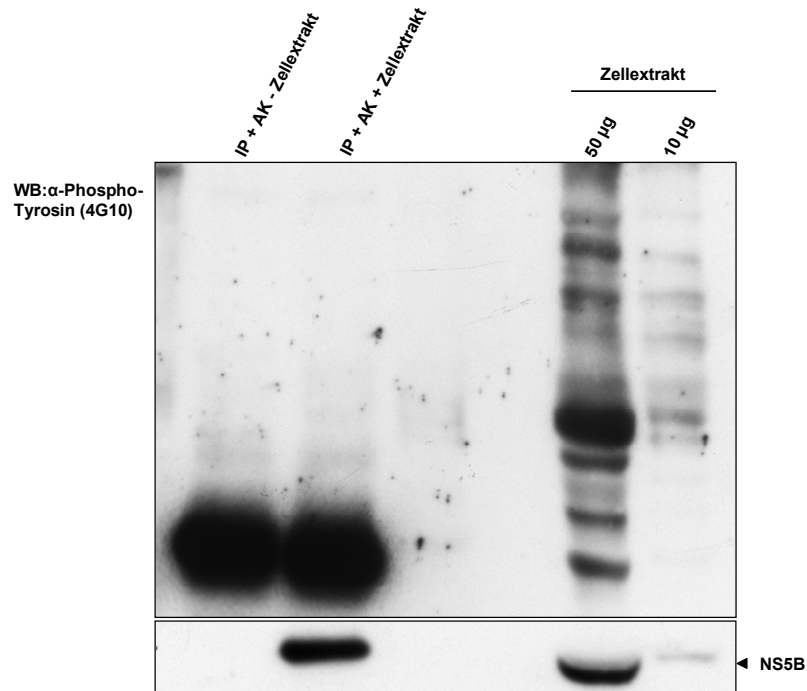


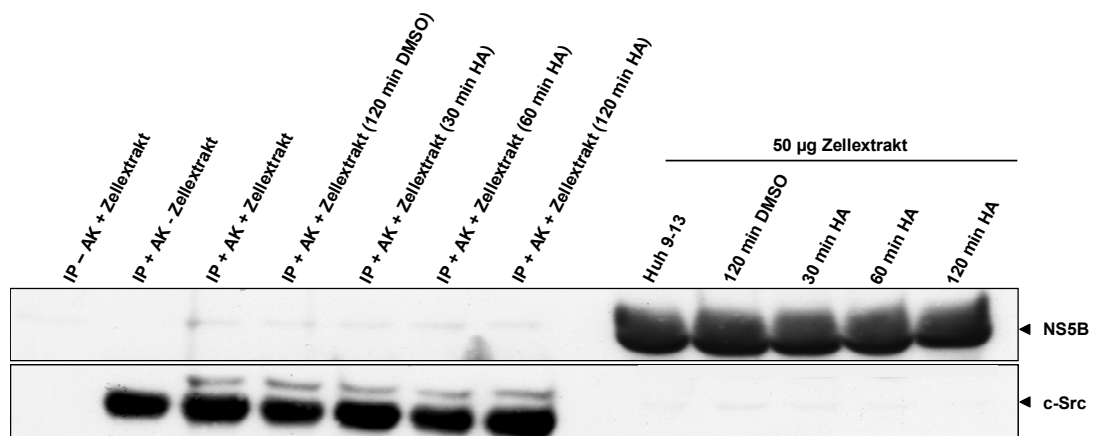
Abbildung 3.14: **NS5B wird nicht Tyrosin-phosphoryliert**

Die Immunpräzipitation aus Huh9-13-Zellextrakten wurde mit einem spezifischen NS5B-Antikörper (5B-12B7) durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phosphotyrosin (4G10). Als Beladungskontrolle diente die Gegenfärbung mit NS5B.

Mit Hilfe von Ko-Immunpräzipitationsstudien sollte überprüft werden, ob der hemmende Effekt von Herbimycin A auf die virale Replikation darauf basiert, dass es die Interaktion zwischen c-Src und NS5B stört.

Die beiden folgenden Abbildungen legen nahe, dass unter Stimulation mit Herbimycin A die Ausbildung des c-Src/NS5B-Komplexes nachgewiesen werden kann (Abbildung 3.15 A und B). Diese Ergebnisse deuten an, dass die Interaktion zwischen c-Src und NS5B durch Herbimycin A nicht beeinträchtigt wird.

A



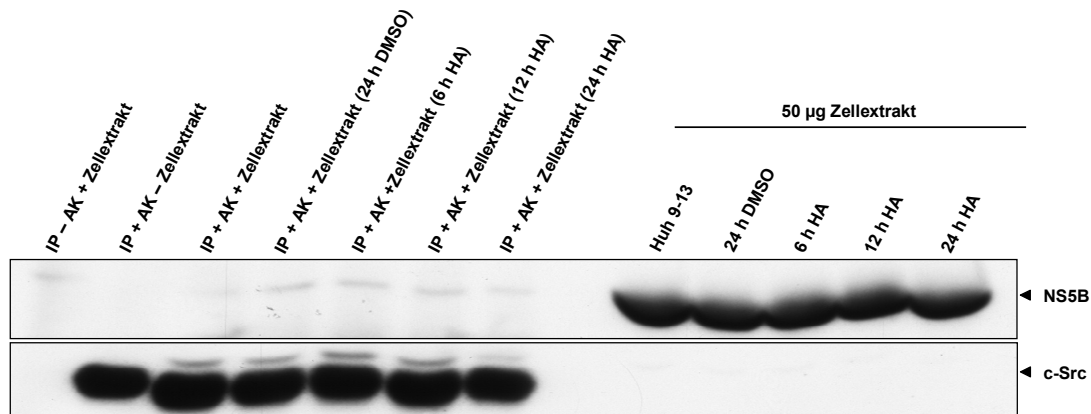
B

Abbildung 3.15: Die Interaktion von c-Src und NS5B wird nicht durch Herbimycin A beeinträchtigt

Die Stimulation der Huh9-13-Zellen erfolgte mit 0,1 µM (A) bzw. 0,2 µM (B) Herbimycin A für die angegebenen Zeiträume. Als Kontrolle wurde mit DMSO stimuliert. Die Immunpräzipitation der verschiedenen Huh9-13-Zell-extrakte erfolgte über einen c-Src spezifischen Antikörper. Um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Agarose zu berücksichtigen, wurde in einer sogenannten Antikörper-Kontrolle die Präzipitation in Abwesenheit des Antikörpers durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5B. Als Beladungskontrolle diente die Gegenfärbung mit c-Src.

Um die Interaktion zwischen c-Src und NS5B näher zu charakterisieren, wurden GST-Pulldown-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde zunächst Vollängen c-Src mit einem GST-Tag versehen und in Bakterien exprimiert. Abbildung 3.16 belegt, dass das GST-getaggte c-Src-Konstrukt, welches durch das pGEX-Plasmid exprimiert wird, genau wie sein endogenes Äquivalent in der Lage ist mit NS5B zu interagieren. Eine Bindung von NS5B an GST alleine oder an die Glutathion-Sepharose konnte nicht nachgewiesen werden.

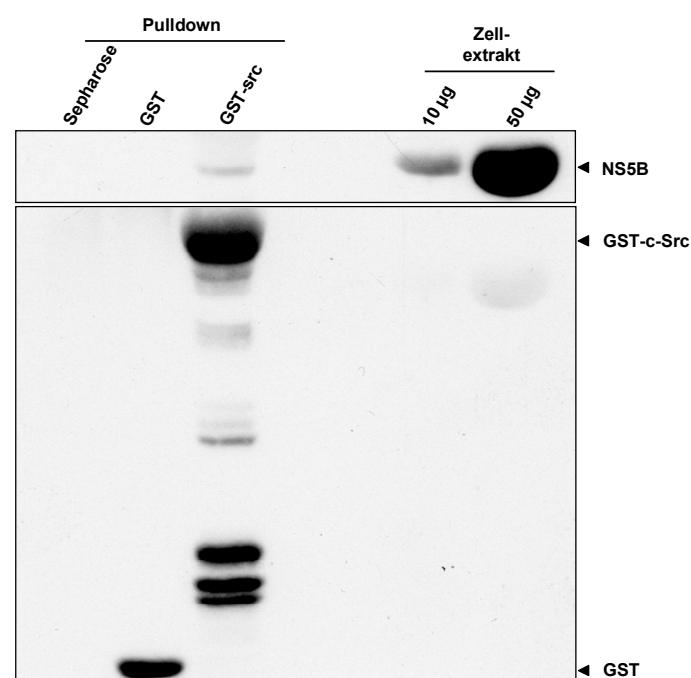


Abbildung 3.16: GST-getaggttes c-Src interagiert mit NS5B

Für den GST-Pulldown wurden Huh9-13-Zellextrakte mit GST-getaggttem c-Src inkubiert. Um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Sepharose bzw. an den GST-Anteil zu berücksichtigen, wurde der Pulldown zum einen in Abwesenheit der GST-Proteine bzw. in Anwesenheit des GST-Proteins durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5B. Als Beladungskontrolle diente die Gegenfärbung mit einem polyklonalen GST-Antikörper.

Als nächstes wurden verschiedene Verkürzungsmutanten von c-Src auf ihre Bindung mit NS5B hin analysiert. Dazu wurden mittels PCR die Domänen von c-Src in das pGEX-Plasmid kloniert und in Bakterien exprimiert. Abbildung 3.17 A zeigt die generierten Verkürzungsmutanten, bei denen verschiedene Domänen trunkiert wurden. Wie in Abbildung 3.17 B dargelegt, ist die SH1-Domäne von c-Src nicht in der Lage mit NS5B zu interagieren. Im Gegensatz dazu konnte sowohl mit GST-SH2/1 als auch mit GST-SH3/2 eine Bindung mit NS5B nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Interaktion mit NS5B über die SH2- und die SH3-Domäne von c-Src vermittelt wird.

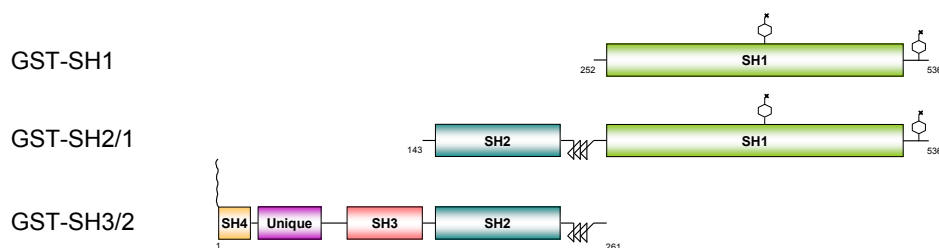
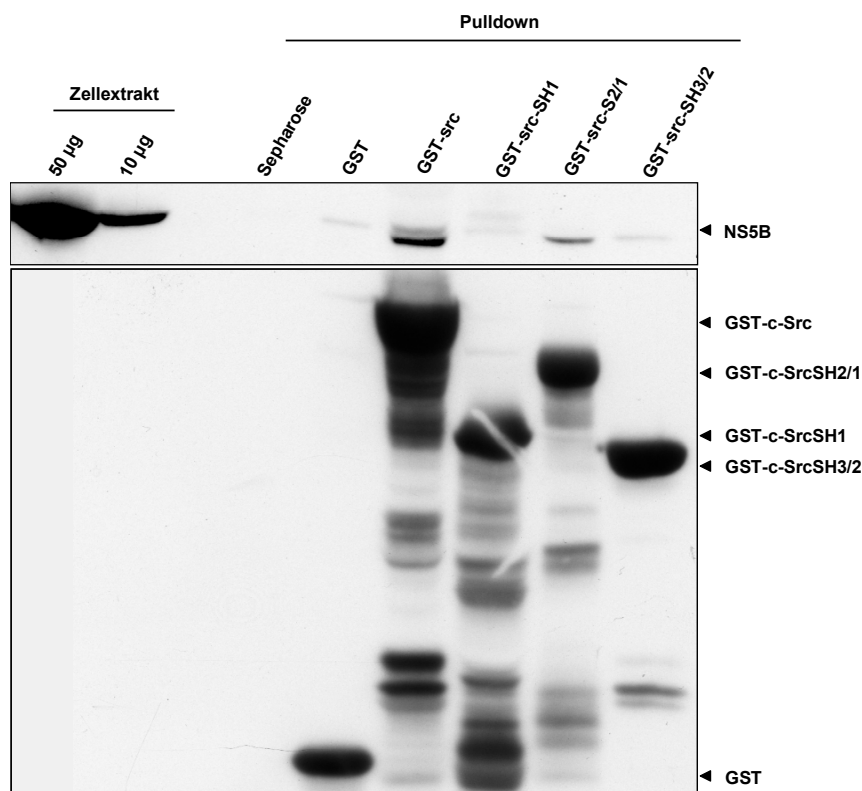
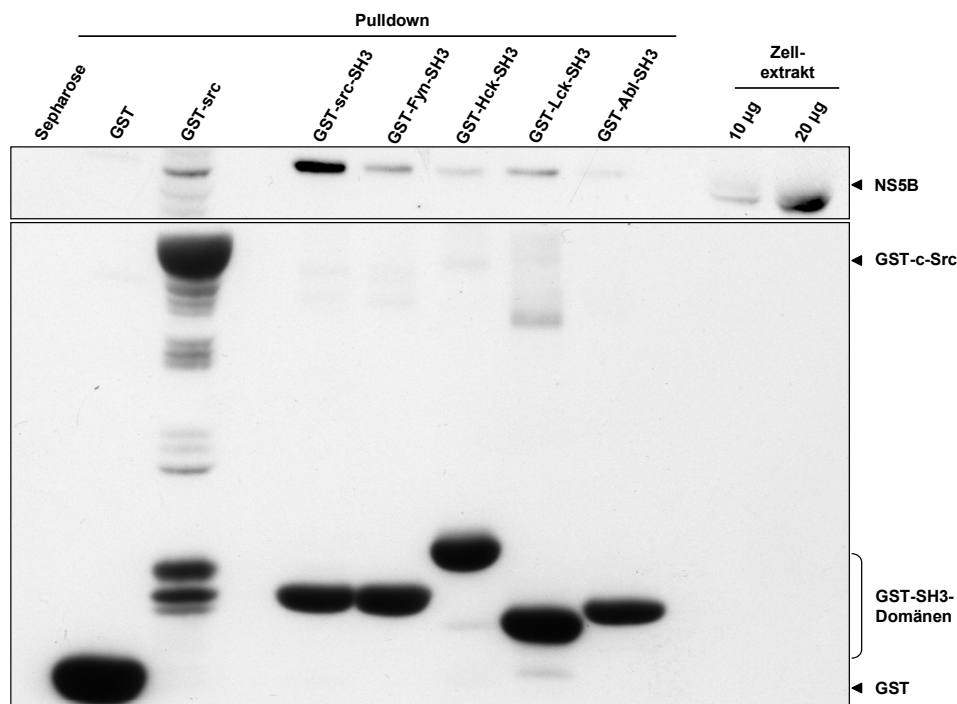
A**B**

Abbildung 3.17: NS5B bindet die SH2- und SH3-Domänen von c-Src

(A) Darstellung der c-Src-Verkürzungsmutanten (B) Für den GST-Pulldown wurden Huh9-13-Zell-extrakte mit GST-getaggen Verkürzungsmutanten von c-Src inkubiert. Um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Sepharose bzw. an den GST-Anteil zu berücksichtigen, wurde der Pulldown zum einen in Abwesenheit der GST-Proteine bzw. in Anwesenheit des GST-Proteins durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5B. Als Beladungskontrolle diente die Gegenfärbung mit einem polyklonalen GST-Antikörper.

Um zu klären, ob NS5B auch mit anderen Proteinen, die SH3-Domänen besitzen, interagieren kann, wurden verschiedene GST-Fusionsproteine eingesetzt, die die SH3-Domänen von weiteren Src-Kinasen (Fyn, Hck, Lck) und die der Abl-Kinase enthalten (zur Verfügung gestellt von Prof. Willbold, Düsseldorf). Abbildung 3.18 bestätigt, dass NS5B mit dem Volllängen c-Src sowie mit der SH3-Domäne von c-Src interagiert. Auch mit den anderen getesteten SH3-Domänen von Fyn, Hck und Lck scheint es eine Interaktion zu geben, wobei diese aber nicht so stark sind, wie im Fall der SH3-Domäne von c-Src. Bei der SH3-Domäne von Abl dagegen ist nur eine sehr schwache Interaktion mit NS5B nachweisbar. Diese Daten belegen, dass die Fähigkeit von NS5B mit SH3-Domänen zu interagieren nicht nur auf c-Src beschränkt ist, da NS5B imstande ist, mit SH3-Domänen von anderen Mitgliedern der Src-Kinase Familie zu interagieren.


Abbildung 3.18: NS5B bindet SH3-Domänen von Src-Kinasen

Für den GST-Pulldown wurden Huh9-13-Zell-extrakte mit GST-getaggen SH3-Domänen von Src-Kinasen inkubiert. Um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Sepharose bzw. an den GST-Anteil zu berücksichtigen, wurde der Pulldown zum einen in Abwesenheit der GST-Proteine und zum anderen in Anwesenheit des GST-Proteins durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5B. Als Beladungskontrolle diente die Gegenfärbung mit einem polyklonalen GST-Antikörper.

3.2.5 c-Src beeinflusst die subzelluläre Organisation der viralen Proteine

Zur Klärung der funktionellen Relevanz des c-Src/NS5B-Komplexes bei der Replikation von HCV wurde mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie überprüft, ob eine Inhibition von c-Src durch Herbimycin A Einfluss auf die zelluläre Lokalisation der Virus-Proteine besitzt. Die von Andreas Pfannkuche (Düsseldorf) durchgeführten Immunfluoreszenzen in Abbildung 3.19 demonstrieren beispielhaft, dass die Stimulation mit Herbimycin A bereits nach 12 h zu einer veränderten subzellulären Organisation der Virus-Proteine führt. Wie man sieht, kommt es im Fall von NS5A anstelle einer Lokalisation in cytoplasmatischen und periplasmatischen Regionen eher zu einer Akkumulation in vesikulären Strukturen im Cytoplasma. Bei NS5B dagegen lässt sich keine deutliche Veränderung der Lokalisation durch die konfokale Laserscanning-Mikroskopie ausmachen.

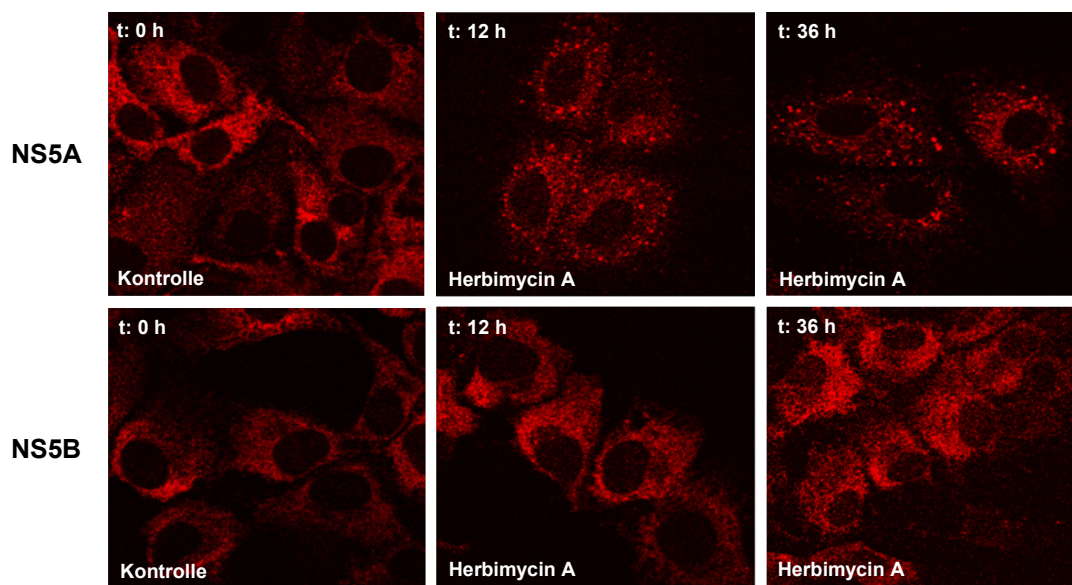


Abbildung 3.19: **Herbimycin A beeinflusst die subzelluläre Organisation der viralen Proteine**

Huh9-13-Zellen wurden mit 0,1 μ M Herbimycin A stimuliert und über die angegebenen Zeiträume kultiviert. Die Immunfluoreszenz erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen NS5A und NS5B. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy3-konjugierter Maus-Antikörper eingesetzt. Die zelluläre Lokalisation wurde mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Vergrößerung: d x 100.

Auch ein siRNA-*Knockdown* der c-Src-Proteinlevel führt zu einer Veränderung der zellulären Lokalisation der Virus-Proteine. Die in Abbildung 3.20 dargestellten Immunfluoreszenzen demonstrieren, dass es durch den Gen-*Knockdown* von c-Src bei NS5B anstelle einer Lokalisation in cytoplasmatischen und periplasmatischen Regionen eher zu einer Akkumulation in vesikulären Strukturen im Cytoplasma kommt.

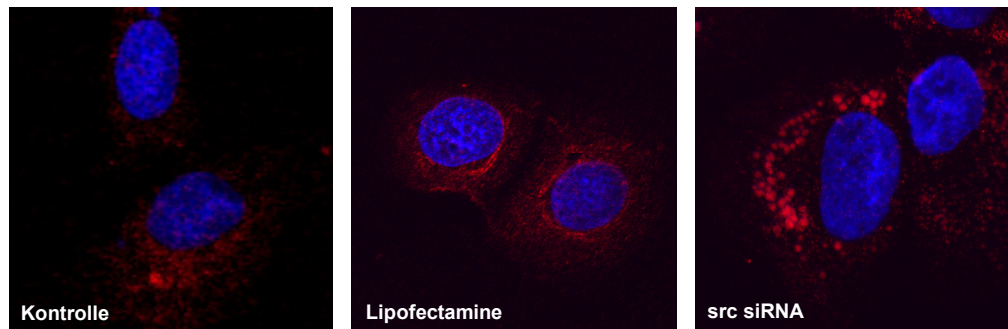


Abbildung 3.20: **siRNA-Knockdown des c-Src-Proteinlevels beeinflusst die subzelluläre Organisation von NS5B**

Huh9-13-Zellen wurden mit 20 nM von einem src-spezifischen siRNA-Pool transfiziert und für 48 h kultiviert. Die Immunfluoreszenz erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5B. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy3-konjugierter Maus-Antikörper eingesetzt. Um den Zellkern anzufärben, wurde Mounting Medium mit DAPI verwendet. Die zelluläre Lokalisation wurde mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Vergrößerung: d x 120.

3.3 Generierung NS5B-spezifischer humaner Antikörperfragmente

Aufgrund des Mangels an präventiven Impfstoffen oder einer effektiven antiviralen Therapie bleiben Infektionen mit dem Hepatitis C Virus eines der größten Gesundheitsprobleme weltweit. Intrazelluläre Antikörper, die virale oder zelluläre Proteine antagonisieren, repräsentieren in diesem Zusammenhang eine Klasse von neutralisierenden Molekülen, die im Rahmen gentherapeutischer Therapiestrategien ein großes Potential haben. In diesem Kontext konnten insbesondere Einzelkettenantikörperfragmente (scFv; *single-chain variable fragments*) bereits erfolgreich im Bereich der HIV-Forschung und der Onkologie eingesetzt werden ^{219, 220}. Ein rekombinantes scFv besteht aus der variablen Domäne der schweren Kette (V_H), die über einen Polypeptid-Linker mit der variablen Domäne der leichten Kette (V_L) verbunden ist und somit eine voll funktionelle, antigenbindende Einheit erzeugt (Abbildung 3.21).

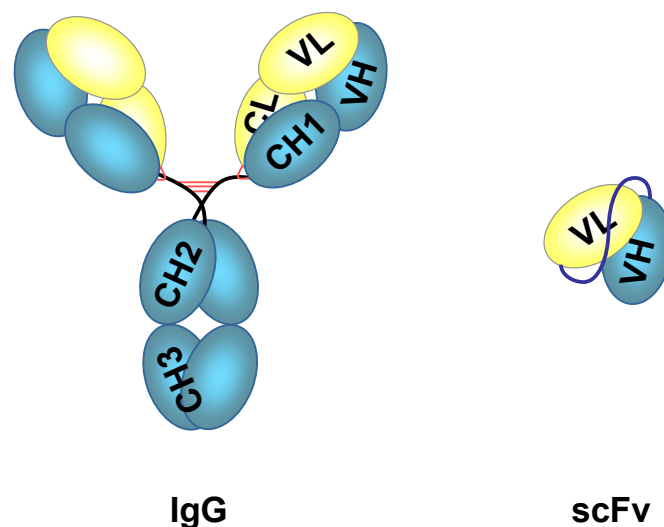


Abbildung 3.21: **Schematische Darstellung eines Einzelkettenantikörperfragments (scFv) im Vergleich zum Immunglobulin G (IgG)**

Jedes Oval repräsentiert eine Immunglobulin-Faltungsdomäne. Disulfidbrücken sind durch rote Linien dargestellt und der Polypeptid-Linker des scFv durch eine blaue Linie. VL = variable Domäne der leichten Kette; VH = variable Domäne der schweren Kette; CL = konstante Domäne der leichten Kette; CH = konstante Domäne der schweren Kette (verändert nach Peterson et al ²²¹).

Die Isolierung von hochaffinen scFv, die spezifisch für ein Target-Protein sind, ist durch die Phagen-Display-Technologie möglich, die die Expression von kombinatorischen Immunglobulin-Gen-Bibliotheken auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen erlaubt.

3.3.1 Affinitätsselektion

Die in dieser Arbeit verwendete humane scFv-Bibliothek, die sich von Knochenmarksaspirat von chronisch HCV-infizierten Patienten herleitet, wurde für drei Runden der Affinitätsselektion gegen 100 µg/ml der verschiedenen Peptid-Motive von NS5B verwendet, um scFv zu selektionieren, die spezifisch an diese binden.

In der ersten Runde der Affinitätsselektion wurden 10^{12} cfu/ml der rekombinanten Phagen eingesetzt. In den folgenden Runden konnten nur relativ geringe Phagentiter amplifiziert werden, so dass in der zweiten und dritten Selektionsrunde nur etwa 10^9 bis 10^{10} cfu/ml eingesetzt wurden. Nach Inkubation der Phagenbibliothek mit den immobilisierten Motiven im ELISA-Format wurden Phagen mit Affinität zu NS5B um ein Vielfaches angereichert. Erkennbar ist dies anhand der über die Selektionsrunden zunehmenden Anzahl an eluierten Phagen im Verhältnis zu den eingesetzten Phagen (Tabelle 3.1). Im Fall der Phagen gegen Motiv A kommt es nach der dritten Runde der Affinitätsselektion zu einer 174-fachen, gegen Motiv B zu einer 1652-fachen, gegen Motiv C zu einer 2133-fachen, gegen Motiv D zu einer 45-fachen und gegen Motiv F zu einer 1380-fachen Gesamt-Anreicherung der spezifischen Phagen.

Tabelle 3.1: Anzahl der in der Affinitätsselektion (Panning) eingesetzten Phagen und der anschließend eluierten Phagen (cfu/ml)

Die Anreicherung der ersten Runde der Affinitätsselektion wurde gleich 1 gesetzt.

Antigen	Panningrunde	Phagentiter vor Panning	Phagentiter nach Panning	Verhältnis Phagentiter nach/vor Panning	Anreicherung
Motiv A	1	1×10^{12}	$6,9 \times 10^3$	$6,9 \times 10^{-9}$	1
	2	2×10^{10}	$1,6 \times 10^3$	8×10^{-8}	11,6
	3	$1,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^{-6}$	15
Motiv B	1	1×10^{12}	$2,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^{-9}$	1
	2	$3,5 \times 10^9$	2×10^2	$5,7 \times 10^{-8}$	24,8
	3	$5,5 \times 10^9$	$2,1 \times 10^4$	$3,8 \times 10^{-6}$	66,6
Motiv C	1	1×10^{12}	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^{-9}$	1
	2	$2,6 \times 10^9$	$1,7 \times 10^3$	$6,5 \times 10^{-7}$	433
	3	$1,2 \times 10^9$	$3,8 \times 10^3$	$3,2 \times 10^{-6}$	4,9
Motiv D	1	1×10^{12}	$3,3 \times 10^3$	$3,3 \times 10^{-9}$	1
	2	6×10^9	2×10^2	$3,3 \times 10^{-8}$	10
	3	2×10^{10}	3×10^3	$1,5 \times 10^{-7}$	4,5
Motiv F	1	1×10^{12}	$2,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^{-9}$	1
	2	$2,9 \times 10^9$	8×10^3	$2,8 \times 10^{-6}$	1333
	3	1×10^{10}	$2,9 \times 10^4$	$2,9 \times 10^{-6}$	1

Nach der dritten Runde der Affinitätsselektion erfolgte die Isolation einzelner klonaler Phagen. Hierzu wurde stichprobenweise von jedem Motiv eine Vielzahl von Einzelkolonien gepickt. Um die scFv in löslicher Form zu exprimieren, wurden HB2151-Zellen mit den monoklonalen Phagen infiziert. Bei diesen *E. coli*-Zellen handelt es sich um einen sogenannten Nicht-Suppressor Stamm, bei dem die scFv nicht mehr als Fusionsprotein auf der Oberfläche der Phagen präsentiert werden, sondern in den periplasmatischen Raum der *E. coli* sekretiert werden²²².

Die periplasmatischen Extrakte der Zellen wurden verwendet, um lösliche scFv mit Affinität gegen die Motive von NS5B zu identifizieren. Die Spezifität der Antikörperfragmente wurde zunächst in einem indirekten ELISA gegen die Motive getestet. Abbildung 3.22 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines ELISA von scFv gegen Motiv A. Man erkennt, dass die OD₄₀₅ von einigen Klonen deutlich über dem Hintergrundsignal von 3% BSA liegen.

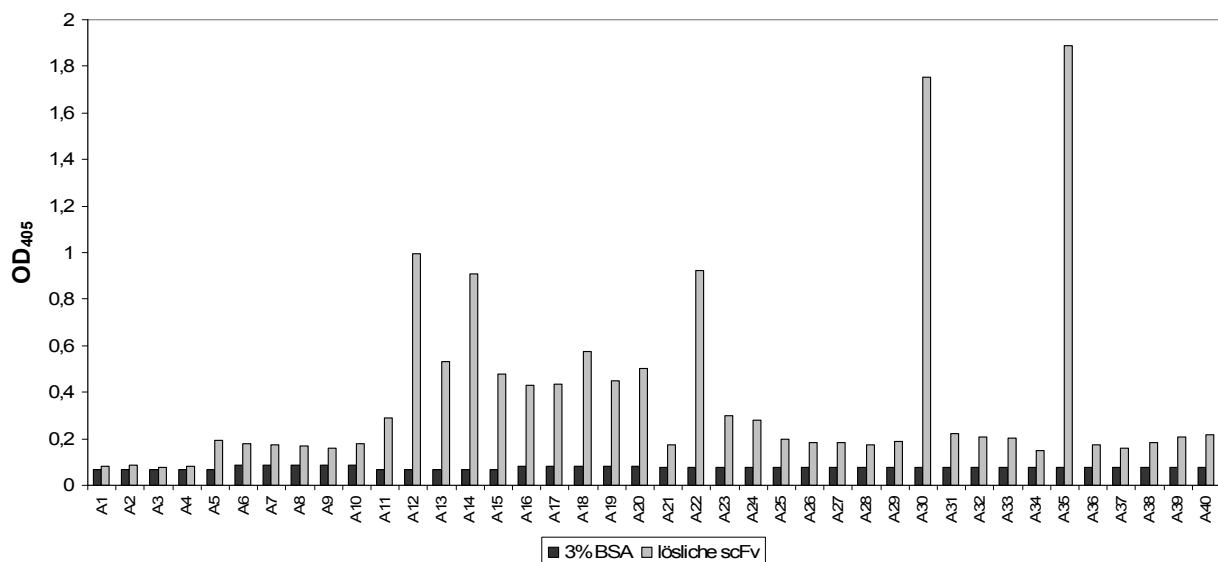


Abbildung 3.22: **Bindung von bakteriell exprimierten, monoklonalen scFv an Motiv A von NS5B**

Periplasmatische Extrakte der scFv gegen Motiv A wurden präpariert. Nach Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit Motiv A von NS5B und anschließender Blockierung erfolgte eine Inkubation mit 100 µl des periplasmatischen Extrakts. Anschließend wurde mit einem monoklonalen Flag-Antikörper und einem HRP-konjugierten Maus-Antikörper inkubiert. Die Detektion der Bindung erfolgte anhand einer ABTS-Anfärbung und Messung der optischen Dichte.

Um das Vorhandensein vollständiger Antikörperfragmente zu verifizieren, wurde ein SfiI-Verdau der ELISA-positiven Klone durchgeführt. Ein vollständiges scFv-Gen ergibt ein Fragment von 750 bp. Abbildung 3.23 zeigt beispielhaft einen SfiI-Verdau von einigen selektierten scFv gegen Motiv A. Wie man sieht, zeigen nicht alle analysierten Klone das spezifische scFv-Insert von etwa 750 bp. Nicht positive Klone wurden verworfen.

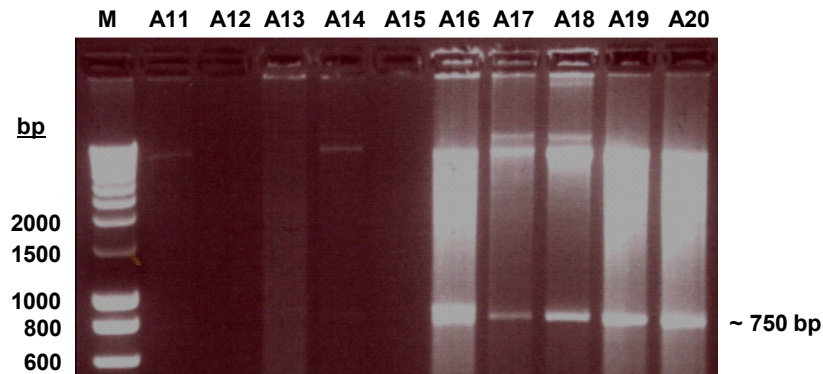


Abbildung 3.23: **Kontrolle von selektierten scFv-Klonen gegen Motiv A von NS5B auf Vollständigkeit der Antikörperfragmente**

pAK100-scFv Plasmide wurden für 3 h bei 50 °C mit SfiI verdaut. Proben wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert. M: DNA-Größenstandard.

3.3.2 Immunoblot-Analysen

Um die richtige Expression und Größe der scFv zu überprüfen, wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden periplasmatische Extrakte im PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Antikörperfragmente mit Hilfe eines Flag-Antikörpers detektiert. Abbildung 3.24 zeigt, dass in einigen Fällen die erwartete, spezifische Bande bei etwa 31 kDa deutlich nachgewiesen werden kann (scFv B30, B33, C7, C12, C19 und D2). Einige Antikörperfragmente dagegen zeigen nur eine sehr schwache oder auch kaum nachweisbare Expression im Periplasma.

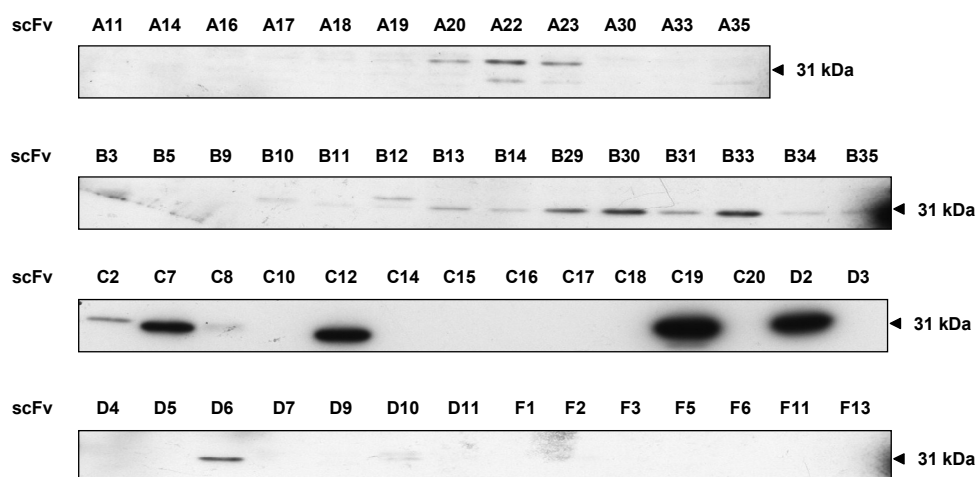


Abbildung 3.24: **Bakterielle Expression von löslichen monoklonalen scFv**

Um die Expression und Größe der bakteriell exprimierten Antikörperfragmente zu bestimmen, wurden 12 µl der periplasmatischen Extrakte per SDS/PAGE aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen Flag.

Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse der indirekten ELISA gegen die verschiedenen Antigene, des Sfil-Verdau und der Analyse auf die richtige Expression zusammen. Es wird deutlich, dass die Spezifität von den stichprobenweise selektierten scFv im ELISA nicht hoch ist. Von den ELISA-positiv getesteten scFv enthielten einige Klone kein vollständiges Antikörperfragment oder sie zeigten nur eine sehr schwache bis keine Expression in periplasmatischen Extrakten. So konnten letztlich nur einige wenige Klone für eine weitere Charakterisierung selektiert werden.

Tabelle 3.2: **Spezifität der Bindung der löslichen scFv an Motive von NS5B**

Antigen	Anzahl getesteter scFv	ELISA positive scFv	Sfil-Verdau positive scFv	korrekte Expression
Motiv A	60	23	15	7
Motiv B	69	41	29	27
Motiv C	54	22	22	16
Motiv D	49	24	19	9
Motiv F	30	15	7	1

3.3.3 Sequenzierung und Klassifizierung der variablen Domänen

Die kodierende Sequenz der Phagemid-DNA von ausgesuchten Klonen wurde bestimmt und die Aminosäuresequenz der variablen Domänen der Antikörperfragmente abgeleitet. Die Positionen der Framework-Regionen (FR) und Komplementaritäts-determinierenden Regionen (CDR) wurden entsprechend der Systematik nach Kabat ^{223, 224} festgelegt. Ein Vergleich der scFv-Sequenzen der variablen Domänen ausgesuchter Klone zeigt Abbildung 3.25. Zusätzlich zu den scFv, die gegen die Motive von NS5B selektiert wurden, sind auch scFv aufgeführt, die in einer Affinitätsselektion gegen Vollängen NS5B selektiert wurden (scFv 72, 78, 82; durchgeführt von Cliff Brackmann). Einige Klone gegen die jeweiligen Motive besaßen identische DNA-Sequenzen, demzufolge kodieren sie das gleiche Antikörperfragment (Daten nicht gezeigt). Dies deutet an, dass in der Affinitätsselektion Klone mit identischer Sequenz angereichert werden konnten.

Die Gruppierung der variablen Domänen und Identifikation der am nächsten verwandten V-, D- und J-Segmente wurde durch Alignment mit Hilfe des DNA-Plot (<http://www.dnaplot.de>) oder des Immunglobulin-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) durchgeführt. Die verschiedenen Charakteristika der Antikörperfragmente sind in Tabelle 3.3 dargestellt. V(D)J-Keimbahnsegmente mit der größten Ähnlichkeit zu der Sequenz der scFv sind angegeben. Wie man erkennt, besitzen einige Antikörperfragmente λ -leichte Ketten und

einige κ -leichte Ketten. In einigen Fällen war es nicht möglich, die Keimbahnsegmente zu bestimmen.

	--flag--	FR-L1	CDR-L1	FR-L2	CDR-L2	FR-L3
A35	MADYKDKQSVLTQ-PPSASGTPGQRTVITSC	SGSRSNIGMN---TVN	WYQHLPGTAPKLLIY	SNHQRFPS	GVPDRFSG--PKSGTSASLAISGLQSDDEADYYC	
B12	MADYKDEIVLTQSPSLSLPVTGPGEPAISIC	RSSQSLHLSNGDNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	LGSNRRAS	GVPDRFSG--SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYC	
B35	MADYKDDIVMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQDIRRD----MG	WYQKPGTAPKLLIY	GASSLQT	GVPSRFSG--SGSGTDFTLTITISLQPEDFATYYC	
C2	MADYKDDIVMTQSPGTLSPGERATLSC	RASHS-VNSN---SLA	WYQKPGRAPRLLIY	DASTRAT	GIPDRFSG--SGSGTDFTLTISRLEPEDFAIYYC	
C10	MADYKDEIVLTQSPSLSLPVTGPGEPAISIC	RSSQSLHLSNGDNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	LGSNRRAS	GVPDRFSG--SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYC	
D2	MADYKDETTLTQSPGQPEWESNLIPPP	LRFLAVAPS----LS	SLPIST-VPSCAVH	GLFRQNR	GVLS--EK--QKVLATQGLQCGGVFPKCLKRVYS	
F1	MADYKDNFMLTQ-PHSVSES PGKITITISC	TRSSGSGITSN---FVH	WYQCPGNSLTMTIY	DHHKRPS	GVPDRFSGSIDRSSNSASLTISGLKTEDEADYYC	
72	MADYKDKQSVLTQ-PPSVSAAPGQKVTI SC	SGSSSNIGNN---YVS	WYQQLPGTAPKLLIY	ENNKRPS	GIPDRFSG--SKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC	
78	MADYKDEIVLTQSPSLSLPVTGPGEPAISIC	RSSQSLHLSNGYNYLA	WYLQKPGQSPQLLIY	LGSNRRAS	GVPERFSG--SGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVIYC	
82	MADYKDSSELTQ-DPAVSVALGQTVRITC	---QG--DSLAYSAT	WYQQRSGQAPILVIY	DGNIRSS	GIADRFSG--SRSGDTASLTITGAQADDEADYYC	

	--CDR-L3--	--FR-L4--	--LINKER--	--FR-H1--	--CDR-H1--	--FR-H2--
A35	AAWDDSLNGYV	FGPGTKLTIVL	GGGGSGGWWFWRRSGSGGGGS	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	GGSSISSSGYWG	WIRQPPGKGLEWIG
B12	MQALQTPR--T	LGGQTKLEIKR	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	QVNLRESGGDLVQPGSRSLRLSRAAS	G--HTFGESAMH	WVRQAPGKGLEWVS
B35	LQHYNYPR--T	FGGQTKVDIKR	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	QVNLRESGGGLLQPGESPRVSCAAS	G--FSFPYYWMH	WVRQTPGKELLWVS
C2	QQYGSGLG-YT	FGQGTKLEIKR	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	QVNLRESGADVKKPGSSVKVSCKVS	G-APFSSYGLS-	WVRRTPGQGLEWMMG
C10	MQALQTPR--T	LGGQTKLEIKR	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	QVQLQES-----GTG-----	-----AGV	GAASGLGLGLKHL
D2	QVQWLMVP-TL	ALWGTGVDIKR	GGGGSGGGGSGGGGSGGGRS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	G--FTFSSYAMS	WVRHAPGKGLEWVS
F1	QSYDRGVM--V	LGGGTKVTIVL	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLKLSGAS	G--LTFSGSAVH	WVRQASGKGLEWVG
72	GTWDSLSAGV	FGGGTKVTIVL	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	G--FAFSNYAMN	WVRQAPGKGLEWVS
78	MEALRSPF--T	FGPGTKVDIKR	GGGGSGGGGS-----	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTFS	G-DSFNSYNWNW	WVRQSPGKGLEWIG
82	NSRDTADNRVL	FGGGTQLTIVL	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	QVNLRESGAGLLKPSETLSLTCAVS	GGSF--SGYYWT	WIRQPPGKGLEWIG

	--CDR-H2--	FR-H3	CDR-H3	FR-H4--
A35	SIYSSGST---YNNSSLKS	RVTISVDTSKNQFTLRSLSSVTAADTAVYYCAR	R---NGVTRHFGNY--FDS	WGQGTTLTVSS
B12	GISYSGIT---DHADSVKG	RFTISRDNANNPLYLHMSSSLRAEDTALYFCAR	DRGRFGST-SLGDGM---DV	WGQGTTLTVSS
B35	RISPDGKT---TNYADSVKG	RFTISRDNANNLTFLRMNSLRADDTAVYYCAR	-----VRGSRN----DL	WGQGTTLTVSS
C2	ATIPFNT---TNYARQFEG	RVTITADTSTSTAYTDPSGLISDDTAVYYCTR	G---AYDLSSGYHHPAFDF	WGQGTTLTVSS
C10	PALHARL---LLDVLPP	-VTHVS---QVPLLRWRGQERAAHPLMHAPW	STPPSASVYPLHWAV---EC	PLHGTTLTVSS
D2	AISGSGGS---TNYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	DGSAYYDFWSGYRYG---MDV	WGQGTTLTVSS
F1	RITSKAQSYATAYGESVKG	RFTISRDDSKNTACLQMNLSKTEDTAVYYCAL	P---YCSSTSC-YA--LDV	WGQGTTLTVSS
72	TIRGSGRS---TFYADSVKG	RFTISRDNPRYTIVYLQNLGRGEDTAVYFCAR	R---REEKDYNYGWH-FDL	WGRGTTLTVSS
78	EVFESGT---THYNPSLKG	RVTISLDESKNRFSLIVTSLTAADSAVYFCAR	A---PQPTYYYG---LDV	WGQGTTLTVSS
82	EINDSGN---TIYNPSLKS	RVTISLDGSRNHFSKLKLTVAADTAIYFCAR	GRRIPQILRKAQVSG--FDY	WGQGTTLTVSS

Abbildung 3.25: Aminosäuresequenzen der variablen Domänen selektierter scFv gegen Motive von NS5B und NS5B

Von monoklonalen scFv wurde die kodierende DNA isoliert. Es erfolgte eine automatische Sequenzierung der variablen Domänen mit spezifischen Primern. Anschließend wurde die entsprechende Aminosäuresequenz abgeleitet, die hier aufgeführt ist. Die CDR der einzelnen Antikörper sind gelb hervorgehoben, der Linker grau. Disulfidbrücken bildende Cystein-Reste sind fett dargestellt. Flag = Flag-tag, FR = Framework-Region, CDR = Komplementaritäts-determinierende Region, L = leichte Kette, H = schwere Kette.

Tabelle 3.3: Klassifizierung und entwicklungsgeschichtlicher Ursprung der variablen Domänen der klonierten Antikörperfragmente nach Kabat

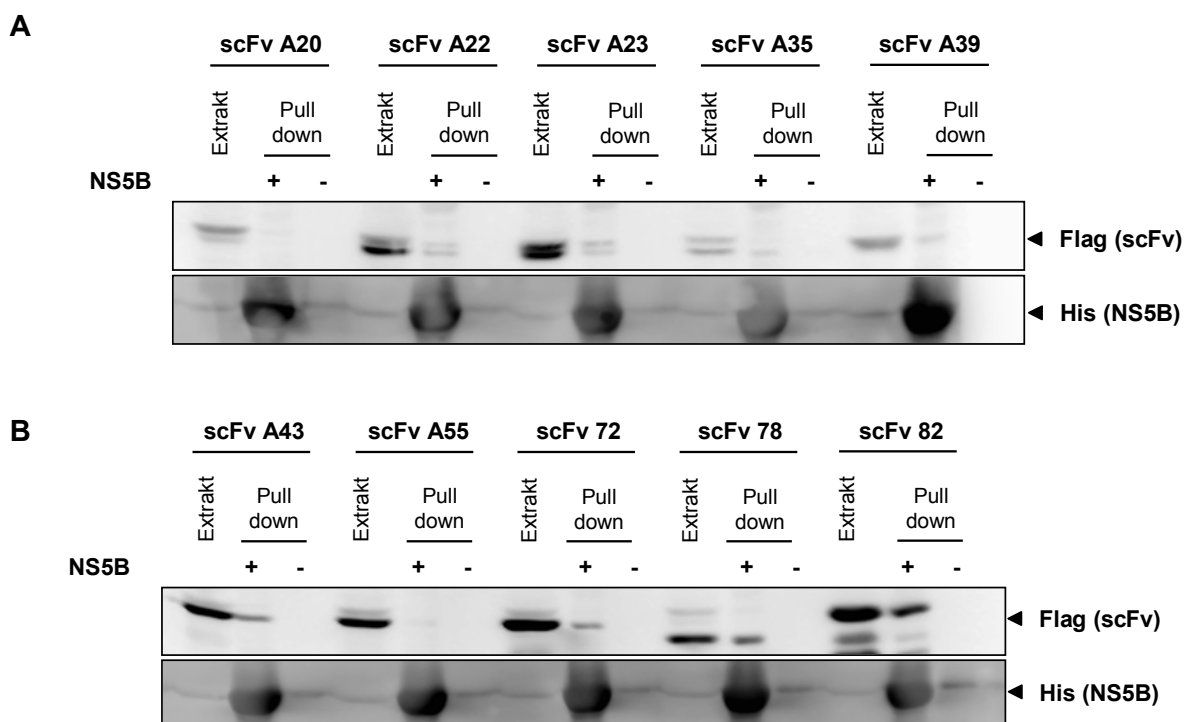
n.k. = nicht klassifizierbar

	Leichte Kette				Schwere Kette			
scFv	Klasse	Familie	V-Segment	J-Segment	Familie	V-Segment	D-Segment	J-Segment
A35	λ	VL1	V1-16	JL1	VH4	VH4-39	D7-27/D1-26	JH4b
B12	κ	VKII	A19	JK1	VH3	VH3-9	D3-16	JH5a
B35	κ	VKI	L11	JKI	VH3	VH3-74	n.k.	JH5b
C2	κ	VKIII	A27	JK2	VH1	VH1-69	D3-3	JH3a
C10	κ	VKII	A19	JK1	VH4	VH4	n.k.	JH6
D2	κ	n.k.	n.k.	n.k.	VH3	VH3-23	D3-3	JH6b
F1	λ	VL6	V1-22	JL2/JL3a/b	VH3	VH3-73	D4/4-b	JH6b
72	λ	VL1	V1-19	JL2/JL3a	VH3	VH3-23	D5-12	JH2
78	κ	VKII	A3/A19	JK3	VH4	VH4-28	D4-23	JH6b
82	λ	VL1	V3-19	JL2/3a	VH4	VH4-34	D1-14	JH4b

3.3.4 Expression von rekombinantem NS5B und His-Pulldown-Experimente

Die NS5B RNA-abhängige RNA-Polymerase wurde in einen Baculovirus-Expressionsvektor kloniert (pBac C 5B Rev 1-3; zur Verfügung gestellt von Prof. Bartenschlager, Heidelberg) und als aminoterminal His₆-getaggttes Fusionsprotein in Insektenzellen exprimiert. Die Infektion von *Sf21*-Zellen mit dem rekombinanten Baculovirus resultierte in der Synthese eines Polypeptids mit der erwarteten Größe von etwa 69 kDa, welches über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Um zu analysieren, ob die selektionierten Antikörperfragmente mit dem Vollängen NS5B interagieren, wurden His-Pulldown-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde das rekombinante His-getaggte NS5B an Ni-NTA-Agarose gekoppelt. Durch Inkubation mit den periplasmatischen Extrakten der verschiedenen scFv sollten diese ko-präzipitiert werden. Abbildungen 3.26 A - D zeigen die Ergebnisse der His-Pulldown-Experimente mit ausgesuchten Antikörperfragmenten selektioniert gegen Motiv A (**A**) (**B**), Motiv C (**C**) (**D**) und Vollängen NS5B (**B**). Wie man sehen kann, sind Interaktionen der scFv mit NS5B darstellbar, wie beispielsweise im Fall der scFv gegen Vollängen NS5B (scFv 72, 78 und 82). Auch Antikörperfragmente, die gegen Motive von NS5B selektioniert wurden, scheinen mit NS5B zu präzipitieren, wie z. B. scFv A22, A43, C2 und C19. Andere scFv zeigen nur eine schwache Interaktion mit NS5B (scFv A20, A55) oder gar eine unspezifische Bindung an die Ni-NTA-Agarose wie scFv C12, C22 oder auch C23.



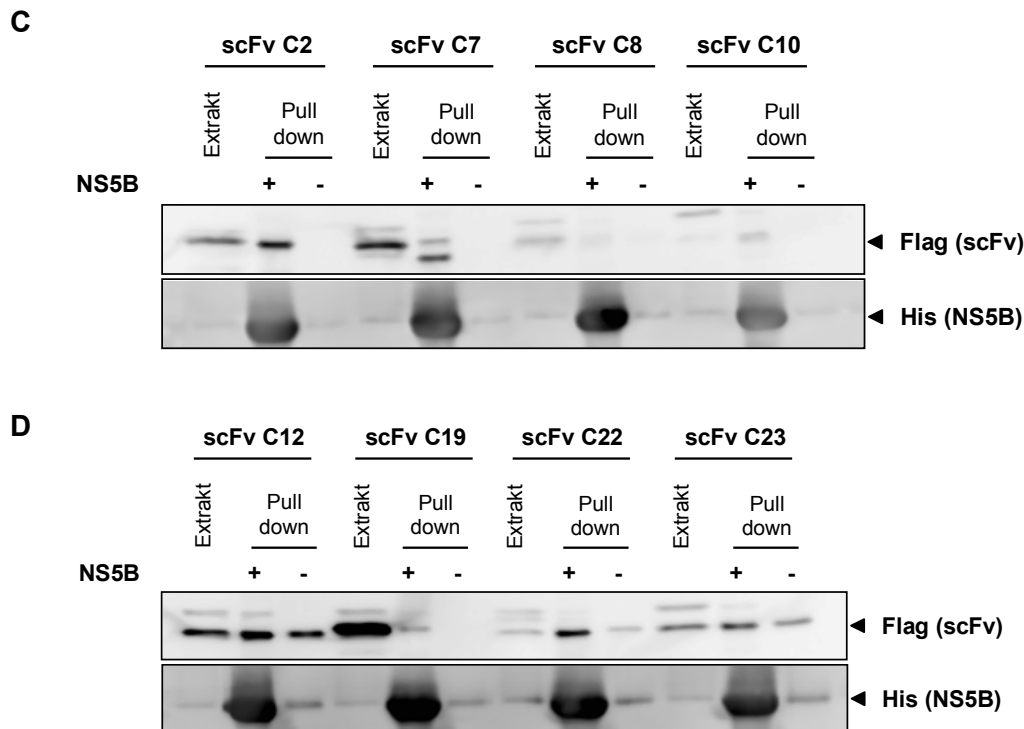


Abbildung 3.26: **His-Pulldown-Experimente**

Für die His-Pulldown-Experimente wurde His-getaggt NS5B mit periplasmatischen Extrakten selektionierter scFv gegen Motiv A (**A**) (**B**), Vollängen NS5B (**B**) und Motiv C (**C**) (**D**) inkubiert. Um die unspezifische Bindung von scFv an die Ni-NTA-Agarose zu berücksichtigen, wurde der Pulldown zusätzlich in Abwesenheit von NS5B durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen Flag. Als Beladungskontrolle diente die Gegenfärbung mit einem monoklonalen His-Antikörper.

3.3.5 Polymerase-Aktivitäts-Assay

Um die enzymatische Aktivität der rekombinanten Polymerase zu bestimmen, wurde ein Polymerase-Aktivitäts-Assay im ELISA-Format entwickelt. Der in der Polymerase-Reaktion durch NS5B neu synthetisierte RNA-Strang kann mit einem Digoxigenin-Antikörper und einer nachfolgenden Farbreaktion detektiert werden.

Zunächst wurde die rekombinante Baculovirus-exprimierte Polymerase auf ihre Fähigkeit untersucht, einen RNA-Doppelstrang zu synthetisieren. Das Ergebnis in Abbildung 3.27 A zeigt, dass die rekombinante Polymerase aktiv ist und dass die Menge an synthetisiertem RNA-Doppelstrang mit steigender Polymerase-Konzentration in einer nahezu dosisabhängigen Weise zunimmt. Eine Sättigung, die einer 100%igen Synthese entspricht, wird bei etwa 4 µg/µl Enzym erreicht.

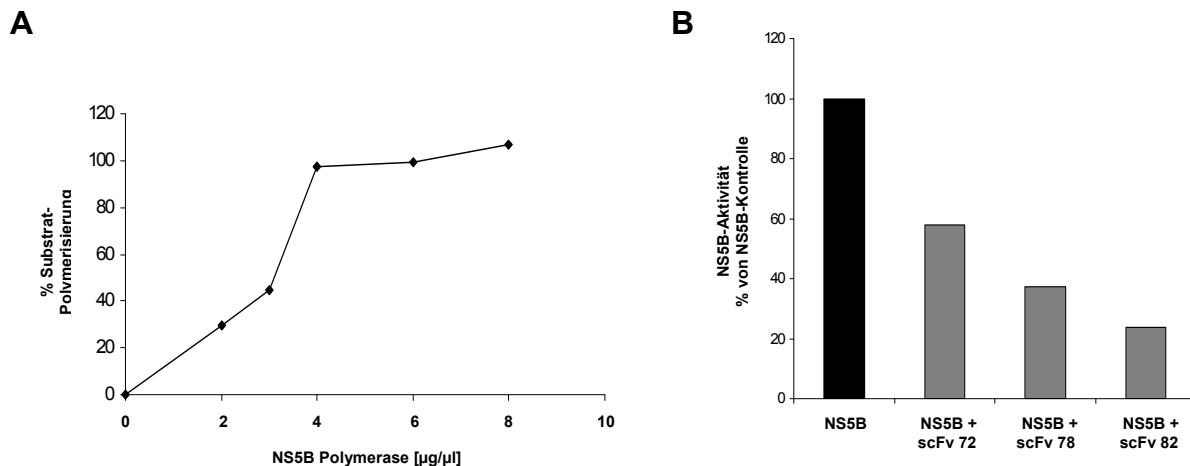


Abbildung 3.27: **Polymerase-Aktivitäts-Assay**

(A) Effekt der Enzym-Konzentration auf die Substratpolymerisierung. Die Polymerase-Reaktionen wurden mit verschiedenen Mengen der rekombinanten Baculovirus-exprimierten NS5B Polymerase durchgeführt. (B) *Screening* von anti-NS5B scFv auf inhibitorische Aktivität. Aufgereinigte Antikörperfragmente wurden mit NS5B in Reaktionspuffer vorinkubiert. Die Polymerase-Reaktion wurde durchgeführt und die Doppelstrang-Neusynthese bestimmt. Die Polymeraseaktivität des Enzyms ohne vorinkubierte Antikörper wurde als 100% bezeichnet.

Um ein inhibitorisches Potential von ausgewählten scFv im Polymerase-Aktivitäts-Assay zu bestimmen, wurden Antikörperfragmente und NS5B eingesetzt, die über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt wurden. Die scFv wurden in gleichem molaren Verhältnis mit dem Enzym in Reaktionspuffer vorinkubiert, die Polymerase-Reaktion durchgeführt und die Doppelstrang-Neusynthese wurde bestimmt. Eingesetzt wurden die drei Antikörperfragmente, die gegen das Volllänge NS5B-Protein selektiert wurden. Alle getesteten Antikörper inhibierten die Polymeraseaktivität von NS5B mit Effizienzen zwischen 40% bis nahezu 80% im Fall von scFv 82 (Abbildung 3.27 B).

3.3.6 Generierung und Testung von YFP- und CFP-Fusionsproteinen

Die Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist ein modernes Werkzeug zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Für zukünftige FRET-Analysen wird es wichtig sein, die zelluläre Lokalisation der scFv und von NS5B untersuchen zu können. Aus diesem Grunde wurden scFv-YFP- (scFv 72, 78, 82) sowie NS5B-CFP-Fusionsproteine kloniert.

Nicht dargestellt ist die nach der Klonierung durchgeführte biochemische und funktionelle Charakterisierung der Fusionskonstrukte; die Funktionskontrolle erfolgte auf Proteinebene. Abbildung 3.28 demonstriert beispielhaft – mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie – die Funktionsfähigkeit der Fusionsproteine *in situ*.

Die scFv-YFP-Fusionsproteine sind alle in cytoplasmatischen Regionen lokalisiert (Abbildung 3.28 A-C). Das NS5B-CFP-Fusionsprotein (Abbildung 3.28 D) wird wie das endogene NS5B in Huh9-13-Zellen (Abbildung 3.28 E) in cytoplasmatischen und perinukleären Regionen exprimiert.

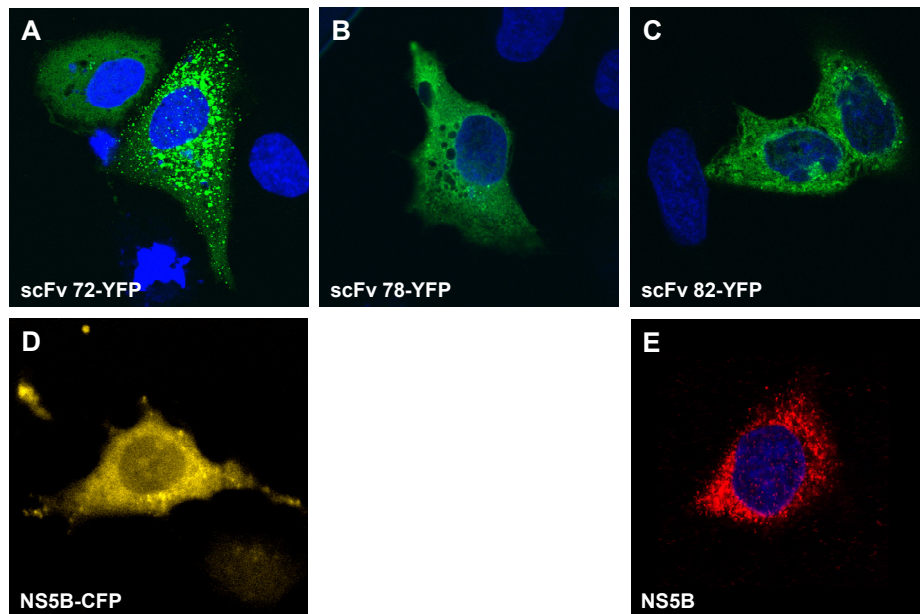


Abbildung 3.28: Zelluläre Lokalisation der scFv-YFP- und NS5B-CFP-Fusionskonstrukte

Huh7-Zellen wurden mit 5 μ g scFv 72-YFP (A), scFv 78-YFP (B), scFv 82-YFP (C) und NS5B-CFP (D) transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert. (E) Zur Kontrolle wurde in Huh9-13-Zellen NS5B mit einem monoklonalen Antikörper angefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy3-konjugierter Maus-Antikörper eingesetzt. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde Mounting Medium mit DAPI verwendet. Die zelluläre Lokalisation der Fusionskonstrukte und NS5B wurde mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Vergrößerung: d x 100

4. DISKUSSION

4.1 Anisoosmolarität beeinflusst die HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von anisoosmolarem Stress auf die HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell untersucht.

In den 1990er Jahren konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Leberzellen mit Hormonen wie beispielsweise Insulin oder die vermehrte Aufnahme von Aminosäuren zu Änderungen der zellulären Hydratation und damit des zellulären Volumens führen und hierdurch eine Modifikation des zellulären Metabolismus und der Genexpression hervorrufen^{124, 129, 137}. Zentrale Effekte von Hormonen wie Insulin konnten durch Inkubation von Leberzellen in hypoosmolarem Medium und die hierdurch bedingte Änderung des Zellvolumens simuliert werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen des *Osmosensings* und durch diese aktivierte Osmosignalübertragungsprozesse konnten in der Folge am Modellsystem anisoosmotisch exponierter Zellen und Gewebe charakterisiert werden. Diese Experimente konnten eindeutig belegen, dass ein Zusammenhang zwischen Änderungen des Zellvolumens und der Regulation von Protein- und Kohlenhydratmetabolismus besteht und dass Stimuli wie Insulin diese Prozesse über Änderungen des Zellvolumens regulieren^{133, 135, 225, 226}. Dementsprechend führen Substanzen, die wie z.B. bestimmte Diuretika die Insulin-bedingte Zunahme des Zellvolumens unterbinden, zu einer relativen Insulinresistenz der Leberzelle. Verallgemeinernd lässt sich feststellen, dass eine Hydratationszunahme (Zellschwellung) anabole Stoffwechselprozesse und die Proliferation fördert, wohingegen eine Hydratationsabnahme (Zellschrumpfung) zur Katabolie führt, Insulinresistenz vermittelt, sowie die Zellen für apoptotische Signale sensitiviert^{135, 227}.

Der Einfluss der Zellhydratation auf die virale Replikation wurde bereits in den 1960er und 70er Jahren unter anderem an RNA-Viren wie dem Polio-^{149, 150}, dem Sindbis-^{153, 154} und dem Influenza Virus¹⁵⁵ untersucht. In den bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die virale Replikation durch Anisoosmolarität beeinflusst wird. So führt eine hypoosmotische Zellschwellung zu einer verminderten Replikation, wohingegen eine hyperosmotische Zellschrumpfung die Replikation steigert^{149, 150, 152, 153, 158}. In Studien zur Replikation des HIV wurde auch gezeigt, dass die virale Replikation durch Erhöhung der Osmolarität ansteigt¹⁵⁷. Auch der hepatozelluläre Hydratationszustand beeinflusst die virale Replikation. Dies konnte am Entenhepatitis-Modell zur Infektion mit HBV belegt werden¹⁵². Inwieweit Hydratationsänderungen einen Effekt auf eine HCV-Infektion besitzen, ist bisher noch nicht erörtert worden. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss

von Anisoosmolarität auf die HCV-Replikation in Huh9-13-Zellen untersucht, die das subgenomische HCV-Replikon I₃₇₇/NS3-3' enthalten.

Die durchgeführten Studien demonstrieren, dass die virale Replikation des HCV-Replikons in den Hepatomazellen durch Änderungen der umgebenden Osmolarität nachhaltig reguliert wird. Bereits nach einer Inkubationsdauer von 24 h kommt es unter hypoosmotischen Bedingungen zu einer Verringerung der RNA-Level, deren Ausmaß sich bei Verlängerung der Inkubationsdauer auf bis zu 72 h noch deutlich ausgeprägter darstellt (>90% Reduktion). Dieser inhibitorische Effekt der Zellschwellung konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene (Abbildung 3.1 und 3.2) nachgewiesen werden. Eine durch Hyperosmolarität induzierte Zellschrumpfung dagegen zeigte keinen eindeutigen Effekt auf die HCV-Replikation. Im Gegensatz zu anderen Zellvolumen-sensitiven Stoffwechselprozessen, die innerhalb weniger Minuten bis zu einigen Stunden beeinflusst werden ¹²⁹, erfolgt die Abnahme der viralen Replikation nach Zellschwellung mit einer Zeitverzögerung von etwa 24 h. Dies könnte auf die Beteiligung von komplexen Langzeit-adaptiven Mechanismen für die Triggerung der viralen Replikation in Reaktion auf Zellvolumenänderungen hinweisen.

Für die Expression zellulärer Proteine in der Leber konnte bereits gezeigt werden, dass sie sensitiv auf geringe Osmolaritätsänderungen reagieren ²²⁸. Auch im Fall des subgenomischen Replikons zeigt sich sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine fein abgestufte Sensitivität gegenüber osmotischen Modifikationen (Abbildung 3.3).

Um die Frage zu klären, ob der Effekt der Anisoosmolarität auf die virale Replikation auf Modifikationen des zellulären Volumens beruht oder auf Änderungen der Ionenstärke (ausgelöst durch Erhöhung der Natriumchlorid-Konzentration), wurde NaCl gegen den nicht-zellpermeablen Osmolyt Raffinose ausgetauscht. Durch Zugabe von Raffinose zum hypoosmolaren Medium kommt es zu einer Steigerung der viralen Replikation ähnlich wie bei Zugabe von NaCl (Abbildung 3.4). Eine weitere Erhöhung der Osmolarität durch Raffinose über normoosmolare Bedingungen hinaus führt auch hier zu keiner deutlichen Änderung der viralen Replikation. Dies zeigt, dass der Effekt der Anisoosmolarität nicht durch eine Änderung der Ionenstärke erzielt wird. Es ist also davon auszugehen, dass die Änderung des Zellvolumens für den Effekt auf die virale Replikation verantwortlich ist, was möglicherweise auf eine Signalübertragung durch Integrine hinweist.

Wie einleitend beschrieben, dienen Integrine als Sensoren der Zellvolumenänderung und übersetzen die mechanische Information der Zellschwellung in ein chemisches Signal, um verschiedene Signalkaskaden zu aktivieren (Abbildung 4.1).

Um aufzuklären, welche komplexen Signalstrukturen an der hypoosmotisch-induzierten Reduktion der viralen Replikation beteiligt sind, kamen in dieser Arbeit Inhibitoren zum Einsatz, die mehr oder weniger spezifisch einzelne Komponenten bekannter Signalwege ausschalten können. Die Auswirkungen der Inhibitoren auf die Hemmung der viralen

Replikation durch Hypoosmolarität wurden sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene untersucht.

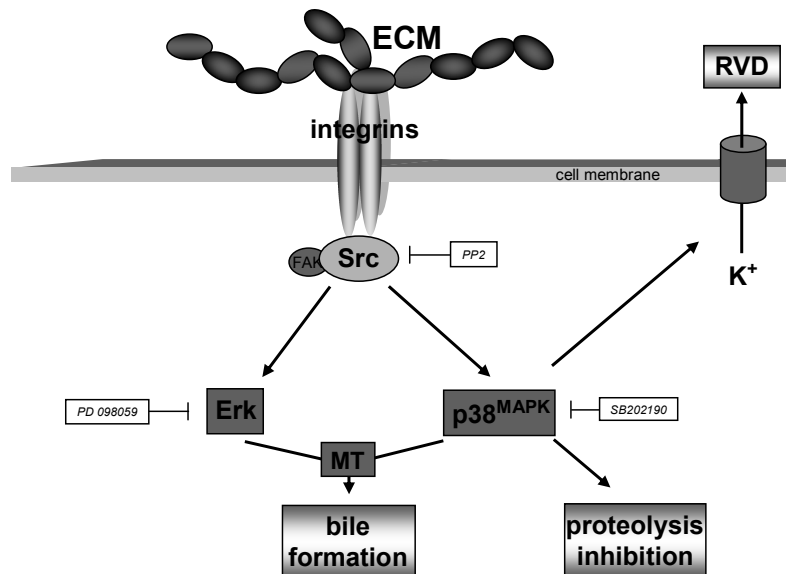


Abbildung 4.1: **Zellvolumen-Sensing und -Signaling in der Leber**

Eine Hepatozytenschwellung wird durch das Integrin/Src-System registriert und führt zur Aktivierung der Erk- und p38 MAP-Kinasen (verändert nach Häussinger et al. ¹³⁰). ECM = Extrazelluläre Matrix, MT = Mikrotubuli, RVD = Regulatorische Volumenabnahme.

Nach gegenwärtigen Modellvorstellungen wird die Volumenänderung des Hepatozyten durch das Integrin/Src-System registriert und aktiviert Erk- und p38 MAP-Kinasen (Abbildung 4.1). Weder für Inhibitoren der Src-Kinase (PP2, SU6656, Herbimycin A) noch für Substanzen, die die Aktivität der Erk-Kinase (PD98059) und der p38 MAP-Kinase (SB202190) hemmen, konnte ein signifikanter Einfluss auf die inhibitorische Wirkung von Hypoosmolarität nachgewiesen werden (Abbildung 3.5 und 3.6), so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Hemmung der Replikation nicht durch Aktivierung dieser Kinasen vermittelt wird. Auch ein Inhibitor gegen die c-Jun N-terminale Kinase (L-JNKI) vermochte diesen Effekt der Hypoosmolarität nicht zu unterbinden. Ebenso scheinen weitere Tyrosinkinasen nicht beteiligt zu sein, da der Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein ohne Effekt auf die Hemmung der Replikation durch hypoosmolare Inkubationsbedingungen war. Des Weiteren ergab sich auch kein Anhalt für die Beteiligung von Serin/Threonin-Phosphatasen in der Vermittlung der Effekte von Hypoosmolarität auf die virale Replikation. So war Okadainsäure nicht in der Lage, die Abnahme der Expression der viralen Proteine zu verhindern. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere Tyrosinkinasen und Phosphatasen beteiligt sind, die gegenüber den bislang eingesetzten Inhibitoren insensitive sind.

In Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, dass osmotischer und oxidativer Stress miteinander assoziiert sind ¹⁴². Eine zentrale Bedeutung von oxidativem Stress für die hier

beschriebenen Effekte ist jedoch unwahrscheinlich, da N-Acetylcystein mit seiner antioxidativen Wirkung keinen Einfluss auf die hypoosmotisch verminderte virale Replikation besitzt.

Die im ersten Teil der Arbeit vorgestellten Daten belegen, dass die virale Replikation des subgenomischen Replikons durch hypoosmolare Exposition deutlich supprimiert wird und bereits geringe Osmolaritätsabnahmen dafür ausreichend sind. Die bisherigen Befunde weisen darauf hin, dass Änderungen des Zellvolumens für diesen Effekt verantwortlich sind und bisher unbekannte Signalwege an der Regulation der viralen Replikation unter Hypoosmolarität beteiligt sind. Die Identifikation dieser und deren Komponenten wird das Ziel von weiteren Studien sein.

4.2 c-Src beeinflusst die HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell

Wie beschrieben, gibt es eine Vielzahl von Wirtszell-Faktoren, die die Replikation des HCV-Genoms oder -Replikons durch Interaktion mit der viralen RNA oder den viralen Proteinen regulieren²²⁹⁻²³¹. Besonders für die HCV-Proteine NS5A und NS5B konnten Interaktionen mit den unterschiedlichsten Proteinen identifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Relevanz der zellulären Kinase c-Src für die Replikation des Hepatitis C Virus untersucht. Src-Kinasen sind bereits als verbreitetes Target für eine virale Interferenz mit zellulären Signalwegen bekannt^{188, 194}. Zunächst wurde der Effekt des c-Src-Inhibitors Herbimycin A auf die HCV-Replikation in den Huh9-13-Zellen, die das subgenomische Replikon enthalten, untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Herbimycin A die virale Replikation nachhaltig unterdrückt. Selbst bei geringen Konzentrationen von 10 nM lässt sich noch ein signifikanter inhibitorischer Effekt auf die virale Replikation belegen (Abbildung 3.7). Der hemmende Einfluss von Herbimycin A auf die Replikation von HCV ist auf RNA-Ebene bereits nach 12 h zu beobachten, auf Proteinebene aber erst nach 24 h (Abbildung 3.8).

Neben seiner Eigenschaft als Inhibitor von c-Src wird Herbimycin A auch als Inhibitor von Hsp90 beschrieben²³². In diesem Zusammenhang konnte bereits 2007 von Nakagawa et al.²³³ ein supprimierender Effekt von Herbimycin A auf die HCV-Replikation nachgewiesen werden. Hiermit übereinstimmend ließ sich die virale Replikation auch durch einen siRNA-vermittelten *Knockdown* von Hsp90 unterdrücken. Hsp90 und c-Src stehen aber auch direkt in einem Verhältnis zueinander, so ist beschrieben, dass sie in kurzlebigen Komplexen interagieren^{234, 235}.

Um eine mögliche Beteiligung von c-Src an der Replikation des HCV-Replikons zu untermauern, wurden weitere bekannte Inhibitoren von Mitgliedern der Src-Kinase-Familie untersucht, und sowohl SU6656 als auch PP2 weisen einen zwar deutlich geringeren, jedoch ebenfalls vorhandenen suppressiven Effekt auf die virale Replikation auf (Abbildung 3.9). Die Tatsache, dass die inhibitorische Potenz letzterer Inhibitoren nicht mit derjenigen von Herbimycin A vergleichbar ist, lässt sich hierbei am ehesten darauf zurückführen, dass im Gegensatz zu Herbimycin A, einem relativ potenten und selektiven Inhibitor von c-Src ²¹², sowohl SU6656 als auch PP2 präferentiell andere Mitglieder der Src-Kinase-Familie hemmen ^{210, 211} und erst ab sehr viel höheren Konzentrationen auch c-Src hemmen. Diese Ergebnisse deuten an, dass c-Src für eine effiziente Replikation des HCV-Replikons eine entscheidende Rolle spielt. Dies wird weiter bestätigt durch Expression einer konstitutiv aktiven viralen Src (v-Src) in Huh9-13-Zellen, was zu einer Erhöhung der Proteinexpression von NS5A führt (Abbildung 3.10).

Um zu untersuchen, ob die Suppression der HCV-Replikation durch c-Src-Inhibitoren aus einer funktionellen Hemmung von c-Src resultiert, wurde zusätzlich zu der pharmakologischen Inhibition die c-Src-Proteinexpression durch siRNA herunterreguliert. In Übereinstimmung mit den Inhibitor-Experimenten kommt es auch durch den *Knockdown* von c-Src mit den verschiedenen eingesetzten siRNAs zu einer deutlichen Hemmung der Replikation (Abbildung 3.11 und 3.12). Mit Hilfe der Laserscanning-Mikroskopie konnte zudem gezeigt werden, dass der c-Src-*Knockdown* zu einer Veränderung der Lokalisation von NS5B führt (Abbildung 3.20).

Die bisherigen Befunde deuten darauf hin, dass c-Src möglicherweise direkt oder indirekt mit einem der viralen Proteine NS3 bis NS5B interagiert, um die Replikation des HCV-Replikons zu regulieren. In einigen Studien wurde bereits beschrieben, dass NS5A mit c-Src interagiert ^{111, 195, 196}. In den hier vorgestellten Ergebnissen war es nicht möglich NS3 über einen c-Src-spezifischen Antikörper zu kopräzipitieren (Abbildung 3.13), im Gegensatz dazu konnte aber gezeigt werden, dass NS5B und c-Src interagieren. Soweit Untersuchungen mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper eine solche Schlussfolgerung zulassen, legen die hier vorgelegten Befunde nahe, dass NS5B nicht von c-Src tyrosinphosphoryliert wird (Abbildung 3.14). Durch einen Abgleich mit einem Programm zur Vorhersage von möglichen Phosphorylierungsstellen (NetPhos 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> ²³⁶) konnte nachgewiesen werden, dass beispielsweise die sogenannte Finger-Domäne von NS5B mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen besitzt, einschließlich Tyrosinresten an der Position 64 und 103 ²³⁷. Diese putativen Phosphorylierungsstellen befinden sich alle auf der Oberfläche dieser Domäne, so dass sie für eine Phosphorylierung durch c-Src zugänglich wären. Insgesamt besitzt NS5B 7 Tyrosinreste, die potentiell phosphoryliert werden können.

Die Aktivität von c-Src scheint für die Interaktion mit NS5B nicht von Bedeutung zu sein, da eine Hemmung der c-Src-Aktivität durch Behandlung der Zellen mit Herbimycin A keinen messbaren Einfluss auf die Ausbildung des c-Src/NS5B-Komplexes hatte (Abbildung 3.14). Der supprimierende Effekt von Herbimycin A auf die virale Replikation basiert daher eher nicht auf einer Beeinträchtigung der Interaktion der beiden Proteine, sondern muss in der Hemmung der Aktivität von c-Src begründet sein.

Die Analyse der Lokalisation der viralen Proteine unter Herbimycin A-Stimulation (Abbildung 3.19) zeigte, dass es bei NS5B zu keiner Lokalisationsänderung kommt, bei NS5A im Gegensatz dazu aber schon. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Herbimycin A möglicherweise die Bildung der Replikationskomplexe mit den viralen Proteinen und der viralen RNA unterbindet. Da NS5B direkt mit NS3/4A²³⁸, NS5A²³⁹ und durch NS5A indirekt mit NS4B²⁴⁰ interagiert, ist NS5B nicht nur das zentrale Enzym der viralen Replikation, sondern möglicherweise auch das Hauptprotein für die Assemblierung der Replikationskomplexe²⁴¹. Ergebnisse mit dem HCV-Replikon-System legen nahe, dass NS5A und NS5B in die Regulation der HCV-Replikation involviert sind^{72, 101, 242, 243}. Es wird angenommen, dass die Polymerase-Aktivität von NS5B auf der Basis von Protein-Protein-Interaktionen, homomerer Oligomerisierung und heteromerer Interaktion zwischen NS5B und NS5A reguliert wird^{239, 241, 244}. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Polymerase-Aktivität von NS5B auch durch die Interaktion mit c-Src beeinflusst wird. Durch die pharmakologische Inhibition von c-Src interagieren NS5A und NS5B möglicherweise nicht mehr, was zu einer Änderung der Lokalisation von NS5A führt, aber nicht zu einer Lokalisationsänderung von NS5B, so dass es zu einer Dissoziation des viralen Replikationskomplexes kommt. Bereits in einer anderen Veröffentlichung wurde angenommen, dass virale Proteine wie NS5A und NS3, die multiple Funktionen in der viralen Replikation und Pathogenese ausüben, nur zu den Replikationskomplexen in dem sogenannten membranösen Netz rekrutiert werden, wenn sie an der RNA-Replikation beteiligt sind. So war in der Tat der Anteil der nicht-strukturellen Proteine, die mit dem membranösen Netz assoziiert sind, höher in den Zellen, die eine stärkere Replikation aufwiesen¹¹³. Wird jedoch durch den Einsatz von spezifischer siRNA die Proteinexpression von c-Src supprimiert, kommt es auch bei NS5B zu einer Lokalisationsänderung in den Replikonzellen. So ist c-Src möglicherweise wichtig für die Bildung von funktionellen membranassoziierten Replikationskomplexen und die Lokalisation von NS5B darin, und die Aktivität von c-Src für die Interaktion von NS5B und NS5A, die Voraussetzung ist für eine effiziente Replikation des Virus.

Interaktionen von viralen Proteinen mit Src-Kinasen werden vorwiegend durch zwei Arten von molekularen Erkennungsvorgängen vermittelt: erstens die Interaktion von Phosphotyrosin-Resten mit SH2-Domänen, wie beispielsweise bei der Assoziation von EBV

LMP2A mit Lyn²⁴⁵ und zweitens die Interaktion von prolinreichen Motiven mit SH3-Domänen, beispielhaft veranschaulicht durch die Interaktion von HIV-1 Nef mit Hck, Lck, Lyn, Fyn und c-Src^{246, 247}. Um die Interaktion von NS5B mit c-Src näher zu charakterisieren, wurden GST-Pulldown-Experimente etabliert. Zunächst einmal konnte gezeigt werden, dass auch in Bakterien exprimiertes GST-getaggtetes c-Src an NS5B aus Replikonzellextrakten bindet (Abbildung 3.16).

Experimente mit Deletionsmutanten von GST-c-Src deuten an, dass sowohl die SH2- als auch die SH3-Domäne essentiell sind für die Interaktion mit NS5B (Abbildung 3.17 B). Durch den Einsatz von GST-getaggteten SH3-Domänen von weiteren Src-Kinase-Familie-Mitgliedern (rot dargestellt in Abbildung 4.2) und einer Nicht-Src-Kinase konnte gezeigt werden, dass NS5B in die zweite Kategorie der Interaktionen von Src-Kinasen einzuordnen ist, da es im Stande ist, die SH3-Domäne von c-Src und in geringeren Ausmaß auch die von Fyn, Hck und Lck zu binden. Mit der Nicht-Src-Kinase Abl dagegen konnte nur eine sehr schwache Interaktion mit NS5B gezeigt werden (Abbildung 3.18). Ähnliche Ergebnisse konnten bereits für NS5A von HCV beschrieben werden. Macdonald et al. zeigten 2004¹⁹⁴, dass NS5A über ein polyprolinreiches Motiv mit Hck, Lck, Lyn und Fyn interagiert, wohingegen eine Bindung mit der SH3-Domäne von c-Src interessanterweise nicht nachgewiesen werden konnte.

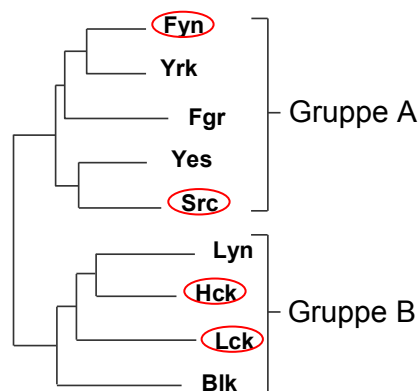


Abbildung 4.2: **Phylogenetischer Baum der Src-Kinasen**

Der phylogenetische Baum zeigt zwei Subklassen innerhalb der Familie (verändert nach Williams et al.¹⁹⁴). Rot umrandet dargestellt sind die in GST-Pulldown-Analysen eingesetzten Src-Kinasen.

Durch einen Abgleich mit dem SH3-Hunter (<http://cbm.bio.uniroma2.it/SH3-Hunter/>), einem Web-Server für die Detektion von putativen Interaktionsmotiven von SH3-Domänen in Proteinsequenzen²⁴⁸, konnte das Vorhandensein zweier möglicher prolinreicher Regionen innerhalb der NS5B-Sequenz aufgedeckt werden. Diese sind in Abbildung 4.3 rot dargestellt.

1	SMSYTWTGALITPCAAEETKLPINALSNSLLRHHNLVYATTSRASLRQK	50
51	KVTFDRLQVLDDHYRDVLKEMKAKASTVKAKLLSVEEACKLTPPHSARSK	100
101	FGYGAKDVRNLSSKAVNHRSVWVDLLEDTETPIDTTIMAKNEVFCVQPE	150
151	KGGRKPARLIVFPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQAVMGSSYGFQYSPGQR	200
201	VEFLVNAWKAKKCPMGFAYDTRCFDSTVTENDIRVEESYQCCDLAPPEAR	250
251	QAIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCTYLKAA	300
301	AACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDEASLRAFTEAMTRY	350
351	GDPPK PEYDLELITSCSSNVSAHDASGKRYYL TRDPTT LARAAWETA	400
401	RHTPVNSWLGNIIIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAQEQLKALDCQIYGA	450
451	CYSIEPLDLPQIIQRLHGLSAFSLHSYSPGEINRVASCLRKLGVPLRVW	500
501	RHRARSVRARLLSQGGRAATCGKYLFWAVRTKLKLTPIPAASQLDLSSW	550
551	FVAGYSGGDIYHSLSRARPRWFMWCLLLSVGVGIYLLPNR	591

Abbildung 4.3: **Aminosäuresequenz von NS5B**

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von NS5B. Die rot hervorgehobenen Aminosäuren zeigen die beiden putativen SH3-Interaktionsmotive (PxxP).

Um die Rolle dieser beiden Motive bei der Interaktion mit SH3-Domänen der Src-Kinasen zu bestimmen, wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits GST-NS5B-Verkürzungsmutanten mit den einzelnen Motiven kloniert (siehe Material und Methoden). Anhand von GST-Pulldown-Experimenten soll in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, welche der beiden prolinreichen Regionen die Interaktion zur SH3-Domäne von c-Src vermittelt.

Eine Schlüsselfrage, die zu beantworten bleibt, ist, welche physiologischen Konsequenzen die Interaktion von c-Src mit NS5B auf die Virus-Replikation und die Pathogenese besitzt. Ein erster Schritt zur Beantwortung dieser Frage ist die Analyse der Kinase-Aktivität von c-Src in HCV-Replikon-exprimierenden Zellen. Waris et al.¹⁹⁵ haben 2005 gezeigt, dass ein subgenomisches HCV-Replikon in Huh7-Zellen c-Src aktiviert. In Studien unserer Arbeitsgruppe dagegen konnten keine Unterschiede in der aktivierenden Tyrosinphosphorylierung von c-Src in Huh7- und Huh9-13-Zellen nachgewiesen werden (Dissertation E. D. Brenndörfer²⁴⁹).

Da eindeutig gezeigt werden konnte, dass c-Src sowohl mit NS5B interagiert, als auch die virale Replikation moduliert, ist davon auszugehen, dass die beiden Proteine innerhalb der Replikonzellen kolokalisieren. Bisher gibt es aber noch keinen direkten Nachweis für eine Kolokalisation, aber mehrere Studien konnten demonstrieren, dass NS5B vorwiegend mit der cytosolischen Seite der ER-Membranen assoziiert⁷⁸. Für c-Src ist beschrieben, dass es mit dem an der ER-Membran lokalisierten IP₃-Rezeptor assoziiert und diesen phosphoryliert²⁵⁰, was einem indirekten Beweis für eine mögliche Kolokalisation von NS5B und c-Src entspricht.

Die im zweiten Teil der Arbeit vorgestellten Daten identifizieren die zelluläre Kinase c-Src als neuen Interaktionspartner der NS5B-Polymerase von HCV, wobei die Interaktion auf Seiten

von c-Src über die SH3-, aber möglicherweise auch über die SH2-Domäne vermittelt wird. Es konnte belegt werden, dass c-Src unabdingbar ist für eine effiziente Replikation des subgenomischen Replikons, da sowohl die pharmakologische Inhibition von c-Src durch spezifische Inhibitoren, als auch eine Hemmung der c-Src-Expression durch siRNA zu einer signifikanten Supprimierung der viralen Replikation führt. Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie konnte angedeutet werden, dass c-Src möglicherweise für eine effiziente Bildung der membranassoziierten Replikationskomplexe notwendig ist. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine Inhibition von c-Src ein mögliches therapeutisches Konzept für die Behandlung von HCV-Infektionen darbietet. Es ist nämlich anzunehmen, dass antivirale Wirkstoffe, die direkt gegen virale Enzyme gerichtet sind, aufgrund der hohen genetischen Diversität, Mutationsrate und dem schnellen *Turnover* von HCV, eine Entstehung von viralen Resistenzen begünstigen könnten^{251, 252}. Daher scheint eine anti-HCV-Therapie, die gegen Wirtszell-Faktoren wie die zelluläre Kinase c-Src gerichtet ist, gegenüber einer Inhibition von viralen Proteinen präferabel zu sein.

4.3 Generierung NS5B-spezifischer humaner Antikörperfragmente

Im letzten Teil der Arbeit wurden schließlich NS5B-spezifische humane Antikörperfragmente generiert und auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht.

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B, das zentrale Enzym für die Replikation des viralen Genoms in infizierten Zellen, ist ein vielversprechender Angriffspunkt für die Entwicklung von antiviralen Wirkstoffen. Gegenwärtig sind zahlreiche Kleinmolekül-Inhibitoren für NS5B beschrieben, wobei einige bereits in klinischen Studien eingesetzt werden²⁵³. Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane monoklonale Antikörper gegen das NS5B-Protein für eine mögliche Anwendung als sogenannte Intrabodies für eine intrazelluläre Immunisierung kloniert. Eine intrazelluläre Expression dieser Antikörperfragmente in Patienten sollte aufgrund ihres humanen Ursprungs nicht von einer Immunreaktion gegen das Transgen begleitet sein.

Rekombinante Antikörper sind bedeutende Hilfsmittel bei der Prävention, Diagnose und Behandlung einer breiten Auswahl an Krankheiten, inklusive infektiösen Krankheiten, Krebs, neurologischen Störungen und Autoimmunerkrankungen, geworden²⁵⁴. Aufgrund ihrer geringen Größe, der einfachen Produktion und der besseren Gewebedurchdringung haben scFv einige Vorteile gegenüber vollständigen Antikörpern²⁵⁵. Aus der geringen Größe ergeben sich aber auch Eigenschaften, die einen therapeutischen Einsatz limitieren. So liegt die Halbwertszeit von Einzelkettenantikörpern im Blut im Bereich von wenigen Stunden²⁵⁶.

²⁵⁷, so dass sie damit deutlich schneller aus der Blutzirkulation eliminiert werden als ganze Antikörper.

Der Phagen-Display ist ein leistungsstarkes Hilfsmittel für die Gewinnung von spezifischen Antikörperfragmenten mit hohen Bindungseigenschaften aus einer großen Anzahl von Varianten. Für HCV konnten bereits humane als auch humanisierte spezifische scFv beschrieben werden ^{258, 259}.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun mit Hilfe des Phagen-Display und einer aus HCV-infizierten Patienten hergestellten Phagenbibliothek Phagen mit hochaffinen Antikörperfragmenten gegen verschiedene Motive der NS5B-Polymerase angereichert und selektiert werden. Da zahlreiche rekombinante Antikörper identifiziert werden sollten, wurden nur drei Runden der Affinitätsselektion durchgeführt. Hierdurch werden aber nicht nur hochaffine scFv selektiert, sondern auch solche minderer Spezifität zur Erweiterung der Diversität. Um möglichst hochaffine Phagen zu isolieren, kann die Prozedur des Pannings mehrere Male wiederholt werden, wobei es jedoch bei zu vielen Selektionsrunden aufgrund eines Wachstumsvorteils entsprechender Klone in *E. coli* zu einer Anreicherung unvollständiger oder mutierter Antikörperfragmente kommen kann ²⁶⁰⁻²⁶². In der Literatur werden daher meist 2 – 6 Runden vorgeschlagen ^{255, 263}.

Die verwendete Phagenbibliothek wurde bereits erfolgreich zur Isolierung von scFv gegen die HCV-Proteine NS3 ²⁰⁶ und Core ²⁶⁴ eingesetzt. Die Selektion dieser Phagenbibliothek erfolgte mit für die Polymerase-Aktivität von NS5B wichtigen Motiven als Antigene, die direkt auf einer Plastikoberfläche (96 Well-Platte) immobilisiert wurden. Diese Methode wurde aufgrund der einfachen Handhabbarkeit und dem bereits erfolgreichen Einsatz bei einer diversen Reihe von Antigenen ausgewählt ²⁶⁵.

Die Anreicherung von spezifischen Antikörperfragmenten wurde durch die Bestimmung der Phagentiter vor und nach jeder Panningrunde mittels Titration kontrolliert. In der dritten Runde der Affinitätsselektion gegen die verschiedenen immobilisierten Motive von NS5B war die Anzahl der eluierten Phagen deutlich erhöht im Vergleich zu der Anzahl der Phagen, die in der ersten Runde eluiert wurden (Tabelle 3.1). Dies deutet an, dass eine Population von spezifisch bindenden Phagen während der Panningrunden angereichert wurde. Nach der dritten Selektionsrunde wurden monoklonale Phagen isoliert und periplasmatische Extrakte hergestellt. Etwa 40-60% von diesen Phagen zeigten in einem indirekten ELISA eine spezifische Bindung an die Motive von NS5B (Tabelle 3.2).

Die Sekretion der scFv in den periplasmatischen Raum der *E. coli*-Bakterien war eine Schlüsselentdeckung bei der Entwicklung der Phagen-Display-Technologie, da es die Produktion von löslichen und funktionellen Proteinen mit korrekt gebildeten Disulfidbrücken erlaubt ²⁵⁵. Bei der periplasmatischen Expression wird das im Cytoplasma der Zelle translatierte scFv durch eine aminoterminal vom scFv-Gen gelegene Signalsequenz (*pe/B*) in

den periplasmatischen Raum zwischen äußerer und innerer Membran des Bakteriums dirigiert. Das dort herrschende oxidative Milieu begünstigt die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken der schweren und leichten Ketten und die korrekte Faltung der Antikörperfragmente, so dass lösliche, funktionelle scFv entstehen ²⁶⁶. In einem sogenannten Nicht-Suppressor *E. coli*-Stamm wie HB2151 werden die löslichen scFv durch Induktion mit IPTG produziert und durch osmotischen Schock aus dem periplasmatischen Raum extrahiert.

Nach Extraktion der Phagemid-DNA der bindenden Klone wurde diese einem SfiI-Verdau unterzogen, um das Vorhandensein vollständiger Antikörperfragmente zu verifizieren. Die Analyse des Verdau zeigte, dass nicht alle selektierten Klone das spezifische scFv-Insert von etwa 750 bp trugen (Abbildung 3.23). Aufgrund der Verwendung von degenerierten Primern für die PCR-Amplifikation der variablen Domänen der Antikörper können Fehlpaarungen, Punktmutationen, interne Stopcodons und andere Fehler innerhalb der amplifizierten DNA auftreten und zur Produktion von nicht-funktionellen und unvollständigen scFv-Molekülen führen. Plasmide, die nichtproduktive, anomale oder trunkierte Antikörperfragmente-kodierende Sequenzen tragen, werden oft durch den *E. coli*-Wirt bevorzugt. Sie verfügen über einen Wachstums- und Selektionsvorteil gegenüber Klonen, die vollständige scFv tragen und verursachen Probleme während der Anreicherung von antigenbindenden Antikörpersequenzen durch Phagen-Display ²⁶⁷⁻²⁶⁹. Diese Ereignisse zeigen die Wichtigkeit von stringenten Waschschritten während des Pannings, um scFv-freie Phagen zu entfernen ²⁶².

Die Ergebnisse der Immunoblot-Analysen der periplasmatischen Extrakte zeigten bei den meisten Klonen distinkte Banden mit dem erwarteten Molekulargewicht von etwa 30 kDa (Abbildung 3.24) ²⁵⁵. Das Auftreten von Phagen mit kleineren Inserts (16 kDa) beruht, wie beschrieben, meist auf einem Abbruch der Transkription/Translation, wobei gewöhnlich die VH-Region fehlt ²⁵⁵. Des Weiteren ist es möglich, dass Proteasen im Periplasma die Antikörperfragmente proteolytisch abbauen. Ein weiteres Problem bei der periplasmatischen Expression ist die Tendenz der scFv zur Bildung von unlöslichen Aggregaten (*inclusion bodies*), die nicht ins Periplasma transportiert werden ²⁷⁰ und somit im Immunoblot der periplasmatischen Extrakte nicht nachweisbar sind.

Schließlich wurde die kodierende DNA der bindenden scFv isoliert, sequenziert, und die variablen Domänen der selektierten Einzelkettenantikörperfragmente wurden charakterisiert. Einige Klone besaßen identische DNA-Sequenzen, doch eine Anreicherung von Klonen gleicher Sequenz korreliert nicht notwendigerweise mit der Spezifität und Affinität der Fragmente, sondern ist möglicherweise auch auf einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Klonen zurückzuführen ²⁷¹. Die isolierten Sequenzen lassen sowohl λ -leichte Ketten, als auch κ -leichte Ketten erkennen (Tabelle 3.3). Des Weiteren wurden die einander am

nächsten verwandten V-, D- und J-Segmente identifiziert. Durch Alignment anhand der Regeln von Kabat ²²³ konnten die hypervariablen Bereiche (CDRs) und die Framework-Regionen der scFv eindeutig identifiziert werden (Abbildung 3.25). Erkennbar ist, dass bei einigen Klonen nur ein Paar der Disulfidbrücken-bildende Cystein-Reste vorhanden sind, diese aber trotzdem als spezifisch bindende scFv isoliert werden konnten (scFv C10 und scFv D2). Des Weiteren scheinen Mutationen im Glycin-Linker keine negativen Auswirkungen zu haben (scFv A35 und scFv 78).

Um zu überprüfen, ob ausgesuchte Einzelkettenantikörperfragmente gegen die Motive von NS5B auch an Vollängen-NS5B binden, wurden His-Pulldown-Experimente durchgeführt. Diese zeigten, dass die scFv, die gegen Vollängen-NS5B selektioniert wurden (scFv 72, 78 und 82), deutlich besser an NS5B binden als die scFv, die gegen die verschiedenen Motive selektioniert wurden (Abbildung 3.26). Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die zur Selektion verwendeten Motive im Vollängen-Protein nicht vollständig für eine Bindung der Antikörperfragmente zugänglich sind. Einige der scFv gegen NS5B-Motive zeigen aber auch eine eindeutige Bindung an NS5B (scFv A43 und scFv C2).

Um eine potentielle Beeinträchtigung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Aktivität von NS5B durch selektionierte Einzelkettenantikörperfragmente zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Polymerase-Aktivitäts-Assay unter Verwendung eines Baculovirus-exprimierten NS5B im ELISA-Format etabliert. Dieser Assay erlaubt die reproduzierbare Quantifizierung der Polymerase-Aktivität und bietet eine schnelle Screening-Methode für inhibitorische Verbindungen. In diesem System war NS5B erfolgreich in der Lage, einen RNA-Doppelstrang zu synthetisieren (Abbildung 3.27 A). Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch den Einsatz dieses Assays gezeigt werden, dass die gegen Vollängen-NS5B selektionierten scFv die Polymerase-Aktivität von NS5B *in vitro* hemmen (Abbildung 3.27 B). Die effizienteste Inhibition konnte für den Klon scFv 82 gemessen werden. Eine Beeinträchtigung der Polymerase-Aktivität von scFv, die gegen die Motive von NS5B selektioniert wurden, sollte in weiteren Experimenten analysiert werden.

Zusammenfassend wurden im dritten Teil der Arbeit mit Hilfe eines Phagen-Display in drei Runden der Affinitätsselektion spezifische Einzelkettenantikörperfragmente mit hoher Affinität gegen NS5B bzw. essentielle Motive von NS5B aus einer aus HCV-infizierten Patienten hergestellten Phagenbibliothek generiert, die zumindest zum Teil die Polymerase-Aktivität von NS5B in einem *in vitro*-Assay hemmen. Die weitere Evaluierung des inhibitorischen Potentials dieser Antikörperfragmente im Kontext des Replikonsystems bzw. replikationsfähiger Viren wird Gegenstand künftiger Untersuchungen sein. Sollten sich die scFv in diesem Kontext als effektiv erweisen, würden sie potentielle Kandidaten für eine intrazelluläre Immunisierung gegen eine HCV-Infektion repräsentieren.

Andere Arbeitsgruppen konnten belegen, dass eine intrazelluläre Expression von Einzellkettenantikörperfragmenten als sogenannte Intrabodies sehr effektiv ist bei der Inhibition von diversen intrazellulären Proteinen. Auch für verschiedene scFv, die gegen HIV-Proteine gerichtet sind, ist beschrieben, dass sie nach intrazellulärer Expression die Replikation und Infektion des HIV inhibieren ²⁷²⁻²⁷⁷. Andere Intrabodies wurden erfolgreich gegen verschiedene Onkogene eingesetzt. So ist veröffentlicht, dass scFv, die gegen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (VEGFR2, Tie-2) und ATF-1 gerichtet sind, das maligne Potential von Melanomzellen reduzieren ^{278, 279}. Im Fall des erbB2-Onkogens führte die adenovirale Expression eines spezifischen scFv ebenfalls zu einer Aufhebung des malignen Potentials von Ovarkrebszellen und förderte die Initiation einer klinischen Studie an Patienten mit Ovarkrebs ²⁸⁰. Eine intrazelluläre Immunisierung mit Intrabodies könnte also ein viel versprechender Ansatz sein für die Behandlung von chronischen HCV-Infektionen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Hepatitis C Virus stellt weltweit eine der Hauptursachen chronischer Lebererkrankungen dar und ist damit ein globales gesundheitspolitisches Problem. Die gegenwärtige Therapie basiert auf einer Kombination von pegyliertem Interferon- α und Ribavirin, geht jedoch Genotyp-abhängig einher mit niedrigen Ansprechraten, bei vergleichsweise hoher Frequenz an zum Teil schwergradigen Nebenwirkungen. Die Entwicklung von alternativen und effektiveren Strategien zur Behandlung einer HCV-Infektion ist daher von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang ist die genaue Kenntnis der zellulären Faktoren, die die virale Replikation determinieren, von essentiellem Interesse, um neben viralen auch zelluläre Angriffspunkte einer therapeutischen Intervention zu identifizieren.

In einem ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss zellulärer Hydratationsänderungen auf die virale Replikation analysiert. Hierbei konnte belegt werden, dass eine hypoosmotisch bedingte Zunahme der zellulären Hydratation über bislang unverstandene Mechanismen die virale Replikation im subgenomischen Replikon-Modell unterdrückt, während diese durch hyperosmolare Inkubationsbedingungen unbeeinflusst blieb.

In einem zweiten Teil der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die zelluläre Tyrosinkinase c-Src essentiell für die Replikation von HCV ist, und dass c-Src mit der viralen Polymerase NS5B zumindest über seine SH3-Domäne interagiert. Inhibitorstudien und der Einsatz c-Src-spezifischer siRNA legen nahe, dass c-Src die subzelluläre Lokalisation von NS5A und NS5B bestimmt und dass Hemmung von c-Src möglicherweise zu einer Störung der Replikonstruktur führt.

Im dritten Teil der Arbeit erfolgte mit Hilfe eines Phagen-Display aus einer aus HCV-infizierten Patienten hergestellten Phagenbibliothek die Isolation affiner Einzelkettenantikörperfragmente gegen essentielle Motive der viralen Polymerase NS5B sowie gegen Vollängen-NS5B. Die Bindungsaktivität der bakteriell exprimierten scFv wurde mittels ELISA überprüft, und nach Verdau und Immunoblot-Analysen erfolgte die Analyse und Charakterisierung der Sequenzen der positiven scFv hinsichtlich ihrer Integrität. Darüber hinaus gelang es bei den gegen Vollängen-NS5B generierten scFv in einem Polymerase-Aktivitäts-Assay zu belegen, dass sie *in vitro* die Aktivität einer rekombinant generierten NS5B-Polymerase hemmen.

6. SUMMARY

The hepatitis C virus represents one of the major causes of chronic liver disease worldwide and is, therefore, a global health policy problem. Current therapy is based on the combination of pegylated interferon- α and ribavirin, but it is genotype-dependent accompanied by a low response rate with comparatively high frequency of severe side-effects. The development of alternative and more effective strategies for the treatment of HCV infection is of great importance. In this regard, the precise knowledge of the cellular factors that determine viral replication is of essential interest to identify both viral and cellular targets of therapeutic intervention.

In the first part of the thesis, the influence of alterations of cellular hydration on viral replication was analysed. It could be shown that viral replication in the subgenomic replicon model was inhibited by hypoosmotic increase of cellular hydration via so far unknown mechanisms, whereas it was unaffected by hyperosmotic incubation.

In the second part of the thesis it could be demonstrated that the cellular tyrosine kinase c-Src is crucial for the replication of HCV and that c-Src interacts with the viral polymerase NS5B at least via its SH3 domain. Inhibitor studies and the use of c-Src specific siRNA suggest that c-Src regulates the subcellular localisation of NS5A and NS5B and that inhibition of c-Src potentially leads to a disruption of the replicon structure.

In the third part of the thesis a phage display from a phage library cloned from patients infected with HCV was carried out for the isolation of high affinity single-chain antibody fragments against essential motifs of the viral polymerase NS5B and full length NS5B. Binding activity of bacterially expressed scFv was assessed via ELISA and after digestion and immunoblot analysis the sequences of positive scFv were analysed regarding their integrity. Furthermore, it was possible to show, using a polymerase activity assay, that the scFv generated against full length NS5B inhibit the activity of a recombinant NS5B polymerase in vitro.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.
2. Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter, and P. V. Holland. 2001. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. 1975. *Rev Med Virol* 11:3-8.
3. Schreier, E., D. Radun, H. Neuhauser, and K. Stark. 2003. Hepatitis C. *Robert Koch Institut* 15.
4. Patel, K., A. J. Muir, and J. G. McHutchison. 2006. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis C infection. *BMJ* 332:1013-1017.
5. Yen, T., E. B. Keeffe, and A. Ahmed. 2003. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol* 36:47-53.
6. Freeman, A. J., G. J. Dore, M. G. Lay, M. Thorpe, J. von Overbeck, A. R. Lloyd, G. Marinos, and J. M. Kaldor. 2001. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 34:809-816.
7. Seeff, L. B. 1997. The natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 1:587-602.
8. Deforges, S., A. Evlashev, M. Perret, M. Sodoyer, S. Pouzol, J. Y. Scoazec, B. Bonnaud, O. Diaz, G. Paranhos-Baccala, V. Lotteau, and P. Andre. 2004. Expression of Hepatitis C Virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol* 85:2515-2523.
9. Forton, D. M., P. Karayiannis, N. Mahmud, S. D. Taylor-Robinson, and H. C. Thomas. 2004. Identification of unique Hepatitis C Virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol* 78:5170-5183.
10. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. 2002. *NIH Consensus State Sci Statements* 19:1-46.
11. Kiiver, K., A. Merits, M. Ustav, and E. Zusinaite. 2006. Complex formation between hepatitis C virus NS2 and NS3 proteins. *Virus Res* 117:264-272.
12. Fried, M. W., M. L. Shiffman, K. R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F. L. Goncales Jr, D. Häussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman, and J. Yu. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347:975-982.
13. Toniutto, P., C. Fabris, E. Fumo, L. Apollonio, M. Caldato, C. Avellini, R. Minisini, and M. Pirisi. 2005. Pegylated versus standard interferon-alpha in antiviral regimens for post-transplant recurrent hepatitis C: Comparison of tolerability and efficacy. *J Gastroenterol Hepatol* 20:577-582.
14. Pawlotsky, J. M., S. Chevaliez, and J. G. McHutchison. 2007. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 132:1979-1998.
15. Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D. G. Murphy, H. Okamoto, J. M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I. Shin, L. J. Stuyver, H. J. Thiel, S. Viazov, A. J. Weiner, and A. Widell. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962-973.
16. Martell, M., J. I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia, and J. Gomez. 1992. Hepatitis C Virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66:3225-3229.
17. Simmonds, P., E. C. Holmes, T. A. Cha, S. W. Chan, F. McOmish, B. Irvine, E. Beall, P. L. Yap, J. Kolberg, and M. S. Urdea. 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74:2391-2399.

18. Bukh J, R. H. Miller, and R. H. Purcell. 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 15:41-63.
19. Simmonds, P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol* 85:3173-3188.
20. Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara, and A. Nomoto. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66:1476-1483.
21. Wang, C., P. Sarnow, and A. Siddiqui. 1993. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67:3338-3344.
22. Wang, C., S. Y. Le, N. Ali, and A. Siddiqui. 1995. An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* 1:526-537.
23. Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger, and R. Bartenschlager. 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75:12047-12057.
24. Kim, Y. K., C. S. Kim, S. H. Lee, and S. K. Jang. 2002. Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* 290:105-112.
25. Yanagi, M., M. St Claire, S. U. Emerson, R. H. Purcell, and J. Bukh. 1999. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2291-2295.
26. Friebe, P., and R. Bartenschlager. 2002. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76:5326-5338.
27. Yi, M., and S. M. Lemon. 2003. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77:3557-3568.
28. You, S., D. D. Stump, A. D. Branch, and C. M. Rice. 2004. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78:1352-1366.
29. Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann. 2004. Novel insights into hepatitis c virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63:71-180.
30. Walewski, J. L., T. R. Keller, D. D. Stump, and A. D. Branch. 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7:710-721.
31. Xu, Z., J. Choi, T. S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, D. Chien, M. J. Selby, and J. Ou. 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 20:3840-3848.
32. Boulant, S., M. Becchi, F. Penin, and J. P. Laverne. 2003. Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1B. *J Biol Chem* 278:45785-45792.
33. Varaklioti, A., N. Vassilaki, U. Georgopoulou, and P. Mavromara. 2002. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 277:17713-17721.
34. McLauchlan, J. 2000. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 7:2-14.
35. Lo, S. Y., M. J. Selby, and J. H. Ou. 1996. Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol* 70:5177-5182.
36. Ma, H. C., C. H. Ke, T. Y. Hsieh, and S. Y. Lo. 2002. The first hydrophobic domain of the hepatitis C virus E1 protein is important for interaction with the capsid protein. *J Gen Virol* 83:3085-3092.
37. Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67:1385-1395.
38. Ralston, R., K. Thudium, K. Berger, C. Kuo, B. Gervase, J. Hall, M. Selby, G. Kuo, M. Houghton, and Q. L. Choo. 1993. Characterization of hepatitis C virus envelope

- glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 67:6753-6761.
39. Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight, and Q. X. Zhang. 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12766-12771.
 40. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.
 41. Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R. M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21:5017-5025.
 42. Lin, C., B. D. Lindenbach, B. M. Pragai, D. W. McCourt, and C. M. Rice. 1994. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 68:5063-5073.
 43. Selby, M. J., E. Glazer, F. Masiarz, and M. Houghton. 1994. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology* 204:114-122.
 44. Griffin, S. D., L. P. Beales, D. S. Clarke, O. Worsfold, S. D. Evans, J. Jaeger, M. P. Harris, and D. J. Rowland. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535:34-38.
 45. Pavlovic, D., D. C. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R. A. Dwek, W. B. Fischer, and N. Zitzmann. 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6104-6108.
 46. Jones, C. T., C. L. Murray, D. K. Eastman, J. Tassello, and C. M. Rice. 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for infectious virus production. *J Virol* 81:8374-8383.
 47. Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A. H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 3:e103.
 48. Santolini, E., L. Pacini, C. Fipaldini, G. Migliaccio, and N. Monica. 1995. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol* 69:7461-7471.
 49. Pallaoro, M., A. Lahm, G. Biasiol, M. Brunetti, C. Nardella, L. Orsatti, F. Bonelli, S. Orru, F. Narjes, and C. Steinkuhler. 2001. Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J Virol* 75:9939-9946.
 50. Lorenz, I. C., J. Marcotrigiano, T. G. Dentzer, and C. M. Rice. 2006. Structure of the catalytic domain of the hepatitis c virus NS2-3 Protease. *Nature* 442:831-835.
 51. Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10583-10587.
 52. Hijikata, M., H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, T. Tanaka, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1993. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67:4665-4675.
 53. Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F. L. Cosset, and R. Bartenschlager. 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7408-7413.
 54. Yi, M., Y. Ma, J. Yates, and S. M. Lemon. 2007. Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J Virol* 81:629-638.
 55. Hijikata, M., H. Mizushima, Y. Tanji, Y. Komoda, Y. Hirowatari, T. Akagi, N. Kato, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1993. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10773-10777.

56. Kolykhalov, A. A., E. V. Agapov, and C. M. Rice. 1994. 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* 68:7525-7533.
57. Tanji, Y., M. Hijikata, Y. Hirowatari, and K. Shimotohno. 1994. Identification of the domain required for trans-cleavage activity of hepatitis C viral serine proteinase. *Gene* 145:215-219.
58. Han, D. S., B. Hahm, H. M. Rho, and S. K. Jang. 1995. Identification of the protease domain in NS3 of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 76(Pt 4):985-993.
59. Steinkuhler, C., A. Urbani, L. Tomei, G. Biasiol, M. Sardana, E. Bianchi, A. Pessi, and R. De Francesco. 1996. Activity of purified hepatitis C virus protease NS3 on peptide substrates. *J Virol* 70:6694-6700.
60. Suzich, J. A., J. K. Tamura, F. Palmer-Hill, P. Warrener, A. Grakoui, C. M. Rice, S. M. Feinstone, and M. S. Collett. 1993. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol* 67:6152-6158.
61. Kim, D. W. Y. Gwack, J. H. Han, and J. Choe. 1995. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Comm* 215:160-166.
62. Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 2000. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 74:2046-2051.
63. Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen. 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 68:5045-5055.
64. Failla, C., L. Tomei, and R. De Francesco. 1994. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 68:3753-3760.
65. Lin, C., B. M. Pragai, A. Grakoui, J. Xu, and C. M. Rice. 1994. Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. *J Virol* 68:8147-8157.
66. Tanji, Y., M. Hijikata, S. Satoh, T. Kaneko, and K. Shimotohno. 1995. Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J Virol* 69:1575-1581.
67. Penin, F., J. Dubuisson, F. A. Rey, D. Moradpour, and J. M. Pawlotsky. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39:5-19.
68. Quinkert, D., R. Bartenschlager, and V. Lohmann. 2005. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* 79:13594-13605.
69. Huang, L., J. Hwang, S. D. Sharma, M. R. Hargittai, Y. Chen, J. J. Arnold, K. D. Raney, and C. E. Cameron. 2005. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 280:35417-36428.
70. Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J. A. Hellings, H. E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 277:8130-8139.
71. Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H. E. Blum, R. Bartenschlager, and D. Moradpour. 2004. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 279:40835-40834.
72. Blight, K. J., A. A. Kolykhalov, and C. M. Rice. 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290:1972-1974.
73. Lohmann, V., F. Korner, A. Dobierzewska, and R. Bartenschlager. 2001. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 75:1437-1449.
74. Kaneko, T., Y. Tanji, S. Satoh, M. Hijikata, S. Asabe, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1994. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun* 205:320-326.

75. Quintavalle, M., S. Sambucini, C. DiPietro, R. De Francesco, and P. Neddermann. 2006. The alpha isoform of protein kinase CKI is responsible for hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation. *J Virol* 80:11305-11312.
76. Quintavalle, M., S. Sambucini, V. Summa, L. Orsatti, F. Talamo, R. De Francesco, and P. Neddermann. 2007. Hepatitis C virus NS5A is a direct substrate of casein kinase I-alpha, a cellular kinase identified by inhibitor affinity chromatography using specific NS5A hyperphosphorylation inhibitors. *J Biol Chem* 282:5536-5544.
77. Pietschmann, T., V. Lohmann, G. Rutter, K. Kurpanek, and R. Bartenschlager. 2001. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 75:1252-1264.
78. Schmidt-Mende, J., E. Bieck, T. Hugle, F. Penin, C. M. Rice, H. E. Blum, and D. Moradpour. 2001. Determinants for membrane association of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 276:44052-44063.
79. Ivashkina, N., B. Wolk, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* 76:13088-13093.
80. Oh, J. W., T. Ito, and M. M. Lai. 1999. A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA. *J Virol* 73:7694-7702.
81. Luo, G., R. K. Hamatake, D. M. Mathis, J. Racela, K. L. Rigat, J. Lemm, and R. J. Colonno. 2000. De novo initiation of RNA Synthesis by the RNA-dependent RNA Polymerase (NS5B) of Hepatitis C virus. *J Virol* 74:851-863.
82. Zhong, W., A. S. Uss, E. Ferrari, J. Y. Lau, and Z. Hong. 2000. De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol* 74:2017-2022.
83. Binder, M., D. Quinkert, O. Bochkarova, R. Klein, N. Kezmic, R. Bartenschlager, and V. Lohmann. 2007. Identification of determinants involved in initiation of hepatitis C virus RNA synthesis by using intergenotypic replicase chimeras. *J Virol* 81:5270-5283.
84. Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626.
85. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-796.
86. Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita, and F. V. Chisari. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9294-9299.
87. Bartosch, B., J. Dubuisson, and F. L. Cosset. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197:633-642.
88. Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Rice, and J. A. McKeating. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7271-7276.
89. Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz, and C. M. Rice. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-805.
90. Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. 2006. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80:5308-5320.
91. Tscherne, D. M., C. T. Jones, M. J. Evans, B. D. Lindenbach, J. A. McKeating, and C. M. Rice. 2006. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 80:1734-1741.

92. Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in HUH-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77:5487-5492.
93. Bartenschlager, R., and V. Lohmann. 2001. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 52:1-17.
94. Gunji, T., N. Kato, M. Hijikata, K. Hayashi, S. Saitoh, and K. Shimotohno. 1994. Specific detection of positive and negative stranded hepatitis C viral RNA using chemical RNA modification. *Arch Virol* 134:293-302.
95. Lanford, R. E., C. Sureau, J. R. Jacob, R. White, and T. R. Fuerst. 1994. Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* 202:606-614.
96. Takyar, S. T., D. Li, Y. Wang, R. Trowbridge, and E. J. Gowans. 2000. Specific detection of minus-strand hepatitis C virus RNA by reverse-transcription polymerase chain reaction on polyA(+)-purified RNA. *Hepatology* 32:382-387.
97. Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.
98. Lohmann, V., F. Korner, A. Dobierzewska, and R. Bartenschlager. 2001. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaption. *J Virol* 75:1437-1449.
99. Bartenschlager, R. 2005. The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application. *J Hepatol* 43:210-216.
100. Pietschmann, T., V. Lohmann, G. Rutter, K. Kurpanek, and R. Bartenschlager. 2001. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 75:1252-1264.
101. Krieger, N., V. Lohmann, and R. Bartenschlager. 2001. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 75:4614-4524.
102. Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand, and R. Bartenschlager. 2002. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 76:4008-4021.
103. Blight, K. J., J. A. McKeating, and C. M. Rice. 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA Replication. *J Virol* 76:13001-14014.
104. Blight, K. J., J. A. McKeating, J. Marcotrigiano, and C. M. Rice. 2003. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1A RNAs in cell culture. *J Virol* 77:3181-3190.
105. Date, T., M. Miyamoto, T. Kato, K. Morikawa, A. Murayama, D. Akazawa, J. Tanabe, S. Sone, M. Mizokami, and T. Wakita. 2007. An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. *Hepatol Res* 37:433-443.
106. Domitrovich, A. M., K. W. Diebel, N. Ali, S. Sarker, and A. Siddiqui. 2005. Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology* 335:72-86.
107. Houshmand, H., and A. Bergqvist. 2003. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display. *Biochem Biophys Res Commun* 309:695-701.
108. Hirano, M., S. Kaneko, T. Yamashita, H. Luo, W. Qin, Y. Shiota, T. Nomura, K. Kobayashi, and S. Murakami. 2003. Direct interaction between Nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem* 278:5109-5115.
109. Shimakami, T., M. Honda, T. Kusakawa, T. Murata, K. Shimotohno, S. Kaneko, and S. Murakami. 2006. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-Nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol* 80:3332-3340.
110. Zech, B., A. Kurtenbach, N. Krieger, D. Strand, S. Blencke, M. Morbitzer, K. Salassidis, M. Cotten, J. Wissing, S. Obert, R. Bartenschlager, T. Herget, and H. Daub. 2003. Identification and characterization of Amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 84:555-560.
111. Masumi, A., H. Aizaki, T. Suzuki, J. B. DuHadaway, G. C. Prendergast, K. Komuro, and H. Fukazawa. 2005. Reduction of hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II. *Biochem Biophys Res Commun* 336:572-578.

112. Tu, H., L. Gao, S. T. Shi, D. R. Taylor, T. Yang, A. K. Mircheff, Y. Wen, A. E. Gorbalenya, S. B. Hwang, and M. M. Lai. 1999. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARElike protein. *Virology* 263:30-41.
113. Gao, L., H. Aizaki, J. W. He, and M. M. Lai. 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 78:3480-3488.
114. Zhang, J., O. Yamada, T. Sakamoto, H. Yoshida, T. Iwai, Y. Matsushita, H. Shimamura, H. Araki, and K. Shimotohno. 2004. Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology* 320:135-143.
115. Hamamoto, I., Y. Nishimura, T. Okamoto, H. Aizaki, M. Liu, Y. Mori, T. Abe, T. Suzuki, M. M. Lai, T. Miyamura, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2005. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 79:13473-13482.
116. Watashi, K., N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyanari, and K. Shimotohno. 2005. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19:111-122.
117. Heck, J. A., X. Meng, and D. N. Frick. 2009. Cyclophilin B stimulates RNA synthesis by the HCV RNA dependent RNA polymerase. *Biochem Pharmacol*
118. Lan, S., H. Wang, H. Jiang, H. Mao, X. Liu, X. Zhang, Y. Hu, L. Xiang, and Z. Yuan. 2003. Direct interaction between α -actinin and hepatitis C virus NS5B. *FEBS Lett* 554:289-294
119. Kim, S. J., J. H. Kim, Y. G. Kim, H. S. Lim, and J. W. Oh. 2004. Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* 279:50031-50041.
120. Supekova, L., F. Supek, J. Lee, S. Chen, N. Gray, J. P. Pezacki, A. Schlapbach, and P. G. Schultz. 2008. Identification of human kinases involved in hepatitis C virus replication by small interference RNA library screening. *J Biol Chem* 283:29-36.
121. Häussinger, D., and F. Schliess. 1995. Cell volume and hepatocellular function. *J Hepatol* 22:94-100.
122. Häussinger, D. 1996. Regulation of cell function by level of hydration. *Naturwissenschaften* 83:264-271.
123. Häussinger, D., F. Schliess, U. Warskulat, and S. vom Dahl. 1997. Liver cell hydration. *Cell Biol Toxicol* 13:275-287.
124. Häussinger, D., and F. Lang. 1992. Cell volume and hormone action. *Trends Pharmacol Sci* 13:371-373.
125. Häussinger, D., F. Lang, and W. Gerok. 1994. Regulation of cell function by the cellular hydration state. *Am J Physiol* 267:E343-E355.
126. Schliess, F., and D. Häussinger. 2003. Cell volume and insulin signaling. *Int Rev Cytol* 225:187-228.
127. vom Dahl, S., F. Schliess, and D. Häussinger. 1999. Significance of cellular hydration for cellular function. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 34:769-773.
128. Häussinger, D., T. Stehle, and F. Lang. 1990. Volume regulation in liver: further characterization by inhibitors and ionic substitutions. *Hepatology* 11:243-254.
129. Häussinger, D., and F. Lang. 1991. Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control. *Biochim Biophys Acta* 1071:331-350.
130. Häussinger, D., R. Kubitz, R. Reinehr, J. G. Bode, and F. Schliess. 2004. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol Aspects Med* 25:221-360.
131. Graf, J., and D. Häussinger. 1996. Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism. *J Hepatol* 24:53-77.
132. Lang, F., G. L. Busch, M. Ritter, H. Völkl, S. Waldegger, E. Gulbins, and D. Häussinger. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78:247-306.
133. Schliess, F., R. Reinehr, and D. Häussinger. 2007. Osmosensing and signaling in the regulation of mammalian cell function. *FEBS J* 274:5799-5803.

134. Schliess, F., C. Schäfer, S. vom Dahl, R. Fischer, M. R. Lordnejard, and D. Häussinger. 2002. Expression and regulation of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter NKCC1 in rat liver and human HuH-7 hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys* 401:187-197.
135. Schliess, F., and D. Häussinger. 2002. The cellular hydration state: a critical determination for cell death and survival. *Biol Chem* 383:577-583.
136. Schliess, F., and D. Häussinger. 2005. The cellular hydration state: role in apoptosis and proliferation. *Signal Transduction* 5:297-302.
137. Häussinger, D. 1996. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 313:697-710.
138. Häussinger, D., and F. Lang. 1991. Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control. *Biophys Acta* 1071:331-350.
139. Häussinger, D., and F. Schliess. 1999. Osmotic induction of signalling cascades: role in regulation of cell function. *Biochem Biophys Res Commun* 255:551-555.
140. Weiergräber, O., and D. Häussinger. 2000. Hepatocellular hydration: signal transduction and functional implications. *Cell Physiol Biochem* 10:409-416.
141. Häussinger, D., R. Reinehr, and F. Schliess. 2006. The hepatocyte integrin system and cell volume sensing. *Acta Physiol* 187:249-255.
142. Reinehr, R., F. Schliess, and D. Häussinger. 2003. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. *FASEB J* 17:731-733.
143. Häussinger, D., A. K. Kurz, M. Wettstein, D. Graf, S. vom Dahl, and F. Schliess. 2003. Involvement of integrins and src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced cholestasis. *Gastroenterology* 124:1476-1487.
144. vom Dahl, S., F. Schliess, R. Reissmann, B. Görg, O. Weiergräber, M. Kocalkova, F. Dombrowski, and D. Häussinger. 2003. Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem* 278:27088-27095.
145. Schliess, F., R. Reissmann, R. Reinehr, S. vom Dahl, and D. Häussinger. 2004. Involvement of integrins and src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem* 279:21294-21301.
146. Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari, and R. L. Juliano. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50:197-263.
147. Miranti, C. K., and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4:E83-E90.
148. Reinehr, R., S. Becker, J. Braun, A. Eberle, S. Grether-Beck, and D. Häussinger. 2006. Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 281:23150-23166.
149. Tolskaya, E. A., V. I. Agol, M. K. Voroshilova, and G. Y. Lipskaya. 1966. The osmotic pressure of the maintenance medium and reproduction of Poliovirus. *Virology* 29:613-621.
150. Agol, V. I., G. Y. Lipskaya, E. A. Tolskaya, M. K. Voroshilova, and L. I. Romanova. 1970. Defect in Poliovirus maturation under hypotonic conditions. *Virology* 41:533-540.
151. Ussery, M. A., R. Ramirez-Mitchell, and B. A. Hardesty. 1976. Inhibition of Friend murine leukemia virus production by low-ionic-strength medium. *J Virol* 17:453-461.
152. Bishop, J. M., R. L. Maldonado, R. F. Garry, P. T. Allen, H. R. Bose and M. R. F. Waite. 1976. Effect of medium of lowered NaCl concentration on virus release and protein synthesis in cells infected with Reticuloendotheliosis virus. *J Virol* 17:446-452.
153. Waite, M. R. F., and E. R. Pfefferkorn. 1968. Effect of altered osmotic pressure on the growth of Sindbis virus. *J Virol* 2:759-760.
154. Garry, R. F., D. A. Bostick, R. Schramm, and M. R. F. Waite. 1985. The ratio of plasma membrane cholesterol to phospholipid and the inhibition of Sindbis virus maturation by low NaCl Medium. *J Gen Virol* 66: 1171-1177.

155. Eaton, M., and R. Scala. 1956. Reversible effect of hypotonic solutions on growth of Influenza virus in tissue cultures. *Proc Soc Exptl Biol Med* 92:289.
156. Akeson, M., J. Scharff, C. M. Sharp, and D. M. Neville, Jr. 1992. Evidence that plasma membrane electrical potential is required for Vesicular stomatitis virus infection of MDCK cells: a study using fluorescence measurements through polycarbonate supports. *J Membrane Biol* 125:81-91.
157. Shapiro, L., K. A. Heidenreich, M. K. Meintzer, and C. A. Dinarello. 1998. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in HIV type 1 production in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7422-7426.
158. Offensberger, W.-B., S. Offensberger, B. Stoll, W. Gerok, and D. Häussinger. 1994. Effects of anisotonic exposure on duck Hepatitis B virus replication. *Hepatology* 20:1-7.
159. Chou, C-K., T-S. Su, C. Chang, C-P. Hu, M-Y. Huang, C-S. Suen, N-W. Chou, and L-P. Ting. 1989. Insulin suppresses Hepatitis B surface antigen expression in human hepatoma cells. *J Biol Chem* 264:15304-15308.
160. Lin, Y-L., H-C. Chen, S-F. Yeh, and C-K. Chou. 1995. Differential Pathways of insulin action upon the Hepatitis B surface antigen gene expression and cell proliferation in human hepatoma cells. *Endocrinology* 136:2922-2927.
161. Thomas, S. M., and J. S. Brugge. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:513-609.
162. Ingley, E. 2008. Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* 1784:56-65.
163. Parsons, S. J., and J. T. Parsons. 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23:7906-7609.
164. Brown, M. T., and J. A. Cooper. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287:121-149.
165. Roskoski Jr., R. 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324:1155-1164.
166. Yeatman, T. J. 2004. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4:470-80.
167. Boggon, T. J., and M. J. Eck. 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23:7918-7927
168. Schwartzberg, P. L. 1998. The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* 17:1463-1468.
169. Tatosyan, A. G., and O. A. Mizenina. 2000. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 65:49-58.
170. Bjorge, J. D., A. Jakymiw, and D. J. Fujita. 2000. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19:5620-5635.
171. Xu, W., S. C. Harrison, and M. J. Eck. 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385:595-602.
172. Sicheri, F., I. Moarefi, and J. Kuriyan. 1997. The crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385:602-609.
173. Williams, J. C., R. K. Wierenga, and M. Saraste. 1998. Insights into Src kinase functions: structural comparisons. *Trends Biochem Sci* 23:179-184.
174. Blume-Jensen, P., and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-365.
175. Okada, M., S. Nada, Y. Yamanashi, T. Yamamoto, and H. Nakagawa. 1991. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J Biol Chem* 266:24249-24252.
176. Nada, S., M. Okada, A. MacAuley, J. A. Cooper, and H. Nakagawa. 1991. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosin kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 351:69-72.
177. Martin, G. S. 2001. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:467-475.
178. Rous, P. A. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cell. *J Exp Med* 13:397-411.

179. Czernilofsky, A. P., A. D. Levinson, H. E. Varmus, J. M. Bishop, E. Tischer, and H. Goodman. Corrections to the nucleotide sequence of the src gene of Rous sarcoma virus. *Nature* 301:736-738.
180. Martin, G. S. 2004. The road to Src. *Oncogene* 23:7910-7917.
181. Takeya, T., and H. Hanafusa. 1982. DNA sequence of the viral and cellular src gene of chickens. II. Comparisons of the src genes of two strains of avian sarcoma virus and of the cellular homolog. *J Virol* 44:12-18.
182. Irby, R. B., and T. J. Yeatman. 2000. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19:5636-5642.
183. Irby, R. B., W. Mao, D. Coppola, J. Kang, J. M. Loubeau, W. Trudeau, R. Karl, D. J. Fujita, R. Jove, and T. J. Yeatman. 1999. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* 21:187-190.
184. Sugimura, M., K. Kobayashi, S. Sagae, Y. Nishioka, S. Ishioka, K. Terasawa, T. Tokino, and R. Kudo. 2000. Mutation of the SRC gene in endometrial carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 91:395-398.
185. Goodsell, D. S. 2001. The molecular perspective: The src oncogene. *Oncologist* 6:474-476.
186. Soriano, P., C. Montgomery, R. Geske, and A. Bradley. 1991. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64:693-702.
187. Cooper, J. A., and B. Howell. 1993. The when and how of src regulation. *Cell* 73:1051-1054.
188. Collette, Y., and D. Olive. 1997. Non-receptor protein tyrosine kinases as immune targets of viruses. *Immunol Today* 18:393-400.
189. Klein, N. P., M. J. Bouchard, L. H. Wang, C. Kobarg, and R. J. Schneider. 1999. Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *EMBO J* 18:5019-5027.
190. Saksela, K. 1997. HIV-1 Nef and host cell protein kinases. *Front Biosci* 2:d606-618.
191. Liang Y., and B. Roizmann. 2006. State and role of src family kinases in replication of herpes simplex virus 1. *J Virol* 80:3349-3359.
192. Chu, J. J. H., and P. L. Yang. c-src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus. *PNAS* 104:3520-3525.
193. Hirsch, A. J., G. R. Medigeshi, H. L. Meyers, V. DeFilippis, K. Früh, T. Briese, W. I. Lipkin, and J. A. Nelson. 2005. The src family kinase c-yes is required for maturation of west nile virus particles. *J Virol* 79:11943-11951.
194. MacDonald, A., K. Crowder, A. Street, C. McCormick, and M. Harris. 2004. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J Gen Virol* 85:721-729.
195. Waris, G., J. Turkson, T. Hassanein, and A. Siddiqui. 2005. Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: role of STAT-3 in HCV replication. *J Virol* 79:1569-1580.
196. Nanda, S. K., D. Herion, and T. J. Liang. 2006. Src homology 3 domain of hepatitis C virus NS5A protein interacts with Bin1 and is important for apoptosis and infectivity. *Gastroenterology* 130:794-809.
197. Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato. 1982. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42:3858-3863.
198. Frese, M., K. Barth, A. Kaul, V. Lohmann, V. Schwärzle, and R. Bartenschlager. 2003. Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumor necrosis factor- α . *J Gen Virol* 84: 1253-1259.
199. Wickham, T. J., T. Davis, R. R. Granados, M. L. Shuler, and H. A. Wood. 1992. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog* 8: 391-396.
200. Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, G. J. Tompkins, and P. McCawley. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13:213-217.

201. Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1988. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
202. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1996. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, New York* 3rd Edition.
203. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
204. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
205. Kaelin, W. G., D. C. Pallas, J. A. DeCaprio, F. J. Kaye, and D. M. Livingston. 1991. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64:521-532.
206. Tessmann, K., A. Erhardt, D. Häussinger, and T. Heintges. 2001. Cloning and characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol Methods* 103:75-88.
207. Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco, and F. A. Rey. 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13034-13039.
208. Qin, W., T. Yamashita, Y. Shirota, Y. Lin, W. Wei, and S. Murakami. 2001. Mutational analysis of the structure and functions of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Hepatology* 33:728-737.
209. Vieira, J., and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153:3-11.
210. Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok, and P. A. Connelly. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271:695-701.
211. Blake, R. A., M. A. Broome, X. Liu, J. Wu, M. Gishizky, L. Sun, and S. A. Courtneidge. 2000. SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 20:9018-9027.
212. Fukazawa, H., P. M. Li, C. Yamamoto, Y. Murakami, S. Mizuno, and Y. Uehara. 1991. Specific inhibition of cytoplasmic protein tyrosine kinases by herbimycin A in vitro. *Biochem Pharmacol* 42:1661-1671.
213. Bonny, C., A. Oberson, S. Negri, C. Sauser, and D. F. Schorderet. 2001. Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50:77-82.
214. Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, and Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595.
215. Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Keys, S. W. Landvatter, J. E. Strickler, M. M. McLaughlin, I. R. Siemens, S. M. Fisher, G. P. Livi, J. R. White, J. L. Adams, and P. R. Young. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739-746.
216. Pang, L., T. Sawada, S. J. Decker, and A. R. Saltiel. 1995. Inhibition of MAP kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J Biol Chem* 270:13585-13588.
217. Haystead, T. A., A. T. Sim, D. Carling, R. C. Honnor, Y. Tsukitani, P. Cohen, and D. G. Hardie. 1989. Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337:78-81.
218. Aruoma, O. I., B. Halliwell, B. M. Hoey, and J. Butler. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6:593-597.

219. Rondon, I. J., and W. A. Marasco. 1997. Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases. *Annu Rev Microbiol* 51:257-283.
220. Marasco, W. A., J. LaVeccio, and A. Winkler. 1999. Human anti-HIV-1 tat sFv intrabodies for gene therapy of advanced HIV-1-infection and AIDS. *J Immunol Methods* 231:223-238.
221. Peterson, E., S. M. Owens, and R. L. Henry. 2006. Monoclonal antibody form and function: manufacturing the right antibodies for treating drug abuse. *AAPS J* 8:E383-390.
222. Skerra, A., and A. Plückthun. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 20:1038-1041.
223. Kabat, E. A., T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, and C. Foeller. 1991. Sequences of proteins of immunological interest. 5th edn. Bethesda, MD: National Technical Information.
224. Martin, A. C. 1996. Accessing the Kabat antibody sequence database by computer. *Proteins* 25:130-133.
225. Häussinger, D. and F. Schliess. 1999. Osmotic induction of signaling cascades: role in regulation of cell function. *Biochem Biophys Res Commun* 255:551-555.
226. Schliess, F. and D. Häussinger. 2007. Osmosensing by integrins in rat liver. *Methods Enzymol* 428:129-144.
227. Reinehr, R., D. Graf, R. Fischer, F. Schliess and D. Häussinger. 2002. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 36:602-614.
228. Schäfer, C., L. Hoffmann, K. Heldt, M. R. Lornejad-Schäfer, G. Brauers, T. Gehrmann, T. A. Garrow, D. Häussinger, E. Mayatepek, B. C. Schwahn, and F. Schliess. 2007. Osmotic regulation of betaine homocysteine-S-methyltransferase expression in H4IIE rat hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1089-1098.
229. Harris, D., Z. Zhang, B. Chaubey, and V. N. Pandey. 2006. Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol Cell Proteomics* 5:1006-1018.
230. Mannova, P., R. Fang, H. Wang, B. Deng, M. W. McIntosh, S. M. Hanash, and L. Beretta. 2006. Modification of host lipid raft proteome upon hepatitis C virus replication. *Mol Cell Proteomics* 5:2319-2325.
231. Ng, T. I., H. Mo, T. Pilot-Matias, Y. He, G. Koev, P. Krishnan, R. Mondal, R. Pithawalla, W. He, T. Dekhtyar, J. Packer, M. Schurdak, and A. Molla. 2007. Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology. *Hepatology* 45:1413-1421.
232. Duncan, R. F. 2005. Inhibition of Hsp90 function delays and impairs recovery from heat shock. *FEBS J* 272:5244-5256.
233. Nakagawa, S., T. Umehara, C. Matsuda, S. Kuge, M. Sudoh, and M. Kohara. 2007. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochem Biophys Res Commun* 353:882-888.
234. Oppermann, H., W. Levinson, and J. M. Bishop. 1981. A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1067-1071.
235. Stancato, L. F., A. M. Silverstein, J. K. Owens-Grillo, Y. H. Chow, R. Jove, and W. B. Pratt. 1997. The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J Biol Chem* 272:4013-4020.
236. Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351-1362.
237. Kim, S. J., J. H. Kim, Y. G. Kim, H. S. Lim, and J. W. Oh. 2004. Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* 279:50031-50041.
238. Ishido, S., T. Fujita, and H. Hotta. 1998. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 244:35-40.

239. Yamashita, T., S. Kaneko, Y. Shiota, W. Qin, T. Nomura, K. Kobayashi, and S. Murakami. 1998. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *J Biol Chem* 273:15479-15486.
240. Lin, C., J. W. Wu, K. Hsiao, and M. S. Su. 1997. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol* 71:6465-6471.
241. Shiota, Y., H. Luo, W. Qin, S. Kaneko, T. Yamashita, K. Kobayashi, and S. Murakami. 2002. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 277:11149-11155.
242. Ikeda, M., M. Yi, K. Li, and S. M. Lemon. 2002. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 76:2997-3006.
243. Hirano, M., S. Kaneko, T. Yamashita, H. Luo, W. Qin, Y. Shiota, T. Nomura, K. Kobayashi, and S. Murakami. 2003. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem* 278:5109-5115.
244. Qin, W., H. Luo, T. Nomura, N. Hayashi, T. Yamashita, and S. Murakami. 2002. Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 277:2132-2137.
245. Miller, C. L., A. L. Burkhardt, J. H. Lee, B. Stealey, R. Longnecker, J. B. Bolen, and E. Kieff. 1995. Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 2:155-166.
246. Saksela, K., G. Cheng, and D. Baltimore. 1995. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef⁺ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.* 14:484-491.
247. Briggs, S. D., E. C. Lerner, and T. E. Smithgall. 2000. Affinity of Src family kinase SH3 domains for HIV Nef in vitro does not predict kinase activation by Nef in vivo. *Biochemistry*. 39:489-495.
248. Ferraro, E., D. Peluso, A. Via, G. Ausiello, and M. Helmer-Citterich. 2007. SH3-Hunter: discovery of SH3 domain interaction sites in proteins. *Nucleic Acids Res.* 35:W451-454.
249. Brenndörfer, E. D.. 2008. Modulation der intrahepatischen Signalvermittlung durch die NS3/4A Protease/Helikase des Hepatitis C Virus. Dissertation der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
250. Wang, Q., D. Rajshankar, D. R. Branch, K. Siminovitch, M. T. Herrera Abreu, G. P. Downey, and C. A. McCulloch. 2009. Protein tyrosine phosphatase-alpha and Src functionally link focal adhesions to the endoplasmic reticulum to mediate IL-1 induced Ca²⁺ signalling. *J Biol Chem*. Jun 3 [Epub ahead of print].
251. Lin, C., C. A. Gates, B. G. Rao, D. L. Brennan, J. R. Fulghum, Y. P. Luong, J. D. Frantz, K. Lin, S. Ma, Y. Y. Wei, R. B. Perni, and A. D. Kwong. 2005. In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. *J Biol Chem* 280:36784-36791.
252. Tomei, L., S. Altamura, G. Paonessa, R. De Francesco, and G. Migliaccio. 2005. HCV antiviral resistance: the impact of in vitro studies on the development of antiviral agents targeting the viral NS5B polymerase. *Antivir Chem Chemother* 16:225-245.
253. De Francesco, R. and C. Carfi. 2007. Advances in the development of new therapeutic agents targeting the NS3-4A serine protease or the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev* 59:1242-1262.
254. Souriau, C. and P. J. Hudson. 2003. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin Biol Ther* 3:305-318.

255. Azzazy, H. M. and W. E. Highsmith Jr.. 2002. Phage Display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 35:425-445.
256. Larson, S. M., A. M. El-Shirbiny, C. R. Divgi, G. Squoros, R. D. Finn, J. Tschmelitsch, A. Picon, M. Whitlow, J. Schlom, J. Zhang, and A. M. Cohen. 1997. Single chain antigen binding protein (sFv CC49): first human studies in colorectal carcinoma metastatic to liver. *Cancer* 80:2458-2468.
257. Fitch, J. C., S. Rollins, L. Matis, B. Alford, S. Aranki, C. D. Collard, M. Dewar, J. Elefteriades, R. Hines, G. Kopf, P. Kraker, L. Li, R. O'Hara, C. Rinder, H. Rinder, R. Shaw, B. Smith, G. Stahl, and S. K. Shernan. 1999. Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation* 100:2499-2506.
258. Sullivan, D. E., M. U. Mondelli, D. T. Curiel, V. Krasnykh, G. Mikheeva, P. Gaglio, C. B. Morris, S. Dash, and M. A. Gerber. 2002. Construction and characterization of an intracellular single-chain human antibody to hepatitis C virus non-structural 3 protein. *J Hepatol* 37:660-668.
259. Zhong Y. W., J. Cheng, G. Wang, S. S. Shi, L. Li, L. X. Zhang, and J. M. Cheng. 2002. Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its identification in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 8:863-867.
260. Cárcamo, J., M. W. Ravera, R. Brissette, O. Dedova, J. R. Beasley, A. Alam-Moghé, C. Wan, A. Blume, and W. Mandecki. 1998. Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11146-11151.
261. de Bruin, R., K. Spelt, J. Mol, R. Koes, and F. Quattocchio. 1999. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat Biotechnol* 17:397-399.
262. Tur, M. K., M. Huhn, S. Sasse, A. Engert, and S. Barth. Selection for scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. *Biotechniques* 30:404-408.
263. Hust, M. and S. Dübel. 2005. Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments. *Methods Mol Biol* 295:71-96.
264. Karthe, J., K. Tessmann, J. Li, R. Machida, M. Daleman, D. Häussinger, and T. Heintges. 2008. Specific targeting of hepatitis C virus core protein by an intracellular single-chain antibody of human origin. *Hepatology* 48:702-712.
265. Winter, G., A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, and H. R. Hoogenboom. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12:433-455.
266. Charlton, K. A.. 2004. Expression and isolation of recombinant antibody fragments in *E. coli*. *Methods Mol Biol* 248:245-254.
267. Seehaus, T., F. Breitling, S. Dübel, I. Klewinghaus, and M. Little. 1992. A vector for the removal of deletion mutants from antibody libraries. *Gene* 114:235-237.
268. Courtney, B. C., K. C. Williams, and J. J. Schlager. 1995. A phage display vector with improved stability, applicability and ease of manipulation. *Gene* 165:139-140.
269. Dziegiel, M., L. K. Nielsen, P. S. Andersen, A. Blancher, E. Dickmeiss, and J. Engberg. 1995. Phage display used for gene cloning of human recombinant antibody against the erythrocyte surface antigen, rhesus D. *J Immunol Methods* 182:7-19.
270. Kipriyanov, S. M., G. Moldenhauer, and M. Little. 1997. High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *J Immunol Methods* 200:69-77.
271. Wälchli, S., X. Espanel, A. Harrenga, M. Rossi, G. Cesareni, and R. Hooft van Huijsduijnen. 2004. Probing protein-tyrosine phosphatase substrate specificity using a phosphotyrosine-containing phage library. *J Biol Chem* 279:311-318.
272. Poznansky, M. C., R. Foxall, A. Mhashikar, R. Coker, S. Jones, U. Ramstedt, and W. Marasco. 1998. Inhibition of human immunodeficiency virus replication and growth advantage of CD4+ T cells from HIV-infected individuals that express intracellular antibodies against HIV-1 gp120 or Tat. *Hum Gene Ther* 9:487-496.

273. Marasco, W. A., J. LaVecchio, and A. Winkler. 1999. Human anti-HIV-1 tat sFv intrabodies for gene therapy of advanced HIV-1-infection and AIDS. *J Immunol Methods* 231:223-238.
274. Mhashilkar, A. M., J. LaVecchio, B. Eberhardt, J. Porter-Brooks, S. Boisot, J. H. Dove, C. Pumphrey, X. Li, R. N. Weissmahr, D. B. Ring, U. Ramstedt, and W. A. Marasco. 1999. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro in acutely and persistently infected human CD4+ mononuclear cells expressing murine and humanized anti-human immunodeficiency virus type 1 Tat single-chain variable fragment intrabodies. *Hum Gene Ther* 10:1453-1467.
275. Kitamura, Y., T. Ishikawa, N. Okui, N. Kobayashi, T. Kanda, T. Shimada, K. Miyake, and K. Yoshiike. 1999. Inhibition of replication of HIV-1 at both early and late stage of the viral life cycle by single-chain antibody against viral integrase. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20:105-114.
276. BouHamdan, M., L. X. Duan, R. J. Pomerantz, and D. S. Strayer. 1999. Inhibition of HIV-1 by an anti-integrase single-chain variable fragment (SFv): delivery by SV40 provides durable protection against HIV-1 and does not require selection. *Gene Ther* 6:660-666.
277. Goncalves, J., F. Silva, A. Freitas-Vieira, M. Santa-Marta, R. Malhó, X. Yang, D. Gabuzda, and C. Barbas 3rd. 2002. Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication. *J Biol Chem* 277:32036-32045.
278. Jean, D., C. Tellez, S. Huang, D. W. Davis, C. J. Bruns, D. J. McConkey, S. H. Hinrichs, and M. Bar-Eli. 2000. Inhibition of tumor growth and metastasis of human melanoma by intracellular anti-ATF-1 single chain Fv fragment. *Oncogene* 19:2721-2730.
279. Jendreyko, N., M. Popkov, C. Rader, and C. F. Barbas 3rd. 2005. Phenotypic knockout of VEGF-R2 and Tie-2 with an intradiabody reduces tumor growth and angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8293-8298.
280. Alvarez, R. D., M. N. Barnes, J. Gomez-Navarro, M. Wang, T. V. Strong, W. Arafat, R. B. Arani, M. R. Johnson, B. L. Roberts, G. Siegal, and D. T. Curiel. 2000. A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin Cancer Res* 6:3081-3087.

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, die wertvollen Anregungen und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dieter Willbold bedanke ich mich außerordentlich für die Übernahme der Betreuung meiner Promotion als Gutachter in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät und für die Bereitstellung der GST-Fusionskonstrukte.

Herrn Prof. 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.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Experimentellen Hepatologie für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken. Für das besonders freundschaftliche Miteinander möchte ich Andreas Pfannkuche danken.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben, meinem Bruder für die Korrektur der vorliegenden Arbeit und meinem Freund Udo Schwegmann für seine Geduld mit mir.

9. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Katrin Büther
Geburtstag	16.01.1978
Geburtsort	Ochtrup
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schul Ausbildung

1984-1988	Marienschule Ochtrup
1988-1997	Städtisches Gymnasium Ochtrup

Studium

1997-2003	Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
davon 2002/2003	Diplomarbeit zum Thema „Molekulare Charakterisierung des KIBRA-Proteins und seiner Interaktionspartner“ in der Abteilung für Experimentelle Tumorbologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Promotion

2004-2009	Promotion zum Thema „Interaktion von c-Src mit der viralen Polymerase NS5B des Hepatitis C Virus und Generierung NS5B-spezifischer humaner Antikörperfragmente“ 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, 20.10.2009

Katrin Büther