

HCV interferiert mit Ack1-abhängigen Signalwegen durch Herabregulation der TC-PTP

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Patricia Cebula

aus Peiskretscham

Düsseldorf, Mai 2011

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: Prof. Dr. Johannes G. Bode
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2011

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht

in Originalarbeiten

Brenndörfer E.D., Karthe J., Frelin L., **Cebula P.**, Erhardt A., Schulte am Esch J., Hengel H., Bartenschlager R., Sällberg M., Häussinger D., Bode J.G. (2009) *The non-structural 3/4A protease of HCV activates EGF-induced signal-transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase*. Hepatology 49(6): 1810-1820

als Posterbeiträge

Albrecht U, **Cebula P.**, Häussler J, Bode JG, Parlesak A. *Polar differentiation is essential for interleukin-6 induced activation of STAT3 in intestinal epithelia cells*. 10th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), November 2006, Weimar.

Brenndörfer E.D., Karthe J., Frelin L., **Cebula P.**, Erhardt A., Sällberg M., Häussinger D., Bode J.G. *The hepatitis C virus non-structural 3/4A protease interferes with EGF-induced signal-transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase*. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oktober 2008, San Antonio, USA

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

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Das Hepatitis C Virus	1
1.1.1. Taxonomie des Hepatitis C Virus	1
1.1.2. Genomorganisation des Hepatitis C Virus	2
1.1.3. Der NS3/4A-Komplex	4
1.1.4. Der Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis C Virus	8
1.1.5. Interferenz von HCV mit der hepatozellulären Apoptose	11
1.1.6. Therapie einer Hepatitis C Virus Infektion	15
1.1.7. Modellsysteme zur Untersuchung des Hepatitis C Virus	17
1.2. Die EGFR-Familie	25
1.3. Ack1	28
1.4. Zielsetzung der Arbeit	32
2. Material und Methoden	33
2.1. Material, Substanzen und Lösungen	33
2.1.1. Materialien für die Zellkultur	33
2.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze	33
2.1.3. Reagenzien und Feinchemikalien	34
2.1.4. Reaktionskits	34
2.1.5. PCR und Klonierung	35
2.1.6. Bakterienstämme	35
2.1.7. Zelllinien	36
2.1.8. Oligonukleotide	36
2.1.9. Plasmide	38
2.1.10. Primärantikörper und Sekundärantikörper	38

2.2. Methoden	40
2.2.1. Zellbiologische Methoden	40
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	44
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	52
2.2.4. Generierung stabiler Zelllinien	57
2.2.5. Generierung des <i>Targeting</i>-Vektors	59
2.2.6. Statistische Auswertung	61
3. Ergebnisse	62
3.1. Etablierung von Systemen für die HCV-Forschung	62
3.1.1. Generierung der Zelllinien	63
3.1.2. Vorarbeiten zur Generierung einer konditionalen, transgenen NS3/4A Maus	67
3.2. Funktionelle Untersuchung der generierten stabilen Zelllinien	74
3.2.1. Untersuchungen zur Apoptoseinduktion in Hepatomazelllinien	74
3.2.2. Identifizierung einer kreuzreaktiven Bande in verschiedenen HCV-Systemen	79
3.2.3. Datenbankanalyse	81
3.3. Funktionelle Untersuchungen von Ack1 in HCV-System	83
4. Diskussion	95
4.1. Generierung und Charakterisierung von Systemen für die HCV- Forschung	95
4.2. Einfluss von HCV auf die TNFα-vermittelter Apoptose	98
4.3. Einfluss von HCV auf die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Ack1	102
5. Zusammenfassung	107
6. Summary	109
7. Literaturverzeichnis	111
Danksagung	127
Lebenslauf	128

Abbildungsverzeichnis**1. Einleitung**

1.1.	Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des Hepatitis C Virus	5
1.2.	Modell des HCV-Eintritts in die Wirtszelle	11
1.3.	Zusammenfassende Darstellung des Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis C Virus	10
1.4.	Der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose	13
1.5.	Modellsysteme zur Analyse des HCV Infektionszyklus	18
1.6.	Cre/loxP-vermittelte Exzision von DNA	24
1.7.	Zusammenfassende schematische Darstellung der EGFR-Familie und durch den EGFR-regulierter downstream Signalkaskaden	27
1.8.	Strukturelle Organisation von Ack1	29

3. Ergebnisse

3.1.	Biochemische Charakterisierung der generierten, stabilen Zelllinien	64
3.2.	Konfokale lasermikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von HCV Core bzw. NS3 und dem Ha-Tag in den generierten, stabilen Hepatoma Zelllinien	65
3.3.	Western Blot-Analyse der monoklonalen Zellkulturen	66
3.4.	Strategie für die Generierung der konditionalen, transgenen HCV NS3/4A-Maus	69
3.5.	Sondentest der 5-flankierenden Southernsonde	70
3.6.	Strategie der in vitro Cre-vermittelten Rekombination des konditionalen HVC NS3/4A-Targeting-Konstrukts	71
3.7.	Gewebe- und Zeit-spezifische Expression von HCV NS3/4A in der Maus	73
3.8.	Untersuchung der Aktivierung von Caspasen	75
3.9.	Proteolytische Prozessierung von PARP nach Stimulation mit TNF α und TNF α /IFN γ	76
3.10.	Prozessierung von Caspase-3 und PARP in der Hepatoma Zelllinie Huh7 wt und Huh 9-13	78
3.11.	Detektion eines Bandenmusters mittels des Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers pTyr ⁷⁰⁵ STAT3	80

3.12.	Kopräzipitation des unbekannten Phosphoproteins mit dem Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörper.....	81
3.13.	Schematische Darstellung der für die Datenbankanalyse verwendeten Aminosäuresequenz des STAT3-Proteins.....	82
3.14.	Nachweis der konstitutiven Phosphorylierung von Ack1 in HCV Proteine enthaltenden Zellen.....	84
3.15.	Keine veränderte mRNA-Expression von Ack1 in subgenomischen HCV-Replikonzellen.....	85
3.16.	TC-PTP hemmt die Tyrosinphosphorylierung von Ack1 am Motiv 757/758.....	86
3.17.	Erhöhter Proteinlevel von Nedd4 in Huh 9-13-Zellen.....	87
3.18.	Herabregulation der ErbB3-Proteinmenge durch das HCV-Replikon.....	88
3.19.	HCV verstärkt die basale sowie die EGF-induzierte Ack1-Phosphorylierung.....	89
3.20.	Die HCV-vermittelte konstitutive Ack1-Phosphorylierung ist partiell abhängig von der Aktivität der EGFR-Kinase.....	90
3.21.	Keine Beeinflussung der HCV Replikation durch den siRNA-vermittelten Knockdown der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Ack1.....	91
3.22.	FACS-Analyse zur Bestimmung der EGF-induzierten Internalisierung von EGFR unter konstitutiver Phosphorylierung von Ack1.....	93
3.23.	Erhöhter Proteinlevel von Cdc42 sowohl in NS3/4A-exprimierenden HepG2 Zellen als auch in subgenomischen HCV-Replikonzellen.....	94

Tabellenverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Transgene Mäuse, die HCV-Gene exprimieren	21
--	----

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Zelllinien	36
2.2. Verwendete Oligonukleotide für PCR	36
2.3. Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung des <i>Targeting</i> -Vektors und der Sonden zur Detektion positiver Klone	37
2.4. Verwendete Oligonukleotide für die Real-Time-PCR	37
2.5. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	38
2.6. Kultivierungsmedien für Zellen und Zelllinien	40
2.7. Transfektion von siRNA	43
2.8. Verwendete Fluorophore	55

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der NCBI-Datenbanksuche (BlastP)	82
--	----

Abkürzungsverzeichnis

Ack1	<i>activated cdc42-associated kinase 1</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
Asp	Asparaginsäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CARD	caspase recruitment domain
CARDIF	<i>CARD adaptor inducing IFNβ</i>
cdc42	<i>cell division control protein 42</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CRIB	<i>Cdc42/Rac interactive binding</i>
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
DGalN	D-Galaktosamin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	embryonalen Fibroblasten
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMCV	Encephalomyokarditis-Virus
ER	endoplasmatisches Retikulum
ErbB	<i>avian erythroblastosis oncogene B</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ES	embryonale Stammzellen
FADD	<i>Fas-associated death domain-containing protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat

GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Gly	Glycin
HA	Hämagglutinin
HCV	Hepatitis C Virus
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
His	Histidin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
JCRB	<i>Japanese Collection of Research Bioresources</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
LB	<i>Luria-broth</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
Mig6	<i>Mitogen-inducible gene 6</i>
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Neo	Neomycinphosphotransferase
NEAS	Non-Essential Amino Acids
nm	Nanometer
NS	nichtstrukturell
NTK	Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase
NTR	nichttranslatierte Region
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p-	Phospho-
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rezeptor
RIP	<i>receptor-interacting factor</i>
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
sec	Sekunde
Ser	Serin
SD	<i>standard deviation</i>
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	Src-Homologie
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TC-PTP	<i>T-cell protein tyrosine phosphatase</i>
Thr	Threonin
TK	Thymidinkinase
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRADD	<i>TNF-receptor-associated death domain</i>
TRAF	TNF receptor associated protein
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TLP	Triton-Lysispuffer
Tris	Trishydroxy-Aminoethan
Tyr	Tyrosin
UTR	untranslatierte Region
U	unit(s)
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/o	ohne
wt	Wildtyp

X-Gal	5-Brom 4-Chlor-3-indolyl β -D-Galaktopyranosid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel

Die Standardeinheiten des SI-Systems wurden nicht aufgenommen. Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt.

1. Einleitung

1.1. Das Hepatitis C Virus

Bis 1988 kannte man nur das Hepatitis A-Virus und das Hepatitis B-Virus, die für weit mehr als die Hälfte der viral verursachten Leberentzündungen verantwortlich waren. Allerdings gab es auch einige Verlaufsformen der Leberentzündung, die sich von der Hepatitis A und B unterschieden. Bereits in den 1970ern postulierte Prince *et al.* die Existenz eines weiteren infektiösen Agens als Erreger der Non-A-Non-B-Hepatitis ^[1]. Erst 1989 gelang es Choo *et al.* durch die Klonierung und Charakterisierung eines Genomfragmentes (5-1-1) aus dem Serum eines Non-A-Non-B-Hepatitis infizierten Schimpansen das Hepatitis C Virus (HCV) als neuen Erreger zu identifizieren ^[2]. Die Hepatitis C Virusinfektion stellt heute ein globales Problem dar. Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gelten rund 170 Millionen Menschen als chronisch infiziert ^[3], was einer Prävalenz von etwa 3 % entspricht ^[4].

1.1.1. Taxonomie des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist bislang der einzig bekannte Vertreter des Genus Hepacivirus innerhalb der Familie der Flaviviridae. Letztere beinhalten auch die Genera Flavivirus und Pestivirus. Zu den Flaviviren zählt man unter anderem das Gelbfieberevirus und weitere humanpathogene Erreger, wie die Dengue-Viren. Durch die Vertreter des zweiten Genus Pestivirus werden schwere Tierseuchen hervorgerufen: Dazu gehören unter anderem das Bovine Virus-Diarrhöe Virus (BVDV) und das Virus der klassischen Schweinepest (CSF, *classical swine fever virus*).

HCV weist eine hohe genetische Diversität auf. Zugrunde liegend sind die fehlenden Korrekturmechanismen (3'→5'-Exonukleaseaktivität) der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase bei gleichzeitig hoher viraler Replikationsrate ^[5]. Die durchschnittliche Mutationswahrscheinlichkeit variiert von etwa $1,4 \times 10^3$ bis $1,9 \times 10^3$ Austauschen pro Nukleotid und pro Jahr ^[6]. Die genetische Diversität des HCV führt zu einer Klassifizierung in sechs verschiedene Genotypen (1-6), Subtypen (a-b), Isolaten und Quasispezies ^[7]. Die Genotypen und Subtypen zeigen zudem eine geographische und epidemiologische Verteilung: So findet man in Nordamerika und Mitteleuropa vorwiegend die Genotypen 1, 2 und 3, in Afrika den Genotyp 4. In Deutschland liegt überwiegend eine Infektion mit Subtyp 1b (44 %) und bei jüngeren Patienten zunehmend Subtyp 1a (36 %) und 3a (13 %) vor ^[8].

1.1.2. Genomorganisation des Hepatitis C Virus

Die infektiösen Viruspartikel des HCV haben einen Durchmesser von 40-70 nm. Sie bestehen aus einer Hüllmembran, in die virale Glykoproteine eingelagert sind, und einem Kapsid, das das virale Genom enthält. Das einzelsträngige RNA-Genom positiver Polarität hat eine Länge von ungefähr 9600 Basen. Das RNA Genom wird von den 5'- und 3'-nichttranslatierten Regionen (NTRs) flankiert und kodiert für einen einzigen offenen Leserahmen (ORF – *open reading frame*). Ein zweites Translationsprodukt, das *frame shift* (F) -Protein kann durch ribosomale Leserahmenverschiebung entstehen. Die Rolle dieses Proteins im viralen Lebenszyklus ist bisher ungeklärt ^[9]. Die ca. 340 Nukleotide umfassende NTR am 5'-Ende ist hochkonserviert und bildet durch komplementäre Basenpaarung mehrere stabile Sekundärstrukturen. Sie fungiert als interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), an der die Translation startet ^[10, 11]. Die 3'-NTR besteht aus drei Abschnitten ^[12-14]: auf das Stop-Codon des ORF folgt eine variable Sequenz, daran schließen sich ein poly(U)-Abschnitt von variabler Länge (20 bis 90 Nukleotide) sowie eine hochkonservierte Sequenz von 98 Nukleotiden an. Letztere ist essentiell für die Replikation ^[15]. Der offene Leserahmen kodiert ein lineares Vorläuferprotein von ungefähr 3000 Aminosäuren. Die Prozessierung in die einzelnen, funktionell aktiven, vier strukturellen und sechs nichtstrukturellen Proteine erfolgt sowohl ko- als auch posttranslationell durch zelluläre und virale Proteinasen (Abbildung 1.1). Eine zelluläre Proteinase, die Signalpeptidase (Signalase) des Endoplasmatischen Retikulums (ER), spaltet das Polyprotein im aminoterminalen Bereich an vier Erkennungsstellen und führt zur Freisetzung der vier Strukturproteine Core, E1, E2 und p7. Das RNA-bindende Protein Core bildet das virale Nukleokapsid. Die viralen Hüllproteine E1 und E2 sind glykosyliert und in der Lipidmembran des Virus verankert. Die beiden Glykoproteine sind sowohl bei der Bindung an Wirtszellrezeptoren, als auch bei der Fusion mit der Wirtszellmembran beteiligt und nehmen daher eine zentrale Rolle beim Viruseintritt des Hepatitis C Virus ein ^[16, 17]. Die Funktion des Proteins p7 hingegen ist nicht abschließend geklärt. Strukturanalysen weisen auf einen hydrophoben Membranankerabschnitt hin, dem sich eine zytoplasmatische Region anschließt und lassen auf die Funktion eines Ionenkanals schließen. Des Weiteren legen Untersuchungen an Schimpansen nahe, dass p7 essentiell für die Infektiosität des Virus ist ^[18].

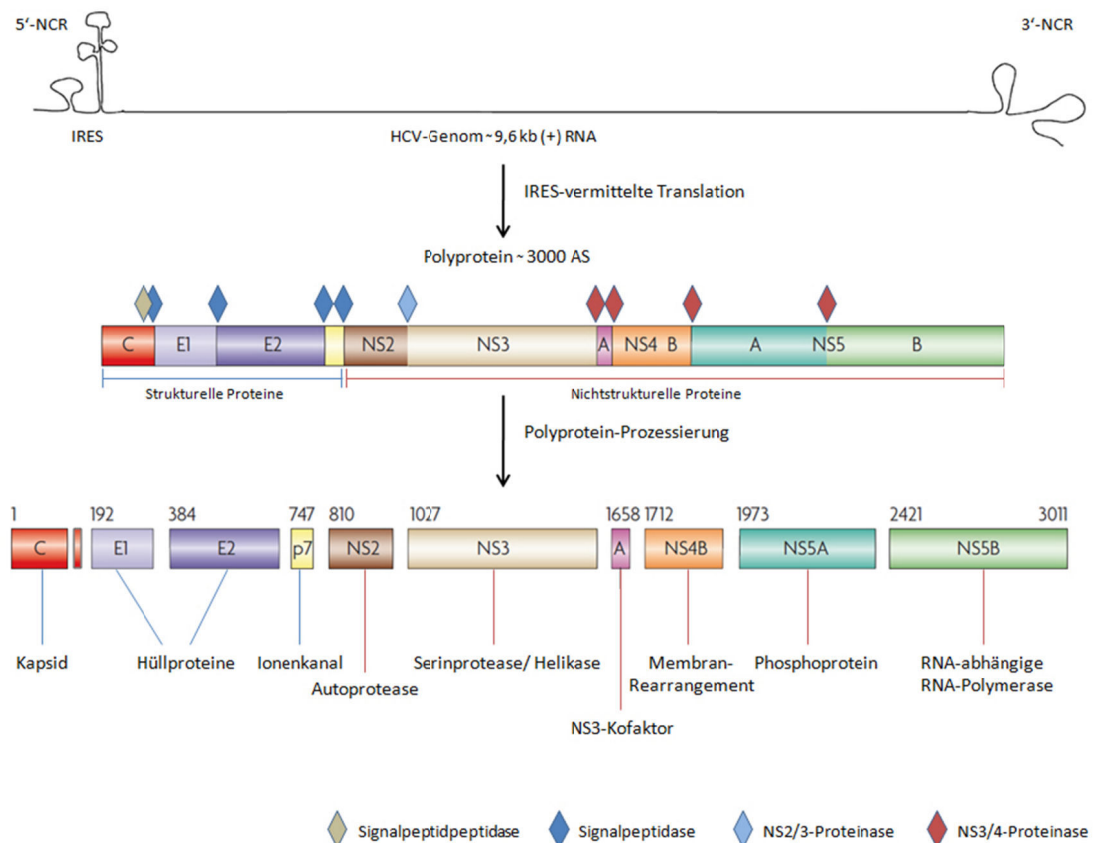


Abbildung 1.1 Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des Hepatitis C Virus. Das HCV umfasst ein 9,6 kb (+) RNA-Genom. Die IRES-vermittelte Translation führt zur Bildung eines ca. 3000 Aminosäuren langen Polyproteins, das anschließend durch zelluläre und virale Proteasen prozessiert wird. Es entstehen vier strukturelle (Core, E1, E2, p7) und sechs nichtstrukturelle (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) Proteine. Abkürzungen: IRES: *internal ribosome entry site*; NCR: *noncoding region*; E1/2: *envelope*; NS: *nonstructural*; HCV: Hepatitis C Virus (modifiziert nach Moradpour *et al.* [6]).

Zwei Virus-kodierende Proteinasen (NS2-NS3 und NS3) vermitteln die Prozessierung der nichtstrukturellen Proteine aus dem Vorläuferprotein [19]. Die Zink-abhängige Autoprotease NS2-NS3 spaltet zwischen NS2 und NS3, die NS3 Serinprotease vermittelt die Prozessierung der Proteine NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Das Protein NS2 ist ein nichtglykosyliertes, integrales Membranprotein, dessen einzige bisher bekannte Funktion die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins von HCV ist. Kürzlich publizierte Daten weisen NS2 weitere putative Funktionen im Bereich des Zusammenbaus und der Freisetzung der Viruspartikel zu [20]. Das NS3-Protein ist multifunktionell: N-terminal befindet sich eine Serinprotease, deren Aktivität durch den Kofaktor NS4A verstärkt wird. Der C-Terminus besitzt eine RNA-Helikase und eine NTPase-Domäne. Das NS3-Protein interagiert mit NS4A und bildet ein Heterodimer, das für die nachfolgende Prozessierung der von NS3 *downstream* gelegenen

nichtstrukturellen Proteine verantwortlich ist. Der NS3/4A-Komplex ist essentiell für die Bildung des viralen RNA-Replikationskomplexes ^[21]. Das NS4A-Protein fungiert nicht nur als essentieller Kofaktor der NS3 Protease, sondern ist auch wichtig für die Membranassoziation des NS3/4A-Komplexes an das ER (Endoplasmatisches Retikulum) ^[22]. Das nichtstrukturelle Protein NS4B induziert intrazelluläre Membranänderungen, die zur Ausbildung spezieller Membranstrukturen führen, die für die effektive Replikation von HCV nötig sind ^[23]. Das Membran-assoziierte Phosphoprotein NS5A kann in einer phosphorylierten (56 kDa) und hyperphosphorylierten (58 kDa) Form vorliegen. Mehrere Studien deuten auf eine wichtige Rolle des NS5A-Proteins in der Replikation des HCV hin. Das Protein interagiert mit allen nichtstrukturellen Proteinen des HCV ^[24] und ist Teil des Membran-assoziierten Replikationskomplexes ^[25]. Des Weiteren interagiert es mit Proteinen zellulärer Signaltransduktionwege, die in der angeborenen Immunität von Bedeutung sind, und führt zu deren Inaktivierung ^[26-28]. Das NS5B-Protein ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und fungiert als katalytische Einheit der HCV RNA-Replikationsmaschinerie ^[29, 30]. Im Hinblick auf ihre Enzymaktivität stellen die NS5B-Polymerase und die NS3/4A-Protease potentielle Ziele für die Entwicklung von spezifischen antiviralen Therapien dar ^[26, 31].

1.1.3. Der NS3/4A-Komplex

NS3 ist ein multifunktionelles virales Protein, das eine zentrale Rolle bei der Polyproteinprozessierung und dem HCV-Replikationszyklus einnimmt. Verantwortlich hierfür sind zwei funktionelle Domänen: die Serinprotease und die Helikase/NTPase. Die ersten 189 Aminosäuren des Proteins umfassen die Serinprotease. Sequenzvergleiche zwischen HCV und anderen Flaviviren identifizierten drei hoch konservierte Aminosäuren an den Positionen His-57, Asp-81 und Ser-139, die die katalytische Triade der Serinprotease darstellen ^[32]. Die zweite Domäne beinhaltet die Helikase/NTPase und füllt zwei Drittel des C-Terminus (442 AS). Nach der autoproteolytischen Abspaltung vom naszierenden HCV-Polyprotein wird der N-Terminus mit dem Kofaktor NS4A (54 AS) assoziiert ^[33], der dadurch die Stabilisierung der NS3 Protease bewirkt und somit für die Prozessierung aller anderen Nichtstrukturproteine essentiell ist. NS4A vermittelt des Weiteren die Verankerung von NS3 mit zellulären Domänen, verantwortlich hierfür sind 20 N-terminal lokalisierte hydrophobe Aminosäurereste ^[22]. Die C-terminal lokalisierte DExH/D-box Helikase vermittelt das Entwinden doppelsträngiger RNA, DNA und komplexer RNA-

Sekundärstrukturen in 3'→5'-Orientierung^[34, 35]. Die dazu benötigte Energie bezieht das Enzym aus der Hydrolyse von NTP. Es wird angenommen, dass die Helikaseaktivität von NS3 bei der Initiierung der viralen RNA-Replikation eine Rolle spielt^[36]. Das NS3-Protein interagiert im Replikationskomplex über den Kofaktor NS4A direkt mit NS5B, NS4B und NS5A.

Zusätzlich zu seiner Funktion bei der Virusreplikation und der Polyproteinprozessierung wurden für das NS3-Protein zahlreiche Interaktionen mit Proteinen der Wirtszelle beschrieben. Das NS3-Protein interagiert mit der Proteinkinase A aber auch mit der Proteinkinase C und moduliert infolgedessen die subzelluläre Verteilung der regulatorischen Untereinheiten der Kinasen^[37, 38]. Verantwortlich hierfür ist eine Arginin-reiche Region (AS 1487-1500 des HCV-Polyproteins) im NS3-Protein. Diese weist hochgradige Ähnlichkeit mit der Substrat-Erkennungsstelle der regulatorischen Untereinheit, ebenso mit den autoinhibitorischen Pseudosubstratregionen der Kinasen auf und inhibiert die Kinase-Aktivität durch die Interaktion mit der katalytischen Domäne des Enzyms. Kurze synthetische Peptide mit der Sequenz des Arginin-reichen Motivs, sowie trunkierte NS3-Fragmente, die das Motiv enthalten, inhibieren die katalytische Aktivität der PKA und PKC *in vitro*^[37, 39]. Borowski *et al.* konnten eine signifikante Reduzierung der Translokation der C-Untereinheit in den Zellkern und der nachfolgenden Phosphorylierung eines Substrates der PKA (Histon H2B) durch NS3 *in vitro* nachweisen^[40]. In weiteren Experimenten konnten sie belegen, dass NS3 zur Immobilisierung der PKC im zytosolischen Zellkompartiment und somit zur Inhibition der Assoziation mit spezifischen Rezeptorproteinen (RACK – *receptors for activated C kinase*) führt. In diesem Zusammenhang wurde eine weitere Region des NS3-Proteins (AS 1189-1525 des HCV Polyproteins) identifiziert, die die Bindung des viralen Proteins an Histone bewerkstelligt^[40]. Histone spielen eine essentielle Rolle innerhalb der Transkriptionsmaschinerie und können durch Modifizierungen (z.B. Methylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung) als Regulatoren der Genexpression fungieren^[41]. Sie stellen zudem Substrate der PKA und PKC dar. Da NS3 vorwiegend im Zytosol lokalisiert ist^[42], führt die Interaktion des viralen Proteins an die Core-Histone H2B und H4 *in vitro* und die daraus resultierende Konformationsänderung zur Immobilisierung von Histonen in zytosolischen Kompartimenten. Somit stehen diese nicht für die Formation der Nukleosomen im Zellkern zur Verfügung. Die Blockierung der Translokation von Histonen durch NS3 kann somit ihre Funktion deutlich beeinflussen^[40]. Für das NS3-Protein ist des Weiteren eine Interaktion mit dem Tumorsuppressorprotein p53 *in vitro* beschrieben^[43]. Die Interaktion geht von einem in der NS3-Proteasedomäne gelegenen Sequenzbereich aus und stört die *trans*-aktivierende Funktion von p53^[44]. Kwun *et al.* beobachteten eine p53-abhängige

Inhibition der p21-Promotoraktivität durch NS3 in den murinen Fibroblasten NIH 3T3 ^[45]. Zudem führte die stabile Expression von NS3-Fragmenten in NIH 3T3-Zellen zu einer p53-abhängigen Resistenz gegenüber der Actinomycin-D-induzierten Apoptose ^[46]. In seiner Funktion kann p53 als Transkriptionsfaktor fungieren, indem es die Expression von Genen reguliert, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind ^[47-49]. Die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 ist ein wichtiges Ereignis in der Immortalisierung von Zellen und ein entscheidender Schritt in Richtung Transformation und Tumorgenese. Das onkogene Potential von NS3 wird jedoch kontrovers diskutiert. Vielmehr wird ein putativer hepatokarzinogener Einfluss von NS3 durch Modulation von endogenen Signalwegen in einem frühen Stadium diskutiert, der Mutationen des p53 Gens hervorruft und sekundär zur Transformationen von Hepatozyten führt ^[42, 43, 50].

Die HCV NS3/4A Serinprotease/Helikase moduliert die IRF-3 (*IFN regulatory factor 3*)-Aktivierung und die daraufhin resultierende IFN β -Expression. Virale Infektionen und damit verbundene doppelsträngige RNA können IRF-3 durch zwei voneinander unabhängige Signalwege aktivieren. Die Aktivierung eines der beiden Signalwege resultiert in der Phosphorylierung und der nukleären Akkumulation von IRF-3 und der Expression zahlreicher protektiver zellulärer Gene ^[51-54]. Ein Signalweg involviert den TLR3 (*toll-like receptor-3*) durch Liganden, wie z.B. dsRNA, der zweite die zelluläre DExH(D) Helikase RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*). In beide Signalwege greift NS3/4A durch die proteolytische Spaltung von Adapterproteinen ein: im Falle des TLR3-Signalweges wird TRIF (*toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN*), im Falle des RIG-I-Signalweges wird CARDIF (*CARD adaptor inducing IFN- β*) proteolytisch gespalten ^[55]. Funktional bestätigt wurden diese Untersuchungen durch die Wiederherstellung der IFN-Induktion durch den NS3/4A Proteaseinhibitor BILN-2061 ^[56]. Die virale Kontrolle der IFN-Produktion kann zu systemischen Immundefekten und der während HCV Infektion beobachteten Permissivität beitragen. Folglich stellt NS3/4A ein wichtiges Ziel antiviraler Therapien dar, da durch die Blockierung der Proteaseaktivität nicht nur die HCV-Replikation und folglich die Produktion viraler Proteine inhibiert wird, sondern auch die Typ I-Immunantwort des Wirtes wiederhergestellt werden kann. Brenndörfer *et al.* konnten darüber hinaus nachweisen, dass HCV die Aktivierung des EGFR (*epithelial growth factor receptor*)/Akt-Signalweges durch die NS3/4A-abhängige Herabregulation der ubiquitär exprimierten TC-PTP (*T cell protein tyrosine phosphatase*) beeinflusst ^[57]. Diese Tyrosin-Phosphatase ist für die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors nach Aktivierung wichtig und fungiert damit als endogener Inhibitor des EGF-induzierten Signalweges ^[58], so dass es in HCV infizierten Zellen zu einer verstärkten Liganden-

induzierten Aktivierung des EGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signalkaskaden, wie der PLC γ - und der Akt-abhängigen Signalübertragung kommt. Darüber hinaus legen die Befunde nahe, dass TC-PTP die basale Akt-Aktivität EGFR-unabhängig reguliert, wodurch es zu einer konstitutiven Aktivierung von Akt in HCV-infizierten Zellen kommt, welche ihrerseits essentiell für die Virusreplikation ist. Vor diesem Hintergrund ist ferner interessant, dass zahlreiche Publikationen eine Aktivierung des PI3K (*phosphoinositol-3-kinase*)/Akt-Signalweges mit dem Schutz HCV-infizierter Zellen vor Apoptose in Verbindung bringen und so eine putative Relevanz im Hinblick auf die Pathogenese eines HCC (*hepatocellular carcinoma*)^[59] oder anderer HCV-assoziiierter Malignome, wie dem B-Zell-Lymphom^[60] besteht.

Weitere Beobachtungen legen nahe, dass NS3/4A einen wesentlichen Einfluss auf die hepatische Immunantwort hat und hierdurch die Etablierung einer persistierenden Infektion begünstigt. So werden Monozyten und dendritische Zellen direkt durch NS3 beeinflusst. Das NS3-Protein induziert dabei pro- und anti-inflammatorische Signalwege in Monozyten und inhibiert die Differenzierung und allostimulatorische Kapazität durch Erhöhung der IL-10- und Erniedrigung der IL-2-Spiegel^[61]. Die NS3-vermittelte Bildung von Sauerstoffradikalen durch Monozyten und polymorphnukleären Phagozyten resultiert aus der erhöhten Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase, dem Schlüsselenzym der Sauerstoffradikalbildung. HCV NS3 kann durch die Aktivierung der Phagozyten auf drei wesentliche Unterklassen von Lymphozyten Einfluss nehmen und zu ihrer Dysfunktion bzw. zur Apoptose führen: CD3⁺/56⁻ T-Zellen, CD3⁺/56⁺ NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) und CD3⁺/56⁺ NK/T-Zellen. Diese Subklassen sind häufig im Lebergewebe HCV-infizierter Patienten lokalisiert. Des Weiteren wurde eine um den Faktor 100.000 erhöhte Produktion von Sauerstoffradikalen im Lebergewebe HCV-infizierter Patienten beschrieben^[62].

In transgenen Mäusen mit leberspezifischer NS3/4A-Expression ist die Population von plasmazytoiden dendritischen Zellen (CD11c⁺/CD11b⁻/MHC-II^{int}/Ly6C/G⁺) und CD4⁺ T-Zellen signifikant reduziert^[63]. Zudem sind NS3/4A transgene Mäuse gegenüber einer für den Wildtyp letalen Dosis an TNF α (*tumor necrosis factor α*)/D-GalN (D-Galaktosamin) resistent. Die transgenen Tiere sind ferner vor einer TNF α /D-GalN, LPS (Lipopolysaccharid)/D-GalN oder CCl₄-vermittelten Leberschädigung über einen p38^{MAPK}-abhängigen Mechanismus weitestgehend geschützt. TNF α spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer viralen Infektion, da es ein Schlüsselmolekül in der T-Zell-vermittelten Eliminierung Virus-infizierter Hepatozyten ist^[64]. Die HCV NS3/4A-vermittelte Resistenz gegenüber der TNF α -induzierten Apoptose^[65, 66] kann die Koexistenz von hohen Serumleveln von TNF α in HCV-infizierten Patienten, TNF α -

produzierenden intrahepatischen CTLs (*cytotoxic T lymphocyte*) und einer hohen viralen Replikationsrate erklären ^[67].

1.1.4. Der Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist hochspezialisiert, der einzige natürliche Wirt des Hepatitis C Virus ist der Mensch ^[68]. Das Virus infiziert hauptsächlich Hepatozyten, zudem konnte auch eine Infektion von B-Zellen und dendritischen Zellen beobachtet werden. Die zelluläre Aufnahme des Hepatitis C Virus ist ein komplexer Vorgang, der aus zahlreichen Schritten besteht. Wie auch für andere behüllte Viren beinhaltet dies die Bindung an zelluläre Oberflächenstrukturen und Rezeptoren, die Fusion der Lipidhülle mit der Zellmembran und die Freisetzung des viralen Genoms in das Zytoplasma. Mindestens drei verschiedene Wirtszell-Molekülklassen sind bei dem HCV-Eintritt von zentraler Bedeutung: das Tetraspaninprotein CD81, der *Scavenger*-Rezeptor der Klasse B1 (*SR-BI: scavenger receptor BI*), sowie die *tight junction*-Proteine Claudin (CLDN) -1, -6 und -9. Kürzlich wurde zudem ein weiteres *tight junction*-Protein, Occludin, entdeckt, welches essentiell für den HCV-Zelleintritt ist ^[69]. Weitere Wirtszellproteine und -moleküle, die bisher nicht eindeutig als essentielle Interaktionspartner identifiziert werden konnten, aber mit dem viralen Zelleintritt in Verbindung gebracht werden, sind der LDL (*low density lipoprotein*) -Rezeptor ^[70, 71], die Lipoprotein-Lipase ^[72], das Glykosaminoglykan Heparansulfat ^[73, 74] sowie die Mannose-bindenden Lektine DC-SIGN (*dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) und L-SIGN (*liver/lymph nodespecific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) ^[75, 76]. Basierend auf zahlreichen Literaturdaten wird derzeit folgendes Modell des Replikationszyklus von HCV postuliert (Abbildung 1.2): Durch die Expression der Lektine DC-SIGN und L-SIGN sind lebersinusoidale Endothelzellen in der Lage, HCV-Partikel in der Leber zu binden und somit die Interaktion mit Hepatozyten zu erleichtern. Auf der Wirtszelloberfläche lokalisierte Glykosaminoglykan-Ketten und der LDL-Rezeptor stellen initiale Kontaktstellen für die Bindung des HCV-Virions an den Hepatozyten dar ^[74], da das HCV mit ihren Liganden – die Lipoproteine HDL oder LDL – komplexiert ist ^[70, 77]. Dabei interagiert E2 zuerst mit SR-BI, bevor es mit CD81 in Kontakt tritt. Neben der indirekten durch HCV-assoziierte Lipoproteine vermittelten Interaktion kann das Hüllprotein E2 auch direkt an SR-BI binden ^[78, 79]. Das *tight junction*-Protein Claudin-1 interagiert erst im späteren Verlauf des Eintrittsprozesses mit HCV, nachdem der Virus-Rezeptor-Komplex lateral zu den *tight junctions* der Wirtszelle migriert. Zwei erst kürzlich

identifizierte Rezeptor-Tyrosinkinasen – der EGF-Rezeptor und EphA2 (*ephrin receptor* A2) – regulieren hierbei die CD81-Claudin-1-Korezeptor-Assoziation und die darauffolgende HCV Glykoprotein-vermittelte Membranfusion ^[80]. Das Virus gelangt durch die Clathrin-vermittelte, pH-abhängige Endozytose in die Zelle. Hierzu wird das Innere der Endosomen über eine ATP-abhängige H⁺-Ionenpumpe, die Bestandteil der Vesikelmembran ist, angesäuert. Die Viruspartikel fusionieren nachfolgend mit frühen Endosomen, so dass das Genom ins Zytoplasma entlassen und die virale Replikation eingeleitet wird.

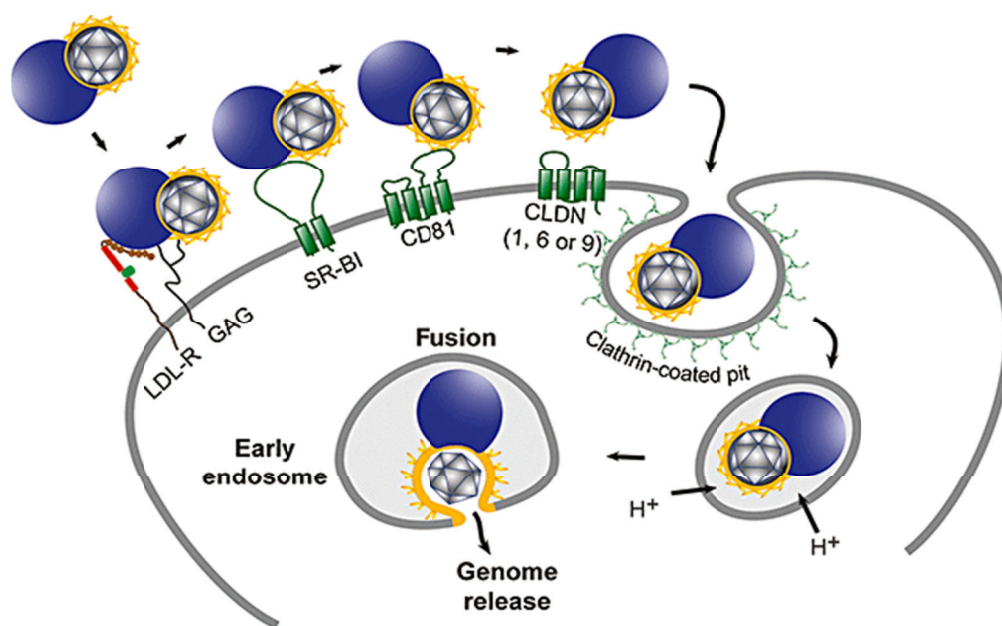


Abbildung 1.2 Modell des HCV-Eintritts in die Wirtszelle. Virale Partikel binden mittels GAG (Glykoaminoglykanen) und dem LDL-R (LDL-Rezeptor) an die Wirtszelloberfläche. Assoziierte Lipoproteine (blau) können an der Interaktion beteiligt sein. HCV interagiert mit SR-BI und CD81, bevor es mit den *tight junction*-Proteinen CLDN (*claudin*) -1, -6 oder -9 wechselwirkt. Die Clathrin-vermittelte Internalisierung ist pH-abhängig. Die Azidifikation des Endosoms induziert die HCV Glykoprotein-vermittelte Fusion mit frühen Endosomen. Die HCV-RNA wird ins Zytoplasma entlassen (übernommen aus Dubuisson *et al.* ^[81]).

Die Translation der viralen Proteine erfolgt über die IRES. Diese bildet sich durch komplementäre Basenpaarung in der 5'-NTR zu mehreren stabilen Sekundärstrukturen aus und ermöglicht eine cap-unabhängige Translation der viralen RNA. Das erste Translationsprodukt ist das Core-Protein. Aufgrund einer Signalsequenz im C-Terminus des Proteins wird das naszierende Polyprotein zum rauen Endoplasmatischen Retikulum transportiert. Hier erfolgt die Translokation von E1 in das Lumen des ER. Während der fortgehenden Biosynthese des Polyproteins werden

die strukturellen viralen Proteine durch eine Serie von Spaltungen durch zelluläre Proteinasen generiert. Nachfolgend kann auch die *downstream* gelegene nichtstrukturelle Region durch virale Proteinasen prozessiert werden. Das virale Protein NS4B induziert die Bildung netzartiger Membranstrukturen, den *membranous web*, die die Grundlage für die Bildung Membran-gebundener Replikationskomplexe bilden. Innerhalb dieser Membran-Kompartimente amplifiziert die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B das positivsträngige virale Genom. Dies geschieht über die Synthese eines negativsträngigen Genoms als Zwischenschritt. In den Replikationskomplex sind virale nichtstrukturelle Proteine, aber auch zelluläre Faktoren integriert. Die neu generierten RNA-Genome können als Matrize für die Synthese neuer Polyprotein-Kopien, für die Produktion weiterer Genome oder zum Einbau in Nukleokapside eingesetzt werden. Das Core-Protein kann aufgrund seiner Ladungseigenschaften die virale RNA binden. Es kommt folglich zur Einstülpung der Membran in das ER-Lumen, so dass sich der initiale *Budding*-Komplex bildet und dieser sich schließlich abschnürt. Die neuen Virionen werden zum Golgi-Apparat geleitet. Hier werden die viralen Proteine E1 und E2 glykosyliert. Die viralen Partikel verlassen die infizierten Zellen dann durch zelluläre Sekretion (Abbildung 1.3) ^[6].

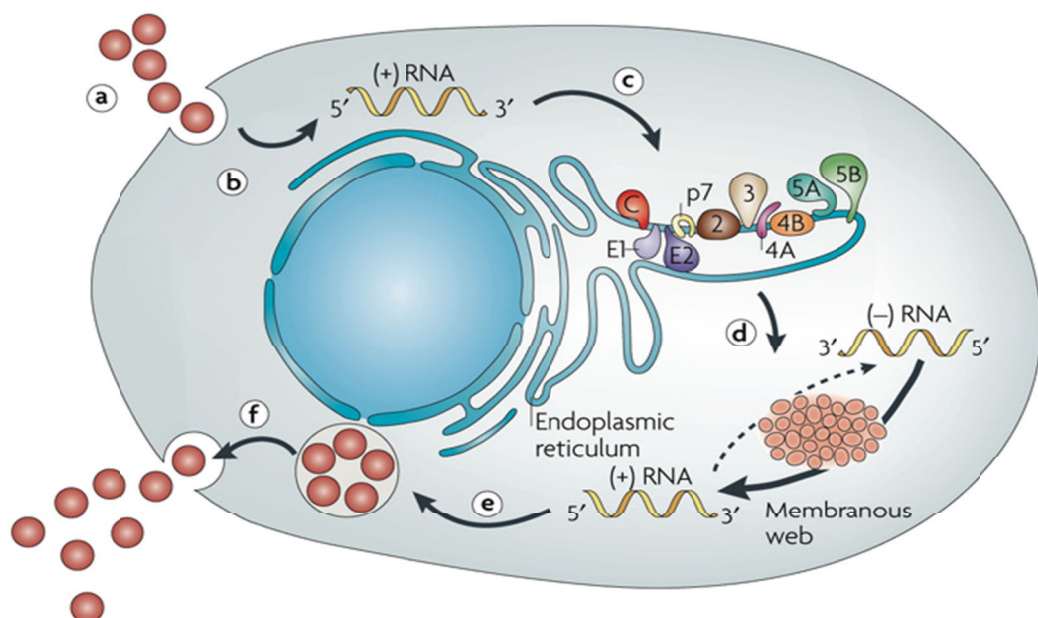


Abbildung 1.3 Zusammenfassende Darstellung des Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis C Virus. a) Virusbindung und Internalisierung in die Wirtszelle; b) Zytoplasmatische Freisetzung und Entpackung der Viruspartikel; c) IRES-vermittelte Translation und Prozessierung des Polyproteins; d) RNA-Replikation; e) Verpackung und Zusammenbau des Virus f) Reifung und Freisetzung der Virionen (übernommen aus Moradpour *et al.* ^[6]).

1.1.5. Interferenz von HCV mit der hepatozellulären Apoptose

1.1.5.1 Die Signaltransduktion der Apoptose

Apoptose ist ein aktiver Prozess, der morphologisch durch Chromatinkondensation, intrazytoplasmatische Granula, Zytoplasmakondensation und den Zerfall der DNA charakterisiert wird. Der Prozess endet mit der Formierung von apoptotischen Körperchen, die von umgebenden Zellen phagozytiert werden ^[82, 83]. Die meisten morphologischen Veränderungen der Zelle werden biochemisch durch Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) hervorgerufen ^[84]. Alle Caspasen besitzen eine große (~ p20) und eine kleine Untereinheit (~ p10) sowie eine Prodomäne, die jedoch zwischen den Mitgliedern in der Größe variiert. Caspasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert, die erst durch Spaltung zwischen den beiden Untereinheiten sowie der zusätzlichen Entfernung der Prodomäne aktiviert werden. Die Proteasen werden während der Apoptose kaskadenartig in großen Mengen aktiviert und vollziehen durch die gezielte Spaltung einer Vielzahl von Substraten das apoptotische Programm ^[85, 86]. Caspasen werden in inflammatorische und apoptotische Caspasen unterteilt, wobei bei letzteren wiederum zwischen apoptotischen Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) und Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) unterschieden wird ^[87, 88]. Die Effektor-Caspasen besitzen eine kurze Prodomäne und werden im Verlauf der Apoptose durch Initiator- und andere Effektor-Caspasen aktiviert. Sie vermitteln durch die gezielte Spaltung definierter Zielproteine die Charakteristika der Apoptose ^[85]. Im Gegensatz zu den Effektor-Caspasen besitzen Initiator-Caspasen eine längere Prodomäne, in der sich funktionelle Protein-Protein-Interaktionsdomänen befinden. Durch das Vorhandensein von CARD (*caspase recruiting domain*) – Caspase-9 und -2 – oder DEDs (*death effector domain*) – Caspase-8 und -10 – werden die Initiator-Caspasen in hochmolekulare Aktivierungskomplexe zur Initiierung der Caspasen-Kaskade rekrutiert. Diese Komplexe werden nach bestimmten Apoptose-induzierenden Stimuli gebildet, die entweder extrinsischer oder intrinsischer Natur sein können (Abbildung 1.4).

Der extrinsische Apoptoseweg wird über die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren, die zu den Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören, ausgelöst. In der Leber vermitteln vor allem der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1), der TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)-Rezeptor 1/2 und CD95 nach Aktivierung durch entsprechende Liganden (TNF α , TRAIL, CD95-Ligand) den apoptotischen Signalweg. Die Mitglieder der TNFR-Superfamilie weisen extrazellulär mehrere Cystein-reiche Domänen auf, die der Ligandenbindung dienen. Intrazellulär besitzen sie eine so genannte Todesdomäne (DD, *death domain*), über die im Zytoplasma nach

Rezeptoraktivierung Signalkomplexe gebildet werden. Nach Bindung des entsprechenden Liganden wird eine Oligomerisierung des Rezeptors induziert, wodurch die intrazellulären Todesdomänen der Rezeptoren in der Lage sind, andere DD-besitzende Adapterproteine zu rekrutieren. Folglich wird die Bildung des Todessignal-Komplexes (DISC, *death-inducing signaling complex*) initiiert ^[89]. In diesem Komplex bindet zunächst das Adapterprotein FADD (*Fas-associating protein with death domain*) mittels seiner Todesdomäne an den CD95-Rezeptor. FADD seinerseits verfügt über eine weitere Interaktionsdomäne (DED), an die die Initiator-Caspase-8 und -10 rekrutiert und folglich aktiviert werden ^[90, 91]. Die räumliche Bindung im DISC erzeugt eine Konformationsänderung in den Initiator-Caspasen, durch die das aktive Zentrum zugänglich und die Protease aktiv wird ^[92, 93]. Im Falle des TNF-R1 wird ein leicht abgewandeltes Modell postuliert, in dem der aktive Caspase-8-Komplex nicht an der Zellmembran, sondern erst nach Internalisierung des Rezeptors im Zytoplasma gebildet wird ^[94]. Zudem bindet bei der DISC-Formation zunächst das Adapterprotein TRADD (*TNFR-associated death domain*) mittels seiner Todesdomäne an den Todesrezeptor, bevor FADD rekrutiert wird. TNF-R1 vermittelt sowohl apoptotische als auch Überlebenssignale. Alternativ zu FADD rekrutiert TRADD die Adapterproteine TRAF-2 (*TNFR-associated factor-2*) und RIP (*receptor interactive protein*). Die beiden Adapterproteine führen zur Aktivierung der MAP Kinasen und NFκB. Durch die NFκB-Aktivierung wird u.a. die Expression anti-apoptotischer Gene erhöht (z.B. XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), cIAP (*cellular inhibitor of apoptosis*) 1 und 2, FLIP (*FLICE-inhibitory protein*)) ^[95].

Die zweite Signaltransduktion der Apoptose wird als der intrinsische Weg bezeichnet und wird über die Mitochondrien durch die Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) -Proteine reguliert. Ausgehend von der durch die Oligomerisierung des Todesrezeptors aktivierte Initiator-Caspase-8 (und -10) kommt es zur Spaltung des Proteins BID (*BH3 interacting domain death agonist*) durch die Caspase. Das nun trunkierte Protein (t-BID) transloziert in die Mitochondrien. Zusammen mit zwei Proteinen der Bcl-2 Familie, BAX (*Bcl-2-associated X protein*) und BAK (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) initiiert t-BID eine Änderung des Membranpotentials und die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Es kommt zu Freisetzung mitochondrialer Proteine wie Diablo (*direct inhibitor of apoptosis protein-binding protein with low pI*)/Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*) und Cytochrom c ^[96]. Das aus den Mitochondrien freiwerdende Cytochrom c assoziiert mit APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und der Initiator-Caspase-9. Durch dieses sogenannte Apoptosom wird die Caspase-9 proteolytisch aktiviert ^[97]. Die aktivierte Caspase prozessiert

wiederum die Effektor-Caspasen-3 und -7 ^[98]. Letztere initiieren u.a. die Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP (*poly (ADP-ribose) polymerase*).

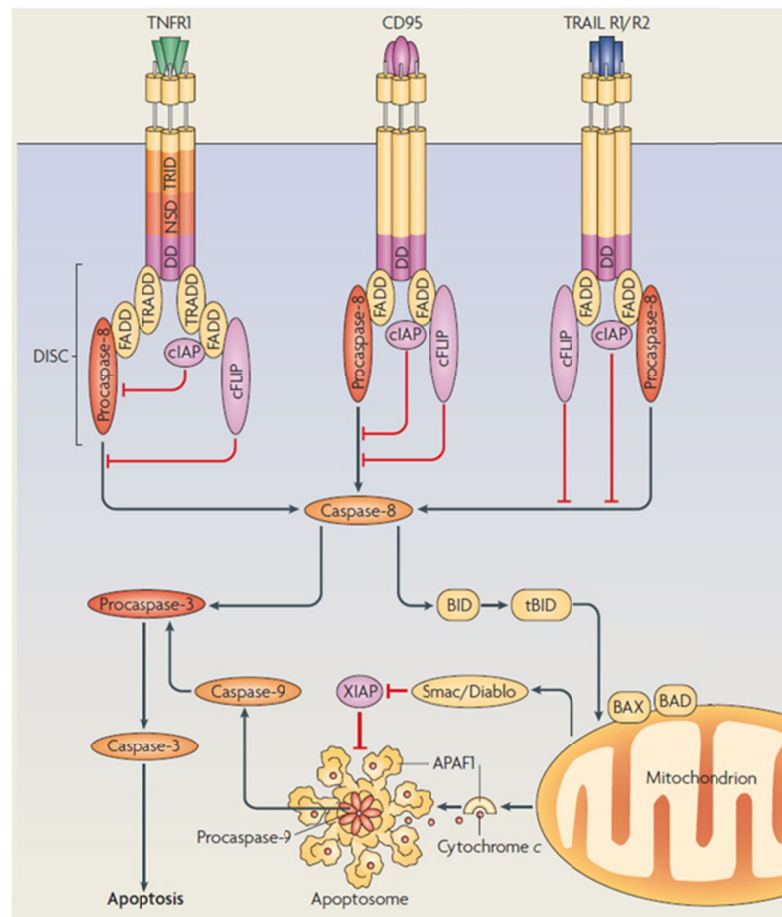


Abbildung 1.4 Der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose. Bei dem extrinsischen Signalweg erfolgt durch die Bindung von Liganden an den jeweiligen Rezeptor TNFR1, CD95 (Fas) oder TRAIL R1/R2 die Bildung verschiedener Rezeptor-proximaler Komplexe, die Adapterproteine wie TRADD bzw. FADD enthalten. Diese Adapterproteine binden wiederum andere Schlüsselproteine, z. B. Procaspase-8, an den Rezeptorkomplex und führen zur DISC-Bindung. Die aktivierte Caspase-8 aktiviert die Effektor-Caspase-3 und induziert die Apoptose. Der intrinsische Apoptoseweg kann durch die durch Caspase-8-vermittelte Spaltung von BID, zusammen mit BAX und BAD ausgelöst werden. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c und Smac/Diablo in das Zytoplasma, wo die Bildung des Apoptosoms induziert wird. Cytochrom c bindet an APAF-1 und führt zu dessen Heptamerisierung. Procaspase-9 bindet an APAF-1 und wird aktiviert. Am Apoptosom wird anschließend die Effektor-Caspase-3 aktiviert, was letztendlich zur Apoptose führt. Die zwei verschiedenen Signalwege werden durch die Aktivierung anti-apoptotischer Proteine reguliert (cIAP, cFLIP, XIAP). APAF1: apoptotic protease activating factor 1; BAX: *Bcl-2-associated X protein*; BID: *BH3 interacting domain death agonist*; tBID: trunkiertes BID; cIAP: *cellular inhibitor of apoptosis*; cFLIP: *cellular FLICE-inhibitory protein*; DISC: *death-inducing signaling complex*; DD: *death domain*; FADD: *Fas-associated protein with DD*; TNFR: *tumor necrosis factor receptor*; TRADD: *TNFR-associated death domain*; TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*; XIAP: *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (modifiziert nach Schütze et al. ^[95]).

1.1.5.2. Hepatitis C-vermittelte Modulation der Apoptose

HCV Hüllenproteine E1 und E2

In Verbindung mit den beiden Hüllenproteinen HCV E1 und E2 gibt es wenig experimentelle Daten in Bezug auf Apoptose. Im transgenen Mausmodell konnte beobachtet werden, dass E1 und E2 die CD95-Ligand-induzierte Apoptose inhibieren^[99, 100]. Untersuchungen ergaben zudem eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges, da die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die Aktivierung der Caspase-9, nicht aber die der Caspase-8 inhibiert wird. Untersuchungen im Zellkultursystem verdeutlichten zudem, dass HCV E2 die TRAIL-induzierte Apoptose hemmt^[101]. Dieser anti-apoptotische Effekt wird durch die Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom c bewirkt. Im gleichnamigen System konnte für HCV E1 hingegen keine Apoptose-modulierende Wirkung beobachtet werden. Chiou *et al.* konnte unter Verwendung der gleichen Hepatomazelllinie einen anti-apoptotischen Effekt von HCV E2 allerdings nicht bestätigen^[102]. Aufgrund der kontroversen Beobachtungen bleibt es weiterhin unklar, ob HCV E1 eine Apoptose-modulierende Aktivität aufweist, und ob HCV E2 einen pro- oder anti-apoptotischen Einfluss ausübt.

HCV Core

Abhängig von dem eingesetzten experimentellen System sind sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Effekte beschrieben. Untersuchungen ergaben, dass Core die CD95-Ligand-^[103] und die TNF α -induzierte Apoptose^[104] in Hepatomazellen unterdrückt. In Verbindung mit CD95 ist der anti-apoptotische Effekt durch Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und der daraus resultierenden Aktivierung der Caspase-9, -3 und -7 belegt^[100]. Zudem sind direkte Interaktionen von Core mit der Todesdomäne von FADD und cFLIP beschrieben, die den anti-apoptotischen Effekt unterstützen^[105]. In einigen Studien wurde die Apoptose durch die Core-bedingte Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) inhibiert^[106, 107]. Die Aktivierung des STAT3-Signalweges führt zur Steigerung der Zellproliferation, die unter gewissen Umständen auch zu einer Zelltransformation führen kann^[107, 108]. Bei der Verwendung anderer experimenteller Zellkultur- und Transgen-Modellsysteme konnte der anti-apoptotische Einfluss von Core allerdings nicht bestätigt werden. So konnte in Zelllinien beobachtet werden, dass Core durch direkte Interaktion mit den zytoplasmatischen Domänen von CD95, TNF-R1^[109] und Lymphotoxin- β -Rezeptor^[110] pro-apoptotisch wirkt. Zudem wurden mitochondrielle Funktionen durch die HCV Core-vermittelte Induzierung von

oxidativem Stress, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Erniedrigung des mitochondrialen Transmembranpotentials moduliert ^[111, 112].

HCV nichtstrukturelle Proteine

Für das HCV NS3-Protein ist eine Interaktion mit dem Tumorsuppressorprotein p53 *in vitro* nachgewiesen ^[43], die zu einer p53-abhängigen Resistenz gegenüber der Actinomycin-D-induzierten Apoptose führte (siehe auch 1.1.3) ^[46]. Bei Untersuchungen im Zellkulturmodell induziert NS3 die Caspase-8-abhängige Apoptose in Hepatozyten und dendritischen Zellen ^[113, 114]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch nicht näher charakterisiert worden. Die Studie von Nomura-Takigawa *et al.* demonstriert, dass der NS3 assoziierte Kofaktor NS4A zusätzlich zu der Lokalisation am ER auch an Mitochondrien nachgewiesen werden konnte ^[115]. In einer transient transfizierten Hepatomazelllinie führt die Expression von HCV NS4A oder NS3/4A zu der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und folglich zur Caspase-8-unabhängigen Apoptose.

Für HCV NS5A sind anti-apoptotische Effekte und Wachstums-modulierende Eigenschaften beschrieben worden. So wurde nachgewiesen, dass NS5A mit p53 interagiert und die p53-vermittelte Apoptose inhibiert ^[116]. Der anti-apoptotische Effekt wird zudem durch Aktivierung des PI3-Kinase-Akt/PKB Signalweges ^[59], STAT3 und NFκB vermittelt ^[117] und führt zur erhöhten Expression Apoptose-inhibierender Gene. Auch hier gibt es kontrovers diskutierte Daten, da die anti-apoptotischen Eigenschaften von NS5A nicht in weiteren Zellsystemen bestätigt werden konnten ^[118]. Der Einfluss der nichtstrukturellen Proteine NS2, NS4B und NS5B auf Apoptose in Hepatozyten ist bisher nicht oder kaum untersucht worden.

1.1.6. Therapie einer Hepatitis C Virus Infektion

Während eine spontane Ausheilung der Hepatitis C Virusinfektion bei ca. 25 % angenommen wird, entwickeln bis zu 75-80 % der infizierten Personen eine persistierende Infektion. Über einen Zeitraum von 20-30 Jahren kommt es dann bei etwa 10-20 % der chronisch Erkrankten zur Entwicklung einer Leberzirrhose und bei ca. 1-5 % zu einem hepatozellulären Karzinom. Die derzeitige Standardtherapie zur Behandlung einer chronischen HCV Infektion basiert auf einer Kombination von pegylierten Interferon α (IFNα) und Ribavirin. Ribavirin ist ein Nukleosidanalogen (Guanosin) und wirkt auf eine Vielzahl von DNA- und RNA-Viren supprimierend. Als mögliche Wirkmechanismen des Ribavirins werden der Einbau in die RNA, die

Inhibierung der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase und die Hemmung des zellulären Enzym Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) ^[119], das für die Synthese von Guanosin-Monophosphat benötigt wird, diskutiert. Ribavirin moduliert zudem die antivirale Immunantwort und wirkt dabei auf die T-Helferzellen. Es verstärkt einerseits die Zytokinproduktion der Th1-Zellen (IL-2, IFN γ , TNF α) und supprimiert andererseits die der Th2-Zellen (IL-4, IL-5, IL-10) ^[120, 121]. IFN α aktiviert verschiedene direkte und indirekte antivirale Mechanismen. Durch die Bindung an Oberflächenrezeptoren wird die Expression zahlreicher Effektorproteine induziert, hierzu gehören unter anderem die OAS (2', 5'-Oligoadenylatsynthetase), die PKR (Proteinkinase R) oder die Mx-Proteine ^[122, 123]. Interferon ist ebenso für die indirekte Aktivierung von B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems wichtig. Die Aktivierung wird durch die Effekte des IFN auf APC (*antigen-presenting cells*) vermittelt. Diese dendritischen Zellen induzieren die Produktion des Zytokins und nehmen so Einfluss auf die B- und T-Zell-Antwort.

Die Ansprechraten auf diese Standardtherapie variieren allerdings zwischen den verschiedenen Genotypen des Virus, so dass es bei den Genotypen 2 und 3 in 88 % der Fälle, bei den Genotypen 1, 4, 5 und 6 jedoch nur in 48 % zu einer Eliminierung des HCV kommt ^[124]. Da viele Patienten nicht therapierbar sind und die Nebenwirkungen der IFN-Therapie eine starke Belastung darstellen, ist die Entwicklung neuer Therapieansätze weiterhin ein wichtiges Ziel. Einen Ansatzpunkt stellt die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren, die essentielle virale Proteine blockieren, dar. Im Mittelpunkt stehen hierbei die NS3/4A-Protease und die NS5B-Polymerase ^[31]. Dazu gehört der Inhibitor der HCV-NS3/4A-Protease, BILN-2061, der erste HCV-Inhibitor, der in einer klinischen Studie eingesetzt wurde ^[125], sowie der nicht für alle Genotypen wirksame Protease Inhibitor VX-950 ^[126]. Die Entstehung von Resistenzen ist hierbei ein entscheidendes Kriterium für den möglichen therapeutischen Einsatz. Weitere alternative Therapieansätze, die sich derzeit in der Entwicklung befinden, umfassen den Einsatz der RNA-Interferenz-Technologie, von Antisense-Oligonukleotiden oder von Immunsuppressiva (wie z.B. das Cyclosporin A). Die Entwicklung von Impfstoffen gegen das Hepatitis C Virus gestaltete sich bisher schwierig, doch wächst mittlerweile die Anzahl putativer Impfstoffkandidaten ^[127, 128]. Die Entwicklung erfolgt in drei Ansätzen: (I.) Prävention einer initialen Infektion; (II.) Prävention der viralen Persistenz; und (III.) Verbesserung der virologischen Antwort in chronisch infizierten Patienten.

1.1.7. Modellsysteme zur Untersuchung des Hepatitis C Virus

1.1.7.1. *In vitro* Modelle

Primäre Zielzellen des Hepatitis C Virus sind Leberzellen. Somit sind primäre humane Hepatozyten am besten für die Erforschung von HCV geeignet ^[129]. Doch ist ihre Verfügbarkeit nicht nur stark limitiert, die Etablierung und die Langzeitkultur sind zudem schwierig. Des Weiteren stellen sie bezogen auf ihre Infizierbarkeit mit HCV-Partikeln ein ungeeignetes zelluläres System dar ^[130].

Da primäre Zellkulturen aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit nicht eingesetzt werden können, werden viele Versuche mit Zelllinien humanen Ursprungs unternommen. Humane immortalisierte Leberzelllinien, wie Huh7 ^[131] und HepG2 ^[132], entstanden aus Leberzelltumoren. Durch ihre Verwendung können sie die Problematik der Arbeit mit primären Zellen teilweise lösen. So stellen sie ein gängiges Modellsystem dar, weisen allerdings andere Nachteile hinsichtlich ihrer Morphologie, genetischer Stabilität und der Entwicklung verschiedener Subklone auf ^[21, 133].

Die Problematik, den kompletten HCV-Lebenszyklus nicht in Zellkultur reproduzieren zu können, führte zur Entwicklung von Modellsystemen, die Teile der viralen Interaktion mit der Zielzelle darstellen. So konnten mit C-terminal-verkürzten, löslichen E2-Proteinen (sE2) Virus-Zell-Interaktionen untersucht und putative HCV-Rezeptoren identifiziert werden ^[134-137]. Weitere Systeme, mit denen die Interaktion der Hüllproteine näher untersucht werden, sind E1/E2-Liposomen ^[138], Vesicular-Stomatitis-Viren (VSV) mit chimären E1/E2-Glykoprotein-G-Oberflächenproteinen ^[139, 140] und in Insektenzellen generierte HCV-ähnliche Partikel (*Hepatitis C virus-like particles*, HCV-LPs) ^[141]. Letztere zeigen ähnliche morphologische und antigene Eigenschaften, wie HCV-Partikel aus dem menschlichen Plasma oder der Leber ^[141-143]. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass HCV-LPs eine spezifische humorale und zelluläre Immunantwort induzieren. Sie stellen somit vielversprechende Kandidaten zur Entwicklung von Vakzinen dar ^[144, 145].

Das Fehlen eines adäquaten Zellkulturmodells für HCV erschwerte lange Zeit die Untersuchung verschiedener Fragestellungen. Den ersten großen Durchbruch in der *in vitro* Replikation von HCV stellte das von Lohmann *et al.* generierte HCV-Replikon dar ^[146, 147]. In dem generierten Konstrukt wurden die Strukturgene Core bis p7, sowie NS2 durch die Sequenz des Neomycin-Phosphotransferase-Gens ersetzt. (Abbildung 1.5 A) Die folgende zweite, heterologe EMCV (Encephalomyokarditis-Virus) -IRES ermöglicht die Translation der nichtstrukturellen Proteine NS3-5B des Isolats Con1 (Genotyp 1b). Nach der Transfektion in die humane Hepatomazelllinie Huh7 war es

nun aufgrund des Neomycin-Phosphotransferase-Gens möglich, positive Klone mit Genetizin (G418) zu selektieren.

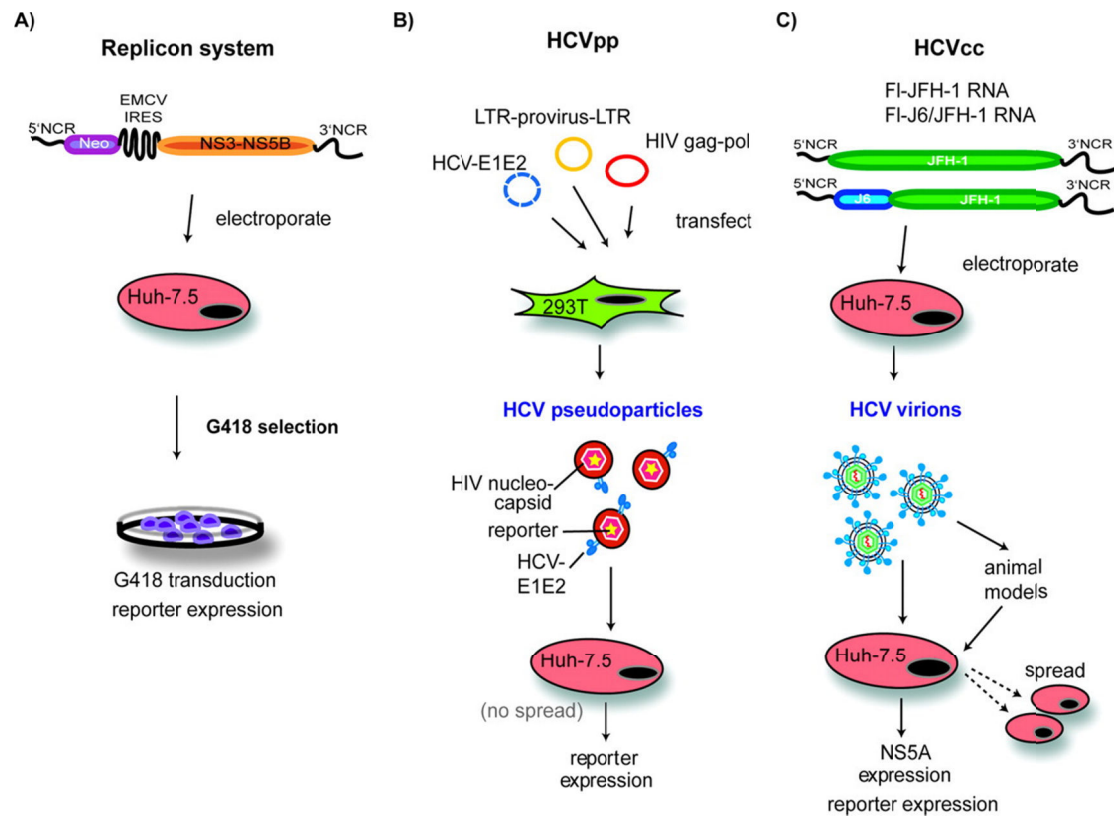


Abbildung 1.5 Modellsysteme zur Analyse des HCV Infektionszyklus. (A) Das Replikon-System. Die Elektroporation des Replikon-Konstruktes ermöglicht das Studium der viralen RNA-Replikation in Zellkultur. Die Selektion erfolgt über die erworbene NeoR (Neomycin-Resistenz). (B) Herstellung von infektiösen HCV-Pseudotypen. Die Ko-Transfektion von 293T-Zellen mit Plasmiden, welche die Expression von HCV-E1/E2-Glykoproteinen, retroviralen Core-Proteinen und einem GFP-Expressionskonstrukt erlaubt, führt zur Sekretion von HCV-Pseudopartikeln in den Überstand, welche die HCV-Hüllglykoproteine auf ihrer Oberfläche tragen. (C) HCVcc-Partikel werden durch Elektroporation der genomischen bzw. chimären RNA in Huh7.5-Zellen gewonnen. Die sezernierten Partikel sind für naive Zellen in Zellkultur sowie im Tiermodell infektiös (modifiziert nach Tellinghuisen *et al.* ^[148]).

Die ursprünglich aus dem HCV-Genom generierten Replikons zeigten nur niedrige Replikationsraten. Diese wurden schließlich durch adaptive Mutationen – vor allem in NS5A, aber auch in NS3 und NS4B – verbessert ^[149]. Das Con1-Genom – ohne adaptive Mutationen – repliziert zwar sehr ineffizient, doch ist es im Gegensatz zum adaptierten Genom in der Lage, infektiöse HCV-Partikel zu generieren ^[150].

Mittlerweile stehen weitere auf dem Replikonsystem basierende Systeme zur Verfügung, die das gesamte HCV-Genom enthalten. So generierte Kato *et al.* ein

genomisches Replikon ausgehend von dem Isolat eines japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis C (JFH-1; Genotyp 2a) ^[151]. Der Einsatz des Volllängen-Genoms JFH-1 ermöglichte zum ersten Mal die Untersuchung der Produktion infektiöser Viruspartikel *in vitro*. JFH-1 ist nicht nur in der Lage, ohne adaptive Mutationen in Zellkultur zu replizieren, es bildet auch infektiöse Partikel (HCVcc – *cell-culture-derived HCV*; Abbildung 1.5 C), die naive Zellen infizieren können. Es kann in Huh7 aber auch in anderen Zelllinien replizieren ^[152, 153]. Limitierend war, dass JFH-1 nach Transfektion einen geringen HCVcc-Titer produzierte. Durch den Einsatz von Huh7.5-Zellen, einem Subklon von Huh7, konnte der Titer nachhaltig erhöht werden ^[154]. Als molekulare Ursache der Hyperpermissivität des Subklons Huh7.5 wurde eine Mutation im *rig-I*-Gen identifiziert. Die dadurch resultierende Inaktivierung des RIG-I-Proteins, einer Komponente der angeborenen Immunität, führt zur Unterbrechung der Signalkaskade und inhibiert Teile der Interferonantwort ^[155]. Da sowohl subgenomische als auch Volllängen-Replikons sensitiv auf geringe Mengen IFN α reagieren ^[149, 156, 157], führt die Interferonantwort nach erfolgter Transfektion zu einer geringen HCV-Replikation ^[155]. Die Kinetik und die Ausbeute generierter HCVcc-Partikel konnte des Weiteren durch die Generierung eines chimären Genoms, welches die 5'- und 3'-NTR, aber auch die NS3-5B Region des JFH-1 und die Core-NS2 Region eines anderen Genotyp 2-Isolats (J6) enthielt, signifikant verbessert werden ^[158, 159]. Zudem konnte beobachtet werden, dass in Zellkultur produzierte Virionen Schimpansen, aber auch immundefiziente Mäuse mit humanisierten Lebern infizieren können und somit auch für *in vivo*-Untersuchungen einsetzbar sind ^[154, 160].

Ein weiteres Modellsystem der Untersuchung von HCV-Bindung und -Zelleintritt besteht in der Aufnahme infektiöser HCV-Pseudopartikel. Pseudopartikel zeigen einen beschränkten Tropismus, der lediglich einige humane Hepatomazelllinien, wie z.B. Huh7.5, einschließt ^[16, 161]. HCVpp werden mittels Ko-Transfektion von 293T-Zellen mit drei Expressionsvektoren generiert. (siehe Abbildung 1.5 B) Diese kodieren (I.) für die HCV-Hüllglykoproteine E1 und E2 mit ihren Transmembran-Domänen, (II.) für das retrovirale Core-Protein kodierende *gag-pol*-Verpackungskonstrukt und (III.) für den GFP (*green fluorescent protein*) oder lacZ (für β -Galaktosidase kodierendes Gen) enthaltenden retroviralen Transfervektor. Pseudopartikel, die die HCV-Glykoproteine anstelle der retroviralen Hüllenproteine auf ihrer Oberfläche tragen und das Reportergen GFP im Inneren beherbergen, werden in den Überstand sezerniert und können mittels Zentrifugation über einen Saccharosegradienten aufgereinigt werden ^[16, 162].

1.1.7.2. *In vivo* Modelle

Bei der Erforschung des HCV war der Schimpanse (*Pan troglodytes*) lange Zeit das einzige geeignete Modellsystem. Viele HCV-assoziierte Faktoren, wie die Transmission, der genetische Drift, das klinische Erscheinungsbild der HCV Infektion und die Rolle der Immunantwort wurden an Schimpansen untersucht ^[163]. Das Virus kann Schimpansen infizieren und repliziert in ihnen, so dass es zur Ausbildung einer akuten und chronischen Hepatitis kommt. Bereits zwei Tage nach Infektion von Schimpansen kann die virale RNA in der Leber der Tiere nachgewiesen werden. Studien an Schimpansen spielten zudem eine wichtige Rolle bei der Entdeckung von HCV, so erfolgte die Klonierung und Identifizierung des HCV aus dem Serum eines künstlich mit Non-A-Non-B-Hepatitis infizierten Schimpansen ^[2]. Die Verwendung von Schimpansen ist jedoch nicht nur kostenintensiv, sondern vor allem auch ethisch problematisch. Als alternatives *in vivo* Modell wurden Tupaia (*Tupaia belangeri*) eingesetzt. Xie *et al.* konnte diese Spezies, die für das Hepatitis B-Virus empfänglich ist, mit HCV infizieren ^[164]. Lediglich ein Viertel der Tiere waren für HCV permissiv. Zudem entwickelten sie entweder eine transiente oder intermittierende Virämie mit nur geringem Virustiter. Somit sind Tupaia für Untersuchungen von Faktoren, die zur Persistenz von HCV beitragen, nicht geeignet. Primaten, wie Cynomolgusaffen, Grüne Meerkatzen, Japanmakake, Tamarine und Paviane sind für das Hepatitis C Virus nicht permissiv ^[165-167].

Zur Untersuchung des Infektions-, des Replikationszyklus und der Pathogenese sind jedoch geeignete *in vivo* Modelle erforderlich. So wurden transgene Mausmodelle für HCV etabliert. Eine gut charakterisierte Technik, um transgene Tiere zu erhalten, liegt in der direkten pronukleären Mikroinjektion des *Targeting*-Vektors in fertilisierte Oozyten. Dabei integrieren zwischen 1 und 200 Kopien des Transgens randomisiert in das Wirtsgenom ^[168]. Die generierten Mäuse sind entweder für ein oder mehrere Proteine des HCV transgen ^[169, 170]. Im Hinblick auf die Pathogenese liegen partiell kontrovers diskutierte Daten vor (Tabelle 1.1). Der Grund für diese Diskrepanz ist nicht bekannt, kann aber auf unterschiedliche Expressionslevel des Transgens und auf unterschiedlich verwendete Mausstämme zurückgeführt werden. Für das Core-Protein transgene Mäuse bilden eine hepatische Steatose aus. Diese Ausbildung, die eine Akkumulation von intrazytoplasmischen *lipid droplets* beinhaltet, ist eine histologische Gemeinsamkeit, die mehr als 50 % chronisch infizierter HCV-Patienten teilen ^[171]. Im Hinblick auf die Pathogenese kann eine Steatose zur Progression von Lebererkrankungen und zur Bildung von HCC führen. Ebenso sind von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen die Bildung einer Steatose und eines hepatozellulären Karzinoms in HCV-transgenen Mäusen beschrieben ^[172-174]. Transgene Mäuse, die

Core allein oder in Kombination mit den Hüllproteinen E1 und E2 exprimieren, weisen einen erhöhten Level an Lipidperoxidation und oxidativ geschädigter DNA auf ^[111, 112, 175]. Des Weiteren kann die Expression der viralen Proteine Core-E1-E2, aber auch des gesamten HCV-Polyproteins Steatose mit Lymphozyteninfiltraten, mitochondriale Schäden, Sensitivität gegenüber oxidativem Stress und HCC in adulten Tieren hervorrufen ^[176-179]. Im Gegensatz hierzu konnte bei Mäusen, die für HCV E1-E2 ^[180], E2 ^[181], NS3-NS4A ^[63] oder NS5A ^[182, 183] transgen waren, trotz Nachweis der Expression des Transgens keine zytopathologischen Veränderungen beobachtet werden.

Tabelle 1. 1 Transgene Mäuse, die HCV-Gene exprimieren

Transgen	Promotor	Phänotyp der Leber
Core	HBV	Steatose ^[173, 184] HCC ^[185] Oxidativer Stress ^[174] Erhöhte Lipidoxidation ^[186] Alteration der Zytokinexpression und AP-1-Aktivierung ^[187] Insulinresistenz ^[188] Interaktion mit RXRalpha (<i>retinoid X receptor alpha</i>) ^[189]
	HBV	Modulation der Fas-vermittelten Apoptose ^[190] Konstitutive STAT3-Aktivierung, Implikation in HCC ^[107]
	EF-1 α	Oxidativer Stress ^[111]
	Serum-Amyloid	Maligne Lymphome und hepatozelluläres Adenom in adulten Mäusen ^[191]
Core-E1-E2	Albumin	Entwicklung von Tumoren ^[99]
	Albumin oder MUP	Keine Lebererkrankungen ^[192]
	CMV	Steatose, progressive Tumorentwicklung in Leber und lymphoiden Geweben ^[193]
Core-E1-E2-p7	Albumin	Steatose, HCC ^[172] Oxidativer Stress ^[112]
Core-E1-E2-NS2	Cre-loxP System	Hepatitis, HCV-spezifische Immunantwort ^[100] Suppression Fas-vermittelter Apoptose ^[179]
E1-E2	HBV	Keine Lebererkrankungen ^[180]
E2	Albumin	Keine Lebererkrankungen ^[181]
NS3-NS4A	MUP	Keine Lebererkrankungen, Reduktion hepatischer Zell-Subklassen, Resistenz gegenüber TNF α -vermittelten Leberschäden ^[63]
NS5	ApoE	Keine Lebererkrankungen ^[182]
		Schutz vor TNF α -vermittelten Lebererkrankungen ^[183]
Polyprotein	Alpha-1-Antitrypsin	Steatose, T-Zell Infiltration ^[176] Inhibierung von INF α -induzierten Signalwegen ^[194] Überexpression von PP2A (<i>protein phosphatase 2A</i>) ^[195]
	Albumin	Steatose, HCC ^[172] Beeinträchtigung des intrahepatischen Immunsystems ^[196]

Neben den Bestrebungen, die Pathophysiologie von HCV in transgenen Mäusen zu untersuchen, wurden weitere Versuche unternommen, um Mäuse für die genuine virale Replikation empfänglich zu machen und somit ein hyperpermissives *in vivo* System zu entwickeln. Das „Trimer“-Mausmodell involviert die Generierung einer chimären Maus mit Zellen bzw. Gewebe unterschiedlicher Herkunft ^[197, 198]. Hierbei verwendete immundefiziente BNX (*beige/nude/X-linked*)-Mäuse werden radioaktiver Strahlung ausgesetzt und mit von SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäusen isolierten hämatopoietischen Stammzellen wieder repopuliert. SCID-Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen von B- und T-Lymphozyten aus und besitzen niedrige bzw. nicht messbare Immunglobulinkonzentrationen ^[199]. Diese repopulierten Mäuse tolerieren die Transplantation von heterotropischen Leberfragmenten HCV-infizierter Patienten, aber auch von *ex vivo* infizierten Fragmenten ^[198, 200, 201]. HCV-RNA wurde in bis zu 50 % der transplantierten Tiere von 10 bis 50 Tagen nach der Transplantation detektiert.

Ein weiteres Modell, das von Mercer *et al.* beschrieben wurde, basiert auf der heterotrophen Repopulation von murinen Lebern durch Transplantation humaner Hepatozyten in immundefiziente transgene Mäuse, die durch Kreuzung von SCID/beige-homozygoten mit uPA (*urokinase plasminogen aktivator*)-homozygoten Tieren generiert wurden ^[202]. Letztere zeichnen sich dadurch aus, dass endogene Maushepatozyten aufgrund des toxisch wirkenden uPA-Transgens, das unter Kontrolle eines Albuminpromoters selektiv nur in der Leber exprimiert wird, zerstört werden. Diese Mäuse können chronische Lebererkrankungen entwickeln ^[203]. Nach der Injektion des Serums HCV-infizierter Patienten lag eine signifikante Virämie in ungefähr 75 % der uPA/SCID-Mäusen vor ^[204]. Ebenso konnte die Infektion für mehrere Monate ohne Anzeichen von hepatotoxischen Nebenwirkungen aufrecht erhalten werden. Die Untersuchung des antiviralen, angeborenen Immunsystems bestätigte eine vergleichende ISG (*interferon stimulated gene*)-Antwort, die mit derer HCV-infizierter Patienten vergleichbar war. Dieses auf immundefizienten Mäusen basierende System ist in seinem Anwendungsgebiet stark limitiert, obwohl es die Physiologie der HCV Infektion bei Menschen am ehesten widerspiegelt. Ein wesentlicher Nachteil des uPA/SCID-Mausmodells stellt die Immundefizienz der Mäuse dar. Das Modell ist somit für Studien zur adaptiven Immunantwort und Immunpathologie der HCV Infektion nicht geeignet. Die erfolgreiche Transplantation humaner Hepatozyten ist von einer exzellenten Qualität der Zellen abhängig. Da die SCID/Alb-uPA-Mäuse zudem eine Hämophilie aufweisen, liegt die Mortalität bei 75 %. Das Modell wird hingegen in experimentellen Studien eingesetzt, um die Wirksamkeit verschiedener, sich in der Entwicklung befindlichen antiviralen Wirkstoffe zu untersuchen. Hierzu zählen der HCV

NS3 Protease-Inhibitor BILN-2061 ^[205], der NS5B Polymerase-Inhibitor HCV796 ^[206, 207] und der Cyclophilin-Inhibitor DEBIO-025 ^[208].

1.1.7.3. Das Cre/loxP-System

Bei einem konventionellen *knockout* ist das Gen bereits während der Entwicklungsphase ausgeschaltet. Dabei kann es zu Defekten während der Entwicklung kommen, die häufig zu embryonaler oder postnataler Letalität führen. Diese Nachteile können mit Hilfe der konditionalen Geninaktivierung vermieden werden, die es ermöglicht, die funktionelle Bedeutung von Zielgenen in adulten Tieren oder einzelnen Zelltypen zu untersuchen. Hierfür steht das Cre-loxP-Rekombinationssystem zur Verfügung, das unabhängig von Kofaktoren und der Topologie des Substrates rekombinieren kann ^[209]. Es besteht aus der Cre (*causes recombination*) -Rekombinase, die an konservierte DNA-Erkennungssequenzen, den loxP (*locus of crossing over of P1*) -Stellen bindet. Die loxP-Sequenz besteht aus einem zentralen Element aus acht Basenpaaren, das die Orientierung bestimmt. Zwei 13 bp lange palindromische Sequenzen flankieren jeweils die zentrale Region und bilden zusammen mit dieser eine 34 bp lange Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase. Ein chromosomales DNA-Segment, das zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen flankiert („gefloxt“) wird, wird durch die Cre-Rekombinase in Form eines zirkulären Produktes herausgeschnitten. Die Cre-vermittelte Rekombination resultiert in der Deletion der markierten DNA-Sequenz, sofern die Orientierung der Erkennungsstellen gleich ist (Abb. 1.6). Eine Inversion des markierten Bereichs tritt bei gegenläufig orientierten loxP-Sequenzen auf. Befinden sich die loxP-Sequenzen auf unterschiedlichen DNA-Strängen, kann folglich eine Translokation erfolgen ^[210, 211].

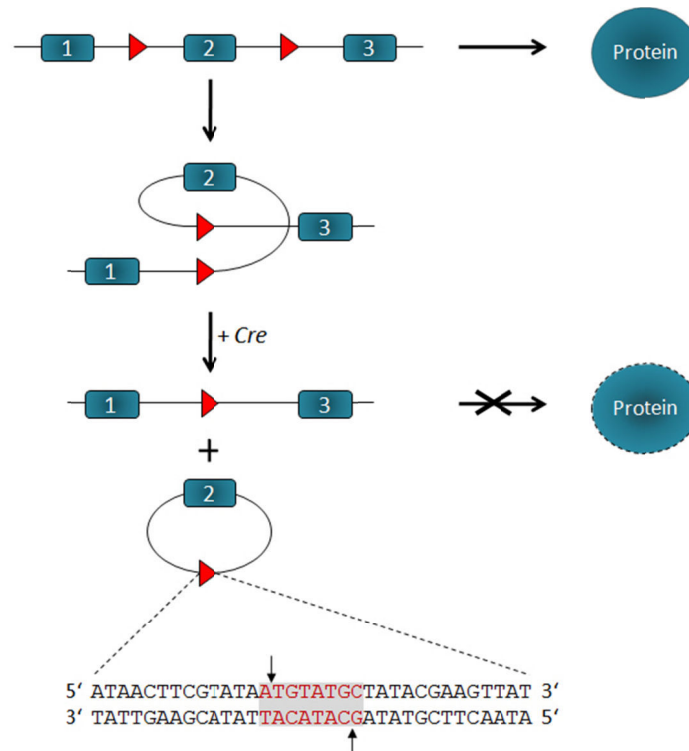


Abbildung 1. 6 Cre/loxP-vermittelte Exzision von DNA. Ein gefloxtes, chromosomales DNA-Segment wird durch die Cre-Rekombinase in Form eines zirkulären Produktes herausgeschnitten. Die Basenfolge der loxP-Erkennungsstelle ist angegeben. Die zentrale Region ist hervorgehoben. Die Schnittstelle ist durch Pfeile markiert (modifiziert nach Jonkers und Berns ^[212]).

Das Flp/frt-System basiert auf dem gleichen Prinzip wie das Cre/loxP-System. Hier wird jedoch die Flp-Rekombinase aus der Hefe verwendet, die spezifische frt-Stellen erkennt ^[213]. So können beide Systeme, Cre/loxP und Flp/frt, in einer Maus nebeneinander vorliegen. Unterschiedliche Cre- und Flp-Linien ermöglichen, je nach Wahl des Promotors, unter dessen Kontrolle die Rekombinase exprimiert wird, eine Zeit- und Gewebe-spezifische Exzision eines flankierten DNA-Abschnitts bzw. eine durch die Exzision induzierte Transgenaktivierung. So stehen Systeme zur Verfügung, in denen die Rekombinase u.a. unter der Kontrolle eines Typ I Interferon-induzierbaren Mx- (*myxovirus resistance*) ^[214], eines TRE- (*tetracycline responsive element*) ^[215] und eines Tamoxifen-induzierbaren Promotors stehen ^[216, 217].

1.2. Die EGFR-Familie

Der EGFR (*epidermal growth factor receptor*) – auch als HER1 (*human ErbB receptor 1*) oder ErbB1 (*avian erythroblastosis oncogene B 1*) bezeichnet – ist ein transmembranärer Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Die EGFR-Familie umfasst neben dem EGFR drei weitere transmembranäre Rezeptoren: HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) ^[218-220]. Allen gemeinsam sind drei funktionelle Domänen: eine glykosylierte, extrazelluläre Liganden-bindende Domäne (N-Terminus), eine hydrophobe Transmembran-Domäne und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität und Phosphotyrosin-Bindemotiven am C-Terminus, die als Rekrutierungsstellen für Effektorproteine dienen. Aufgrund einer Mutation der zytoplasmatischen Domäne besitzt der ErbB3-Rezeptor allerdings keine Tyrosinkinaseaktivität ^[221]. Bei den Liganden der vier Rezeptoren handelt es sich um Peptide, die mit dem EGF verwandt sind. Sie lassen sich aufgrund ihres spezifischen Bindungsverhaltens in vier Gruppen einteilen. Bisher konnten sieben Liganden identifiziert werden, die an den EGFR binden ^[222]. Hierzu gehören u.a. EGF (*epidermal growth factor*), TGF α (*transforming growth factor α*) und Amphiregulin. Epiregulin, HB-EGF (*heparin-binding EGF*) und Betacellulin signalisieren sowohl über EGFR als auch über ErbB4. NRG (Neuregulin) 1 und 2 binden an ErbB3 und ErbB4, NRG3 und 4 nur an ErbB4. ErbB2 kann keine Liganden binden, ist aber der bevorzugte Heterodimerisierungspartner der anderen drei ErbB-Rezeptoren und fungiert so als Verstärker des Liganden-induzierten Signals ^[223]. Die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor führt zur Bildung von Rezeptordimeren. Es kommt dabei sowohl zur Formation von Homodimeren (z.B. EGFR+EGFR) als auch von Heterodimeren (z.B. EGFR+ErbB3). Als Folge der Dimerisierung wird die intrinsische Tyrosinkinase aktiviert. Dies erfolgt durch Autophosphorylierung gezielter Tyrosinreste des Rezeptordimers und legt Bindungsstellen für intrazelluläre SH2 (*src homology 2*) und PTB (*phosphotyrosine binding*) -Domänen enthaltende Effektorproteine frei. Die Rezeptor-Tyrosinkinase besitzt somit nicht nur eine enzymatische Aktivität, sondern fungiert auch als Plattform für andere Signalmoleküle ^[224]. Einige dieser Proteine werden tyrosinphosphoryliert und hierdurch aktiviert (Abbildung 1.7). Hierzu zählt die PLC γ (Phospholipase C γ), die die phosphorylierten Tyrosinmotive 992 und 1173 des EGFR für die Interaktion nutzt. PLC γ katalysiert die Reaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu IP3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol), die beide als *second messenger* bei der Signaltransduktion fungieren. IP3 bindet an intrazelluläre Rezeptoren an der Membran des ER und führt zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Calcium agiert im Zusammenspiel mit DAG und

aktiviert cPKC (*classical protein kinase C*) und nPKC (*novel protein kinase C*). Diese wiederum interagieren mit einer Reihe von nachgeschalteter Signalkaskaden, in die u.a. ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), der Transkriptionsfaktor NFκB, p38^{MAPK} und JNK (c-Jun N-terminale Proteinkinase) involviert sind [225].

Alle ErbB-Rezeptoren können potentiell den Ras/Raf-MAPK-Signalweg induzieren. Die Tyrosin-Phosphorylierung eines Rezeptors führt zur Assoziation der Adapterproteine Shc (*src homology domain c-terminal adaptor homolog*) und/oder Grb2 (*growth factor receptor-bound protein*). Durch die darauf folgende Rekrutierung von SOS (*son of sevenless*) kommt es zur Bildung eines Komplexes, der in mehreren Phosphorylierungsschritten über Ras (*rat sarcoma*), Raf (*rapidly growing fibrosarcoma*) und MEK1/2 (*mitogen-activated protein kinase kinase 1/2*) die Aktivierung von ERK1/2 bewirkt [226].

Des Weiteren können EGFR und ErbB3 die PI3K (*phosphoinositol-3-kinase*) aktivieren. Aufgrund der Existenz multipler Bindungsstellen für die Untereinheit der PI3K (p85) ist ErbB3 der effizienteste Aktivator dieser Kinase. Im Gegensatz hierzu wird die PI3K über das Adapterprotein Gab1 (*Grb2-associated adaptor protein 1*) an EGFR rekrutiert [227]. PI3K katalysiert die Reaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat). Durch die Bindung an den *second messenger* IP3 wird die Verlagerung der PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) und Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*) an die Zellmembran bewerkstelligt. Hier erfolgt die Phosphorylierung von Akt an Thr³⁰⁸/Ser⁴⁷³ durch die aktivierenden Kinasen PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) und PDK2/mTORC2 (*mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2*). Beide Phosphorylierungen sind notwendig für die Aktivierung von Akt [228]. Die aktivierte Kinase setzt eine Transduktionskaskade in Gang, die unter anderem die Hemmung verschiedener Apoptose-auslösender Effektorproteine bewirkt. Zu den *downstream Targets* gehören u.a. mTOR, GSK-3α und -β (*glycogen synthase kinase-3 α/β*) und Bad (*Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter*) [229]. Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg nimmt eine entscheidende Rolle bei der zellulären Proteinbiosynthese, der Proliferation und Apoptose ein.

Die Phosphorylierung zweier weiterer Tyrosine (Tyr⁸⁴⁵ und Tyr¹¹⁰¹) des EGFR-Komplexes wird nicht durch Autophosphorylierung, sondern durch die zytoplasmatische Tyrosinkinase c-Src (*cellular Rous sarcoma oncogene*) vermittelt [230, 231]. Die Phosphorylierung am Tyrosinrest 845 wurde als die wesentliche c-Src-vermittelte Phosphorylierungsstelle, die den EGF-Rezeptor im aktivierten Zustand stabilisiert und somit die Kinaseaktivität des Rezeptors verstärkt, identifiziert. Darüber hinaus dient sie

als Rekrutierungssignal für Faktoren wie z.B. STAT5, das nachfolgend seinerseits phosphoryliert und hierdurch aktiviert wird ^[232, 233].

Zusätzlich zu den hier beschriebenen, durch die ErbB-Rezeptoren aktivierten Signalwegen findet eine Interaktion mit weiteren Systemen statt. Hierzu gehören u. a. der Cadherin/Catenin-Adhensionskomplex ^[234], Steroidrezeptoren ^[235], Integrine ^[236] und der Wnt-Signalweg ^[237].

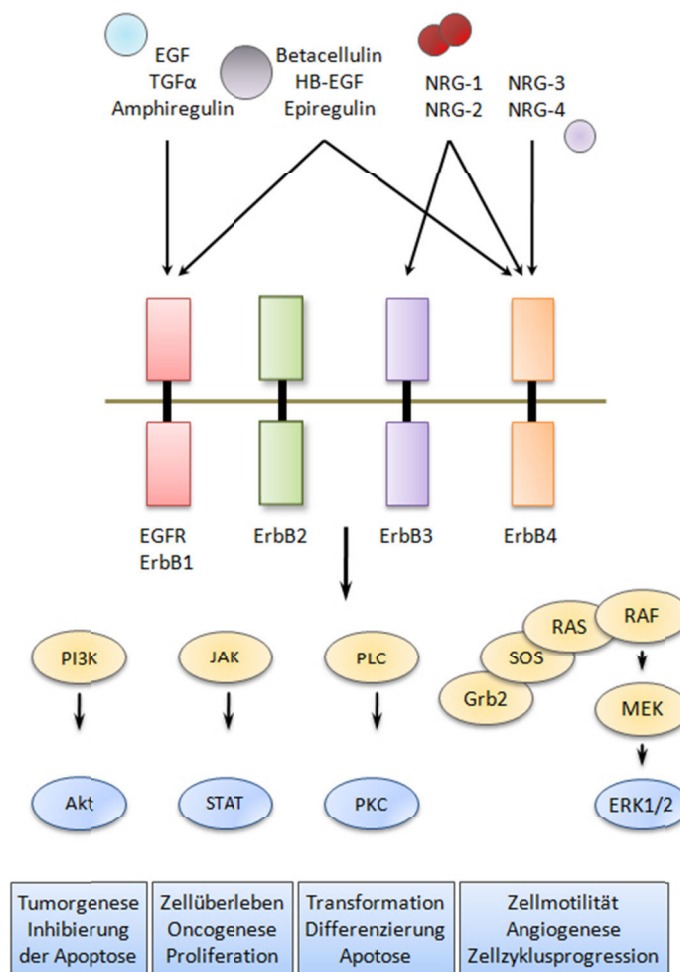


Abbildung 1.7 Zusammenfassende schematische Darstellung der EGFR-Familie und durch den EGFR-regulierter downstream Signalkaskaden. Abkürzungen: Akt: *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*; ErbB: *avian erythroblastosis oncogene B 1*; EGF: *epidermal growth receptor*; EGFR: EGF-Rezeptor; ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinase 1/2*; Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*; HB-EGF: *heparin-binding EGF*; NRG: Neuregulin; JAK: *janus kinase*; MEK: *mitogen-activated protein kinase kinase*; PI3K: *phosphoinositol-3-kinase*; PKC: *protein kinase C*; PLC: *Phospholipase C*; RAS: *rat sarcoma*; RAF: *rapidly growing fibrosarcoma*; SOS: *son of sevenless*; STAT5: *signal transducer and activator of transcription 5*; TGFα: *transforming growth factor α* (modifiziert nach Ono und Kuwano ^[229]).

Die Liganden-vermittelte Aktivierung der EGF-Rezeptoren führt schließlich zur Internalisierung und/oder Degradation des Membranproteins und seinem Liganden. Die E3-Ubiquitin-Proteinligase Cbl (*casitas B-lineage lymphoma*) ist für die Ubiquitylierung und den nachfolgenden Transport des Rezeptors zu lysosomalen Kompartimenten verantwortlich ^[238-240]. Eps15 (*EGFR pathway substrate clone 15*) vermittelt die Internalisierung von EGFR durch *coated pit*-bedingte Endozytose ^[240]. Cbl und Eps15 stellen Beispiele ErbB1-spezifischer Substrate dar ^[239, 241]. Die Negativregulation des EGFR-Signalweges erfolgt außer über die Internalisierung und Degradation des Rezeptors auch über die Dephosphorylierung von EGFR durch die Phosphatasen SHP2 (*src-homology phosphatase 2*) ^[242], PTP 1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) ^[243] und die Tyrosinphosphatase TC-PTP ^[58, 236]. Die Aktivierung von EGFR und ErbB2 induziert zudem die Expression weiterer Negativregulatoren, wie MIG6 (*mitogen-inducible gene 6*) ^[244], LRIG1 (*leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1*) ^[245] und SPRY (*sprouty*) ^[246]. Vor allem die MIG6-vermittelte Inhibierung des EGFR ist physiologisch relevant, da in MIG6-defizienten Mäusen eine Tumorentwicklung beobachtet werden konnte ^[247].

Die aktiven, Liganden-gebundenen ErbB-Rezeptoren wirken in zahlreichen Signalwegen, die in Proliferation, Differenzierung, und Migration involviert sind. Veränderungen der Expression der ErbB-Rezeptoren und ihrer Liganden begünstigen die maligne Transformation gesunder Zellen. Des Weiteren sind verschiedene Mutationen im EGF-Rezeptorgen bekannt, welche eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors zur Folge haben. Eine Überexpression der Rezeptoren kann den Zellzyklus oder die Zelldifferenzierung empfindlich stören und zum Entstehen eines Tumors beitragen. Im Fall eines bestehenden Tumors korreliert die Überexpression des EGFR und/oder ErbB2 mit einer schlechten Prognose. Die verstärkte Expression des EGFR führt zum Tumorwachstum, der Stimulation von Metastasierung, Angiogenese und Gefäßinvasion sowie Apoptoseinhibierung ^[248, 249].

1.3. Ack1

Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase (NTK) Ack1 (*activated Cdc42 kinase 1*) wurde durch das *Screening* einer humanen, hippokampalen cDNA-Bibliothek aufgrund der spezifischen Bindung der Rho-GTPase Cdc42 (*cell division control protein 42*) identifiziert ^[250]. Das ca. 135 kDa große Protein weist multiple, funktionelle Sequenzabschnitte auf: eine N-terminale SAM (*sterile alpha motif*)-Domäne, eine

katalytische Tyrosinkinase, eine SH3 und eine CRIB (*Cdc42-binding domain*) -Domäne (Abbildung 1.8). Am C-Terminus sind Prolin-reiche Sequenzen, aber auch ein Clathrin-, ein Ubiquitin-Bindemotif und eine Mig6 (*Mitogen-inducible gene 6*) -homologe Region kennzeichnend ^[251, 252]. Zu den Mitgliedern der Ack1-Familie gehören Ack1/Tnk2 (*tyrosine kinase, non-receptor, 2*), Tnk1/Kos1 (*kinase of embryonic stem cells*) im Menschen bzw. in der Maus, das bovine Ack2 ^[253], DACK (*Drosophila melanogaster ACK*) und DPR2 (*fak-like tyrosine kinase*) in *Drosophila melanogaster* ^[254] und Ark-1 (*a ras-regulating kinase family member*) in *Caenorhabditis elegans* ^[255]. Die homologen Proteine weisen im Allgemeinen einen der Ack1 vergleichbaren Aufbau auf, z.B. eine Kinase-Domäne, gefolgt von der SH3-Domäne und Prolin-reichen Sequenzen. Ack2 besitzt jedoch eine kürzere N- und C-terminale Region. Tnk1, Kos1 und DACK enthalten keine CRIB-Domäne und weisen zudem ein geringeres Molekulargewicht als Ack1 auf ^[254, 256, 257]. Zudem wird in Bezug auf das humane Ack1 die Existenz mehrerer Isoformen postuliert.

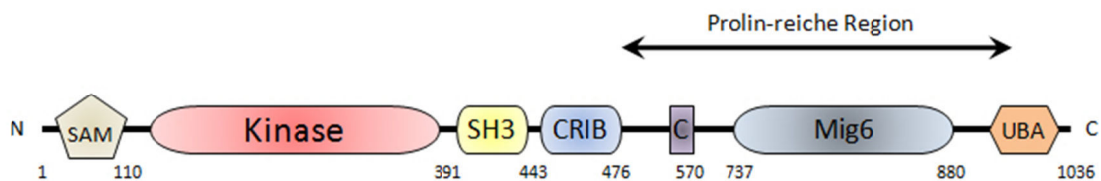


Abbildung 1.8 Strukturelle Organisation von Ack1. Dargestellt ist die Domänenstruktur und Interaktionsregionen der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Ack1. SAM: *sterile alpha motif*; SH3: *Src homology*; CRIB: *Cdc42/Rac interactive binding*; C: *clathrin binding*; Mig6: *Mig6 homology*; UBA: *ubiquitin association* (modifiziert nach Mahajan und Mahajan ^[258]).

Für zahlreiche Proteine wurde eine Interaktion mit Ack1 beschrieben. Ack1 fungiert als *downstream Target* von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und wird als Konsequenz der Assoziation mit Transmembranproteinen, wie z.B. EGFR, an die Membran rekrutiert. Der Mechanismus der Liganden-induzierten Aktivierung von Ack1 ist nicht vollständig verstanden. Es wird diskutiert, dass ein Pool von Ack1-Molekülen in autokatalytisch, tyrosinphosphorylierten Zustand vorliegt ^[259]. Nach erfolgter Ligandenbindung von zahlreichen Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, Integrin-vermittelte Signalwege) wird Ack1 verstärkt tyrosinphosphoryliert und aktiviert ^[260]. Es konnte beobachtet werden, dass das rekrutierte Ack1 einen transienten Komplex mit EGFR über die RTK-bindende, Mig6-homologe Region bildet ^[251]. Der Komplex ermöglicht wahrscheinlich die Bindung

von GTP-gebundenem Cdc42 über die CRIB-Domäne an Ack1. Die Interaktion ermöglicht nachfolgend zudem die Regulation der Stabilität des EGFR durch Interaktionen von Ack1 mit multiplen Proteinen. Ack1 reguliert die Ubiquitylierung und Degradation assoziierter Rezeptoren. Es vermittelt die Degradation des EGFR durch die funktionelle Ubiquitin-bindende UBA-Domäne ^[251]. Neueste Untersuchungen legen nahe, dass die EGF-induzierte Degradation des EGFR stark mit der ebenso induzierten Degradation von Ack1 korreliert. Katalysiert wird Letzteres von der E3 Ubiquitin-Ligase Nedd4, die die Ubiquitylierung durch die Bindung an die Prolin-reiche Region von Ack1 bewirkt und die Degradation der Ack1 initiiert. Es wird diskutiert, dass Ack1 und EGFR eventuell im Komplex endosomal kotransportiert und dem lysosomalen Abbau zugeführt werden ^[261]. Untersuchungen demonstrierten zudem, dass Ack1 mit der schweren Kette von Clathrin interagiert und lassen vermuten, dass Ack1 in die Endozytose durch Clathrin-umhüllte Vesikel involviert ist ^[252, 262]. Als weiterer regulatorischer Faktor wurde SH3PX1 (*sorting nexin 9*) identifiziert, der an die Prolin-reiche Domäne der Ack1 assoziiert und phosphoryliert wird ^[263]. Biochemische Untersuchungen konnten einen aus Ack1, Clathrin und SH3PX1 bestehenden Komplex nachweisen, der in der Degradation des EGFR partizipiert. Eine erhöhte Expression von Ack1 in Hepatomazellen kann einen invasiven Phänotyp dieser Zellen *in vitro* und *in vivo* hervorrufen ^[264]. Ein Hinweis auf den zugrunde liegenden Mechanismus liegt vielleicht in der Beobachtung, dass Ack1 mit p130Cas (*Crk-associated substrate*) ^[265, 266] und Dbl (*diffuse B-cell lymphoma*) ^[267] interagiert und diese tyrosinphosphoryliert. p130Cas stellt eine wichtige Komponente des Integrin-Netzwerkes dar, die in die Zytoskelettregulation und Zelladhäsion involviert ist ^[268-270].

Zusätzlich zu der Interaktion mit dem EGFR wurden weitere RTKs beschrieben, die mit Ack1 assoziieren. Die NTK interagiert gleichermaßen mit MERTK (*c-mer proto-oncogene tyrosine kinase*) ^[271], PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) ^[259], ALK (*anaplastic lymphoma kinase*), LTK (*leukocyte tyrosine kinase*) und AXL (*AXL receptor tyrosine kinase*) ^[272]. Die Interaktion der zytoplasmatischen Tyrosinkinase an die letzten drei Rezeptoren wird nicht direkt vermittelt. Eine effiziente Bindung erfolgt indirekt über das an die Rezeptoren assoziierte Adaptorprotein Grb2 ^[272] und Nck1 (*NCK adaptor protein 1*) ^[259].

Obwohl Ack1 ursprünglich als eine zytoplasmatische Tyrosinkinase identifiziert wurde, demonstrieren Untersuchungen, dass die aktivierte Kinase in den Nukleus transloziert. In diesem Zusammenhang identifizierte Mahajan *et al.* Ack1 als *downstream*-Effektor des ErbB2 ^[273]. Ack1 interagiert mit dem Androgenrezeptor (AR) und phosphoryliert diesen nach Liganden-induzierter Aktivierung des ErbB2. Ein siRNA-induzierter

knockdown der Ack1 resultierte in der Inhibierung der aktivierenden Phosphorylierung des AR. Weitere Untersuchungen legen nahe, dass Ack1 eine wesentliche Komponente des ErbB2-Signalings darstellt. Es wird postuliert, dass Ack1 nach der Interaktion mit AR einen Komplex mit diesem bildet und in den Zellkern transloziert. Die Interaktion ist notwendig für die Rekrutierung des AR an die Androgen-responsiven Elemente (ARE) und somit auch für die optimale Expression AR-induzierter Gene ^[274]. Neueste Untersuchungen legen nahe, dass Ack1 direkt die Aktivierung von Akt regulieren kann ^[275]. Die zytoplasmatische Tyrosinkinase bildet bereits in der Abwesenheit von Liganden einen Komplex mit Akt. Aktiviertes Ack1 induziert nachfolgend die Akt-Phosphorylierung (Tyr¹⁷⁶). Die Depletion von Ack1 verhindert die Phosphorylierung des evolutionär konservierten Tyrosinrestes sowie die Translokation von Akt an die Plasmamembran und folglich die Aktivierung von Akt durch die Phosphorylierung an den bereits bekannten Motiven Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ ^[275]. Die Rolle von Ack1 in Verbindung mit der PI3K-unabhängigen Akt-Aktivierung gewinnt hinsichtlich der Entwicklung maligner Transformationen von Zellen zunehmend an Bedeutung ^[276]. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass eine erhöhte Ack1-Expression in verschiedenen Tumortypen beschrieben wurde und mit einer ungünstigen Prognose des Patienten korreliert ^[264]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht genau verstanden, allerdings scheint der Tumorsuppressor Wwox (*WW domain containing oxidoreductase*) bei einigen Tumortypen eine wesentliche Rolle zu spielen. Unter anderem konnte beobachtet werden, dass Ack1 mit dem Tumorsuppressor direkt interagiert und diesen aktiviert ^[271]. Die Polyubiquitylierung und Degradation des Proteins setzt eine aktivierende Phosphorylierung von Wwox durch Ack1 voraus. Untersuchungen an AIPC- (*androgen-independent prostate cancer*) Tumoren beschreiben ein inverses Verhältnis beider Proteine: so korrelierte ein erhöhter Level an aktiviertem Ack1 mit einem erniedrigten Wwox-Proteinlevel ^[258].

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Über 70 % der HCV Infektionen führen aus bisher nicht verstandenen Gründen zu einem chronischen Verlauf. Dieser persistierende Charakter einer HCV Infektion deutet darauf hin, dass das Virus effektive Strategien entwickelt haben muss, die es ihm ermöglichen, die antivirale Immunantwort des Wirtes zu umgehen. Von besonderem Interesse ist hierbei das HCV NS3/4A-Protein, das durch die proteolytische Spaltung von Wirtszell-eigenen Substraten wie CARDIF und TRIF in die antiviralen Effektormechanismen des Wirtes eingreift. Durch die NS3/4A-vermittelte proteolytische Spaltung von TC-PTP wird das Liganden-induzierte EGFR-Signaling verstärkt und folglich Akt verstärkt aktiviert. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass für das HCV NS3/4A-Protein eine Modulation der Zellproliferation und Apoptoseregulation diskutiert wird.

Ziel dieser Arbeit war:

- Etablierung von Systemen für die HCV-Forschung
 - Generierung von stabilen Zelllinien, die für HCV Gene transgen sind
 - Erstellung einer *Targeting*-Strategie zur Generierung einer konditionalen, für HCV NS3/4A transgenen Maus, die durch den Einsatz des Cre/loxP-Rekombinationssystems eine gewebe- und zeitspezifische Expression des Transgens erlaubt
- Untersuchungen zur Apoptoseinduktion in Hepatomazelllinien und in HCV Proteine beherbergenden Zellen
- Funktionelle Charakterisierung des Proteins Ack1, das im Zuge von Apoptose-relevanten Untersuchungen identifiziert und in HCV Proteine beherbergenden Zellen in einem konstitutiv tyrosinphosphoryliertem Zustand identifiziert wurde

2. Material und Methoden

2.1. Material, Substanzen und Lösungen

2.1.1. Materialien für die Zellkultur

Deckgläser Ø 12 mm	Engelbrecht; Edermünde, Deutschland
Gewebekulturflaschen: 25 cm ² ; 75 cm ²	Greiner; Solingen, Deutschland
Gewebekulturplatten: 50 mm; 100 mm; 150 mm	Falcon; Heidelberg, Deutschland
Gewebekulturplatten; 6 well; 24 well; 48 well; 96 well	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
Minisart ^{Plus} Sterilfilter 0,2 µm; 0,45 µm	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht; Edermünde, Deutschland

2.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM/Nutrient Mix F-12	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMEM (4500 mg/l Glukose)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma; München, Deutschland
FCS	Perbio; Bonn, Deutschland
Gancyclovir	Sigma; München, Deutschland
Glutamin	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
G418 (Genetizin)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
LIF Recombinant Mouse	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Mitomycin C	Sigma; München, Deutschland
Non-Essential Amino Acids	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
PBS (w/o Mg ²⁺ , Ca ²⁺)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Cytogen; Sinn-Fleischbach, Deutschland
Zeocin	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland

2.1.3. Reagenzien und Feinchemikalien

AG1478	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
alpha- ³² P-dCTP	MP Biomedicals; Illkirch, Frankreich
Ampicillin	Sigma; München, Deutschland
Aprotinin	Sigma; München, Deutschland
Benzamidin	Sigma; München, Deutschland
Bradford Protein-Assay	BioRad; Hercules, USA
Bromphenolblau	Sigma; München, Deutschland
BSA	PAA-Laboratories; Linz, Österreich
<i>Mounting Medium</i>	DAKO; Hercules, USA
D-Galaktosamin	Sigma; München, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma; München, Deutschland
DTT	Sigma; München, Deutschland
ECL	Amersham; Braunschweig, Deutschland
EGF, human	Roche; Mannheim, Deutschland
β-Glycerolphosphat	Sigma; München, Deutschland
Leupeptin	Sigma; München, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Na-Pyrophosphat	Sigma; München, Deutschland
PBS (w/o Mg ²⁺ , Ca ²⁺)	Biochrom AG; Berlin, Deutschland
Pefabloc	Fluka; St. Gallen, Schweiz
PMSF	Roche; Mannheim, Deutschland
Polybren	Sigma; München, Deutschland
Protein A-Agarose	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
Protein A/G-Agarose	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
TNFα, human	Roche; Mannheim, Deutschland
Triton X-100	Merck; Darmstadt, Deutschland

2.1.4. Reaktionskits

Ladderman TM Labeling Kit	Takara; Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
QIAGEN PCR Cloning Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraktion-Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAshredder	Qiagen; Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen; Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
VenorGeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs; Berlin, Deutschland

2.1.5. PCR und Klonierung

100 bp DNA Ladder	New England Biolabs; Ipswich, USA
1 kb DNA-Ladder	New England Biolabs; Ipswich, USA
Alkaline Phosphatase rAPid	Roche; Mannheim, Deutschland
dATP	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
dNTP Mix	Roche; Mannheim, Deutschland
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs; Ipswich, USA
High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs; Ipswich, USA
IPTG	Promega; Madison, USA
Mass Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
Oligonukleotide	MWG; Ebersberg, Deutschland
Pwo SuperYield DNA Polymerase	Roche; Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs; Ipswich, USA
Sequenzierungen	MWG; Ebersberg, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec; Köln, Deutschland
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems; Foster City, USA
T4-DNA Ligase	Roche; Mannheim, Deutschland
Taq-Polymerase	Roche; Mannheim, Deutschland
X-Gal	Promega; Madison, USA

2.1.6. Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde der *Escherichia coli*-Stamm JM109 (Promega; Madison, USA) verwendet.

JM109 $endA1$, $recA1$, $gyrA96$, thi , $hsdR17$ (r_k^- , m_k^+), $relA1$,
 $supE44$, $\Delta(lac-proAB)$, [F' $traD36$, $proAB$, $laqI^q\Delta M15$]

2.1.7. Zelllinien

Tabelle 2.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Beschreibung	Referenz
E14.1	murine embryonale Stammzelllinie, aus männlichen 129/SvJ Maus-Blastozyste isoliert	Dr. S. Beer, Düsseldorf
EF	embryonale Maus-Fibroblasten	Dr. S. Beer, Düsseldorf
HepG2	humane Hepatomazelllinie	ATCC # HB-8065
HepG2 mock	humane Hepatomazelllinie; Kontrollzelllinie, konstitutive Expression von <i>EGFP</i>	in dieser Arbeit generiert
HepG2 Core	humane Hepatomazelllinie; konstitutive Expression von <i>HA-Core</i> , <i>EGFP</i>	in dieser Arbeit generiert
HepG2 NS3/4A	humane Hepatomazelllinie; konstitutive Expression von <i>HA-NS3/4A</i> , <i>EGFP</i>	in dieser Arbeit generiert
Huh7	humane Hepatomazelllinie	JCRB # JCRB0403
Huh7 Core/NS3	humane Hepatomazelllinie; stabile Expression von HCV Core-NS3 ^{N-Terminus}	Prof. Dr. R. Bartenschlager, Heidelberg
Huh 9-13	humane Hepatomazelllinie; subgenomisches Replikon (NS2-NS5B)	Prof. Dr. R. Bartenschlager, Heidelberg
mHTC-K1	murine Hepatozyten-Zelllinie	Dr. M. Trilling, Düsseldorf
NIH3T3	murine Fibroblasten-Zelllinie	ATCC # CRL-1658
Phönix-Ampho (ΦNX)	Verpackungszelllinie; humane embryonale Nierenzelllinie (293T-Zellen)	Prof. Dr. S. Ludwig, Münster
PT67	NIH/3T3-basierende Verpackungszelllinie	Clontech Laboratories; Mountain View, USA

2.1.8. Oligonukleotide

Die aufgeführten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. In Tabelle 2.2 sind Oligonukleotidsequenzen aufgeführt, die für die Klonierung der pEGZ-HA-Konstrukten verwendet wurden.

Tabelle 2.2 Verwendete Oligonukleotide für PCR

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	
Core [for / rev]	sense	AATCGATGGAGGAAGCACGAATCCTA
	antisense	AGTTAACTTAAGCGGAAGCTGGGA
NS34A [for / rev]	sense	AATCGATGGAGGAGCGCTATTACGG
	antisense	AGTTAACTTAGCACTCTTCCATCTC

Die Tabelle 2.3 beinhaltet Primer, die für die Klonierung des *Targeting*-Vektors zur Generierung der konditionalen, HCV NS3/4A transgenen Maus verwendet wurden.

Tabelle 2.3 Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung des *Targeting*-Vektors und der Sonden zur Detektion positiver Klone

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	
Exon15*	sense	AGGTACCTTAATTAAC TCGAGGGGTTAACATGTGTAGGCTGTCTACAC CAGTGAAAATCGCAAAAAGAATC
	antisense	TATCGATCACTATTAGTCACTATTAGTCACTATTAGATTCTTTCCATT TGAATTGCAGCACAGAGACAAG
IRES	sense	ACCTGCAGGTCGAGCATGCATCTAGGGCGGCCAATTC
	antisense	TCTGCAGTTGTGGCAAGCTTATCATCGTGTITTTTC
KA1	sense	ATCTAGATTCTGAATGAGAGACTAAAAGCTTATGAACTGTGGC
	antisense	TTCTAGAAAACCATGGTAATGTCTCATGTCTCATGACTC
KA2	sense	AGGTACCTTAATTAAC TCGAGGGGTTAACATGTGTAGGCTGTCTACAC CAGTGAAAATCGCAAAAAGAATC
	antisense	TATCGATCACTATTAGTCACTATTAGTCACTATTAGATTCTTTCCATT TGAATTGCAGCACAGAGACAAG
LA1	sense	ACTCGAGACCCCATAAATCAGCATCCAAACGCTGACACC
	antisense	GTCGACGACCTAGTCTTAGCTGACATCTGTTACTTGG
NS3/4A	sense	ACTGCAGATGGCGCCTATTACGGCCTACTC
	antisense	TGATATCTCATTATTAGCACTCTTCCATCTCATCGAACTC
pA-BGH/DSE	sense	ACCCGGGCAGGCCATGTCTGCCCGTATTTTCGCGTAAG
	antisense	TACTAGTGATCCACTGTCTGGGCTGCTCTCAG
Sonde-5'	sense	TATTCAAGCAAAGAACCTATAGACATAAGG
	antisense	AGTTTCCTCTTCCAGCAGGACTTCTCAAGG

Die Tabelle 2.4 enthält die Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Real-Time-PCR verwendet wurden.

Tabelle 2.4 Verwendete Oligonukleotide für die Real-Time-PCR

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	
Humanes ACK1	sense	TCAATGCCATGCACTCGCT
	antisense	TCCAACAACGATCCCAGAGGT
Humanes SDHA	sense	CCACTCGCTAATGCACACCTT
	antisense	TCCTCTATGCACAGTGCGATG

2.1.9. Plasmide

pBluescript SK(-)

Dr. S. Beer, Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Krankenhaushygiene;
Universitätsklinikum Düsseldorf

pcDNA3

Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland

pDrive

Qiagen; Hilden, Deutschland

pEYFP-C1

Clontech; Mountain View, USA

pGem T-Easy

Promega; Madison, USA

Rc/CMV

Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland

2.1.10. Primärantikörper und Sekundärantikörper

Tabelle 2.5 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft	Erkanntes Epitop	Firma	Verwendung
Primärantikörper				
Ack1	Kaninchen, polyklonal	N-Terminus (human)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
Ack1 pTyr^{857/858}	Kaninchen, polyklonal	Phospho-Ack1 (human, Maus)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
β-Actin	Maus, monoklonal	6 Isoformen von β-Actin (human, Maus, Ratte)	Abcam (Cambridge; GB)	WB (1:10000)
Caspase-3	Kaninchen, polyklonal	Caspase-3 (AS 1-219) (human, Maus)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
EGFR	Kaninchen, polyklonal	endogener EGFR (human, Maus, Ratte)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
EGFR-PE	Maus, monoklonal	Phycoerythrin-gekoppelt (human)	BD Biosciences; (Heidelberg, DE)	FCM (1:5)
EGFR pTyr⁹⁹²	Kaninchen, polyklonal	Phospho-EGFR (human, Ratte)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
EGFR pTyr¹⁰⁶⁸	Kaninchen, polyklonal	Phospho-EGFR (human, Ratte)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
GAPDH	Maus, monoklonal	Glycerinaldehyd-3-PDH (human, Maus, Ratte)	Biodesign (Saco; USA)	WB (1:10000)
GFP (JL-8)	Maus, monoklonal	grün-fluoreszierendes Protein; auch CFP/YFP	Clontech (Saint- Germain-en-Laye; FR)	IF (1:200) WB (1:5000)
Ha	Maus, monoklonal	Influenza Hämagglutinin (YPYDVPDYA)	Roche (Mannheim; DE)	IF (1:200) WB (1:1000)
HCV-Core	Maus, monoklonal	Core Protein (AS 21-40) von HCV	ABR (Rockford; USA)	IF (1:50) WB (1:1000)
HCV-NS3	Maus, monoklonal	NS3-Protein (AS 1252-1477)	Abcam (Cambridge; GB)	IF (1:150) WB (1:2000)

Antikörper	Herkunft	Erkanntes Epitop	Firma	Verwendung
HCV-NS5B (5B-3B1)	Maus, monoklonal	NS5B-Protein (AS 372-382)	Alexis; San Diego, USA	WB (1:5000)
Nedd4	Kaninchen, polyklonal	endogenes Nedd4-1 (human, Maus, Ratte)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
PARP	Kaninchen, polyklonal	endogenes PARP (human, Maus, Ratte)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
Phosphotyrosin (Klon 4G10)	Maus, monoklonal	Phosphotyramin	Millipore (Billerica, USA)	WB (1:4000) IP (1:100)
RIP	Kaninchen, polyklonal	endogenes RIP (human)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
STAT1	Kaninchen, polyklonal	N-Terminus (human, Maus, Ratte)	BD Transduction Lab., Lexington, USA	WB (1:1000)
STAT1 pTyr⁷⁰⁵	Kaninchen, polyklonal	Phospho-STAT1 (human, Maus, Ratte)	Millipore (Billerica, USA)	WB (1:1000)
STAT3	Kaninchen, polyklonal	C-Terminus (human, Maus, Ratte)	Santa Cruz (Santa Cruz; USA)	WB (1:3000)
STAT3 pTyr⁷⁰⁵	Kaninchen, polyklonal	Phospho-STAT3 (human, Maus, Ratte)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000) IP (1:100)
TC-PTP	Maus, monoklonal	TC-PTP (AS 2-314) (human, Maus, Ratte)	R&D Systems (Minneapolis, USA)	WB (1:2000)
TNFR1	Kaninchen, monoklonal	endogener TNFR1 (human)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
TRADD	Kaninchen, polyklonal	endogener TRADD (human, Maus, Ratte)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
TRAF2	Kaninchen, polyklonal	C-Terminus (human, Maus, Ratte)	Cell Signaling (Danvers; USA)	WB (1:1000)
Sekundärantikörper				
HRP-anti-Kaninchen	Ziege, polyklonal	konstanter Bereich von Kaninchen-Ig	DAKO (Hercules; USA)	WB (1:5000)
HRP-anti-Maus	Kaninchen, polyklonal	konstanter Bereich von Maus-Ig	DAKO (Hercules; USA)	WB (1:5000)
Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper	abhängig v. Primärantikörper: Ziege, Esel	konstanter Bereich von Ig der Spezies des eingesetzten Primärantikörpers	Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove; USA)	fitc (1:100) cy3 (1:500) cy5 (1:250)

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

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen und Zelllinien erfolgte in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37°C. Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen mittels PCR-basierten Screeningmethoden (VenorGeM, Minerva) getestet.

Tabelle 2.6 Kultivierungsmedien für Zellen und Zelllinien

Zelllinien	Kultivierung/Zusätze
E14.1	DMEM/High Glucose (4500 mg/L Glukose); 20 % FCS; 0,1 mM β -Mercaptoethanol; 1x NEAS; 1000 U/ml LIF; 2 mM L-Glutamin
EF	DMEM/High Glucose (4500 mg/L Glukose); 20 % FCS; 0,1 mM β -Mercaptoethanol; 1x NEAS; 1000 U/ml LIF; 2 mM L-Glutamin
HepG2	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10 % FCS
HepG2 mock	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10 % FCS; 350 μ g/ml Zeocin
HepG2 Core	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10 % FCS; 350 μ g/ml Zeocin
HepG2 NS3/4A	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10 % FCS; 350 μ g/ml Zeocin
Huh7	DMEM/Nutrient Mix F-12 oder DMEM/High Glucose (4500 mg/L Glukose); 10 % FCS
Huh7 Core/NS3	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10 % FCS; 5 μ g/ml Zeocin
Huh 9-13	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10 % FCS; 1 mg/ml G418
mHTC-K1	DMEM/High Glucose (4500 mg/L Glukose); 10 % FCS; 5 ng/ml EGF
NIH/3T3	DMEM/High Glucose (4500 mg/L Glukose); 10 % FCS
Phönix-Ampho (ΦNX)	DMEM/High Glucose (4500 mg/L Glukose); 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin
PT67	DMEM/High Glucose (4500 mg/L Glukose); 10 % FCS; 4 mM L-Glutamin

Zum Einfrieren der Zelllinien wurden diese bei 70 %igen Konfluenz trypsiniert, mittels Zentrifugation pelletiert und in Einfriermedium (DMEM, 10 % DMSO, 20 % FCS) aufgenommen. Nach der Lagerung der konservierten Zellen bei -80°C für mindestens 12 Stunden wurden diese anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Sowohl die murinen ES-Zellen als auch die murinen EF-Zellen wurden in 80 % FCS/20 % DMSO bei -80°C eingefroren und nach einigen Tagen zur Langzeit-Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Kultur embryonaler Fibroblasten der Maus

Primäre embryonale Fibroblasten (*Feeder*-Zellen) wurden aus Embryonen präpariert, die aus Kreuzungen von Wildtyp-Tieren mit transgenen Neomycin-homozygoten Mäusen stammten ^[277]. Diese Neomycin-resistenten Fibroblasten bilden die ideale Matrix für das Wachstum embryonaler Stammzellen. Die Fibroblasten mussten vor der Kultur mit ES-Zellen wachstumsinaktiviert werden. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml/150 mm Zellkulturschale Mitomycin C-Lösung (1 mg/ml Mitomycin C in PBS) hinzupipettiert. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA für 5 Minuten inkubiert. Nachdem die Zellen in EF-Zellmedium aufgenommen wurden, wurden die Zellen auf neue Zellkulturschalen transferiert.

Kultur von embryonalen Stammzellen der Maus

Die Kultur muriner embryonaler Stammzellen ^[278] (ES-Zellen) erfolgte als Ko-Kultur mit mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten, zur Verhinderung der Differenzierung der ES-Zellen. Ein wesentlicher Faktor hierfür ist das von den Fibroblasten exprimierte, membranständige LIF (*leukemia inhibitory factor*). Zusätzlich wurde den ES-Zellen lösliches LIF mit dem ES-Medium zugeführt, um eine Differenzierung effektiver zu unterdrücken. Nach dem Auftauen wurden die ES-Zellen in 10 ml ES-Zellmedium aufgenommen, bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert und auf mit Fibroblasten bewachsenen 50 mm Kulturschalen kultiviert. Das Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 5 ml 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA für 3 Minuten inkubiert und mit 10 ml ES-Zellmedium aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C. Die ES-Zellen wurden dann auf mit murinen Fibroblasten bewachsenen 100 mm Kulturschalen verteilt.

Limiting dilution

Um aus einer Zellsuspension monoklonale Zellkulturen herzustellen, wurde das Verfahren *Limiting dilution* angewendet. Hierbei wurde die Zellsuspension so verdünnt, dass sich statistisch 4 Zellen in 1 ml Medium befanden. Die verdünnte Zellsuspension wurde dann in eine 96 well-Gewebekulturplatte verteilt (250 µl/Kavität). Einzelne Klone wurden in 24 well-Gewebekulturplatte und schließlich in 75 cm²-Gewebekulturflaschen überführt.

Transfektion von DNA

Der Begriff Transfektion umfasst zahlreiche Verfahren, mit deren Hilfe heterologe DNA in eukaryotische Zellen eingeschleust werden kann. Eine dieser Methoden, die in dieser Arbeit zur Anwendung kam, ist die Lipofektion. Hierbei bilden sich durch polykationische Lipide in wässriger Phase Komplexe aus Nukleinsäure an Liposomen aus. Diese sind in der Lage, die Zellmembran endozytotisch zu passieren. Das transiente Einbringen von Nukleinsäuren in Zellkulturzellen erfolgte adhärent oder in Zellsuspension. Die Lipofektion wurde mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000TM und dem für die Lipofektion optimierte Medium OptiMEM (Invitrogen) durchgeführt. Die Transfektion der Konstrukte erfolgte zunächst nach den allgemeinen Empfehlungen und Protokollen des Herstellers, wurde jedoch im vorgegebenen Rahmen durch Vorversuche modifiziert, und zur Erlangung bester Transfektionseffizienz optimiert.

Transfektion in Zellsuspension. Für die Transfektion wurde je Ansatz 2,2 µg DNA in 50 µl OptiMEM (serumfrei) aufgenommen. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 5 µl Lipofectamine 2000TM mit 245 µl OptiMEM versetzt. Beide Ansätze wurden zusammengeführt, gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Während der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen (75 cm² Zellkulturflasche mit 70-80 % Konfluenz) trypsiniert, pelletiert (Zentrifugation 1000 rpm, 5 Minuten, 4 °C) und anschließend in 15 ml Medium (FCS-frei) resuspendiert. Je Ansatz wurden 1000 µl der Zellsuspension in eine Gewebekulturschale (60 mm) überführt. Jedem DNA/Lipofectamine 2000TM-Ansatz wurden daraufhin 300 µl Medium (FCS-frei) zugegeben und der vollständige Ansatz in die Gewebekulturschale überführt, so dass das Endvolumen 1,6 ml betrug. Nach 4,5 Stunden Inkubation der Zellen bei 37 °C im Brutschrank erfolgte ein Medienwechsel mit 3 ml frischem Kulturmedium. Nach weiteren 48 bis 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen lysiert und wie in den nachfolgenden Abschnitten ausgeführt, bearbeitet.

Transfektion adhärenter Zellen. Bei der Transfektion adhärenter Zellen mit Lipofectamine 2000TM wurden ebenfalls zwei separate Ansätze vorbereitet: ein Ansatz mit DNA und serumfreien OptiMEM-Medium und ein weiterer Ansatz mit Lipofectamine 2000TM und OptiMEM. Die verwendeten DNA-, Transfektionsreagenz- und Medium-Mengen wurden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt und der Größe der verwendeten Gewebekulturschale bzw. der eingesetzten Gewebekulturplatten angepasst.

Transfektion von siRNA

Die Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgte analog der Transfektion mit DNA, hierzu wurden Lipofectamine 2000™ und 2,2 µg DNA pro Ansatz als *Carrier* eingesetzt. Zusätzlich wurden dem DNA-OptiMEM-Gemisch verschiedene Mengen siRNA/Ansatz hinzugefügt. Für die Transfektion von TC-PTP siRNA wurden 37,5 nM, für die Transfektion von Ack1 siRNA wurden 50 nM eingesetzt. Die Sequenz der Kontroll-siRNA wurde einer Publikation entnommen ^[279] (siehe Tab.2.7.). Gegen TC-PTP wurde ein Gemisch aus zwei siRNAs, gegen Ack1 ein Gemisch aus drei siRNA eingesetzt (Ambion/Applied Biosystems; Carlsbad, USA), um die Effizienz des *knockdowns* zu erhöhen.

Tabelle 2.7 Transfektion von siRNA

Bezeichnung		Nukleotidsequenz (5'→3')
Ack1	ID s19851	Ambion/Applied Biosystems; Carlsbad, USA
	ID s19852	
	ID 721	
TC-PTP		AAGAUGUGAAGUCGUAUUAUA
		AAGGAGUUACAUCUUAACACA
Kontrolle		AAUUCUCCGAACGUGUCACGU

Elektroporation des *Targeting*-Vektors in ES-Zellen

Für die Elektroporation wurden 1×10^6 ES-Zellen/800 µl in PBS eingesetzt, in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser II Küvette 0,4 cm, Bio-Rad, München) mit 20-25 µg linearisierten *Target*-Vektor gemischt und bei 300 V, 1200 F mit einem Impuls von 4 ms elektroporiert (L. Fischer, Heidelberg). Im Anschluss wurden die ES-Zellen aus der Küvette direkt auf vier dicht mit Fibroblasten bewachsenen 100 mm Schalen ausplattiert.

Selektion und klonale Expansion Antibiotikum-resistenter ES-Zellen

48 Stunden nach der Elektroporation des *Target*-Vektors begann die Selektion auf homolog rekombinante ES-Zellklone mit Hilfe von 400 µg/ml Genetizin (G418, Invitrogen) im ES-Zellmedium. Ab dem vierten Tag wurde zusätzlich mit 2 µM Gancyclovir doppelselektioniert. Die resistenten Zellklone wurden 11 Tage nach der Transfektion isoliert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Klone daraufhin einzeln mit einer Pipettenspitze in etwa 25 µl PBS in eine 96 well-Platte, die 25 µl PBS enthielt, überführt. Die ES-Zellen wurden durch Zugabe von 25 µl 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA bei 37°C vereinzelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von

100 µl ES-Zellmedium gestoppt. Im Anschluss wurden wachstumsinaktivierte murine EF-Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in 15 ml ES-Zellmedium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 1100 rpm (4°C) zentrifugiert und in 15 ml ES-Zellmedium resuspendiert. In jede Kavität der die rekombinanten ES-Zellklone enthaltenden 96 well-Platte wurden 10 µl der EF-Zellsuspension pipettiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit 25 µl Trypsin behandelt. Die Reaktion wurde mit 135 µl ES-Zellmedium beendet. Um die Hälfte jedes Klon einzufrieren und die andere Hälfte zur Genotypisierung weiter zu expandieren, wurden jeweils 90 µl dieser Zellsuspension in eine neue mit EF-Zellen bewachsene 48 well-Platte überführt. Die restlichen 70 µl der Zellsuspension verblieb in dem ursprünglichen 96 well, dessen Kavitäten jeweils mit 200 µl ES-Zellmedium gefüllt wurden. Die Kavitäten der 48 well-Platten wurden mit weiteren 400 µl ES-Zellmedium gefüllt. Die Zellen wurden für 48 Stunden kultiviert, anschließend eingefroren. Dazu wurden die Klone mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl ES-Zellmedium beendet. In jede Kavität wurde nachfolgend 200 µl eiskaltes Einfriermedium (80 % FCS, 20 % DMSO) pipettiert. Anschließend wurden die Klone der 96 well-Platten gewaschen, jede Kavität mit 50 µl Trypsin inkubiert und in 150 µl ES-Zellmedium aufgenommen. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden in eine neue Kavität auf zwei 96 well-Platten, die mit weiteren 100 µl ES-Zellmedium gefüllt war, überführt. Ein Medienwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Die Klone wurden für 6 Tage inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung (Zelllyse, Restriktion und Southern Blot) bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction* – PCR) ist eine Methode, die die Amplifikation eines DNA-Abschnittes bekannter Länge mittels spezifisch für das *Template* ausgewählten Primern (siehe Abschnitt 2.1.8) *in vitro* ermöglicht ^[280]. Während der PCR katalysiert eine thermostabile Polymerase nach einem Denaturierungsschritt und der Hybridisierung der spezifischen Primer an die DNA (*annealing*) die Verlängerung der Primersequenz (*extension*). Als hitzestabile DNA-Polymerase wurde wahlweise die Pwo SuperYield DNA Polymerase oder die High-Fidelity DNA-Polymerase der Firma Roche eingesetzt. Die High-Fidelity DNA-Polymerase besitzt eine so genannte *proofreading*-Aktivität. Aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität korrigiert die High-Fidelity DNA-Polymerase fehlerhaft

eingebaute Nukleotide und ersetzt diese. Jeder Ansatz enthielt 10-100 ng Template, 2,5 mM dNTPs, je 10 pmol *sense*- und *antisense*-Primer, 1-2,5 Einheiten der Polymerase. Der Ansatz wurde mit Mg^{2+} -haltigem PCR-Puffer versetzt und mit sterilem H_2O auf ein Endvolumen von 50 μl aufgefüllt. Der PCR-Zyklus gliederte sich in drei thermisch unterschiedliche Schritte: Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Dopplestranges (94°C), Primer-Hybridisierung an der einzelsträngigen DNA (Temperatur anhängig von der Primer-Sequenz) und anschließender Verlängerung der Primer (72°C). Durch die zyklische Wiederholung dieser Schritte (25-35 Zyklen) gelingt die Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes. Die PCR-Reaktion erfolgte in dem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ-Research (Hercules, USA).

Anhängen von 3'-A-Überhängen (*A-tailing*)

Thermostabile DNA-Polymerasen mit einer *proofreading*-Aktivität, so wie die Pwo SuperYield DNA Polymerase generieren während der PCR-Amplifikation Fragmente mit glatten Enden (*blunt end*). Um Fragmente mit glatten Enden in den pGEM®T-Easy-Vektor oder pDrive ligieren zu können, wurden diesen Fragmenten zunächst 3'-A-Überhänge angefügt, die komplementär zu den 3'-T-Überhängen des jeweiligen Vektors sind. Der Ansatz enthielt 5 μl des aufgereinigten PCR-Fragmentes, 0,2 mM ATP und 5 U Taq-DNA-Polymerase, Mg^{2+} -haltigen Reaktionspuffer und wurde mit sterilem H_2O auf ein Endvolumen von 10 μl aufgefüllt. Nach der Inkubation für 30 Minuten bei 70°C wurden 2 μl des Ansatzes für die Ligationsreaktion eingesetzt.

Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Die alkalische Phosphatase ist eine Phosphomonoesterase, die 5'-Phosphate von DNA-Enden abspaltet. Um eine Religation des Vektors bei Insertionsligationen zu verhindern, wurde der Vektor nach der Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen mit einer rekombinanten alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm der Firma Roche (rAPid Alkaline Phosphatase) an den 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurde bis zu 1 μg linearisierter Vektor eingesetzt und entsprechend den Angaben des Herstellers weiter bearbeitet. Nach erfolgter Dephosphorylierung wurde die rekombinante Phosphatase für 2 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert. Ein Aliquot des hydrolysierten, dephosphorylierten Vektors wurde zur Kontrolle separat in einem Ligationsansatz eingesetzt.

Auffüllen kohäsiver Enden

Mit dem Klenow-Fragment, der *E. coli* DNA-Polymerase I (ohne 3'→5'-Exonukleaseaktivität), können einzelsträngige, 5'-überhängende Enden von DNA-Fragmenten (*sticky ends*) partiell aufgefüllt werden. Es entsteht ein Doppelstrang mit glattem Ende

(*blunt end*), so dass eine Ligation zwischen zwei DNA-Strängen, die mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, möglich ist. Für die Reaktion wurde 0,5 µg eines DNA-Fragmentes oder Restriktionsnukleasen-behandelten Plasmides mit dem Klenow-Fragment inkubiert. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Angaben des Herstellers. Das Klenow-Fragment wurde durch die Inkubation bei 65 °C für 20 Minuten inaktiviert.

Restriktionsverdau

Zur Hydrolyse von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet, welche charakteristische Palindromsequenzen erkennen und schneiden. Alle eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (USA) bezogen. Die Reaktionsbedingungen (Puffer, Zugabe von BSA, Temperatur) der Restriktionsendonukleasen wurden gemäß der Herstellerangaben gewählt. Die Hydrolyse der DNA erfolgte entweder im analytischen oder im präparativen Maßstab. Für analytische Ansätze wurden 0,5-1 µg DNA und 10-20 Einheiten Enzym mit dem entsprechenden Puffer versetzt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 15 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 1-2 Stunden bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Für präparative Reaktionsansätze wurden 10 µg DNA und 30-40 Einheiten des Restriktionsenzym verwendet, auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und 3-4 Stunden oder über Nacht inkubiert. Die Überprüfung des Restriktionsverdaus erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen.

Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte je nach den zu trennenden Nukleotid-Fragmentgrößen in 0,5 % - 1,0 %-igen Agarosegelen, welche mit einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt wurden^[281]. Als Lauf- und Gelpuffer wurde TAE-Puffer verwendet (242 g/l Tris, 100ml/l 0,5 M EDTA (pH 8,0), 57,1 ml/l Essigsäure). Die Proben wurden zuvor im Verhältnis 1/5 mit einem 5-fach Bromphenolblau-Ladepuffer (25 mg/100 ml Bromphenolblau, 25 mg/100 ml Xylen Cyanol FF, 30 ml 50-fach TAE-Puffer) versetzt. Zur Durchführung wurde eine Flachbett-Elektrophoresekammer der Firma Peqlab (Erlangen) verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von zunächst 80 Volt, die nach dem Einlaufen der Proben auf 120 Volt erhöht wurde. Als DNA-Längenstandard wurde Smart Ladder (Eurogentec; Köln) eingesetzt. Die Auswertung und Dokumentation des DNA-Gels erfolgte mittels des Doc-Print-Geldokumentationssystems der Firma Peqlab.

Isolierung und Aufreinigung von DNA

Die Trennung spezifischer DNA-Einzelfragmente von anderen Fragmenten, Salzen und/oder anderen Verunreinigungen, die in späteren Reaktionen (z.B. Sequenzierung, Ligation usw.) störend wirken können, erfolgte über die Methode der DNA-Elution mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen. Hierzu wurden die spezifischen, aufgetrennten Fragmente in Form eines Agaroseblöckchens aus dem Gel ausgeschnitten und entsprechend den Vorgaben des Herstellers isoliert. Die Nukleinsäurekonzentration der gewonnenen DNA wurde mittels spektral-photometrischer Messung (Extinktion ΔE_{260}) bestimmt.

Isolierung von chromosomaler DNA aus 96 well-Platten

Zur genomischen Southern Blot-Analyse wurde aus ES-Zellklonen die chromosomale DNA isoliert. Dafür wurden pro well 50 μ l ES-Zell-Lysepuffer (10 mM Tris (pH 7,5), 10-mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% N-Lauroylsarcosin, 200 μ g/ml Proteinase K) zu den Zellen geben und die Platte über Nacht bei 56°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde zum Fällern der DNA pro Kavität 100 μ l Ethanol abs. zupipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, bevor der Restriktionsverdau in 50 μ l Restriktionsmix (1x Restriktionspuffer, 100 μ g/ml BSA, 50 μ g/ml RNase, 10 U Restriktionsenzym) bei 37°C über Nacht erfolgte.

Ethanol-Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde zur Fällung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 7,0 und dem 2,5-fachem Volumen Ethanol abs. versetzt. Der Ansatz wurde für mindestens 1 Stunde bei -20°C oder für 30 Minuten bei -70°C belassen. Danach wurde der Ansatz bei 13 000 rpm, 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 μ l 70 % Ethanol aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 Minuten wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O resuspendiert.

Lithiumchlorid-Fällung des *Targeting*-Vektors

Für die Fällung wurde die DNA-Lösung mit 1/8 Volumen 10 M Lithiumchlorid und dem 3-fachem Volumen Ethanol abs. versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei -20°C belassen. Danach wurde der Ansatz bei 13 000 rpm, 4°C für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 μ l 70 % Ethanol aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 250 μ l PBS resuspendiert.

Klonierung

Das Klonieren erfolgte nach Standardprotokollen von Sambrook *et al.* ^[281]. Die Sequenzen aller für diese Arbeit verwendeten Konstrukte wurden durch Sequenzierung durch die Firma MWG (Ebersberg) überprüft. Die TA-Klonierung amplifizierter Fragmente wurde mit dem pGEM®-T Easy Vektor System (Promega) oder dem QIAGEN PCR Cloning Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Southern-Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde gemäß Standard-Methoden auf Nylonmembranen transferiert ^[281]. Dazu wurde die in den Agarosegelen aufgetrennte DNA für 20 Minuten in 0,25 M HCl fragmentiert und jeweils für 30 Minuten in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), sowie in Neutralisierungslösung (2 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 5,5) inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Die Blottingapparatur war mit 20x SSPE-Puffer (3,6 M NaCl, 0,2 M EDTA, 0,2 M Na⁺-Phosphat, pH 7,4) getränktem Filterpapier (3M Whatman™) bedeckt. Zwei in Gelgröße geschnittenen, mit 2x SSPE-Puffer getränkten Filterpapiere und das die zu transferierende DNA enthaltende Agarosegel wurde auf der Blottingapparatur positioniert. Eine Nylonmembran (Hybond™-N+, Amersham) wurde luftblasenfrei in Gelgröße aufgelegt. Die Ränder der Nylonmembran wurden mit Plastikfolie abgedeckt. Auf die Membran wurden zwei weitere mit 20x SSPE getränkte Filterpapiere der gleichen Größe gelegt, darüber ca. 10 cm Handtuchpapier geschichtet und der Aufbau mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert. Die Transferdauer dauerte 18 bis 24 Stunden. Durch UV-Bestrahlung im UV-Stratalinker (0,2 J/cm²) wurde die DNA nach dem Transfer kovalent mit der Membran vernetzt.

Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch *Oligonucleotid primed-Labeling* mittels des Ladderman™ Labeling Kits (Takara) nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurde die DNA mit Hilfe von ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP und der Bca DNA-Polymerase aus *Bacillus caldotenax* YT-G einer 3'-Endmarkierung unterzogen. Überschüssige Nukleotide wurden über eine Sephadex-Säule (MicroSpin S-200; Amersham) abgetrennt und vor Beginn der Hybridisierung 5 Minuten bei 98°C denaturiert.

DNA/DNA-Hybridisierungen mit radioaktiv-markierten Sonden

Die DNA/DNA-Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Sonden erfolgte nach Southern^[282] und Sambrook *et al.*^[281]. Zur Absättigung der Hybond-N Nylonmembran erfolgte zunächst eine Inkubation im Vorhybridisierungspuffer (5x SSPE-Puffer, 0,2 % SDS, 50 % Formamid, 5x Denhardt's-Lösung [50x Denhardt's-Lösung: 5 g Albumin Fraction V, 5 g Ficoll® 400, 5 g Polyvinylpyrrolidon, ad 500 ml A. dest.]) für 3 Stunden bei 37°C. Die Hybridisierung erfolgte in der gleichen Lösung bei 37°C für 16 Stunden. Durch Waschen der Membran in 5x SSPE, 0,2 % SDS bei Temperaturen von 40-60°C wurde überschüssige Radioaktivität und unspezifisch gebundene DNA entfernt. Zur Autoradiographie wurde die Membran für 1-10 Tage mit Röntgenfilmen (Kodak Biomax MR) und zwei Verstärkerfolien (Kodak X-Omatic Regular) exponiert.

Isolierung von RNA

Grundsätzlich wurden für alle RNA-Methoden nur DEPC-behandelte, RNase-freie Lösungen verwendet, um zu verhindern, dass die RNA durch RNasen degradiert wird. Nach der Kultivierung der Zellen auf 60 mm-Schalen wurden diese mit PBS gewaschen und in 350 µl RLT-Puffer (Zugabe von 3,5 µl β-Mercaptoethanol) lysiert. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte mittels des QIAshredder Kits (Qiagen) und die weitere Isolierung und Aufreinigung der RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen). Zusätzlich zur Isolierung wurde ein DNase I-Verdau zur Eliminierung genomischer DNA den Herstellerangaben entsprechend integriert. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm/280 nm bestimmt.

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Quantitect Reverse Transcription Kits (Qiagen). Für einen Ansatz wurden 1,5 µg RNA eingesetzt. Die cDNA wurde nach Angaben des Herstellers synthetisiert, in 100 µl sterilen H₂O aufgenommen und anschließend in der Real-Time-PCR eingesetzt.

Real-Time PCR

Die Real-Time-PCR erlaubt die Quantifizierung von Nukleinsäuren und basiert auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion. Mit der Real-Time-PCR ist es möglich, über die Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes kontinuierlich die Menge an Produkt zu messen. Hierfür wurde der Reporterfarbstoff SYBR Green eingesetzt. Der Farbstoff fluoresziert nur bei Bindung an DNA, dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des Amplikons zu. Da der

SYBR Green Farbstoff nicht nur das Amplikon, sondern auch andere unspezifische, doppelsträngige DNA-Produkte detektieren kann, ist es notwendig die Primer so zu designen, dass diese nur ein einziges spezifisches Produkt generieren und keine unspezifischen Sekundärprodukte wie z.B. Primer-Dimere ausbilden, welche mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse identifiziert werden können. Für das Primer-Design wurde das Computerprogramm Primer-Express (Applied Biosystems) verwendet. Als Konditionen wurden eine Primerlänge von 20-24 bp, eine Primerschmelztemperatur von $\geq 59^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, weniger als 3 G/C-Basen am 3'-Ende und eine Amplikonlänge von 100-200 bp vorgegeben. Als Ausgangsmaterial der Real-Time-PCR wurde 5 μl der 1:4 verdünnten cDNA eingesetzt und zu 50 μl SYBR Green PCR Mastermix nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems) zugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte nach standardisierten Parametern (annealing: 59°C , 40 Zyklen), an die sich eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Reaktionen anschloss. Für die Quantifizierung wurde die ΔCT -Methode verwendet ^[283], dabei ergibt sich der Ct-Wert aus der Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, der signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Als Referenz wurde humane SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A) verwendet.

Ligation

Als DNA-Ligase wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 der Firma Roche verwendet. Dieses Enzym kann nicht nur komplementäre „sticky ends“, sondern auch glatte „blunt ends“ ligieren. Das molare Vektor zu Insert-Verhältnis betrug 1:3 bei Ligationen komplementärer Enden. Die Ligationen wurden wahlweise bei Raumtemperatur für 3 Stunden oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Bei Ligationen glatter Enden (blunt end) wurde das molare Vektor zu Insert-Verhältnis 1:5 gewählt, die Inkubation erfolgte bei 16°C für 16 Stunden. Anschließend wurde die T4-DNA Ligase bei 65°C für 20 Minuten hitzeinaktiviert.

Bakterienstämme und ihre Kultivierung

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien des Stammes JM109 verwendet. Als Nährmedium für die Bakterien diente LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0). Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Selektionsmedien enthielten zusätzlich 50 mg/l Ampicillin. Zur Langzeitkultivierung wurden transformierte *E. coli* Stämme in Einfriermedium (LB-Medium mit 25 % Glycerin) kryokonserviert und bei -80°C gelagert.

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen für Transformationen wurde der *E. coli*-Stamm JM109 (Promega) verwendet. Zur Gewinnung einer klonalen Population wurde aus einer Glycerolstammkultur ein Verdünnungsausstrich mit einer Impföse auf eine LB-Agarplatte ausgebracht. Eine Bakterienkolonie wurde in LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht vorkultiviert. Die Vorkultur wurde in 250 ml Kompetenzmedium (LB-Medium, supplementiert mit 20 nM MgSO_4) überführt und bei 37°C im Schüttler inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte OD_{600} von 0,4 bis 0,6 erfolgte die Zentrifugation bei 4000 rpm, 4°C für 5 Minuten. Das Pellet wurde in TFB-1 Puffer (30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 100 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Die Suspension wurde nachfolgend für 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 4000 rpm bei 4°C für 5 Minuten, wurden die Zellen mit TFB-2 Puffer (100 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 6,5) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert und nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C aufbewahrt.

Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden 100 µl chemisch kompetenter *E. coli* JM109 Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 ng Vektor (oder 10 µl von dem Ligationsansatz) versetzt und für 10-30 Minuten im Eis belassen. Der Ansatz wurde für exakt 45 Sekunden auf 42°C erhitzt und dann sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium (0,5 g/l Hefeextrakt, 2,0 g/l Trypton, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glukose, pH 7,5) wurden die Zellen 1 Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen des Transformationsansatzes (50-200 µl) auf antibiotikahaltigen Platten (mit 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Blau-Weiß-Test zur Selektion rekombinanter Klone (α -Komplementation)

Zur Selektion von Transformanten, die ein Insert im Plasmid enthielten, wurde dem LB-Medium (mit Agar) IPTG (50 µM) und β -D-Galactosid (X-Gal; 80 µg/ml) zugesetzt^[284]. Der verwendete *E. coli* Stamm JM109 besitzt eine (M15-) Deletion im lacZ-Gen und kann daher keine funktionelle β -Galactosidase mehr bilden. Durch Transformation mit Plasmiden wie pGEM T-Easy oder pDrive, die über das Gen der α -Untereinheit der β -Galactosidase verfügen, kommt es zur Bildung eines aktiven Enzyms. Dies kann auf X-Gal und IPTG-haltigen Platten sichtbar gemacht werden, auf denen das lacZ-Gen durch IPTG induziert wird und die β -Galactosidase das

chromogene Substrat X-Gal spaltet. Durch Luftoxidation entsteht dann ein blauer Farbstoff. Da innerhalb des lacZ-Gens eine MCS (*multiple cloning site*) liegt, in die ein Insert einkloniert wird, wird folglich die Sequenz für die β -Galactosidase unterbrochen. Nach der Transformation kommt es zur Bildung einer inaktiven β -Galactosidase und die Kolonie bleibt weiß.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

Zellyse

Die auf Gewebekulturschalen (60 und 100 mm) kultivierten Zellen wurden zum Versuchsende einmal mit kaltem PBS (supplementiert mit 0,1 mM Na_3VO_4) gewaschen und nach Zugabe von Triton-Lysispuffer (1 % Triton X-100, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 4 mM Benzamidin, 2 mM EDTA, 10 % Glycerol, 50 mM β -Glycerolphosphat, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 136 mM NaCl, 20 mM Natrium-Pyrophosphat, 1 mM Na_3VO_4 , 0,2 mM Pefabloc, kurz vor Gebrauch Zugabe von 0,2 % SDS, für 60 mm Schalen: 100-150 μl ; für 100 mm Schalen: 150-250 μl) mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Die geernteten Zellen wurden gevortext, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend einer Ultraschallbehandlung von dreimal 10 Sekunden unterzogen. Somit wurden auch membranständige Proteine, wie zum Beispiel HCV Core und HCV NS3/4A, bei der Lyse gewonnen. Nach dem Ultraschall schloss sich ein kurzer Zentrifugationsschritt an (14000 rpm, 2 Minuten, 4°C). Die Lysate wurde auf ihren Proteingehalt hin quantitativ mittels des Protein-Assays (Biorad) überprüft und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Proteinbestimmung nach Bradford

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

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden jeweils die gleichen Mengen an Protein der einzelnen Proben verwendet. Die Proben wurden mit 4x SDS-Auftragspuffer nach Lämmli (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 40 % Glycerol, 5 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau, kurz vor

Gebrauch Zugabe von 8 % β -Mercaptoethanol) versetzt, bei 98°C für 5 Minuten denaturiert und kurz zentrifugiert. Die diskontinuierliche gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen mit Trenngelen unterschiedlicher PAA-Konzentration (7,5 % bis 12 %). Dabei richtete sich die PAA-Konzentration nach der Größe der zu detektierenden Proteine. Die Sammelgele der Polyacrylamidgele wiesen immer die gleiche PAA-Konzentration (5 %) auf. Zur Durchführung wurde das Gelelektrophoresesystem der Firma Biometra verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 140 Volt über einen Zeitraum von 3-5 Stunden oder bei 64 Volt über Nacht. Als Proteinstandard wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Biorad) eingesetzt.

Nach Beendigung des Gellaufs erfolgte der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach der Semidry-Blotting-Methode in einer Elektrobloitingapparatur der Firma Biorad auf PVDF-Membran (GE Healthcare). Der Stromfluss zwischen den Elektroden wurde durch flüssigkeitsgetränkte Whatman-Papiere (Schleicher & Schuell) gewährleistet. Dabei wurden Blottingpuffer (Anodenpuffer 1: 0,3 M Tris, 20 % Methanol; Anodenpuffer 2: 0,025 M Tris, 20 % Methanol; Kathodenpuffer: 0,04 M 6-Aminocaprinsäure, 20 % Methanol) unterschiedlicher Ionenstärke verwendet. Der Transfer fand bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² für 90-120 Minuten, abhängig von der Größe der zu transferierenden Proteine, statt.

Für die Immundetektion wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % BSA in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 137 mM NaCl; 0,1 % Tween) gesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 bis 1:10.000 (siehe Tabelle 2.5) in 3 % BSA in TBS-T über Nacht bei 4°C. Durch dreimaliges Waschen für jeweils 20 Minuten mit TBS-T wurde unspezifisch gebundener Primärantikörper entfernt. Die Membran wurde nachfolgend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen konnte dann die Detektion des Signals mit Hilfe des WL Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer) und ECL-Filmen (GE Healthcare) in einer Entwicklermaschine der Firma Kodak erfolgen. Um die Membran für weitere Immundetektionen verwenden zu können, wurden nach der Detektion die Protein-Antikörper-Komplexe von der PVDF-Membran mit Hilfe des Stripping-Puffers (67 mM Tris-HCl, pH 6,7; 2 % SDS, 7 % β -Mercaptoethanol) bei 70°C abgelöst.

Immunpräzipitation

Für die Präzipitation von Proteinen wurden jeweils identische Proteinmengen (300 bis 600 µg) in Form von Lysaten verwendet und mit dem Triton-Lysispuffer (ohne SDS) auf das Volumen von 400 µl aufgefüllt. Die Präzipitation von STAT3 (pTyr⁷⁰⁵) erfolgte durch Zugabe von 2-5 µg des entsprechenden spezifischen Antikörpers in einem Volumen von 10 µl. Die Proben wurden dann für 4 Stunden bei 4°C in einem Überkopfrötor inkubiert. Nach Zugabe der Protein A/G-Agarose (Santa Cruz), wahlweise EZview™ Red Protein G Affinity Gel (Sigma) erfolgte eine weitere Inkubation im Überkopfrötor über Nacht. Darauf folgend wurden Antikörper, das präzipitierte Protein und die Agarose bei 2500 rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Es folgten drei Waschschrirte der Präzipitate mit Triton-Waschpuffer (0,1 % Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 136 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM β-Glycerolphosphat, 20 mM Natrium-Pyrophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 4 mM Benzamidin, 0,2 mM Pefabloc, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 10 % Glycerol) durch Absaugen des Überstandes und wiederholter Zugabe von TWP sowie anschließender Zentrifugation (2500 rpm, 4°C, 2 Minuten). Danach wurden die Proben durch Zugabe von 2x Lämmli-Puffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25 % Glycerol, 2 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol) und anschließendem Aufkochen (95°C, 5 Minuten) denaturiert. Nach Zentrifugation der Proben bei 14.000 rpm konnte der Überstand durch die SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Proteine anschließend im Westernblot untersucht werden.

Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 24 well-Gewebekulturplatten auf Glasdeckgläsern ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50-60 % kultiviert. Nach Erreichen der entsprechenden Konfluenz erfolgte die Fixierung der Zellen zur Färbung endogener Proteine. Hierzu wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS wahlweise mit eiskaltem Methanol (100 %) für 5 Minuten bei 4°C oder einer Paraformaldehydlösung (4 % PFA in PBS, pH 10) für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Permeabilisierung der PFA-fixierten Zellen mittels einer 0,1 % Triton X-100-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Durch die Eigenschaften von Methanol, nicht nur fixierend, sondern auch permeabilisierend zu wirken, war nach Anwendung dieser Fixierungsmethode keine Permeabilisierung mehr notwendig. Die Deckgläser wurden erneut mit PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 5% FCS-Lösung (in PBS) für 1 Stunde blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper für inkubiert. Dieser wurde entweder nach den Angaben des Herstellers oder 1:50-1:250 (siehe Tabelle 2.5.) in Blockierungsreagenz verdünnt, auf die Deckgläser

gegeben und diese für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer belassen. Danach wurden die Deckgläser dreimal mit PBS für jeweils 10 Minuten gewaschen, um überschüssigen ungebunden Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper, ebenfalls in Blockierungsreagenz verdünnt, auf die Deckgläser pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Deckgläser wurden erneut dreimal mit PBS für jeweils 10 Minuten sowie einmal mit destilliertem Wasser (zur Entfernung der PBS-Kristalle) gewaschen. Nach Fertigstellung der Färbung wurden die Deckgläser in *Mounting Medium* (Dako) konserviert. Dem *Mounting Medium* wurde der Kernfarbstoff DAPI (Dako) zugegeben. Die Spezifität der Färbungen wurde durch entsprechend durchgeführte Kontrollen (Färbung ohne Primärantikörper) und unter Beachtung der verwendeten Spezies überprüft.

Die Auswertung der Färbung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen *Laserscanning* Mikroskops des Typs LSM 510 META der Firma Zeiss in einem Multitrack-Modus (Trennung der Kanäle), um Interferenzen der verschiedenen Farbstoffe zu verhindern. Das Mikroskop ist mit einem Argon-Laser, zwei Helium-Lasern und einem AOTF (*acousto-optic tunable filters*) ausgestattet, so dass folgende Wellenlängen zur Verfügung stehen: 405 nm, 458 nm, 488 nm, 514 nm, 543 nm und 633 nm. Die gemessenen Emissionen der verwendeten Fluorophore sind in der Tabelle 2.8. zusammengefasst (BP: Bandpass; LP: Longpass). Die Steuerung aller Komponenten und die Bildaufnahmen erfolgten über die Zeiss-Software AxioVision. Die Bildaufnahmen erfolgten mittels eines Objektivs mit 63-facher Vergrößerung.

Tabelle 2.8 Verwendete Fluorophore

Name	Gemessene Anregung [nm]	Emission [nm]
cy3	543 nm	560-615 nm (BP)
cy5	633 nm	640-750 nm (LP)
DAPI	405 nm	420-480 nm (BP)
EGFP	488 nm	505-530 nm (BP)
fitc	488 nm	505-530 nm (BP)

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*flow cytometry*) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA von Zellen. Dabei werden Zellen im Durchflusszytometer anhand spezifischer

Merkmale, wie Größe, Granularität und verschiedener Fluoreszenzen detektiert. Die Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und gelangen einzeln in die Durchflusszelle (*flow cell*), in der sie einem Argon-Laserstrahl ausgesetzt werden. Gemessen wird einerseits die Intensität des Lichtes, welches in Vorwärtsrichtung (*forward scatter*) entlang des einfallenden Lichtstrahls mit einem kleinen Ablenkungswinkel von $0,5-2^\circ$ streut. Diese sogenannte Vorwärtslichtstreuung ist in erster Linie ein Maß für die Zellgröße. Desweiteren wird auch die Intensität des Lichtes, welches in Seitwärtsrichtung (*side scatter*) mit einem Ablenkungswinkel von 90° streut, gemessen. Dieses sogenannte Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Zellgranularität. Das Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Zum anderen werden in den Zellen vorhandene Fluorochrome (wie z. B. Fluoreszein und EGFP) angeregt und führen zur Emission von Fluoreszenz charakteristischer Wellenlänge. Die Durchflusszytometrie wurde auf einem Durchflusszytometer (BD FACSCanto™ II Flow Cytometer, Becton & Dickinson San Jose CA., USA) durchgeführt, und mit der DiVa Software, einem Programm zur Darstellung und Analyse von im FACS gewonnenen Daten (Becton & Dickinson San Jose CA., USA) ausgewertet.

Zunächst erfolgte die Kultivierung der zu untersuchenden Zellen in 60 mm-Schalen oder in 12 well-Gewebekulturplatten bis zu einer Konfluenz von 50-60 %. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und einmal mit PBS/2 mM EDTA gewaschen und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurden die Zellen trypsinisiert, in FACS-Puffer (1x PBS (pH 7,4), 2 % BSA, 0,01 % Natriumazid) aufgenommen und bei 1500 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 μl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Phytoerythrin (PE)-gekoppelten Primärantikörper EGFR inkubiert. Dieser wurde in der Reaktion nach den Angaben des Herstellers in einer 1:5 Verdünnung in FACS-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Die Zellen wurden dreimal mit FACS-Puffer für jeweils 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C gewaschen, um überschüssigen, ungebundenen Antikörper zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen in 250 μl FACS-Puffer aufgenommen und der Messung zugeführt. Bei jeder Messung wurden eine Isotyp-Kontrolle, die jeweiligen Zelllinien (ungefärbt) und eine DAPI-Färbung als Kontrollbedingungen mitgeführt. Eine Messung umfasste 10 000 im FACS detektierte Ereignisse.

2.2.4. Generierung stabiler Zelllinien

Klonierung der für den retroviralen Gentransfer verwendeten Plasmide

Das für den retroviralen Gentransfer verwendete Plasmid pEGZ-HA wurde von Prof. Dr. S Ludwig (Münster) zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält eine IRES, die die cap-unabhängige Translation des 3'-gelegenen Reportergens EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und des darauf folgenden Neomycin-Phosphotransferase-Gens bewerkstelligt. Der vorhandene CMV (humanes Cytomegalovirus) -Promotor sorgt für die Expression des Transgens, das über eine MCS (*multiple cloning site*) einkloniert werden kann und zudem das Ha-taggen des „*gene of interest*“ ermöglicht.

- a. Zur Erstellung des pEGZ-HA-Core wurde die DNA-Sequenz von HCV-Core durch PCR amplifiziert (aus pRV-CNS3-IGZ) und *in frame* über *Clal* und *HpaI*-Schnittstellen einkloniert. Zwischen dem Ha-Tag und HCV-Core wurde so auch ein Glycinlinker eingebracht.
- b. Zur Erstellung des pEGZ-HA-NS3/4A wurde die DNA-Sequenz von HCV-NS3/4A durch PCR amplifiziert (aus pFKi341PiLucNS3-3 ET) und *in frame* über *Clal* (gefolgt von Glycinlinker) und *HpaI*-Schnittstellen in den Vektor einkloniert.

Retroviraler Gentransfer

Die Transduktion bezeichnet im Allgemeinen der Transfer von genetischem Material mit Hilfe von Viren und stellt die wohl effizienteste Methode zum Transfer von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen dar. Dabei bedient man sich der für Viren typischen Eigenschaften, über Rezeptoren gezielt in die Wirtszelle einzudringen. Diese Methode wurde angewandt, um mittels retroviraler Vektoren zwei Transgene (HCV Core, NS3/4A) in Zielzellen (HepG2 wt) stabil zu exprimieren.

Virusproduktion. Die Generierung der stabilen Zelllinien erfolgte in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Professor Dr. Stephan Ludwig (Münster) und Professor Dr. Klaus Schulze-Osthoff (Tübingen). Um die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten retroviralen Vektoren (pEGZ-HA, pEGZ-HA-Core, pEGZ-HA-NS3/4A) in retrovirale Partikel zu verpacken, musste der jeweilige Vektor zusammen mit zwei Verpackungsplasmiden mittels Lipofektion in eine Verpackungszelllinie transferiert werden. Hierfür standen zwei Verpackungszelllinien zur Verfügung: Bei den Phönix-Ampho-Zellen (ΦNX) handelt es sich um eine von 293T Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie, welche durch stabile Transfektion der adenoviralen E1A-Region immortalisiert wurde) abstammende MoMLV Verpackungszelllinie, mit stabil

integrierten Expressionsvektoren für die amphotropen Hüllproteine und die *gag-pol* Proteine (http://www.stanford.edu/group/nolan/tutorials/retpkg_1_packlines.html). Die Zelllinie PT67 entstammte der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3. Zur Generierung viraler Partikel wurden Phoenix-Ampho-Verpackerzellen (ΦNX) bzw. PT67-Verpackerzellen 48 Stunden vor der Lipofektion in einer Dichte von $5,0 \times 10^6$ Zellen pro 100 mm Gewebekulturschale ausgesät. Der Transfektionsansatz bestand aus jeweils drei Plasmiden: 7 µg Vektorkonstrukt (pEGZ-HA Leervektor; pEGZ-HA-NS3/4A; pEGZ-HA-Core), jeweils 16 µg GAG-Pol (*group specific antigen*) sowie je 5 µg VSV (kodiert für das Glykoprotein des *vesicular stomatitis virus*). Es folgte eine Inkubation für 3 Stunden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂, bevor der Medienwechsel durchgeführt wurde. Eine vollständige Transfektion der Phoenix-Zellen mit allen drei Plasmiden führte zur Expression der zur Verpackung der mRNA benötigten viralen Proteine. Nach der Transfektion kam es zur Bildung der infektiösen viralen Partikel, welche in den Zellüberstand abgegeben wurden. Dieser wurde jeweils am zweiten und dritten Tag der Kultivierung abgenommen, gesammelt, bei -80°C eingefroren, sowie durch neues Kulturmedium ersetzt. Die Überstände wurden dann filtriert (Filter der Porengröße 0,45 µm), um Zelltrümmer sowie virusproduzierende Zellen zu entfernen.

Transduktion. Die Hepatomazelllinie HepG2 wurde im adhärennten Zustand transduziert. Dazu wurden HepG2-Zellen 48 Stunden vor Transduktion in 6 well-Gewebekulturplatten überführt. Am darauf folgenden Tag wurde der die viralen Partikel enthaltende Zellüberstand aufgetaut, mit 5 µg/ml Polybren versetzt und mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Das Polybren diente der Steigerung der Gentransfer-Effizienz. Nachfolgend wurde das Medium der in 6 well-Gewebekulturplatten kultivierten HepG2-Zellen durch jeweils 2 ml Phoenix- bzw. PT67-Zellüberstand ersetzt. Die Gewebekulturplatten wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur (1000 rpm) zentrifugiert, um die Infektion der Zellen durch die Viren mechanisch zu unterstützen. Danach wurde das Medium durch Zellkulturmedium ersetzt. 48 Stunden nach erfolgter Transduktion begann die Selektion mittels 350 µg/ml Zeocin im Zellkulturmedium. Die Infektionseffizienz konnte visuell im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden, da der zur Generierung der stabilen HepG2 Zelllinien verwendete retrovirale Vektor (pEGZ-HA) u.a. als Selektionsmarker auch EGFP exprimiert.

2.2.5. Generierung des *Targeting*-Vektors

Klonierung des gene *Targeting*-Vektors für die Generierung der transgenen HCV NS3/4A-Maus

Das Plasmid pEasyFlox wurde für die Klonierung des *Targeting*-Vektors für die Generierung der transgenen HCV NS3/4A-Maus von Dr. S. Beer (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Dieser auf pBSII-KS (Stratagene; USA) basierende Vektor enthält ein von loxP-Sequenzen flankiertes Neomycin-Phosphotransferase-Gen unter Kontrolle des Phosphoglycerol-Kinase-Promotors. Eine weitere LoxP-Sequenz befindet sich *downstream* der Neomycin-Resistenzkassette. Zusätzlich enthält pEasyFlox ein *Herpes simplex* Thymidin-Kinase-Gen (TK) als negativen Selektionsmarker.

Der Vektor Trap90 wurde für die Klonierung des *Targeting*-Vektors für die Generierung der transgenen HCV NS3/4A-Maus von Dr. S. Beer (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Dieser konditionale *gene trap*-Vektor enthält eine IRES, die die cap-unabhängige Translation des 3'-gelegenen Reportergens β -Galaktosidase ermöglicht. Der Vektor enthält ein von loxP-Sequenzen flankiertes Neomycin-Phosphotransferase-Gen unter Kontrolle des Phosphoglycerol-Kinase-Promotors. Als negativen Selektionsmarker enthält Trap90 ein *Herpes simplex* Thymidin-Kinase-Gen (TK).

Zur Herstellung des *Targeting*-Vektors (pFL-NS3/4A) für die Generierung der transgenen HCV NS3/4A-Maus wurden folgende Plasmide generiert:

- a. Der KA2 (kurzer Arm 2; $\approx$ 2700 bp), bestehend aus nichtkodierenden Sequenzen *upstream* des Albumin-Gens, wurde mittels PCR aus der genomischen DNA der murinen embryonalen Stammzelllinie E14 (E14.1) amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Xba*I geschnitten und darauf folgend mit *Xba*I linearisierten pBSK (pBluescript SK(-)) ligiert.
- b. Der Exon15* ($\approx$ 330 bp), bestehend aus Exon 15 (ohne pA-Signal) des Albumin-Gens und umgebenden Intronsequenzen, wurde mittels PCR aus der genomischen DNA der murinen embryonalen Stammzelllinie E14 (E14.1) amplifiziert. Das Fragment wurde über *Cla*I und *Xho*I-Schnittstellen in den pBSK-KA2 einkloniert.
- c. Die DNA-Sequenz des HCV NS3/4A ($\approx$ 2060 bp) wurde mit Start- und Stop-Codon durch PCR amplifiziert (aus pFKi341PiLucNS3-3 ET). Das Fragment wurde mit *Pst*I- und *Eco*RV restringiert und in den *Pst*I und *Sma*I linearisierten Vektor pBSK-Exon15*-KA2 einkloniert.
- d. Die IRES ($\approx$ 630 bp) wurde aus dem Vektor Trap90 durch PCR amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Pst*I geschnitten und in den *Pst*I linearisierten Vektor pBSK-Econ15*-NS3/4A-KA2 *upstream* der NS3/4A ligiert.

- e. Das pA-Signal und BGH/DSE-Elemente (insg. ≈ 1230 bp) wurden aus dem Vektor Trap90 durch PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte die Restriktion mit *Sma*I und *Spe*I. Das Fragment wurde *downstream* des HCV NS3/4A über *Sma*I und *Spe*I-Schnittstellen in den *Sma*I und *Spe*I linearisierten Vektor pBSK-Exon15*-IRES-NS3/4A-KA2 kloniert.
- f. Der LA1 (lander Arm 1; ≈ 2700 bp), bestehend aus dem Exon 13, 14 des Albumin-Gens und umgebenden Intronsequenzen, wurde mittels PCR aus der genomischen DNA der murinen embryonalen Stammzelllinie E14 (E14.1) amplifiziert. Über *Xho*I und *Sal*I-Schnittstellen wurde LA1, *downstream* der Neomycin-Resistenzkassette in den *Xho*I linearisierten pEasyFlox kloniert.
- g. Der KA1 (kurzer Arm 1; ≈ 500 bp), bestehend aus Exon 15 des Albumin-Gens und umgebenden Intronsequenzen, wurde mittels PCR aus der genomischen DNA der murinen embryonalen Stammzelllinie E14 (E14.1) amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Nhe*I geschnitten und mit dem Klenow-Fragment inkubiert. KA1 wurde *upstream* von LA1, aber *downstream* der Neomycin-Resistenzkassette in den *Sal*I linearisierten, Klenow-Fragment behandelten pEasyFlox-LA1 kloniert. Das klonierte KA1-Fragment wurde nach erfolgreicher Ligation von zwei loxP-Sequenzen flankiert.
- h. Das Fragment LA1-KA1-Neo wurde aus dem Vektor pEasyFlox-LA1-KA1 durch Restriktion mit *Bam*HI und *Xho*I isoliert und mit dem Klenow-Fragment behandelt. Der Vektor pBSK-Exon15*-IRES-NS3/4A-pA-BGH/DSE-KA2 wurde mit *Xho*I linearisiert und anschließend mit Klenow behandelt. Das Fragment LA1-KA1-Neo wurde in einer *blunt end*-Ligation *upstream* des Exon15* einkloniert.
- i. Die TK (Thymidin-Kinase; insg. ≈ 8310 bp) wurde mittels *Not*I-Restriktion des Trap90 isoliert. Die Klonierung in den Vektor pBSK-LA1-KA1-Neo-Exon15*-IRES-NS3/4A-pA-BGH/DSE-KA2 erfolgte *downstream* des KA2 über *Not*I-Schnittstellen.

Linearisierung des Targeting-Vektors für die Transfektion in ES-Zellen

Der Targeting-Vektor wurde mit *Pac*I linearisiert. Dafür wurden 200 μ g des pFL-NS3/4A und 200 U des Restriktionsenzym mit dem Reaktionspuffer (NEBuffer 1) und BSA versetzt. Das Volumen wurde mit H₂O auf 200 μ l aufgefüllt. Der Reaktionsansatz inkubierte darauf folgend für 8 Stunden bei 37°C. Die Überprüfung des Restriktionsverdaus erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel.

2.2.6. Statistische Auswertung

Die densitometrische Auswertung der aus den Western Blots erhaltenen Proteinbanden wurde mit Hilfe der Molecular Imaging Software (Version 4.0.3) der Firma Kodak durchgeführt. Der Quotient der Kontrolle wurde dem Wert 1 gleichgesetzt und der zweite Wert wurde relativ zur Kontrolle angegeben. Die Signifikanzen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des ANOVA- und des Mann-Whitney-Tests berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung von Systemen für die HCV-Forschung

Die Hepatitis C-Virusinfektion stellt ein globales Problem dar. Bei ca. 60 % der Infizierten kommt es zu einem chronischen Verlauf, der von einem inflammatorischen Leberschaden, einer viralen Persistenz und einem erhöhten Risiko eines hepatozellulären Karzinoms begleitet wird. Obwohl die molekularen Mechanismen, die einen chronischen Verlauf begünstigen, bisher nicht eingehend verstanden sind, legt der langwierige Verlauf der Krankheitsmanifestation nahe, dass das Hepatitis C Virus mit wirtszelleigenen Signalwegen interferiert, die ihm folglich einen wirkungsvollen Schutz vor der antiviralen Immunantwort des Wirts bieten.

Durch seine vielfältigen Funktionen nimmt das NS3/4A-Protein eine zentrale Rolle im HCV-Replikationszyklus ein. Die virale Protease ist einerseits für die Polyproteinprozessierung und folglich für die Etablierung des Replikationskomplexes essentiell. Andererseits interagiert NS3/4A mit wirtszellspezifischen Proteinen und spaltet diese. So konnte belegt werden, dass der NS3/4A-Komplex durch die proteolytische Spaltung von CARDIF und TRIF in die Blockierung der angeborenen, antiviralen Immunantwort der Wirtszelle involviert ist. Durch die NS3/4A-vermittelte proteolytische Spaltung von TC-PTP wird das Liganden-induzierte EGFR-Signaling verstärkt und folglich Akt verstärkt aktiviert. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass für das HCV NS3/4A-Protein eine Modulation der Zellproliferation und Apoptoseregulation diskutiert wird. Der vorliegende Datensatz ist jedoch zu gering, so dass die Interaktion von HCV NS3/4A mit dem Apoptosesignalweg unvollständig verstanden ist.

Zur detaillierten Analyse Apoptose-relevanter Interaktionen des Hepatitis C Virus mit der Wirtszelle wurden verschiedene *in vitro* Modellsysteme eingesetzt. Das von Lohmann *et al.* etablierte Replikonsystem (Huh 9-13) erlaubt die Untersuchung des modulatorischen Einflusses der nichtstrukturellen Proteine NS3 bis NS5B. Zudem wurden in dieser Arbeit Zelllinien generiert, die für einzelne HCV-Gene transgen waren. So konnten HCV *Core* und *NS3/4A* exprimierende HepG2-Zelllinien generiert werden, die im ersten Teil dieser Arbeit analysiert werden. Zur Untersuchung der Pathogenese sind auch geeignete *in vivo* Modelle erforderlich. Daher wurde parallel eine *Targeting*-Strategie zur Generierung einer konditionalen, für HCV NS3/4A transgenen Maus erstellt und der Rekombinationsvektor kloniert. Ausgehend von diesem Ansatz können weiterführende Studien zur Eingrenzung der Effekte gezielt vorgenommen werden.

3.1.1. Generierung der Zelllinien

Zur detaillierten Untersuchung des modulatorischen Einflusses von HCV wurden humane Hepatomazelllinien, die für HCV-Gene transgen waren, mittels retroviralem Gentransfer generiert. Zu diesem Zweck wurden HepG2-Zellen mit einem Vektor, der u.a. für das Fusionsgen aus Ha-Tag und *Core* bzw. *NS3/4A* kodiert, retroviral transfiziert (für weitere Einzelheiten siehe Abschnitt 2.2.4). Die Generierung der stabilen Zelllinien erfolgte in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Professor Dr. Stephan Ludwig (Münster) und Professor Dr. Klaus Schulze-Osthoff (Tübingen).

Die generierten stabilen Zelllinien wurden mittels Western Blot und indirekter Immunofluoreszenz charakterisiert. Die folgenden Abbildungen 3.1 und 3.2 veranschaulichen das Ergebnis der Charakterisierung: Die Expression des HCV *NS3/4A*-Gens wurde mittels Immundetektion indirekt über den integrierten Ha-Tag nachgewiesen (Abb. 3.1, Spur 4). Aufgrund des Ha-Tags ergab die Western Blot-Analyse für HCV Core ein höheres Molekulargewicht und eine prominente Bande bei 25 kDa (Vergleich Spur 3 mit 6). Zusätzlich wurde die Expression des *EGFP* im Immunoblot überprüft. Als Negativkontrolle wurden Zellextrakte der Hepatomazelllinie HepG2 wt, Huh7 wt und der generierten Kontrollzelllinie HepG2 Mock eingesetzt. Als Positivkontrollen dienten Zellextrakte von Zellen, die das subgenomische HCV-Replikon tragen (Huh 9-13), und Zellen, die die HCV Gene *Core-NS2-NS3*^{N-Terminus} stabil exprimieren (Huh7 Core/NS3).

Zur Analyse der intrazellulären Verteilung der Fusionsproteine wurde ein konfokales Laserscanning Mikroskop verwendet. Aus der Abbildung 3.2 ist in den untersuchten, generierten Hepatomazelllinien die zytoplasmatische Lokalisation von HCV NS3 zu erkennen. Zudem ist sowohl die vesikuläre als auch die zytoplasmatische Verteilung des HCV Core Proteins, aber auch die Kolo-kalisation der Ha-Tags mit dem Core Protein ersichtlich. Die Expression der HCV Gene *Core* und *NS3/4A* wurde mittels indirekter Immunofluoreszenz auch über den integrierten Ha-Tag nachgewiesen. Die Kolo-kalisation wird dabei bei der Betrachtung der übereinander gelagerten Fluoreszenzen des Ha-Tags und des Core- bzw. des NS3-Proteins deutlich (Abbildung 3.2, Merge).

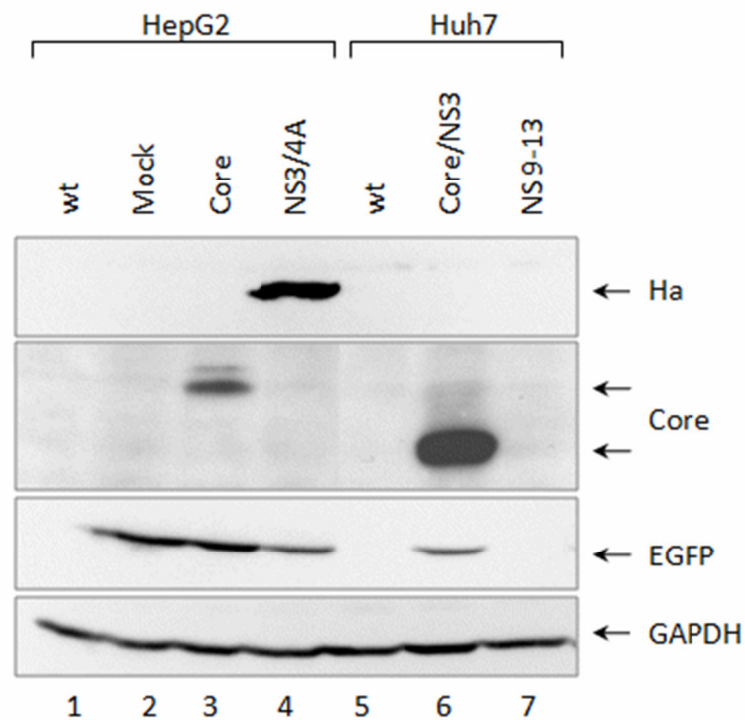


Abbildung 3.1 Biochemische Charakterisierung der generierten, stabilen Zelllinien. HepG2 wt-, HepG2 Mock-, HepG2 Core- bzw. HepG2 NS3/4A-Zellen sowie Huh7 wt-, Huh7 Core/NS3- bzw. Huh 9-13-Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % lysiert. Jeweils 50 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden EGFP, HCV Core, Ha und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

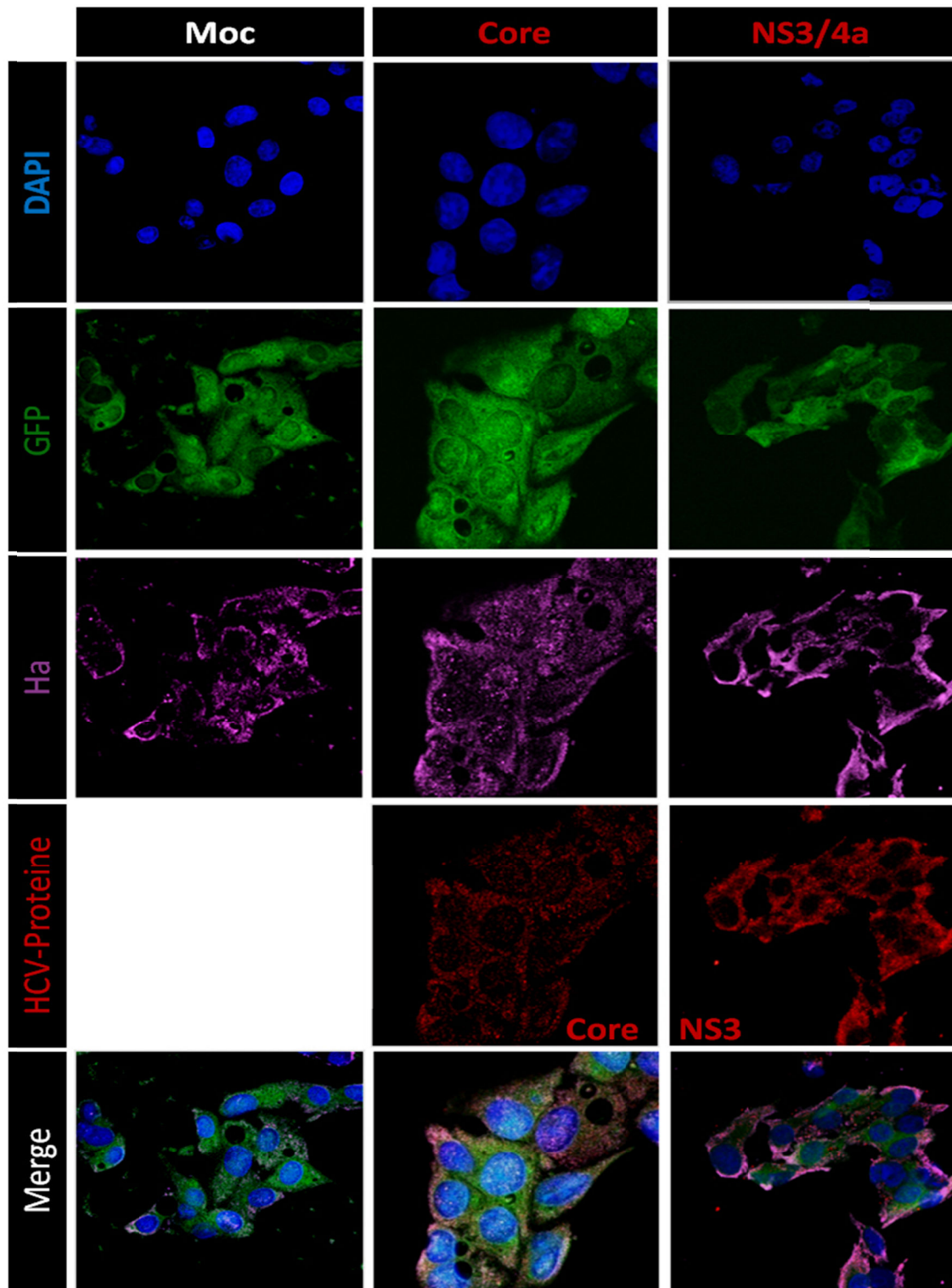


Abbildung 3.2 Konfokale lasermikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von HCV Core bzw. NS3 und dem Ha-Tag in den generierten, stabilen Hepatomazelllinien. HepG2 Mock, Core und NS3/4A-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät nach 24 Stunden mit Methanol fixiert. HCV Core wurde über den Primärantikörper C7-50 (ABR) bzw. HCV NS3 über den Primärantikörper 328 (ABR) und einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (Anregung bei 543 nm), der Ha-Tag wurde über den Ha-Primärantikörper und einem Cy5-konjugierten Sekundärantikörper (Anregung bei 633 nm) visualisiert. Die Anregung des Fluorophors EGFP erfolgte bei 488 nm. Die Färbung wurde mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops analysiert. Merge: Übereinanderlagerung der als rot, grün und lila dargestellten Kanäle.

3.1.1.1. Limiting dilution

Da während der Kultivierung der Zelllinien die Beobachtung gemacht wurde, dass die stabilen HepG2 Core- und NS3/4A-Zellen abhängig von der Dauer der Kultivierung und somit der Anzahl des Passagierens das Transgen verlieren, wurde das Verfahren *Limiting dilution* angewendet, über welches aus einer Zellsuspension monoklonale Zellkulturen hergestellt wurden. Ausgehend von der Zellsuspension wurden aus HepG2 Core zehn, aus HepG2 NS3/4A zwei putative Zellklone isoliert und kultiviert. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, konnte im Immunoblot jeweils eine monoklonale Zellkultur gewonnen werden. Als Kontrollen dienten hier Zellextrakte der Hepatomazelllinie HepG2 wt, HepG2 Mock und Huh7 (Negativkontrolle), Zellen, die das subgenomische HCV-Replikon tragen (Huh7 9-13), und Zellen, die die HCV Gene *Core-NS2-NS3*^{N-Terminus} stabil exprimieren (Huh7 Core/NS3).

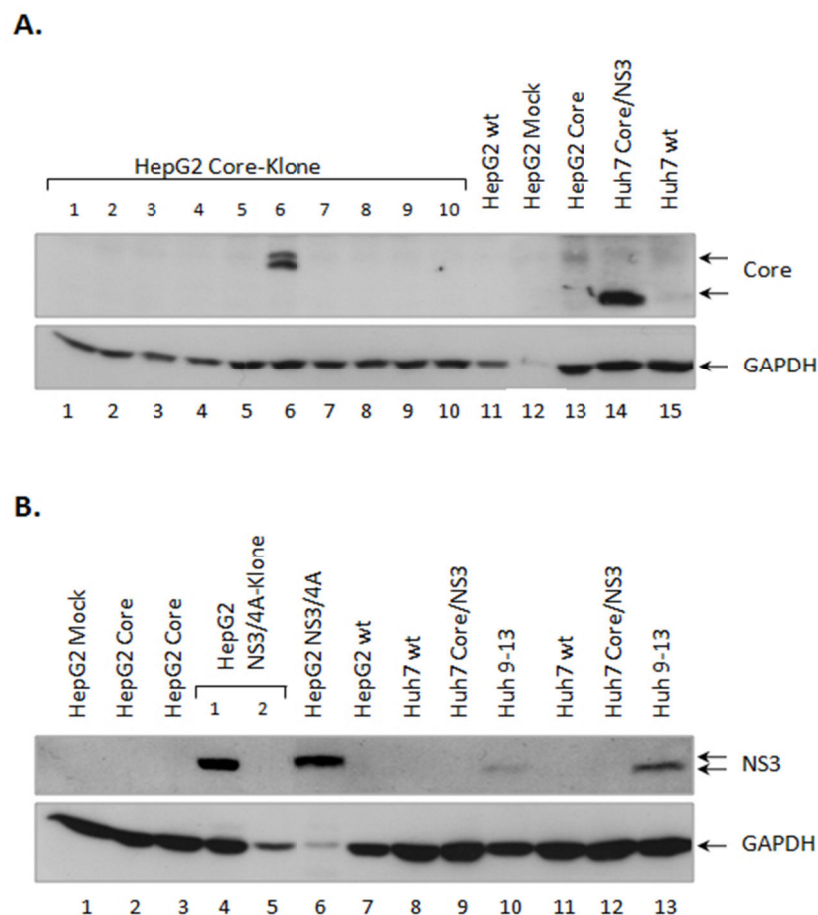


Abbildung 3.3 Western Blot-Analyse der monoklonalen Zellkulturen. HepG2 wt-, HepG2 Mock-, HepG2 Core (und Klone 1-10) bzw. HepG2 NS3/4A-Zellen (und Klone 1-2) sowie Huh7 wt-, Huh7 Core/NS3- bzw. Huh 9-13-Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % lysiert. Jeweils 50 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden (A) HCV Core und GAPDH (Beladungskontrolle); (B) HCV NS3 und GAPDH nachgewiesen.

3.1.2. Vorarbeiten zur Generierung einer konditionalen, transgenen NS3/4A Maus

3.1.2.1. Klonierung des *Targeting*-Vektors

Parallel zur Etablierung der stabilen Zelllinien wurde eine *Targeting*-Strategie zur Generierung einer konditionalen, für HCV NS3/4A transgenen Maus erstellt und der Rekombinationsvektor kloniert. So soll mittels des Cre/loxP-Rekombinationssystems eine Mauslinie generiert werden, die eine zeit- und gewebespezifische Expression des HCV NS3/4A-Gens ermöglicht.

Als Ort des Rekombinationsereignisses wurde das Albumin-Gen fokussiert (Abbildung 3.4 A). Der Genloкус von Albumin ist ca. 15,7 kb groß und besteht aus 15 Exons. Im Exon 1 befindet sich das Start-Codon ATG, im Exon 14 das Stopp-Codon. Der *Targeting*-Vektor pFL-NS3/4A wurde in pBlueskript so konstruiert, dass 3'-abwärts des Exon 15 des genomischen Albumin-Lokus, das das polyA-Signal enthält, eine Neomycin-Resistenzkassette und ein mutiertes Exon 15 eingefügt wird (Abbildung 3.4.B). Die zur Positivselektion enthaltende Neomycin-Phosphotransferase erlaubt das Wachstum von rekombinierten ES Zellklonen in Gegenwart von Genetizin (G418). Hierdurch ist die spätere Cre-vermittelte Deletion in positiven ES-Zellklonen möglich. Bei der Klonierung des *Targeting*-Vektors wurde der Marker in *antisense*-Orientierung eingebaut. Das mutierte Exon 15 weist statt des polyA-Signals dann drei Stopp-Codons auf. Die nachfolgende Kassette enthält die Sequenz für HCV NS3/4A, die von einer IRES und einem polyA-Signal flankiert wird, gefolgt von stabilisierenden Elementen, die eine effiziente Polyadenylierung und das Spleißen der HCV-mRNA gewährleisten. Um eine korrekte Rekombination des Vektors zu ermöglichen, sind die Komponenten von beiden Seiten von unterschiedlich langen homologen Bereichen des Albumin-Lokus flankiert. Sie sind als "langer Arm" 1 bzw. "kurzer Arm" 1 und 2 bezeichnet. Der 2,7 kb umspannende lange Arm liegt 5' der Neomycin-Kassette. Die Neomycin-Kassette ist an beiden Seiten von loxP-Erkennungssequenzen flankiert. Der kurze Arm 1 (enthält Exon 15 und umgebende Intronsequenzen) hat eine Länge von 500 bp und liegt ebenfalls 5'-aufwärts der Neomycin-Kassette. Der Vektor enthält drei loxP-Erkennungssequenzen, die so angeordnet sind, dass der kurze Arm 1 und die Neomycin-Kassette flankiert sind. Das Gen für die *Herpes simplex* Virus Thymidinkinase (TK) wurde 3'-abwärts des kurzen Armes 2 eingesetzt. Der Einbau der TK-Kassette in den *Targeting*-Vektor erlaubt die Negativselektion von ES Zellklonen, bei denen der Rekombinationsvektor nicht über homologe Rekombination und somit ungerichtet in das Genom inseriert wurde. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass bei ungerichteter Rekombination auch heterologe DNA, z.B. die TK-Kassette, ins Genom

eingebaut wird. Diese ist sensitiv für den nachfolgenden Einbau des Thymidinanalogons Gancyclovir in die DNA, so dass es zur Blockade der DNA-Replikation kommt. Da bei homolog rekombinierten ES Zellklonen die TK-Kassette nicht in das Genom integriert wird und die endogene Thymidinkinase Gancyclovir folglich nicht aktivieren kann, sind diese resistent. Die Linearisierung des generierten *Targeting*-Vektors erfolgt über die Schnittstelle *PacI*, die sich 5'-aufwärts des langen Armes 1 befindet (siehe Abschnitt 2.2.5).

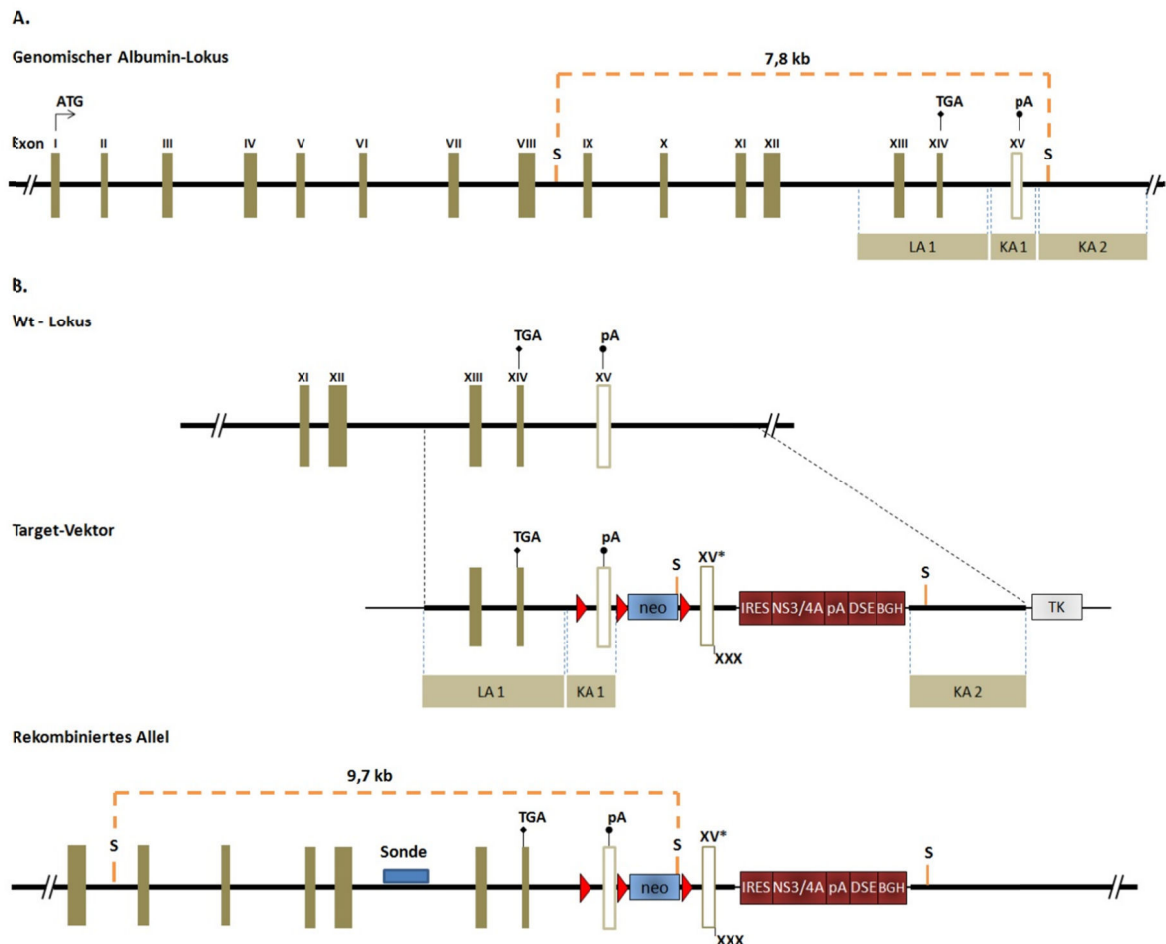


Abbildung 3.4 Strategie für die Generierung der konditionalen, transgenen HCV NS3/4A-Maus. (A) Schematische Darstellung des Wildtyp-Lokus des Albumin-Gens. Im Exon 1 befindet sich das Start-Kodon, Exon 14 enthält das Stopp-Codon, Exon 15 das polyA-Signal. Die theoretische Lage des LA1, KA1 und 2 ist angegeben. (B) Schematische Darstellung des HCV NS3/4A-Rekombinationsvektors und des wildtypischen sowie mutierten Albumin-Lokus. LA 1 besteht aus Exon 13 und 14, KA1 aus Exon 15 (und umgebende Intronsequenzen). Der KA1 ist von zwei loxP- Erkennungssequenzen flankiert, gefolgt von einer ebenfalls geflochten Neomycin-Selektionskassette (neo). 3'-upstream von neo befindet sich das mutierte Exon 15, dessen polyA-Signal durch 3 Stopp-Codons ersetzt wurde. Die nachfolgende IRES erlaubt die Translation des HCV NS3/4A. Das anschließende polyA-Signal terminiert die Transkription. Nach erfolgreichem *Targeting* wird das wildtypische Allel als Bande mit einer Größe von ca. 7,8 kb sichtbar und das rekombinierte Allel als Bande von ca. 9,7 kb sichtbar. Exonsequenzen sind mit grünen horizontalen Rechtecken, Intronsequenzen mit dicker, schwarzer Linie dargestellt. Die Sonde für die Southern-Hybridisierung ist mit einer blauen, horizontalen Box gekennzeichnet, die Größe der erwarteten Restriktionsfragmente durch den *SpeI*-Verdau ist angegeben. BGH: *bovine growth hormone*; DSE: *downstream sequence element*; IRES: *internal ribosome entry site*; KA: kurzer Arm; KA: langer Arm; neo: Neomycin-Selektionskassette; pA: polyA-Signal; S: *SpeI*; TGA; Stopp-Codon; TK: *Herpes simplex Virus* Thymidinkinase; wt: Wildtyp; XV*: mutiertes Exon 15; xxx: 3mal Stopp-Codon.

Die Klonierung des Vektors ist abgeschlossen und soll in Zukunft zur homologen Rekombination von E14 pluripotenten embryonalen Stammzellen herangezogen werden.

3.1.2.2. Testung der Sonden

Nach erfolgreichem *Targeting* können die ES-Zellklone mit der 5'-flankierenden Sonde detektiert werden. Dazu werden die Klone mit dem Restriktionsenzym *SpeI* geschnitten und mit der 5'-Sonde im Southernblot hybridisiert. Das wildtypische Allel wird als Bande mit einer Größe von ca. 7,8 kb sichtbar und das rekombinierte Allel als Bande von ca. 9,7 kb, da über den *Targeting*-Vektor eine zusätzliche *SpeI* Schnittstelle vor der Neomycin-Resistenzkassette eingefügt wurde. Eine 5'-flankierende Southern-Sonde, die das wildtypische Allel genomischer DNA von E14 Zellen detektiert, wurde bereits getestet (Abbildung 3.5).

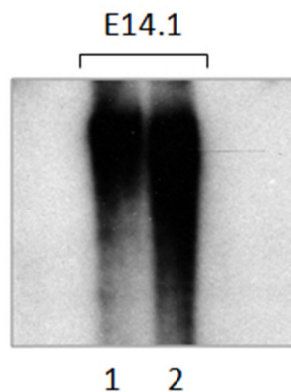


Abbildung 3.5 Sondentest der 5-flankierenden Southernsonde. Isolierte genomische DNA von ES-Zellen (E14.1) wurde mit dem Enzym *SpeI* verdaut und mit der P^{32} radioaktiv markierten 5'-Sonde mittels Southern Blot analysiert. Spur 1 und 2: Auftrag unterschiedlicher DNA-Konzentrationen.

3.1.2.3. Strategie zur Generierung einer konditionalen, transgenen NS3/4A-Maus aus rekombinierten ES Zellen

Nach erfolgreicher homologer Rekombination in ES-Zellen kommt es zum Einsatz der Cre-Rekombinase *in vitro*. Ziel ist es, die Neomycin-Resistenzkassette aus dem Albumin-Lokus der homolog rekombinierten ES-Zellklone zu entfernen. Da drei loxP-Sequenzen bei einer *in vivo* Cre-Rekombination zu drei verschiedenen Rekombinationsereignissen führen können, wird die Zahl der Erkennungssequenzen im Genom von 3 auf 2 reduziert (Abbildung 3.6). Die Deletion der Neomycin-Kassette resultiert dabei aus einer Typ III-Rekombination und wird weiter verwendet. Durch Injektion der ES-Zellen in Blastozysten des Mausstammes C57Bl/6 und

anschließenden Transfer in scheinträchtige C57Bl/6 Ammen können die chimären Mäuse gewonnen werden. Diese Chimären werden in den Inzuchtstamm C57Bl/6 gekreuzt, wobei solche Tiere, die die mutierten Zellen in der Keimbahn tragen, die Mutation an die Nachkommen weitergeben und heterozygote F1-Tiere erzeugen.

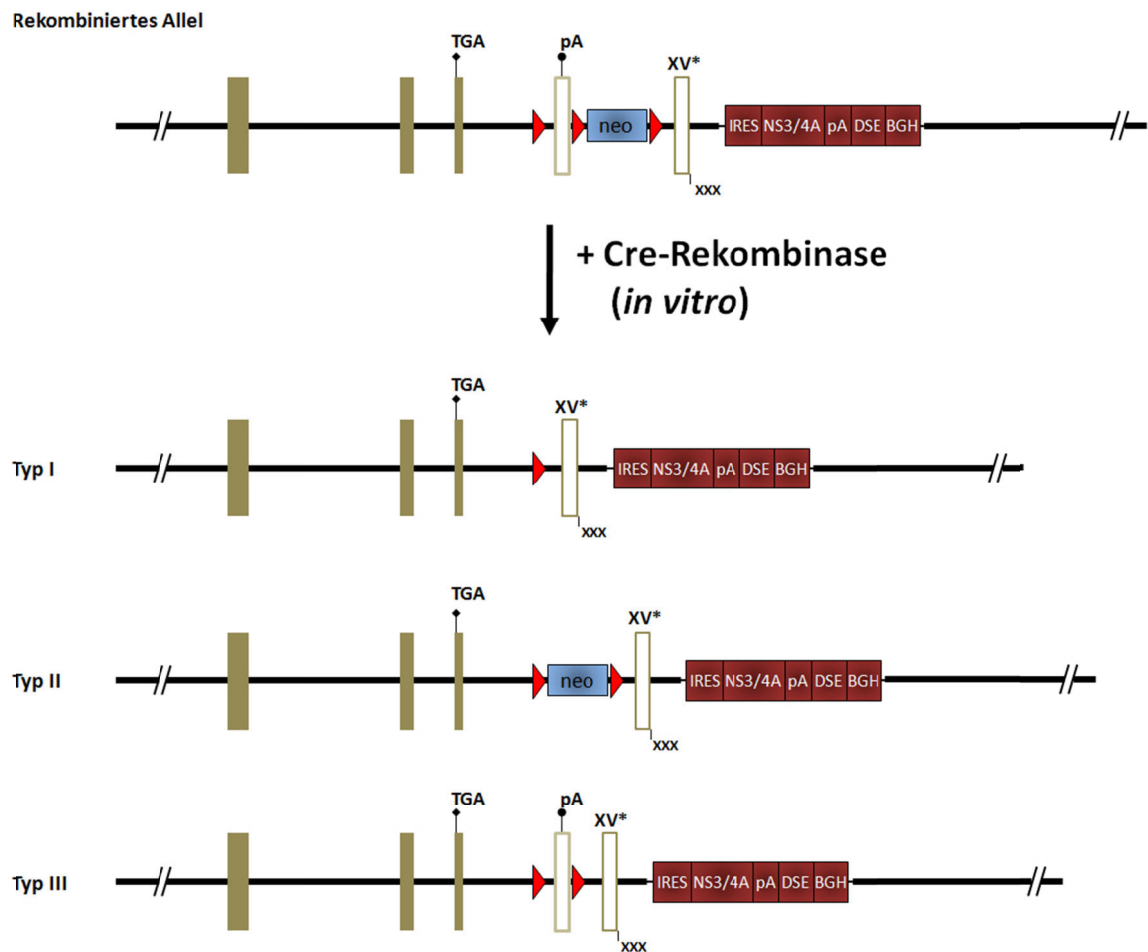


Abbildung 3.6 Strategie der *in vitro* Cre-vermittelten Rekombination des konditionalen HVC NS3/4A-Targeting-Konstrukts. Die Rekombination erfolgt mit der Cre-Rekombinase in ES-Zellen, in denen zuvor der *Targeting*-Vektor über homologe Rekombination in den genomischen Locus von Albumin eingefügt wurde. Der rekombinierte Locus trägt das von zwei loxP-Seiten flankierte KA1 und eine ebenfalls gefloxt Neomycin-Selektionskassette (neo) 3'-abwärts des KA1. Durch die Cre-vermittelte Rekombination kann es an den loxP-Seiten (rote Dreiecke) zu insgesamt drei verschiedenen Rekombinationstypen kommen: I.) Typ I repräsentiert die Deletion des KA1 und der Selektionskassette; II.) Typ II, der zur Rekombination zwischen der ersten und zweiten loxP-site führt und die Neomycin-Kassette im Genom hinterlässt; III.) Typ III stellt die Deletion der Neomycin-Kassette dar. Typ III wird für das weitere Vorgehen verwendet. BGH: *bovine growth hormone*; DSE: *downstream sequence element*; IRES: *internal ribosome entry site*; neo: Neomycin Selektionskassette; pA: polyA-Signal; TGA; Stoppcodon; XV*: mutiertes Exon 15; xxx: 3mal Stoppcodon.

Durch die Kreuzung von heterozygoten Mäusen mit Mäusen, die eine ubiquitäre Expression der Tamoxifen-aktivierbaren Cre-Rekombinase aufweisen, wird ein zeitlich regulierbares Aktivieren der HCV *NS3/4A*-Gene ermöglicht (Abbildung 3.7). Die Rekombinase wurde durch Fusion von Cre mit mutierten LBDs (Ligandenbindungsdomänen) des Estrogenrezeptors konstruiert. Das Fusionsprotein wird im Zytosol an zwei Moleküle des Hitzeschockproteins HSP90 gebunden, so dass der Transport in den Zellkern – dem Ort der Rekombination – verhindert wird. Nach Applikation des Liganden Tamoxifen und Bindung an das Fusionsprotein wird das HSP90 freigesetzt und die Translokation in den Zellkern kann erfolgen. Die Cre-Rekombinase schneidet dann das von loxP-Sequenzen flankierte KA1 (Exon 15 und umgebende Intronsequenzen) heraus. Die Transkriptionsmaschinerie beendet die Transkription des Albumins nicht nach Exon 15, da durch das Herausschneiden des Exon 15 das polyA-Signal entfernt wird. Dies impliziert nachfolgend die Expression der kodierten HCV Gene.

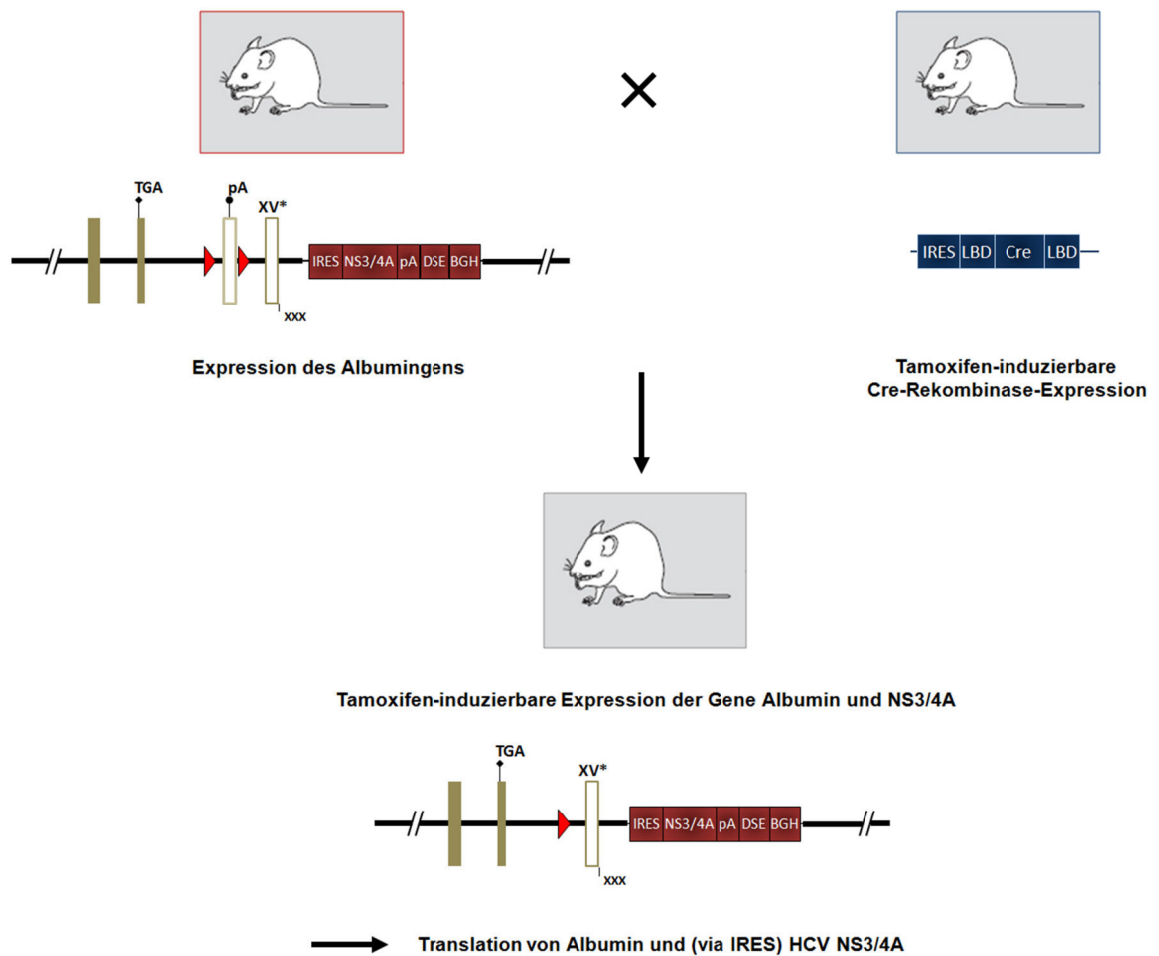


Abbildung 3.7 Gewebe- und Zeit-spezifische Expression von HCV NS3/4A in der Maus. Nach Kreuzung einer für HCV NS3/4A heterozygoten Maus mit einer Maus, die ubiquitär die Tamoxifen-aktivierbare Cre-Rekombinase expimiert, wird ein zeitlich regulierbares Aktivieren von HCV NS3/4A ermöglicht. Die Verabreichung von Tamoxifen aktiviert die Cre-Rekombinase, deren Translokation in den Zellkern zu einer Gewebe-spezifischen Exzision des loxP-flankierten (Dreieck) Exons 15 führt. Die Exzision entfernt das polyA-Signal (im Exon 15), so dass zusätzlich zu dem Albumin auch HCV Gene transkribiert werden können. BGH: *bovine growth hormone*; Cre: Cre-Rekombinase; DSE: *downstream sequence element*; IRES: *internal ribosome entry site*; LBD: Ligandenbindungsdomänen; pA: polyA-Signal; TGA; Stopp-Codon; XV*: mutiertes Exon 15; xxx: 3mal Stopp-Codon.

3.2. Funktionelle Untersuchung der generierten stabilen Zelllinien

Im Zusammenhang mit dem Hepatitis C Virus gibt es Beobachtungen, wonach die Expression einzelner oder mehrerer HCV-Gene Einfluss auf die Apoptose hat. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass durch die NS3/4A-vermittelte proteolytische Spaltung von TC-PTP das Liganden-induzierte EGFR-Signaling und folglich Akt verstärkt aktiviert wird, und somit die Zellproliferation und Apoptoseregulation beeinflusst werden kann ^[57]. Zudem konnten Frelin *et al.* eine Toleranz gegenüber hepatotoxischen Stimuli nachweisen, zu dem u.a. eine für den Wildtyp lethale Dosis an TNF α /D-GalN gehört ^[63].

Der folgende zweite Teil der Dissertation befasst sich mit der Untersuchung der Stimulationsbedingungen zur Apoptoseinduktion in Hepatomazelllinien und der Apoptosemodulation in HCV Proteine beherbergenden Zellen. In den generierten, HCV NS3/4A stabil exprimierenden Zellen konnte im Zuge der Untersuchungen ein konstitutiv phosphoryliertes Protein identifiziert werden, das nachfolgend funktionell untersucht wurde.

3.2.1. Untersuchungen zur Apoptoseinduktion in Hepatomazelllinien

3.2.1.1. Vorarbeiten zur TNF α -vermittelten Apoptoseinduktion in Hepatomazelllinien

TNF α ist eins der wichtigsten inflammatorischen Zytokine, das in die Pathogenese von HCV-vermittelten Lebererkrankungen involviert ist. Aufgrund der Tatsache, dass IFN γ in der Lage ist, die Sensibilität von Zelllinien gegenüber der TNF α -vermittelten Apoptose zu erhöhen ^[285-287], wurden zunächst die Bedingungen für die Apoptose-induzierende Wirkung von TNF α und/oder IFN γ auf die dem HCV-Replikon-System (Huh 9-13) zugrunde liegende Zelllinie Huh7 wt untersucht. Die den retroviral generierten, stabilen Zellen entstammende Zelllinie HepG2 wt wurde ebenfalls in die Apoptose-relevante Untersuchung mit einbezogen. Zudem wurden die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 und die murine Zelllinie mHTC-K1 als Kontrollen verwendet. Die vier verschiedenen Zelllinien wurden für 24 Stunden mit TNF α und/oder IFN γ stimuliert. Da Caspasen an der Induktion von Apoptose beteiligt sind, wurde untersucht, ob eine Aktivierung unter den gewählten Bedingungen erfolgt. Zielgebend hier war die Untersuchung der Prozessierung der Caspase-3: Sie nimmt eine entscheidende Rolle als Effektor-Caspase bei Todesrezeptor-vermittelter Apoptose, aber auch im mitochondrialen Apoptoseweg ein. Die Western Blot-Analyse

verdeutlicht, dass Caspase-3 im Zuge der Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ und/oder $\text{IFN}\gamma$ in den HepG2 wt und Huh7 wt-Zellen nicht prozessiert wird, während in den Zelllinien NIH3T3 und mHTC-K1 (Kontrollzelllinien) nach der $\text{TNF}\alpha$ und der Co-Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ eine Prozessierung beobachtet werden konnte (Abbildung 3.8), diese ist in beiden Fällen von gleicher Intensität. Auffallend ist, dass bei mHTC-K1 die Prozessierung mit deutlich schwächerer Intensität vorliegt (vgl. Bande 12 und 14). Die Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ führt nicht zur Aktivierung der Caspase. Die Co-Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ erhöhte die Sensibilität der Zellen unter den gewählten Bedingungen nicht.

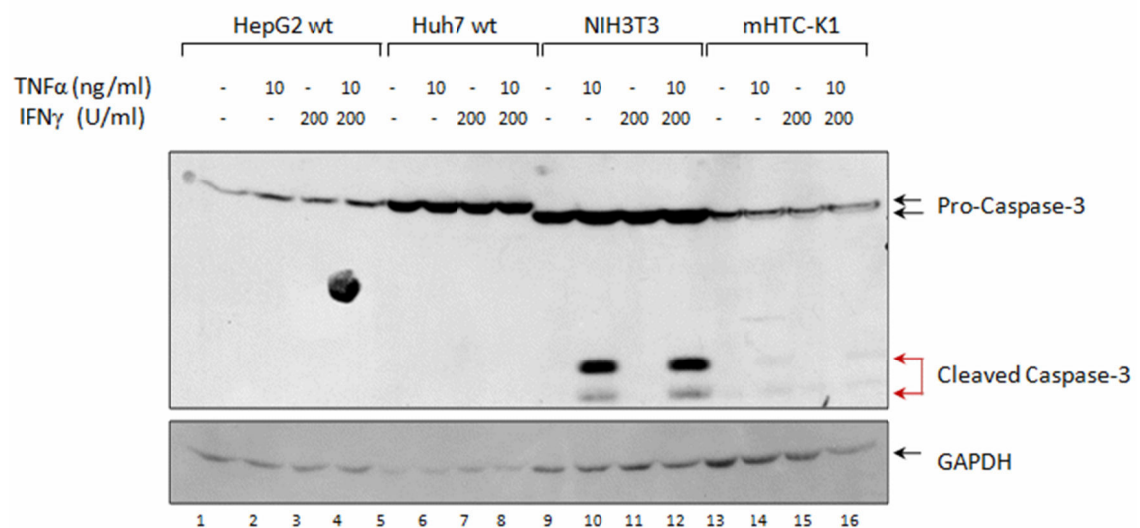


Abbildung 3.8 Untersuchung der Aktivierung von Caspasen. HepG2 wt, Huh7 wt, NIH3T3 und mHTC-K1-Zellen wurden mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) und/oder $\text{IFN}\gamma$ (200 U/ml) für die Zeit von 24 h stimuliert und im Anschluss lysiert. Gleiche Proteinmengen (je 40 μg pro Probe) wurden der Western-Blot-Analyse zugeführt. Mittels spezifischer Antikörper wurden Caspase-3 und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. Die roten Pfeile markieren die erwartete Größe der Prozessierung von Caspase-3.

Mittels Westen Blot-Analysen wurde weiterhin die Beteiligung von Caspasen in der durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ induzierten Apoptose durch die proteolytische Prozessierung des Caspase-Substrates PARP bestimmt. Das 116 kDa große DNA-Reparatur-Enzym wird während der Apoptose von Caspase-3 zum charakteristischen 89 kDa-Fragment geschnitten ^[288]. PARP wurde nach 24-stündiger Stimulation weder in HepG2 wt noch in Huh7 wt-Zellen prozessiert (Abbildung 3.9, Spur 1-8). Übereinstimmend mit der nachgewiesenen Spaltung von Caspase-3 wurde in der Zelllinie NIH3T3 nach $\text{TNF}\alpha$

und der Co-Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ eine proteolytische Prozessierung von PARP nachgewiesen. (Spur 10 und 12). In mHTC-K1 Zellen erkennt der Antikörper eine unspezifische Bande bei ca. 95 kDa, deren Intensität unabhängig von den verschiedenen Stimuli gleich bleibt (Spur 13-16). In Hinblick auf dieses Artefakt wurde in diesen Zellen keine Prozessierung von PARP nachgewiesen.

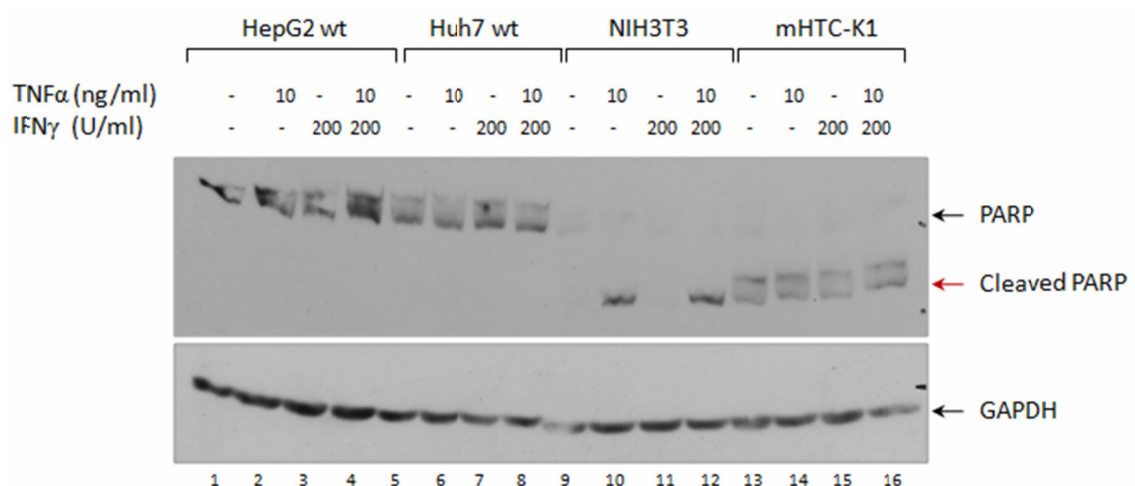


Abbildung 3.9 Proteolytische Prozessierung von PARP nach Stimulation mit TNF α und TNF α /IFN γ . HepG2 wt, Huh7 wt, NIH3T3 und mHTC-K1-Zellen wurden mit TNF α (10 ng/ml) und/oder IFN γ (200 U/ml) für die Zeit von 24h stimuliert und im Anschluss lysiert. Gleiche Proteinmengen (je 40 μ g pro Probe) wurden der Western-Blot-Analyse zugeführt. Mittels spezifischer Antikörper wurden PARP, und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. Der rote Pfeil markiert die erwartete Größe des PARP-Cleavage.

In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluss von FCS auf die TNF α /IFN γ -vermittelte Apoptose untersucht. Hierfür wurden die Zelllinien Huh7 wt, HepG2, mHTCK1 und NIH3T3 unter analogen Bedingungen wie in Abb. 3.9 und zusätzlich in Abwesenheit von FCS mit TNF α und/oder IFN γ stimuliert. Die Western Blot-Analyse ergab für die beiden Zelllinien HepG2 wt und Huh7 wt weiterhin keine Prozessierung von Caspase-3 und PARP (Daten nicht aufgeführt). Im Immunoblot war bei NIH3T3-Zellen die Intensität der Caspase-3 Prozessierung im Vergleich zu der Inkubation mit FCS stärker. Alle nachfolgenden Apoptose-relevanten Experimente wurden daher in Abwesenheit von FCS durchgeführt.

3.2.1.2. Actinomycin D/TNF α -vermittelte Apoptose

Auf der Suche nach geeigneten Apoptose-induzierenden Stimulationsbedingungen wurden verschiedene Transkriptionsinhibitoren eingesetzt. So wurde auch das *in vivo* erfolgreich eingesetzte, Apoptose-induzierende D-Galactosamin (DGalN) in Verbindung mit TNF α verwendet. Die Hepatomazelllinie Zelllinie Huh7 wt wurde mit verschiedenen Konzentrationen von DGalN und TNF α für 24 Stunden stimuliert und anschließend der Western Blot-Analyse zugeführt. Die Analyse ergab keine Prozessierung von Caspase-3 oder PARP (Daten nicht aufgeführt).

Infolgedessen wurde der Transkriptionsinhibitor Actinomycin D in Verbindung mit TNF α eingesetzt. Zur Bestimmung der Versuchsbedingungen wurde zunächst die murine, hepatozelluläre Zelllinie mHTC-K1 mit verschiedenen Konzentrationen von Actinomycin D und TNF α stimuliert. Nach einer Gesamtversuchsdauer von 8 Stunden wurden die Zellen geerntet. Mittels Western Blot erfolgte die Analyse der Prozessierung der Caspase-3 und PARP. So wurde die Konzentration 100 ng/ml Actinomycin D als diejenige identifiziert, bei der die Stimulation mit TNF α zu einer Caspase-3 und PARP Prozessierung führt. Die Inkubation der Zellen mit 100 ng/ml Actinomycin D alleine führt nicht zur Aktivierung der Caspase und folglich zur Spaltung des Substrates PARP (Daten nicht aufgeführt).

Um einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion von Proteinen des Hepatitis C Virus mit Komponenten des Apoptose-Signalwegs zu erhalten, wurden Huh 9-13-Zellen und die entsprechende Kontrollzelllinie Huh7 wt mit der ermittelten Actinomycin D-Konzentration (100 ng/ml) und TNF α stimuliert. Nach einer Gesamtversuchsdauer von 8 Stunden wurden die Zellen geerntet und der Analyse zugeführt. Im Hinblick auf die Prozessierung von Caspase-3 und dessen Substrat PARP konnte auf Proteinebene kein signifikanter Einfluss der HCV Proteine festgestellt werden (Abbildung 3.10).

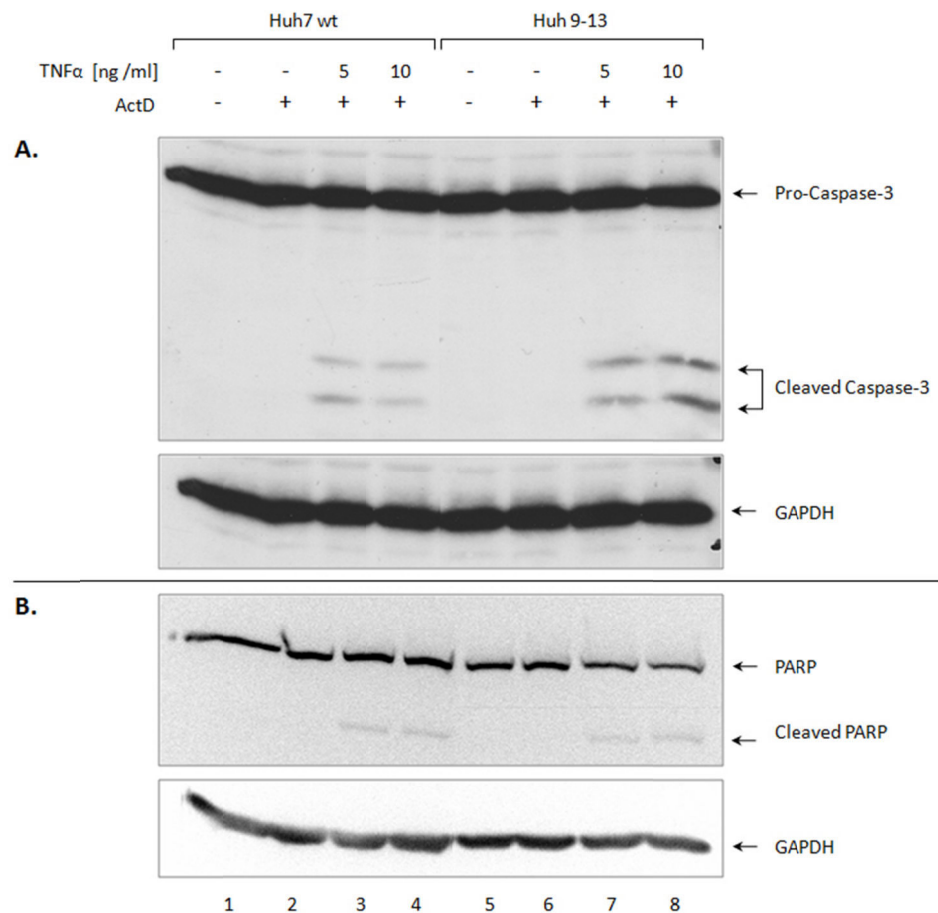


Abbildung 3.10 Prozessierung von Caspase-3 und PARP in der Hepatomazelllinie Huh7 wt und Huh 9-13. Huh7 wt- bzw. Huh 9-13-Zellen wurden mit Actinomycin D (100 ng/ml) und/oder TNF α (5 bzw. 10 ng/ml) für die Zeit von 8h stimuliert und im Anschluss lysiert. Gleiche Proteinmengen (je 40 μ g pro Probe) wurden der Western-Blot-Analyse zugeführt. Mittels spezifischer Antikörper wurden (A) Caspase-3 und GAPDH (Beladungskontrolle); (B) PARP und GAPDH nachgewiesen.

TNF α signalisiert seine apoptotischen Effekte durch die Bindung an TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) [289, 290]. Folglich wird die Bildung des Todessignal-Komplexes (DISC, *death-inducing signaling complex*) initiiert, an den verschiedene Adapterproteine binden, die ihrerseits Initiator-Capasen rekrutieren und aktivieren [90, 91]. Es stellte sich daher die Frage, ob verschiedene Komponenten des extrinsischen Apoptoseweges in dem HCV beherbergenden Replikon-System auf Proteinebene differenziell vertreten sind. Die untersuchten Komponenten, die die Proteine TNFR1, TRADD (*TNF-receptor-associated death domain*), TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*) und RIP (*receptor-interacting factor*) beinhalteten, wurden im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen nicht differentiell reguliert (Daten nicht aufgeführt). Somit konnte eine Modulation der Apoptose durch die Bestandteile des HCV-Replikons in dem untersuchten HCV-System nicht nachgewiesen werden.

3.2.2. Identifizierung einer kreuzreaktiven Bande in verschiedenen HCV-Systemen

Da durch Untersuchungen im Replikonsystem kein regulatorischer Einfluss von HCV Proteinen auf Komponenten des extrinsischen Apoptoseweges nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.10), wurde die Möglichkeit einer Modulation von antiapoptotischen Signalwegen untersucht: Für die Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie wird eine Rolle in der Regulation von Apoptose und Zellproliferation diskutiert ^[291]. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe belegen, dass in Mäusen mit einer leberspezifischen Expression von NS3/4A die Aktivierung von STAT1 nach intraperitonealer Injektion von LPS/D-GalN oder TNF α /D-GalN im Lebergewebe nahezu vollständig gehemmt wird. Die Experimente legen nahe, dass eine indirekte Aktivierung von STAT1 erfolgt und dass NS3/4A mit dieser interferiert (Dissertation E. Brenndörfer). Die Untersuchung der STAT1-Aktivierung nach TNF α -Stimulation ergab in den Replikon beherbergenden Huh 9-13-Zellen keine signifikant differentielle Regulation im Vergleich zu den Kontrollzellen Huh7 wt (Daten nicht dargestellt).

Auch für den Transkriptionsfaktor STAT3 wird eine Rolle in der Regulation von Apoptose und Zellproliferation diskutiert, was durch Studien an Mäusen belegt werden konnte ^[292, 293]. Zudem konnte in NS3/4A-transgenen Tieren beobachtet werden, dass STAT3 sowohl basal als auch TNF α /DGalN-bedingt im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren verstärkt aktiviert vorliegt ^[63]. Befunde der Arbeitsgruppe legen hier eine indirekte Aktivierung von STAT3 nahe (Dissertation E. Brenndörfer). Zum besseren Verständnis des Zeitverlaufes der STAT3-Aktivierung wurden daher die generierten, stabilen Zelllinien HepG2 Mock und HepG2 NS3/4A mit TNF α über einen Zeitraum von 210 Minuten stimuliert. Das Ergebnis der Immundetektion ist in Abbildung 3.11 wiedergegeben: Durch die Verwendung eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers (pTyr⁷⁰⁵ STAT3) konnte die Aktivierung von STAT3 nicht nur in HepG2 NS3/4A-Zellen, sondern auch in der Kontrollzelllinie HepG2 Mock bereits basal beobachtet werden (Vergleich Bande 1 und 8). Auffällig ist, dass im Laufe der Stimulation mit TNF α in beiden Zelllinien keine verstärkte STAT3-Aktivierung auftritt. Dieses Zellkultursystem ist somit ungeeignet, die in den NS3/4A-transgenen Tieren beobachtete, verstärkte basale als auch TNF α /DGalN-bedingte STAT3-Aktivierung zu untersuchen. Interessant ist allerdings die Präsenz eines distinkten Bandenmusters (zwischen 110-140 kDa) in HepG2 NS3/4A-Zellen, das durch eine Kreuzreaktion des Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörpers mit einem bisher unbekannten Protein (evtl. Proteinen) detektiert wurde (Spur 8-14). Unterstützt wurde dieser Befund durch das Ergebnis vorhergehender Untersuchungen: Im Immunoblot mit dem gleichen Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörper konnten diese spezifischen Banden in

den das Replikon beherbergenden Huh 9-13-Zellen ebenfalls nachgewiesen werden (Beobachtung E. Brenndörfer).

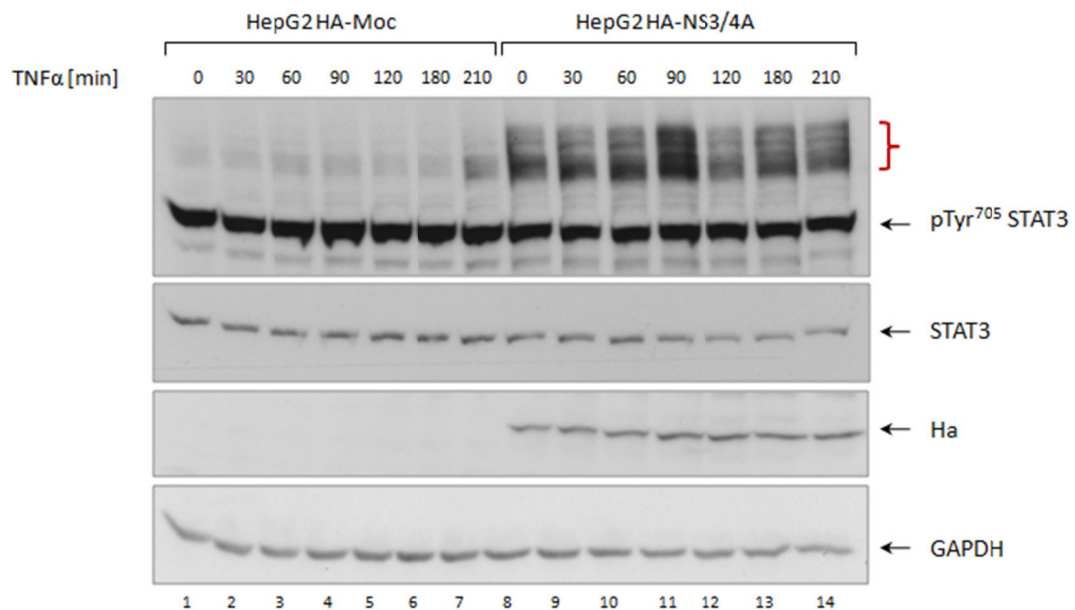


Abbildung 3.11 Detektion eines Bandenmusters mittels des Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers pTyr⁷⁰⁵ STAT3. HepG2 Mock- bzw. HepG2 NS3/4A-Zellen wurden mit TNF α (10 ng/ml) über die angegebenen Zeiten stimuliert und im Anschluss lysiert. Gleiche Proteinmengen (je 60 μ g pro Probe) wurden der Western-Blot-Analyse unterzogen. Mittels spezifischer Antikörper wurden pTyr⁷⁰⁵ STAT3, STAT3, HA und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. Die rote Klammer markiert das kreuzreaktive Bandenmuster in HepG2 NS3/4A-Zellen.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass es sich bei dem beobachteten Bandenmuster um ein Artefakt und somit eine unspezifische Bindung des Antikörpers handelt, waren weitere Experimente notwendig. So wurde im nächsten Schritt eine Immunpräzipitation mit dem phosphotyrosinspezifischen STAT3-Antikörper vorgenommen. Da STAT3 über die Mitglieder der Familie der IL-6-Typ-Zytokine aktiviert wird, wurden HepG2 Mock und HepG2 NS3/4A-Zellen mit IL-6 stimuliert (Kontrolle). Die Auswertung der Immunpräzipitation mittels des Immunoblots verdeutlicht, dass zusätzlich zum tyrosinphosphorylierten STAT3 auch ein weiteres phosphoryliertes Protein von ca. ~130 kDa Größe kopräzipitiert wurde (Abbildung 3.12). Da das phosphorylierte Protein bereits in der Kontrolle der HepG2 NS3/4A nachgewiesen werden konnte (Spur 7), ist davon auszugehen, dass das kopräzipitierte Protein in Gegenwart von HCV NS3/4A konstitutiv tyrosinphosphoryliert vorliegt. Diese Daten

belegen, dass das beobachtete Bandenmuster auf eine spezifische Bindung des Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörpers zurückzuführen ist.

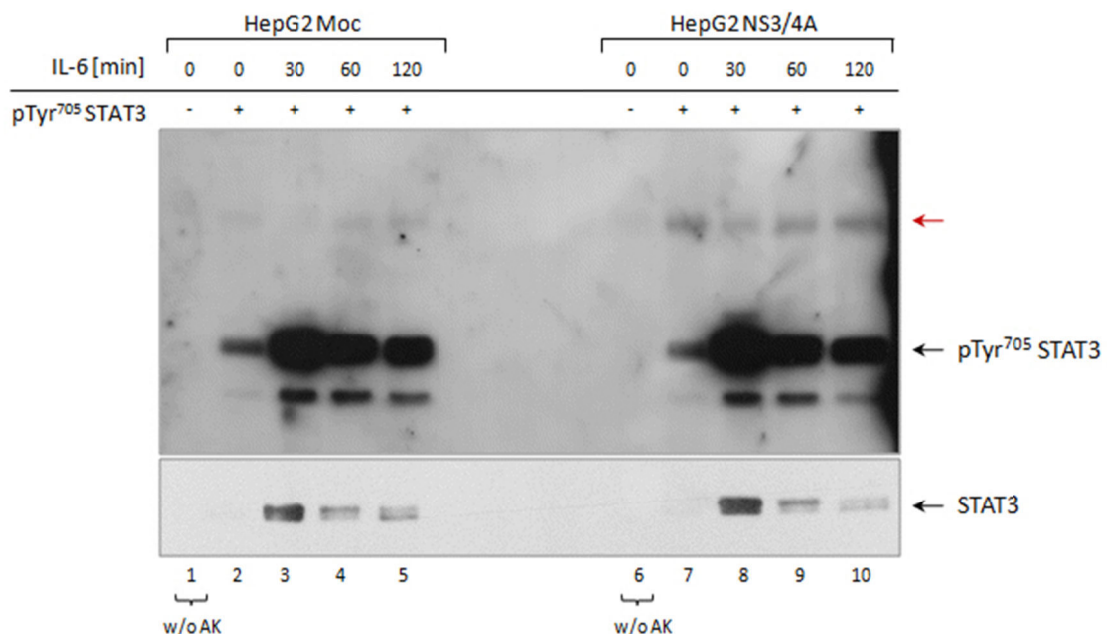


Abbildung 3.12 Kopräzipitation des unbekannten Phosphoproteins mit dem Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörper. HepG2 Mock- bzw. HepG2 NS3/4A-Zellen wurden mit IL-6 (200 U/ml) über die angegebenen Zeiten stimuliert und im Anschluss lysiert. Die Präzipitation erfolgte über den Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper pTyr⁷⁰⁵ STAT3. Um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Agarose zu berücksichtigen, wurde in einer sogenannten Antikörper-Kontrolle (w/o AK) die Präzipitation in Abwesenheit des Antikörpers durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper 4G10. Als Kontrolle diente die Gegenfärbung mit STAT3. Der rote Pfeil markiert die kopräzipitierte Bande.

3.2.3. Datenbankanalyse

Zur Identifizierung und weiteren biochemischen Charakterisierung des Proteins, welches durch den Antikörper pTyr⁷⁰⁵ STAT3 erkannt wurde, wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Hierfür wurden insgesamt elf Aminosäuren, die das Thyrosinmotiv im Bereich 705 von STAT3 umgeben (NP_644805.1), in die NCBI-Datenbanksuche BlastP einbezogen (siehe Abb. 3.13).

STAT3 Homo sapiens

..... 691_{AS} sqehpeadpg saap^ylktkf icvtp^tttcsn 720_{AS}

Abbildung 3.13 Schematische Darstellung der für die Datenbankanalyse verwendeten Aminosäuresequenz des STAT3-Proteins. Dargestellt sind die AS 691 bis 720. Der schwarze Balken unterstreicht die für die Datenbankanalyse verwendeten 12 AS. Das Tyrosinmotiv 705 ist durch rote Schrift dargestellt.

Durch eine vergleichende Analyse der dargestellten Proteinsequenz, dem vorhandenen Tyrosinmotiv und Größenübereinstimmungen von Proteinen (110-130 kDa) wurden putative Kandidaten aus der Ergebnisliste ausgewählt, die in Tabelle 3.1 zusammen mit ihren aus der Literatur bekannten Funktionen aufgeführt sind. Als ein vielversprechender Kandidat wurde Ack1 ausgewählt. Darüber hinaus wurde eine putative differentielle Regulation von DDB1 und PCDH17 in Gegenwart von HCV Proteinen untersucht (Daten nicht aufgeführt). Western Blot-Analysen verdeutlichten jedoch in den HCV-Replikon- bzw. in den HepG2 HCV NS3/4A-Zellen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Huh7 wt und HepG2 Mock), so dass von weiteren Untersuchungen abgesehen wurde.

Tabelle 3.1 Ergebnisse der NCBI-Datenbanksuche (BlastP)

Bezeichnung	Abk.	Gen-ID	Funktion
Eph-like receptor tyrosine kinase	EphB1	2047	Proliferation und Migration von Zellen (Nervensystem)
DNA damage-binding protein 1	DDB1	1642	Partizipiert als Teil des DDB1-Cul4A-RocA Ubiquitinligase-Komplexes in der DNA-Reparatur
Atrophin-1	ATN1	1822	Transkriptioneller Korepressor
Activated Cdc42-associated kinase 1	ACK1	10188	EGFR Stabilität und Vesikel-Dynamik
Protocadherin-17	PCDH17	27253	Zell-Zell-Verbindungen im Gehirn

3.3. Funktionelle Untersuchungen von Ack1 in HCV-System

Im Zuge von Apoptose-induzierenden Untersuchungen wurde ein konstitutiv phosphoryliertes Protein detektiert, welches mit pTyr⁷⁰⁵ STAT3 kreuzreagiert. Zur Identifizierung dieses Proteins wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Als ein vielversprechender Kandidat wurde Ack1 ausgewählt: Der aktuellen Literatur zufolge wurde Ack1 in einem transienten Komplex mit EGFR identifiziert ^[251]. Vor dem Hintergrund der Interaktion von Ack1 und EGFR war die Studie von Brenndörfer *et al.* interessant, die eine HCV-bedingte Beeinflussung der Aktivierung des EGFR-Signalweges verdeutlicht ^[57]. Daher wurde initial überprüft, ob die das HCV-Replikon bzw. HCV NS3/4A enthaltenden Zellen eine veränderte Ack1-Phosphorylierung aufweisen. Der zur Detektion eingesetzte Antikörper ist gegen zwei Tyrosinmotive gerichtet (Tyr^{857/858}), die in der Mig6-Domäne in der Prolin-reichen Region von Ack1 lokalisiert sind. Diese Domäne vermittelt die Bindung von Ack1 an den EGFR ^[251]. Wie in Abbildung 3.14 deutlich erkennbar, konnte auf Proteinebene sowohl in den HepG2 NS3/4A-Zellen als auch in den HCV-Replikon enthaltenden Huh 9-13-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (HepG2 Mock und Huh7 wt) eine verstärkte basale Phosphorylierung von Ack1 an den Tyrosinmotiven 857/858 nachgewiesen werden.

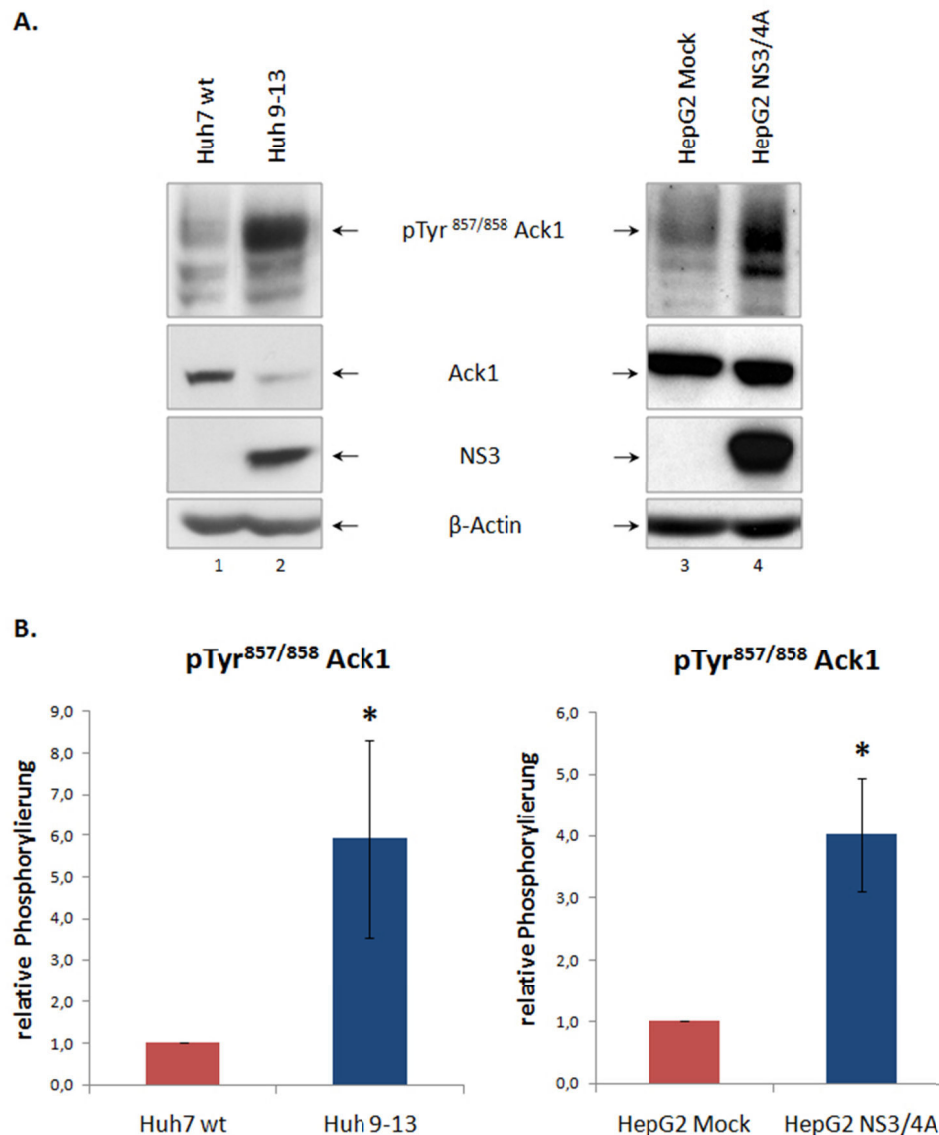


Abbildung 3.14 Nachweis der konstitutiven Phosphorylierung von Ack1 in HCV Proteine enthaltenden Zellen. (A) Huh7 wt- bzw. Huh 9-13-Zellen sowie HepG2 Mock- bzw. HepG2 NS3/4A-Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % lysiert. Jeweils 40 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden pTyr^{857/858} Ack1, Ack1, HCV NS3 und β-Actin (Beladungskontrolle) nachgewiesen. (B) Die Quantifizierung erfolgte durch densitometrische Auswertung. Normalisiert wurde gegen Ack1. Die Mittelwerte wurden aus vier bzw. drei unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von vier unabhängigen Experimenten erstellt. Die Signifikanz (*) wurde mittels des ANOVA-Tests berechnet ($p < 0,05$).

Interessanterweise fand sich ein verstärkter Proteinlevel von Ack1 in Gegenwart von NS3/4A, welcher in Gegenwart des subgenomischen HCV-Replikons, das weitere nichtstrukturelle Proteine wie NS5A und NS5B enthält, deutlich reduziert wird (Vergleich Spur 2 und 4). Um zu überprüfen, ob diese Differenz in der Ack1-Expression sich auch auf mRNA-Ebene widerspiegelt, wurde eine RT-PCR Analyse durchgeführt.

Abbildung 3.15 belegt, dass der Ack1 mRNA-Spiegel in beiden Zelllinien vergleichbar hoch ist, so dass davon auszugehen ist, dass eine transkriptionelle Regulation der Genexpression nicht für die Herabregulation des Proteinlevels von Ack1 verantwortlich ist.

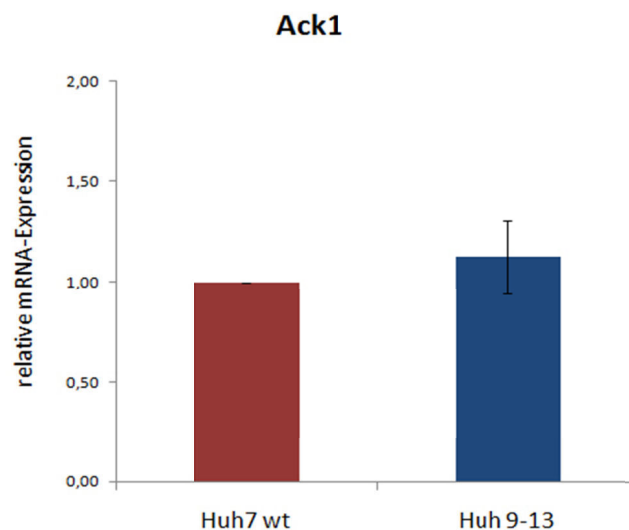


Abbildung 3.15 Keine veränderte mRNA-Expression von Ack1 in subgenomischen HCV-Replikonzellen. Aus Huh7 wt und Huh 9-13 Zellen wurde die RNA isoliert, durch Real-Time-PCR wurde die Expression von *Ack1* bestimmt. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit hSDHA als Referenz verwendet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Kontrolle (Huh7 wt) normalisiert (MW $\pm$ SD).

3.3.1. Der Knockdown von TC-PTP führt zur konstitutiven Phosphorylierung von Ack1

Es ist noch ungeklärt, über welchen Mechanismus Ack1 konstitutiv phosphoryliert wird. Die erhöhte Aktivierung von Ack1 kann durch eine HCV-bedingte Supprimierung von Negativregulatoren erklärt werden. Bisherige Publikationen berichten, dass TC-PTP u.a. die EGF-induzierte EGFR-Phosphorylierung hemmt. Zudem konnte für HCV eine Beeinflussung der Aktivierung des EGFR/Akt-Signalweges durch die NS3/4A-abhängige Herabregulation der Tyrosinphosphatase TC-PTP nachgewiesen werden ^[57]. Da Ack1 im Komplex mit dem EGFR nachgewiesen werden konnte ^[251], wurde vor diesem Hintergrund überprüft, ob die Hemmung der TC-PTP-Expression die Ack1-Phosphorylierung verstärkt. Die Hepatomazelllinie Huh7 wt wurde mit einem Pool von für TC-PTP-spezifische siRNA und Kontroll-siRNA transfiziert. Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, führt der Knockdown von TC-PTP zur konstitutiven Phosphorylierung

von Ack1. Interessant ist, dass durch den Knockdown von TC-PTP für das Gesamtproteinniveau von Ack1 in Huh7 wt-Zellen keine Veränderung zu verzeichnen ist, in Huh 9-13-Zellen hingegen wurde weniger endogenes Protein detektiert (Vergleich Spur 2 und 3).

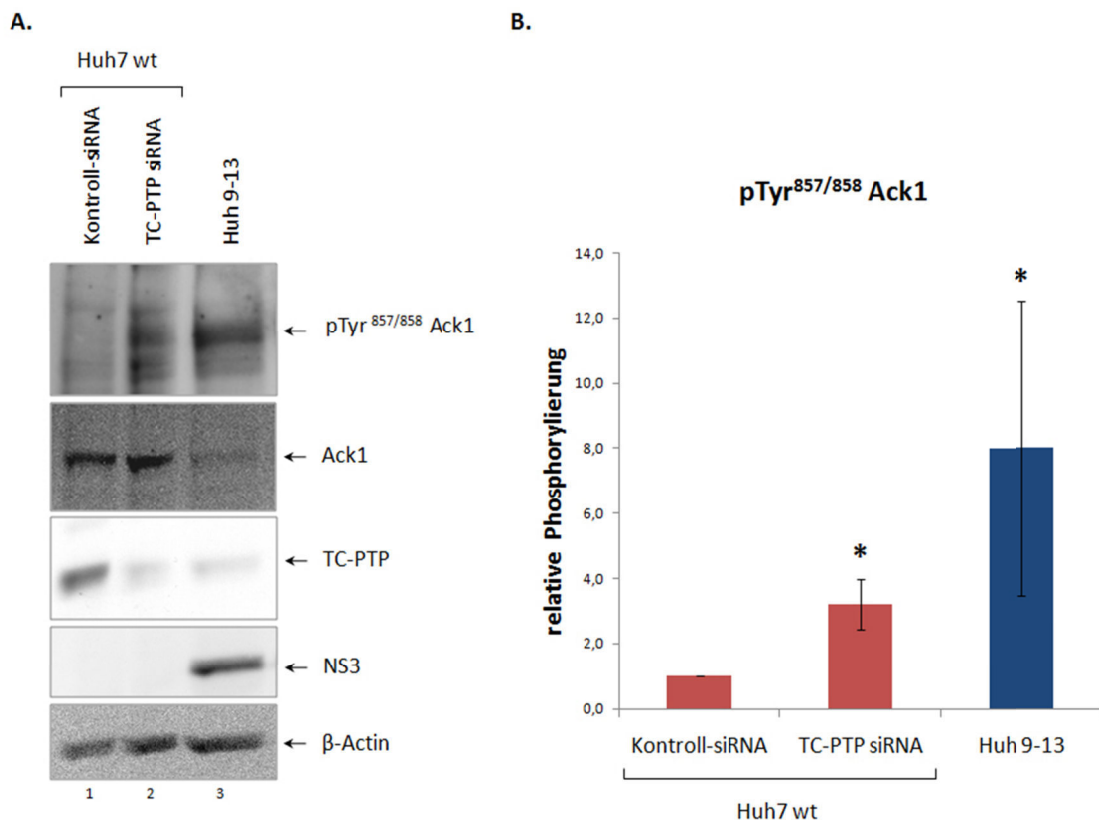


Abbildung 3.16 TC-PTP hemmt die Tyrosinphosphorylierung von Ack1 am Motiv 757/758.

(A) Huh7 wt-Zellen wurden mit für TC-PTP spezifische siRNA oder mit Kontroll-siRNA transfiziert und nach 48h lysiert. Als Kontrolle wurden Huh 9-13-Zellen ausgesät und lysiert. Gleiche Proteinmengen (je 40 μ g pro Probe) wurden der Western-Blot-Analyse unterzogen. Mittels spezifischer Antikörper wurden pTyr^{857/858} Ack1, Ack1 (gesamt), TC-PTP, HCV NS3 und β -Actin (Beladungskontrolle) nachgewiesen. (B) Die Quantifizierung erfolgte durch densitometrische Auswertung. Normalisiert wurde gegen Ack1. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von vier unabhängigen Experimenten erstellt. Die Signifikanz (*) wurde mittels des ANOVA-Tests berechnet ($p < 0,05$).

Diese Daten legen nahe, dass TC-PTP als zelluläre Phosphatase für die Desphosphorylierung von Ack1 verantwortlich ist. Zusammengenommen sprechen diese Daten dafür, dass HCV Proteine in nachgeschaltete Signalwege eingreifen, die den Ack1-Proteinlevel regulieren.

Die Beobachtung, dass Zellen, die das subgenomische Replikon enthalten, einen signifikant erhöhten Level der E3 Ubiquitin-Ligase Nedd4 aufweisen, legt nahe, dass möglicherweise ein kausaler Zusammenhang zwischen dem erhöhten Proteinlevel von Nedd4 und der Reduzierung von Ack1 (gesamt) in Huh 9-13-Zellen besteht. Untersuchungen von Lin *et al.* konnten belegen, dass Nedd4 mit Ack1 interagiert und dieses ubiquitiniert ^[261].

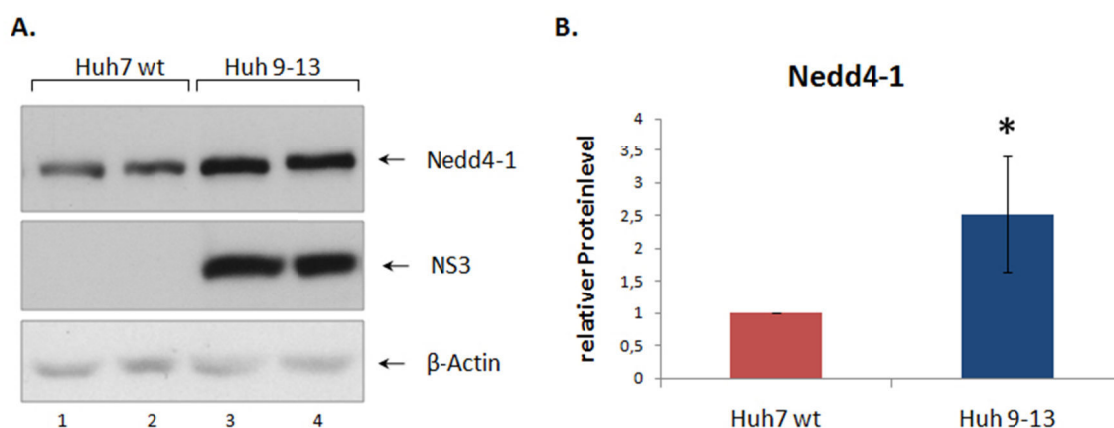


Abbildung 3.17 Erhöhter Proteinlevel von Nedd4 in Huh 9-13-Zellen. (A) Huh7 wt- bzw. Huh 9-13-Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80% lysiert. Jeweils 40 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden Nedd4-1, HCV NS3 und β-Actin (Beladungskontrolle). (B) Die Quantifizierung von Nedd4-1 erfolgte durch densitometrische Auswertung. Normalisiert wurde gegen β-Actin. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von drei unabhängigen Experimenten erstellt. Die Signifikanz (*) wurde mittels des Mann-Whitney-Tests berechnet ($p < 0,05$).

3.3.2. Ack1 spielt eine Rolle im EGF-Signalweg

Die verstärkte basale Phosphorylierung von Ack1 könnte in einer Beeinflussung des Proteinlevels von EGFR resultieren. Da für Ack1 nicht nur Interaktionen mit dem EGFR beschrieben wurden, sondern es auch als *downstream*-Effektor des ErbB2, einem weiteren Mitglied der EGFR-Familie, identifiziert wurde ^[273], wurde eingehend der Proteinlevel der vier Familienmitglieder der EGFR-Familie – EGFR, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 – untersucht. Wie in Abbildung 3.18 verdeutlicht, ist der Proteinlevel von ErbB3 in Zellen, die das subgenomische Replikon exprimieren, deutlich herabreguliert, während der EGFR, ErbB2 und ErbB4 in diesen Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen nicht verändert sind.

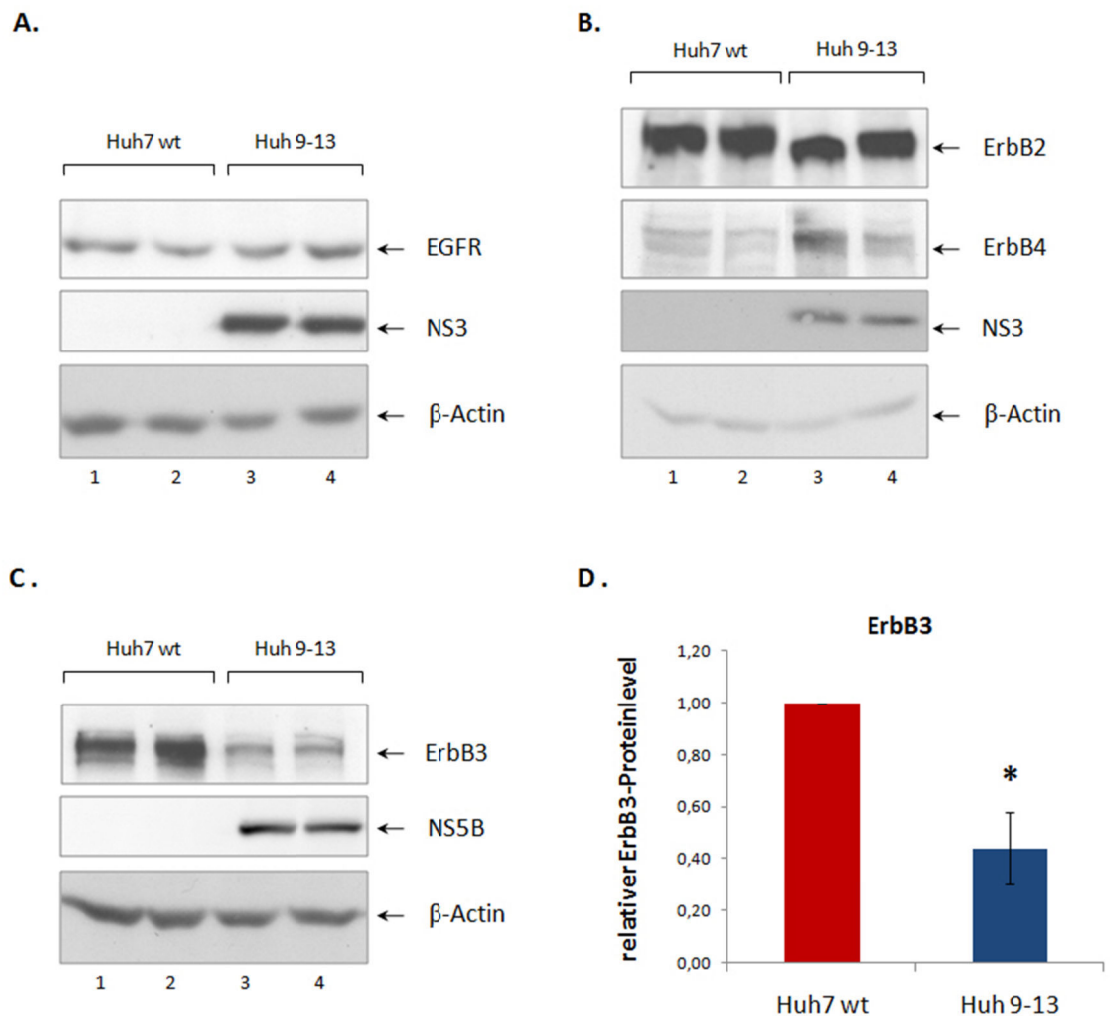


Abbildung 3.18 Herabregulation der ErbB3-Proteinmenge durch das HCV-Replikon. Huh7 wt- bzw. Huh 9-13-Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80% lysiert. Jeweils 40 μ g Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden (A) EGFR, HCV NS3 und β -Actin (Beladungskontrolle); (B) ErbB2, ErbB4, HCV NS3 und β -Actin; (C) ErbB3, HCV NS5B und β -Actin nachgewiesen. (D) Die Quantifizierung von ErbB3 erfolgte durch densitometrische Auswertung. Normalisiert wurde gegen β -Actin. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von drei unabhängigen Experimenten erstellt. Die Signifikanz (*) wurde mittels des Mann-Whitney-Tests berechnet ($p < 0,05$).

Untersuchungen von Shen *et al.* demonstrierten, dass Ack1 mit dem EGFR nach der Bindung des Liganden EGF interagiert ^[251]. Daher wurde die Einflussnahme der konstitutiven Phosphorylierung von Ack1 auf die Kinetik der Signalvermittlung von EGF untersucht. (Abbildung 3.19). Die Western Blot-Analyse verdeutlicht die bereits basal erhöhte Phosphorylierung von Ack1 an den Tyrosinmotiven 857/858 in Huh 9-13 gegenüber Huh7 wt-Zellen, ein Effekt, der durch die EGF-Stimulation weiter gesteigert

werden konnte. Die Western Blot-Analyse lässt durch das Phosphotyrosin-spezifische Bandenmuster zudem vermuten, dass im hepatozellulären System mehrere Isoformen des Ack1-Proteins vorliegen (Vergleich Spur 2 und 3 bzw. 4 und 5; 110 kDa – roter Pfeil – und 130 kDa). Der Ack1-spezifische Antikörper (gesamt Ack1) erkennt hingegen nur die obere Form (130 kDa). Die Existenz mehrerer Isoformen wurde bereits aufgrund verschiedener Untersuchungen postuliert [251, 259].

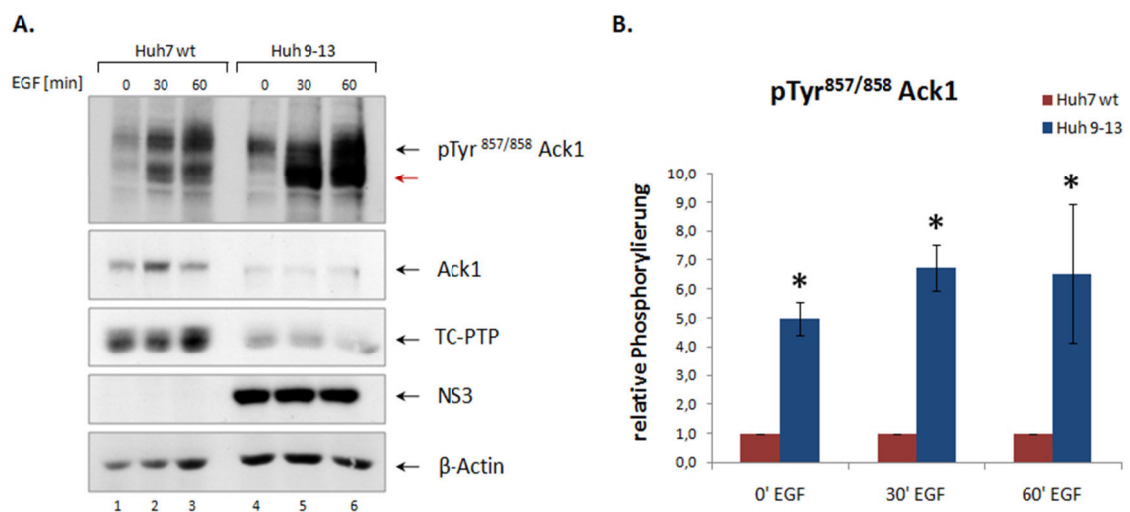


Abbildung 3.19 HCV verstärkt die basale sowie die EGF-induzierte Ack1-Phosphorylierung. (A) Huh7 wt- bzw. Huh 9-13-Zellen wurden mit EGF (100 ng/ml) über die angegebenen Zeiten stimuliert und im Anschluss lysiert. Gleiche Proteinmengen (je 60 μ g pro Probe) wurden der Western-Blot-Analyse unterzogen. Mittels spezifischer Antikörper wurden pTyr^{857/858} Ack1, Ack1 (gesamt), TC-PTP, HCV NS3 und β -Actin (Beladungskontrolle) nachgewiesen. Der rote Pfeil kennzeichnet eine putative zweite Isoform (110 kDa). (B) Die Quantifizierung der Ack1-Phosphorylierung (130 kDa) im unstimulierten Zustand, nach 20- und 40-minütiger Stimulation mit EGF erfolgte durch densitometrische Auswertung. Die Ergebnisse werden relativ zur auf 1 gesetzten Kontrolle dargestellt. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. Die Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von drei unabhängigen Experimenten erstellt. Die Signifikanz (*) wurde mittels des ANOVA-Tests berechnet ($p < 0,05$).

Die Hemmung der EGFR-Kinaseaktivität durch den Inhibitor AG1478 führt in Huh 9-13 Zellen zu einer vollständigen Inhibierung der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors (Abbildung 3.20.A). Die Tatsache, dass die Hemmung der EGFR-Kinaseaktivität keinen Einfluss auf die in Huh 9-13-Zellen basale Ack1-Phosphorylierung an Tyr^{857/858} ausübt, deutet darauf hin, dass diese von der Aktivität des EGF-Rezeptors unabhängig ist. Aufgrund der Tatsache, dass im Immunoblot eine

weitere Bande bei 110 kDa detektiert wird, die durch die Hemmung der EGFR-Kinaseaktivität beeinflusst wird (Vergleich Abbildung 3.20 B, Spur 2-4 und 6-8), kann angenommen werden, dass EGFR diese Ack1-Aktivierung phasenabhängig beeinflusst. Darüber hinaus stützen diese Befunde die Annahme, dass mehrere Isoformen von Ack1 im hepatozellulären System existieren.

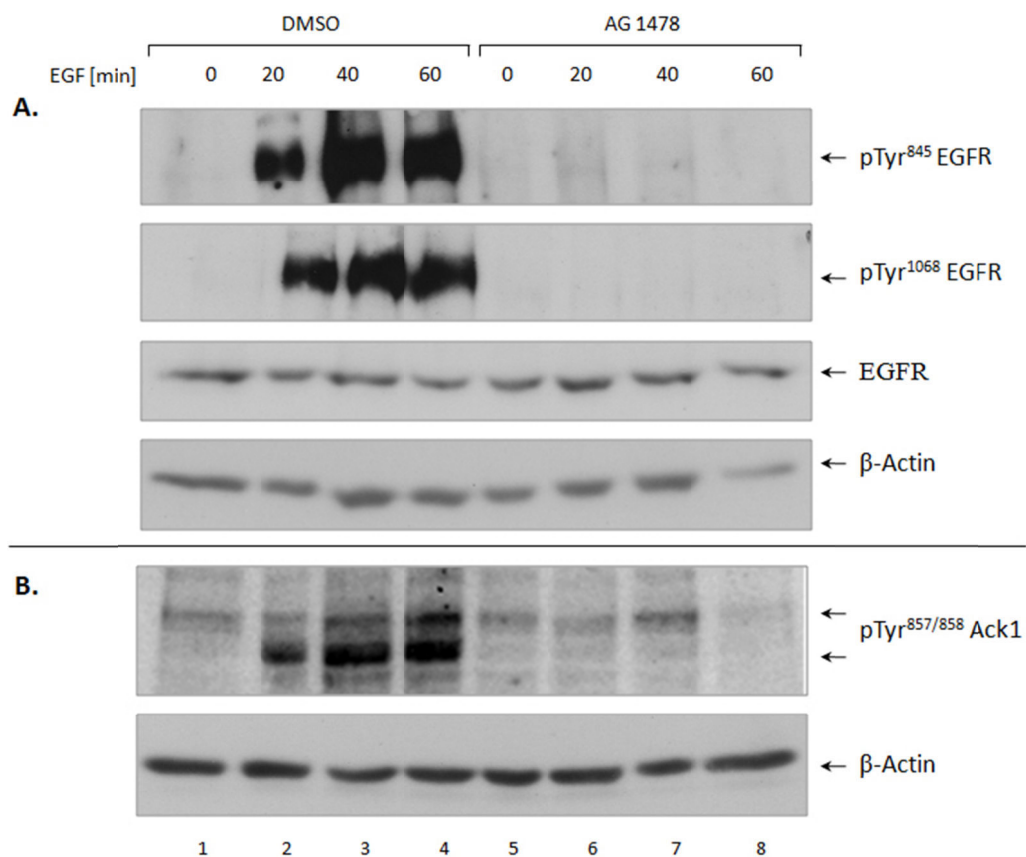


Abbildung 3.20 Die HCV-vermittelte konstitutive Ack1-Phosphorylierung ist partiell abhängig von der Aktivität der EGFR-Kinase. Huh 9-13-Zellen wurden mit 10 μ M AG1478 bzw. mit DMSO (Kontrolle) für 16 h vorbehandelt. Im Anschluss daran wurden sie mit 100 ng/ml EGF stimuliert und über den angegebenen Zeitraum kultiviert. Zelllysate wurden in gleicher Proteinmenge (50 μ g) im PAA-Gel aufgetrennt. Mittels spezifischer Antikörper wurden (A) pTyr⁸⁴⁵ EGFR, pTyr¹⁰⁶⁸ EGFR, EGFR (gesamt), β -Actin (Beladungskontrolle) bzw. (B) pTyr^{857/858} Ack1, und β -Actin nachgewiesen.

3.3.3. Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von Ack1 in HCV Proteine-enthaltenden Zellen

Der Nachweis der TC-PTP-vermittelten Dephosphorylierung von Ack1 führte zur Frage nach der funktionellen Relevanz von Ack1 in HCV infizierten Zellen. Die Beteiligung von Ack1 am EGFR-Signalweg impliziert eine putative Rolle des Proteins für die Replikation des HCV, da die Stimulation mit EGF die HCV-Replikation steigert ^[57]. Zur näheren Untersuchung wurden Huh 9-13 mit einem Pool von für Ack1-spezifischer siRNA und Kontroll-siRNA transfiziert. Bei der Analyse der für 72 Stunden kultivierten Zellen konnte gegenüber der Kontrolle auf Proteinebene keine Beeinflussung des NS3 und NS5B-Levels beobachtet werden (Abbildung 3.21). Ack1 scheint daher keine entscheidende Rolle bei der Replikation von HCV zu spielen.

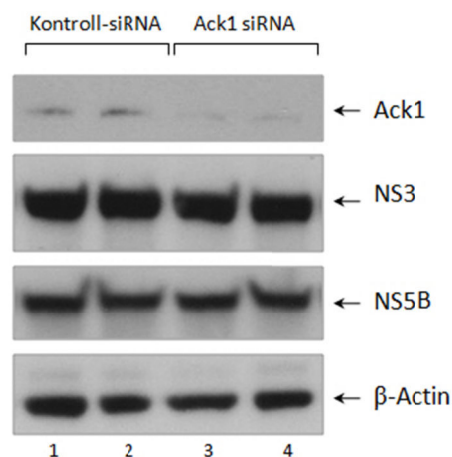


Abbildung 3.21 Keine Beeinflussung der HCV Replikation durch den siRNA-vermittelten Knockdown der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Ack1. Huh 9-13-Zellen wurden mit für Ack1 spezifischen siRNA oder mit Kontroll-siRNA transfiziert und nach 72h lysiert. Zelllysate wurden in gleicher Proteinmenge (50 µg) im PAA-Gel aufgetrennt. Mittels spezifischer Antikörper wurden Ack1 (gesamt), HCV NS3, HCV NS5B und β-Actin (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten belegen, dass die Lignaden-induzierte Endozytose und Degradation des EGFR eine wichtige Rolle in der Regulation des EGFR-Signalweges spielt ^[220]. Zudem konnte mehrfach belegt werden, dass Ack1 mit dem EGFR wechselwirkt und dessen Internalisierung auslöst ^[251, 263, 294]. So ermöglicht die Interaktion von Ack1 die Regulation der Stabilität des EGFR, indem Ack1 die Ubiquitylierung und Degradation des assoziierten Rezeptors reguliert. Dahingehend war es von Interesse zu prüfen, ob die HCV NS3/4A-vermittelte, konstitutive Phosphorylierung von Ack1 einen Einfluss auf die Internalisierung des

EGFR ausübt. Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurden FACS-Analysen durchgeführt (Abbildung 3.22). Bei der Analyse wurde mittels eines spezifischen, Fluoreszenz-markierten Antikörpers der EGFR auf der Oberfläche von Huh7 wt- bzw. Huh 9-13-Zellen und Huh7 wt-Zellen, die mit einem Pool von für TC-PTP spezifischen siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert wurden, quantifiziert. Wie Abbildung 3.22. verdeutlicht, weisen Huh 9-13-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen Huh7 wt im unstimulierten Zustand eine erhöhte, aber nicht signifikant veränderte Oberflächenlokalisation des EGFR auf (Abbildung 3.22.A). Der Knockdown der TC-PTP in Huh 7 wt-Zellen demonstriert im Vergleich zu den Kontrollzellen, dass es im unstimulierten Zustand keinen signifikanten Unterschied bezüglich der EGFR-Oberflächenproteinlokalisation gibt (Abbildung 3.22.B). Die nachfolgende Internalisierung wird durch die Stimulation mit EGF initiiert und weist in den untersuchten Huh 9-13 bzw. in Huh7 wt-Zellen mit TC-PTP Knockdown – bezogen auf die jeweilige Kontrolle – eine vergleichbare Kinetik auf.

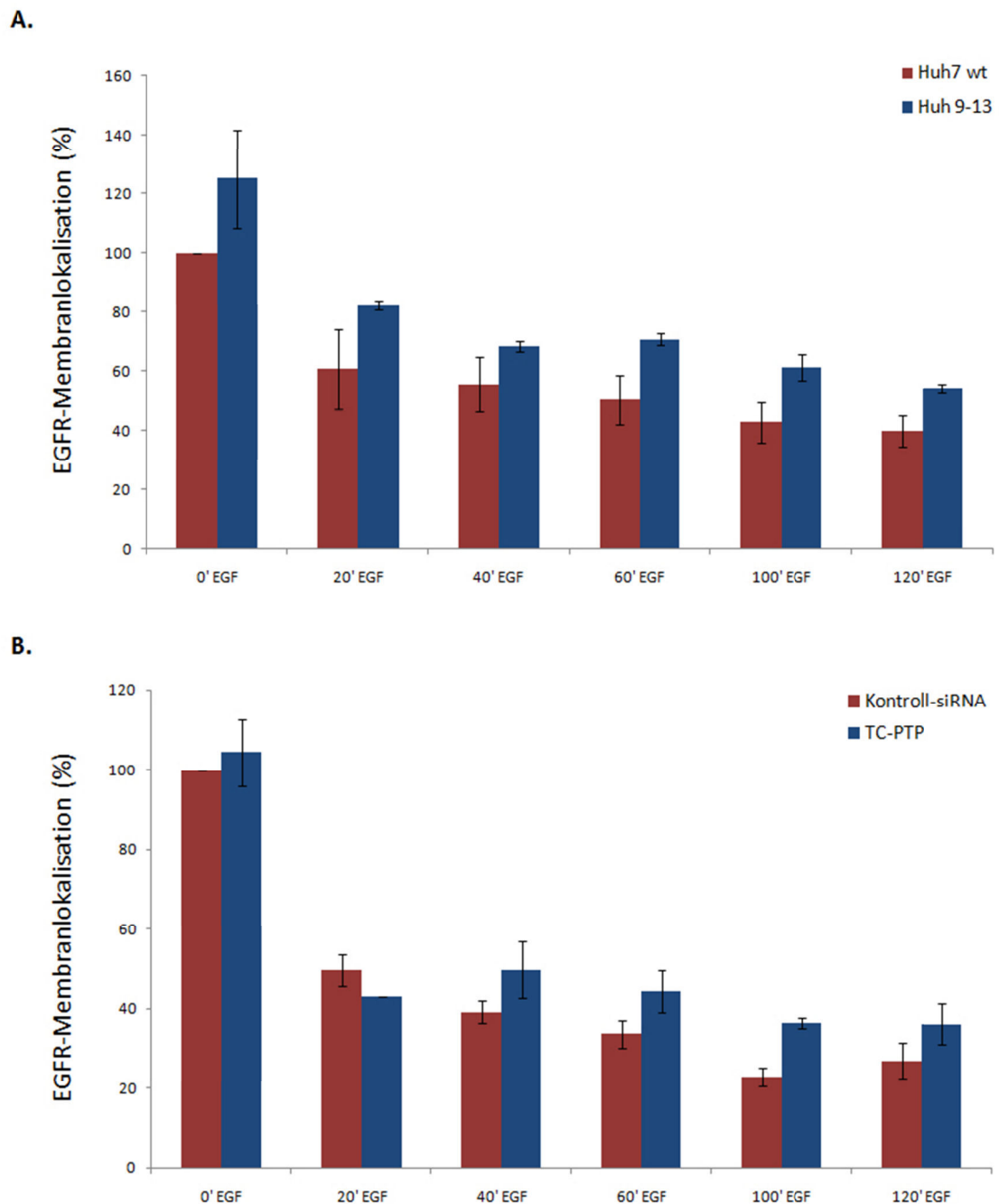


Abbildung 3.22 FACS-Analyse zur Bestimmung der EGF-induzierten Internalisierung von EGFR unter konstitutiver Phosphorylierung von Ack1. (A) Huh7 wt- bzw. Huh 9-13-Zellen wurden ausgesät, nach 48 Stunden mit EGF (100 ng/ml) über die angegebenen Zeiten stimuliert und im Anschluss der FACS-Analyse zugeführt. Hierfür wurde eine Phycoerythrin (PE) -gekoppelter Antikörper gegen EGFR eingesetzt. (B) Huh7 wt-Zellen wurden mit einem für YFP-kodierenden Vektor und mit für TC-PTP spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und nach 48 Stunden der FACS-Analyse zugeführt. Zur Charakterisierung der transient transfizierten Zellen wurde ein Gate um YFP-positive Zellen gelegt. Die Auswertung der Oberflächenlokalisation des EGFR wurde jeweils auf die Kontrolle der Huh7 wt-Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, bezogen. Die Signale der DAPI-Färbung wurden von allen gemessenen Ereignissen subtrahiert. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet und auf die jeweilige Kontrolle normalisiert. Die Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von drei unabhängigen Experimenten erstellt (MW $\pm$ SD).

Um einen Hinweis auf eine mögliche funktionelle Relevanz von Ack1 im HCV-System zu erhalten, wurden veröffentlichte, initiale Beobachtungen herangezogen, die Ack1 als spezifischen *downstream*-Effektor der Rho-GTPase Cdc42 beschreiben ^[250]. Aufgrund der konstitutiven Phosphorylierung von Ack1 in HCV Proteine beherbergenden Zellen wurde der Proteinlevel von Cdc42 untersucht. In Western Blot-Analysen konnte sowohl in den NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zellen als auch in den Replikonzellen Huh 9-13 ein gesteigerter Proteinlevel nachgewiesen werden (Abbildung 3.23).

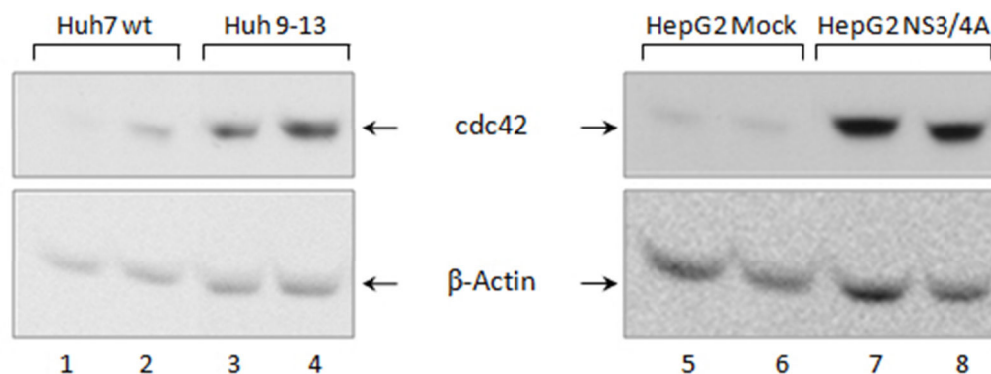


Abbildung 3.23 Erhöhter Proteinlevel von Cdc42 sowohl in NS3/4A-exprimierenden HepG2 Zellen als auch in subgenomischen HCV-Replikonzellen. Huh7 wt- bzw. Huh 9-13-Zellen sowie HepG2 Mock- bzw. HepG2 NS3/4A-Zellen wurden bei Erreichen einer 80%igen Konfluenz lysiert. Jeweils 40 µg Protein/Spur wurden aufgetragen und durch Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden Cdc42 und β-Actin (Beladungskontrolle) nachgewiesen.

Die hier erhobenen Daten demonstrieren, dass Ack1 nicht essentiell für die virale Replikation ist. Zudem übt die konstitutive Phosphorylierung (Tyrosin 857/858) von Ack1 keinen Einfluss auf die Kinetik der Internalisierung des EGFR aus. Der beobachtete, erhöhte Level von Cdc42 in zwei HCV Proteine beherbergenden Zellsystems liefert einen Hinweis auf die HCV relevante Tumorentwicklung. Darüber hinaus besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen den reduzierten Proteinleveln von ErbB3 und der konstitutiven Phosphorylierung von Ack1.

4. Diskussion

4.1. Generierung und Charakterisierung von Systemen für die HCV-Forschung

Im Falle zahlreicher Lebererkrankungen wird eine Apoptoseresistenz impliziert, da Viren häufig apoptotische Wege der Wirtszelle inhibieren, um den Organismus daran zu hindern, die infizierten Zellen zu eliminieren. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass für das HCV NS3/4A verschiedene Wege der Einflussnahme auf apoptotische Prozesse beschrieben wurden. Durch die NS3/4A-vermittelte proteolytische Spaltung von TC-PTP wird das Liganden-induzierte EGFR-Signaling verstärkt und folglich Akt verstärkt aktiviert ^[57]. Zudem sind NS3/4A transgene Mäuse gegenüber einer für den Wildtyp letalen Dosis an TNF α /D-GalN resistent ^[63]. Die transgenen Tiere sind ferner vor einer TNF α /D-GalN, LPS/D-GalN oder CCl₄-vermittelten Leberschädigung über einen p38^{MAPK}-abhängigen Mechanismus weitestgehend geschützt. Daraus resultierend wird für das NS3/4A-Protein eine Modulation der Zellproliferation und Apoptoseregulation diskutiert. Zudem konnte für das HCV NS3-Protein eine Interaktion mit dem Tumorsuppressorprotein p53 *in vitro* nachgewiesen werden ^[43], die zu einer p53-abhängigen Resistenz gegenüber der Actinomycin-D-induzierten Apoptose führt ^[46]. Im Zellkulturmodell induziert NS3 die Caspase-8-abhängige Apoptose in Hepatozyten und Dendritischen Zellen ^[113, 114]. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte jedoch bisher nicht näher charakterisiert werden.

Zur detaillierten Analyse HCV-relevanter Fragestellungen sind verschiedene *in vitro* Modellsysteme unabdingbar. Hierzu zählen mittlerweile die Infektion von primären Hepatozyten, transiente Expressionssysteme, stabil transfizierte Zelllinien, infektiöse Zellkultursysteme sowie subgenomische bzw. Vollängen-Replikons. Mit der Entwicklung des Replikonsystems ist ein entscheidender Durchbruch auf dem Gebiet der HCV Forschung gelungen ^[147]. Das von Lohmann *et al.* etablierte und in dieser Arbeit eingesetzte Zellkultursystem (Huh 9-13) erlaubt die Untersuchung des Einflusses der nichtstrukturellen Proteine NS3 bis NS5B, so dass die viralen Proteine ihre Funktionen im Komplex miteinander erfüllen können. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zudem Zelllinien retroviral generiert, die für die HCV-Gene *Core* bzw. *NS3/4A* transgen sind. Der retrovirale Gentransfer wurde biochemisch und immunzytochemisch bestätigt (Abbildung 3.1 und 3.2).

Von besonderer Bedeutung war die Generierung der HepG2 NS3/4A-Zellen, da bei zahlreichen Apoptose-relevanten Untersuchungen lediglich das HCV Protein NS3 vertreten war. Jedoch ist mehrfach nachgewiesen worden, dass der Kofaktor NS4A essentiell für die optimale Aktivität der NS3 Serin-Protease ist ^[295-299], und dass die Ausbildung des NS3/4A-Komplexes eine Voraussetzung für eine funktionelle Serin-Protease darstellt ^[300-302].

Trotz des erfolgreichen, retroviralen Gentransfers kommt es nach einer gewissen Zeit zu einem Abschalten (sogenanntes *silencing*) der Transgenexpression. Der genaue zugrundeliegende Mechanismus ist nicht bekannt ^[303]. Vor allem Zellpopulationen mit heterologer Transgenexpression sind davon betroffen, da es hierbei im Laufe des Passagierens zur Selektion von Zellen kommt, die einen Wachstums- und Überlebensvorteil haben. Durch Anwendung des Verfahrens *limiting dilution* wurden jeweils eine monoklonale Zellkultur von HepG2 Core bzw. NS3/4A aus einer Zellsuspension gewonnen (Abbildung 3.3) und hierdurch das Problem gelöst. Diese monoklonale Zellkulturen stehen für die Analyse weiterer HCV-relevanter Fragestellungen zur Verfügung.

Fast alle Befunde zu modulierenden Effekten durch NS3/4A und ihren molekularen Mechanismen basieren auf Untersuchungen an Zellkultursystemen und sind nicht direkt auf die *in vivo* Situation übertragbar. Die Überprüfung der biologischen Relevanz im Tiermodell steht weitestgehend noch aus. Daher war ein weiteres Ziel der Arbeit, durch Klonierung und Überprüfung eines *Targeting*-Vektors und Ausarbeitung einer *Targeting*-Strategie die Voraussetzungen für die Generierung einer Mauslinie zu schaffen, die eine zeit- und gewebespezifische Expression des HCV NS3/4A-Gens wie auch anderer HCV Proteine ermöglicht (Abbildung 3.4, 3.6 und 3.7). Die Generierung dieser Mauslinie soll über homologe Rekombination in ES-Zellen erfolgen. Als Ort des Rekombinationsereignisses wurde das Albumin-Gen ausgewählt: Das Albumin-Protein wird postnatal ausschließlich in Hepatozyten synthetisiert und eignet sich daher für die gewebsspezifische Expression der HCV Proteine in ihren primären Zielzellen, den Leberzellen. Der Rekombinationsvektor enthält das Exon 15, das das polyA-Signal enthält, sowie die Neomycin-Phosphotransferase-Kassette. Diese sind von gleichgerichteten loxP-Stellen flankiert. Entsprechend können in einem ersten Rekombinationsschritt insgesamt drei loxP-Stellen sowie ein Selektionsmarker in das Genom embryonaler Stammzellen integrieren. Homolog rekombinierte embryonale Stammzellklone können durch den Einsatz einer bereits generierten 5'-Sonde (Abbildung 3.5) identifiziert werden. In nächsten Schritt wird mittels Cre-vermittelten Rekombination die Selektionskassette im Genom der ES-Zellen entfernt (Abbildung

3.6). Nachfolgend kann die Expression der kodierten HCV Gene *NS3/4A* induziert werden: Durch die Kreuzung von heterozygoten Mäusen mit Mäusen, die eine ubiquitäre Expression der Tamoxifen-aktivierbaren Cre-Rekombinase aufweisen, wird ein zeitlich regulierbares Aktivieren der HCV *NS3/4A*-Gene ermöglicht (Abbildung 3.7). Die Transkriptionsmaschinerie beendet die Transkription des Albumingens nicht nach Exon 15, da die Verabreichung von Tamoxifen die Exzision des Exon 15 und somit auch des polyA-Signals initiiert. Stattdessen erfolgt die Transkription des mutierten Exon 15, welches Stopp-Codons enthält. Dies impliziert die Expression der kodierten HCV Gene. Hervorzuheben sei, dass durch die Cre-Rekombinase-vermittelte Exzision des Exon 15 nicht nur der Albumin-Lokus voll funktionsfähig bleibt, sondern auch das HCV *NS3/4A*-Transgen exprimiert wird. Bis heute ist lediglich eine für HCV *NS3/4A* transgene Maus verfügbar ^[63]. Ihre konventionelle Generierung erfolgte durch den Einsatz des MUP (*major urinary protein*) -Promotors, an den sich die genomische Sequenz des *NS3/4A* des Genotyps 1a anschließt. Basierend auf Studien konnte jedoch belegt werden, dass in Deutschland der Genotyp 1b – gefolgt von 1a, 2 und 3 – vorherrschend ist und gehäuft mit fortgeschrittenen Stadien der Lebererkrankung assoziiert zu sein scheint ^[304, 305]. Zudem entfaltet der zur Generierung der transgenen Maus verwendete MUP-Promotor seine Aktivität auch in anderen Geweben ^[306]. Der Albumin-Promotor fand in anderen Studien – vor allem bei HCV Core-E1-E2 transgenen Mäusen – zahlreiche Verwendung ^[170]. Das Expressionsprofil von Albumin ist auf den Hepatozyten beschränkt und der Promotor ist vor Geburt der Tiere nicht signifikant aktiv. Seine maximale Aktivität wird erst in mindestens zwei Wochen alten Jungtieren erreicht ^[307]. Die Entwicklung der Tiere bleibt somit relativ ungestört, da das Einsetzen der Transgen-Expression nach gegenwärtigem Kenntnisstand dem Alter entspricht, in dem eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus stattfinden könnte.

Die oben beschriebene Strategie bietet gegenüber der konventionellen Generierung weitere Vorteile. Da die loxP-Erkennungssequenzen in das Chromosom gezielt über homologe Rekombination in ES Zellen und nicht randomisiert über ein konventionelles Transgen eingeführt werden, kann ein bekanntes Gen auf diese Weise gezielt verändert werden. Das Cre/loxP-Rekombinationssystem hat sich somit in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug der Mausgenetik entwickelt. Der Einsatz von Mauslinien, die Cre-Rekombinase gewebespezifisch exprimieren, hat bereits vielfach zur Aufklärung biologischer Fragestellungen beigetragen ^[308-310]. Zudem konnten mittlerweile einige Probleme, die der Einsatz von transgenen Cre-Mauslinien mit sich brachte, umgangen werden: die Rekombinase wurde zu unerwünschten Zeitpunkten und/oder in unerwünschten Geweben gebildet („*leakiness*“). Wenn Cre bereits während der frühen Embryonalentwicklung ektopisch aktiv ist, kann die DNA in den meisten

Zellen des adulten Tieres rekombiniert sein. Mittlerweile wird es hauptsächlich zur Herstellung gewebespezifischer Knockout-Mäuse angewendet.

Ein weiterer Vorteil des dargestellten Modells liegt in der Möglichkeit der Untersuchung des Einflusses der *de novo* Expression von HCV Genen im adulten Stadium. Es ist durchaus möglich, dass die Expression des Transgens bereits während der Entwicklung zu adaptiven Effekten führt. Somit wären bisher verwendete transgene Tiermodelle zur Untersuchung des Einflusses von HCV Proteinen nur bedingt geeignet und aussagefähig. Die Generierung einer transgenen Maus, die die Zeit- und Gewebespezifische Expression des HCV NS3/4A-Gens ermöglicht, erlaubt die Untersuchung dieses Aspekts.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Zelllinien mittels retroviralen Transfers generiert, die HCV Core und NS3/4A stabil exprimieren. Biochemische und immunzytochemische Analysen konnten den erfolgreichen Gentransfer bestätigen. Parallel zu der Etablierung des Zellkultursystems wurde die oben ausgeführte Klonierungsstrategie zur Generierung einer HCV NS3/4A transgenen Maus entwickelt, der Rekombinationsvektor kloniert und entsprechende Sonden getestet, über die ein *Screening* der ES-Zellen nach homologer Rekombination erfolgen soll. Ziel ist es, mittels des Cre/loxP-Systems über homologe Rekombination in ES-Zellen eine Mauslinie zu generieren, die eine zeit- und gewebespezifische Expression des HCV NS3/4A-Gens ermöglicht und Analysen erleichtert.

4.2. Einfluss von HCV auf die TNF α -vermittelter Apoptose

Apoptose ist essentiell für die Entwicklung und das Überleben komplexer Organismen. Die Bezeichnung als programmierter Zelltod impliziert die Möglichkeit der gezielten Entfernung redundanter oder defekter Zellen. Apoptose wird unter anderem durch das proinflammatorischen Zytokin TNF α ausgelöst. TNF α ist für die Rekrutierung von Immunzellen in die Leber entscheidend und wirkt direkt auf Hepatozyten, indem es an den TNFR1 (und 2) bindet. Ziel der Untersuchungen war es, Apoptose-auslösende Stimulationsbedingungen für die dem Replikonsystem und den stabilen Zellen zugrundeliegenden Zelllinien zu eruieren, um den Effekt von HCV Proteinen zu untersuchen. Aufgrund der Tatsache, dass IFN γ in der Lage ist, die Sensibilität von Zelllinien gegenüber der TNF α -vermittelten Apoptose zu erhöhen ^[285, 286, 311, 312], wurde

dieses Zytokin in die Apoptose-auslösenden Untersuchungen mit einbezogen. Die Apoptoseinduktion wurde hierbei durch die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und des nachgeschalteten Substrates PARP in Western Blot-Analysen verifiziert. Die Ergebnisse der untersuchten Hepatomazelllinien Huh7 wt und HepG2 wt verdeutlichen, dass $\text{TNF}\alpha$ weder alleine noch in Kombination mit $\text{IFN}\gamma$ eine Aktivierung der Caspase-3 und des nachgeschalteten Substrates PARP hervorruft (Abbildung 3.8 und 3.9). Diese Ergebnisse stimmen dahingehend mit Befunden anderer Arbeitsgruppen überein, die demonstrierten, dass $\text{TNF}\alpha$ alleine in Huh7- und HepG2-Zellen keine Apoptose induzieren kann ^[313, 314]. Selbst in primären Maushepatozyten führt die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ alleine nicht zur Induktion der Apoptose ^[315]. Dies liegt nicht am Fehlen des TNF-Rezeptors oder an einer gestörten Funktionalität ^[65]. Der Grund für die $\text{TNF}\alpha$ -Resistenz von Hepatozyten ist bisher nicht bekannt, könnte aber mutmaßlich durch den Zellhintergrund begründet sein. Zudem wird postuliert, dass die Bindung von $\text{TNF}\alpha$ an den TNF-Rezeptor zu einer schnellen Aktivierung von anti-apoptotischen Transkriptionsfaktoren (NF κ B) führt ^[316]. Interessant in diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Schmich *et al.*, die demonstrieren, dass isolierte Hepatozyten der Maus durch $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation gegenüber Fas/CD95-induzierter Apoptose sensitiviert werden ^[317]. Zudem konnte Walter *et al.* nachweisen, dass frisch isolierte Hepatozyten, die aus der Maus isoliert wurden und auf Collagen oder Matrigel kultiviert werden, einen Wechsel von Typ II- zu Typ I-Signalleitung unterhalb des Todesrezeptoren vollziehen ^[318]. Typ I- und Typ II-Zellen werden aufgrund der Intensität der DISC-Bildung unterschieden ^[319]. In Typ I-Zellen führt eine massive DISC-Bildung zu großen Mengen aktiver Caspase-8 und -10, gefolgt von einer raschen Aktivierung der Caspase-3. Trotz ähnlicher Rezeptorexpression kann in Typ II-Zellen jedoch nur eine schwache DISC-Bildung nachgewiesen werden, die nicht ausreicht, um die Caspase-Kaskade zu aktivieren. Zur effektiven Apoptoseinduktion muss daher in Typ II-Zellen das am Rezeptor generierte Signal über die Mitochondrien verstärkt werden. Dies geschieht über die von Caspase-8/-10 vermittelte Spaltung des BH3-only-Proteins Bid zur aktiven Form tBid (truncated Bid). Das aktive Protein induziert durch Aktivierung von Bax oder Bak die Freisetzung von Cytochrom c und Ausbildung des Apoptosoms (siehe auch Abschnitt 1.1.5.1). Der Typ II- zu Typ-I-Wechsel ist abhängig von der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, da primäre Hepatozyten in Zellsuspension einen Bid-vermittelten Zelltod erfahren. Die Kultivierung der Zellen auf extrazellulären Matrixkomponenten führt zur Modulierung der *in vivo* Funktion von Hepatozyten und der Sensitivität gegenüber Fas/CD95-induzierter Apoptose ^[319].

Bei der Untersuchung der Rahmenbedingungen zur Apoptoseinduktion konnte durch die Detektion der Spaltung von Caspase-3 und PARP mittels Western Blot-Analysen

nachgewiesen werden, dass Apoptose im Falle der verwendeten Zellen nur in Kombination von $\text{TNF}\alpha$ mit dem Translationsinhibitor Actinomycin D induziert werden konnte (Abbildung 3.10). Auf die Actinomycin D-Stimulation reagierten Huh7-Zellen wesentlich sensitiver als auf D-Galactosamin-Inkubation, wodurch in Huh7 wt und Huh 9-13 Spaltprodukte von Caspase-3 und PARP nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.10). Jedoch konnte keine Einflussnahme des subgenomischen Replikons auf die Apoptoseinduktion festgestellt werden. Auch die untersuchten Komponenten des extrinsischen Apoptosesignalweges – TNFR1, TRADD, TRAF2 und RIP – wurden in Huh 9-13 im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen nicht differentiell reguliert. Somit konnte eine HCV bedingte Modulation der Apoptose in dem untersuchten HCV-System nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund steht partiell im Gegensatz zu den Ergebnissen, die aus der Literatur bekannt sind. Nomura-Takigawa *et al.* konnten eine erhöhte Actinomycin D-induzierte Apoptose in Huh 9-13-Zellen detektieren, die auf die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges zurückzuführen war ^[115]. Auch die Expression von NS3/4A resultierte in einer erhöhten Apoptoserate. Für die meisten HCV Proteine findet man in der Literatur widersprüchliche Befunde in Bezug auf ihren Einfluss auf verschiedene Apoptosemechanismen. Verantwortlich für die divergenten Beobachtungen sind mutmaßlich abweichende experimentelle Bedingungen. Hierzu zählen z.B. die jeweils verwendeten Zelllinien, unterschiedliche Analyseverfahren und die Art der Expression (transient oder stabil).

Während der Karzinogenese verlieren Tumorzellen zumindest teilweise ihre Fähigkeit zur Apoptose, weil die Expression proapoptotischer Gene oder die Bildung funktioneller proapoptotischer Proteine supprimiert wird. Hieraus resultiert eine Dysbalance von pro- und anti-apoptotischen Faktoren, ein Mechanismus, der für die Entstehung des HCC postuliert wird ^[320]. Da Untersuchungen im Replikonsystem keinen modulatorischen Einfluss von HCV Proteinen auf den Proteinlevel von Komponenten des extrinsischen Apoptoseweges belegen konnten, wurde die Möglichkeit einer Modulation von anti-apoptotischen Signalwegen untersucht: Für den Transkriptionsfaktor STAT3 wird eine Rolle in der Regulation von Apoptose und Zellproliferation diskutiert. In NS3/4A-transgenen Tieren wurde sowohl eine basale als auch eine $\text{TNF}\alpha$ /DGalN-induzierte Aktivierung von STAT3 im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren beobachtet. (Dissertation E. Brenndörfer) Konstitutiv aktiviertes STAT3 wurde zudem in verschiedenen humanen Tumoren nachgewiesen: zahlreiche Myelome, Brust-, Eileiter-, Prostata-, sowie im Kopf- und Hals-lokalisierte Tumoren ^[232, 321-326].

Die Untersuchung der STAT1 und STAT3-Aktivierung ergab in der Western Blot-Analyse keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien. Auffällig jedoch war

die Präsenz eines distinkten Bandenmusters (zwischen 110-140 kDa) in HepG2 NS3/4A-Zellen, das durch eine Kreuzreaktion des Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörpers (Tyrosin 705) mit einem bisher unbekannten Protein bzw. Proteinen detektiert wurde (Abbildung 3.11). Dieser Befund war sehr interessant, da ein ähnliches Muster im Immunoblot mit dem gleichen STAT3-Antikörper in Huh 9-13-Zellen beobachtet werden konnte (unveröffentlichter Befund E. Brenndörfer). Dieses Phänomen kann auf Kreuzreaktivitäten, Multispezifitäten, molekularem *Mimikry* und *Moonlighting* Proteinen beruhen ^[327]. Die Spezifität des Bandenmusters konnte im Nachfolgenden jedoch durch eine Immunpräzipitation mit dem Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörper bestätigt werden (Abbildung 3.12). Zur Identifizierung des kopräzipitierten Proteins wurde eine Datenbanksuche durchgeführt, die insgesamt elf den Thyrosinrest 705 umgebenden Aminosäuren des STAT3-Proteins einbezog (Abbildung 3.12). Anhand von bestimmten Kriterien (Größe, vorhandener Tyrosinrest) konnten putative Kandidaten identifiziert werden (Tabelle 3.1). Als Letztes wurden die aus der Literatur bekannten Funktionen als Kriterium herangezogen und Ack1 als vielversprechender Kandidat für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Untersuchung von DDB1 und PCDH17, welche durch die Datenbanksuche ebenfalls als putative Kandidaten identifiziert wurden, zeigte in der Western Blot-Analyse keine differentielle Regulation dieser Protein in Gegenwart von HCV Proteinen, so dass von weiteren Untersuchungen abgesehen wurde.

Die im zweiten Teil der Arbeit vorgestellten Daten verdeutlichen, dass die Stimulation mit TNF- α alleine nicht, in Kombination mit Actinomycin D jedoch zur Apoptoseinduktion führt. Eine vermutete Einflussnahme des Replikons auf die Rezeptor-vermittelte Apoptose konnte durch Untersuchungen nicht bestätigt werden. Weiterführende Analysen konzentrierten sich auf den in NS3/4A transgenen Mäusen verstärkt aktivierten anti-apoptotischen Transkriptionsfaktor STAT3. In der Western Blot-Analyse wurde ein distinktes Bandenmuster in Folge einer Kreuzreaktion mit dem Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörper (Tyr⁷⁰⁵) beobachtet. Mittels Koimmunopräzipitation konnte die Spezifität der Kreuzreaktion bestätigt werden. Zudem wurde das unbekannte Protein in Gegenwart von HCV Proteinen im konstitutiv phosphorylierten Zustand nachgewiesen. Eine Datenbanksuche führte zur Wahl der Nicht-Tyrosin-Kinase Ack1 als putativen Kandidaten, die im dritten Teil der Arbeit funktionell analysiert wird.

4.3. Einfluss von HCV auf die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Ack1

Zusätzlich zu der Schlüsselrolle bei der Virusreplikation und der Polyproteinprozessierung sind vielfältige Einflüsse von NS3/4A auf Signalwege der Wirtszelle *in vitro* beschrieben worden. So konnte belegt werden, dass der NS3/4A-Komplex durch die proteolytische Spaltung von CARDIF und TRIF essentielle Komponenten der angeborenen, antiviralen Immunantwort der Wirtszelle blockiert. Als weiteres NS3/4A-Substrat wurde TC-PTP identifiziert ^[57]. HCV NS3/4A interagiert durch die proteolytische Spaltung der TC-PTP mit der EGF-induzierten EGFR-Signalvermittlung und verstärkt damit die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, die in Zellproliferation und Apoptoseregulation involviert sind. Darüber hinaus kommt es hierdurch zu einer EGFR-unabhängigen konstitutiven Aktivierung von Akt, die für die Unterhaltung der viralen Replikation essentiell ist. Im Zuge Apoptose-relevanter Untersuchungen wurde ein weiteres Protein identifiziert, das in Zellen, die entweder das subgenomische Replikon oder NS3/4A exprimieren, differentiell reguliert wird. Hierbei handelt es sich um Ack1, welches letztendlich als das Protein identifiziert werden konnte, das durch den Antikörper erkannt wird, der STAT3 in seinem tyrosinphosphorylierten Zustand erkennt. Das ca. 135 kDa große Protein ist ein multifunktionales Protein, dessen Funktion durch verschiedene Domänen vermittelt wird (Abbildung 1.8). Allen Mitgliedern der Ack-Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen sind die SH3-Domäne und eine Prolin-reiche Region gemein. Zahlreiche Untersuchungen implizieren eine Rolle in der Regulation von Zelladhäsion, Wachstum und Rezeptordegradation ^[251, 259, 294, 328].

In Western Blot-Analysen wurde sowohl in der NS3/4A-exprimierenden HepG2-Zelllinie als auch in den Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten (Huh 9-13), im Vergleich zu den Kontrollzelllinien eine konstitutive Phosphorylierung von Ack1 an den Tyrosinresten 857/858 nachgewiesen (Abbildung 3.14). Die weitere Aufklärung des Mechanismus, der dieser konstitutiven Phosphorylierung zugrunde liegt, legt nahe, dass auch hierfür die NS3/4A-abhängige Degradation von TC-PTP verantwortlich ist. Hiermit übereinstimmend führt die Supprimierung der TC-PTP-Expression mittels spezifischer siRNA ebenfalls zu einer konstitutiven Phosphorylierung von Ack1 (Abbildung 3.16). Der vorliegende Befund ergänzt somit die bereits publizierten Daten ^[57] und identifiziert ein weiteres Protein, dessen Funktion durch die HCV NS3/4A-vermittelte, proteolytische Spaltung von TC-PTP beeinflusst bzw. moduliert wird. Der zur Detektion eingesetzte Antikörper ist gegen zwei Tyrosinreste gerichtet (Tyr^{857/858}), die in der Mig6-Domäne von Ack1 lokalisiert sind. Diese C-terminale Domäne der Prolin-reichen Region vermittelt die Bindung von Ack1 an

Rezeptortyrosinkinasen ^[261], wie dem EGFR ^[251]. Interessanterweise verfügt die Ack1 Mig6-homologe Region über drei weitere Tyrosinphosphorylierungsstellen: Tyrosin 826, 866 und 870 ^[258]. Ob der EGFR Ack1 direkt an diesen Tyrosinresten phosphoryliert oder diese als Autophosphorylierungsstellen fungieren, ist bisher nicht bekannt. Fest steht jedoch, dass Ack1 infolge einer Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen an die Membran rekrutiert wird. Durch die Bildung eines transienten Komplexes mit dem EGFR reguliert Ack1 nachfolgend die Ubiquitylierung und Degradation des assoziierten Rezeptors. Durch die Bindung initiiert, kommt es zur Autophosphorylierung von Ack1 am Tyrosinrest 284, was zur Aktivierung der Kinase führt ^[258, 271, 329]. Der Tyrosinrest 284 ist unter den Mitgliedern der Ack1 Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen hoch konserviert und stellt die primäre Phosphorylierungsstelle dar. Die Mutation des Tyrosins 284 zu Phenylalanin reduzierte signifikant die Phosphorylierung *in vivo* und zudem die Kinase-Aktivität ^[271, 329]. Da die Tyrosinreste 857/858 nicht als primäre Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden, muss untersucht werden, inwieweit diese Phosphorylierungen die Ack1-Aktivität regulieren.

Die Beteiligung von Ack1 im EGFR-Signalweg führte zunächst zu der Annahme, dass die konstitutive Phosphorylierung der Kinase einen modulatorischen Einfluss auf den Proteinlevel von Rezeptortyrosinkinasen der EGFR-Familie ausübt. Da die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor zur Bildung von Rezeptordimeren führt und dabei sowohl zur Formation von Homodimeren (z.B. EGFR+EGFR) als auch von Heterodimeren (z.B. EGFR+ErbB3) führt, konnte eine Einflussnahme der konstitutiven Phosphorylierung von Ack1 auf die Mitglieder der EGFR-Familie nicht ausgeschlossen werden. Diese Annahme konnte in der Western Blot Analyse für den EGFR, ErbB2 und ErbB4 nicht bestätigt werden (Abbildung 3.18). Allerdings wurde ein signifikant erniedrigter Proteinlevel von ErbB3 in Huh9-13-Zellen nachgewiesen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher noch nicht geklärt.

In weitergehenden Untersuchungen in Huh 9-13-Zellen führte die EGFR-Aktivierung im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer verstärkten Phosphorylierung von Ack1 an den beiden Tyrosinen 857/858. Diese trat additiv zu der konstitutiven Phosphorylierung auf (Abbildung 3.19). In der Annahme und durch die Literatur unterstützt, dass Ack1 eine wichtige Rolle in der EGFR-Signaltransduktion einnimmt, da es die Degradation und somit die Stabilität des EGFR reguliert ^[251], war es von großer Bedeutung, die Oberflächenlokalisation des EGFR in Antwort auf eine Stimulation mit dessen Liganden zu quantifizieren. Die konstitutive und die verstärkte EGF-induzierte Phosphorylierung von Ack1 (Tyrosin 857/858) übten keinen Einfluss auf die Kinetik der Internalisierung des EGFR aus (Abbildung 3.22), was zunächst unerwartet war. Neuere Befunde

verdeutlichen jedoch, dass die Interaktion von Ack1 an den EGFR erst nach Ligandenbindung und Aktivierung des Rezeptors erfolgt. Im Vergleich zu der Bindung von Ack1 an andere Rezeptortyrosinkinasen, wie AXL, LTK und ALK ist die Bindung an den EGFR eher als schwach anzusehen, doch führt die Aktivierung des EGFR zu einem erhöhten *Turnover* von Ack1^[330]. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass ein Ack1-Knockdown den EGFR in frühen Endosomen zurückhält und dessen *Sorting* inhibiert^[294].

Die Tatsache, dass der Inhibitor des EGFR, AG1478 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Ack1 hat, legt nahe, dass die konstitutive Phosphorylierung von Ack1 nicht von der Aktivität des EGFR abhängig ist (Abbildung 3.20). Die Frage nach der funktionellen Relevanz der konstitutiven Phosphorylierung von Ack1 führte zu der Untersuchung der Rolle des Proteins für die Replikation des Hepatitis C Virus. Der Knockdown von Ack1 durch den Einsatz einer spezifischen siRNA resultierte in einer unveränderten HCV NS3- und NS5B-Proteinlevel (Abbildung 3.21), so dass angenommen werden kann, dass Ack1 nicht essentiell für die virale Replikation ist. Die Relevanz von Ack1 für den Lebenszyklus des Hepatitis C Virus ist weiterhin unklar. Einen möglichen Hinweis liefert jedoch der in Huh 9-13-Zellen erhöhte Proteinlevel von Cdc42 (Abbildung 3.23). Ack1 fungiert als Target von Cdc42, das zur Familie der Rho GTPasen gehört und mit anderen GTPasen die Reorganisation des Zytoskeletts vermittelt. Cdc42 bindet GTP-abhängig an die CRIB (*Cdc42/Rac interactive binding*) - Domäne von Ack1. Die Beobachtung, dass die Aufnahme von infektiösen HCV-Partikeln (HCVcc – *cell-culture-derived HCV*) mittels Cdc42 siRNA signifikant blockiert werden konnte^[331], legt die funktionelle Relevanz von Ack1 nahe. Cdc42 vermittelt den viralen Transport zu den *Tight junction*, an dem Ack1 auch beteiligt sein könnte. Die Untersuchungen von Berger *et al.* legen weiterhin nahe, dass Cdc42 durch Actin-Reorganisationen in den viralen Lebenszyklus, insbesondere in den Viruszusammenbau beteiligt ist^[332]. Cdc42 wurde neben sechs weiteren Wirtszellproteinen als Kofaktor für die virale Replikation und die infektiöse Partikelproduktion identifiziert^[332, 333]. Der Befund bestätigt frühere Studien, die Actinfilamente und Mikrotubuli für eine effiziente HCV-Replikation benennen^[334], die von NS3 und NS5B gebunden werden können^[335].

In der Western Blot-Analyse konnte ein erniedrigter Proteinlevel von Ack1 in den Replikon-, aber nicht in HepG2 NS3/4A-Zellen festgestellt werden (Abbildung 3.14). Die Untersuchung der Ack1 mRNA schloss eine Modulation auf transkriptioneller Ebene aus (Abbildung 3.15). Bei der Analyse der gegen TC-PTP gerichteter siRNA transfizierten Huh7 wt-Zellen konnte auf Proteinebene gegenüber der Kontrolle keine

Beeinflussung des Ack1-Proteinlevels beobachtet werden (Abbildung 3.16). Demzufolge ist anzunehmen, dass primär nicht der NS3/4A-Komplex, sondern weitere nichtstrukturelle HCV Proteine für den reduzierten Proteinlevel von Ack1 verantwortlich sind. In direktem Zusammenhang hiermit steht der durch die Präsenz der HCV Proteine erhöhte Proteinlevel von Nedd4, einer E3 Ubiquitin-Ligase (Abbildung 3.17). Untersuchungen von Lin *et al.* belegen, dass die beiden Proteine Ack1 und Nedd4-1 interagieren, was zur Ubiquitinierung von Ack1 führt ^[261]. Da der Einsatz von Ack1 siRNA die EGFR-Ubiquitinylierung inhibierte, ohne dass die Aktivierung oder die Endozytose beeinflusst wurde, fungiert Nedd4-1 durch die Herunterregulation von Ack1 indirekt als Regulator der EGFR-Aktivität. Eine weitere Regulation erfährt der EGFR durch die Nedd4-1-vermittelte Ubiquitinylierung von Cbl und Eps15, zwei Proteine, die eine zentrale Rolle in der EGFR-Endozytose und -Degradation einnehmen ^[336, 337]. Ungefähr zur gleichen Zeit konnte Chan *et al.* eine Ubiquitinylierung von Ack1 durch die E3 Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 nachweisen ^[330]. Die Diskrepanz beruht möglicherweise auf den unterschiedlichen experimentellen Systemen, sowie verschiedenen eingesetzten Analysen. Vor dem Hintergrund der Interaktion war interessant, dass eine Überexpression von Nedd4 bei beiden Arbeitsgruppen zu einem erniedrigten Ack1-Proteinlevel führte. Inwieweit jedoch tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen den reziproken Proteinleveln von Nedd4-1 und Ack1 im HCV Replikonsystem besteht, muss noch weiterführend untersucht werden.

In Western Blot-Analysen wurde die Tyrosinphosphorylierung (857/858) eines Proteins mit einem molekularen Gewicht von 110 kDa nach Liganden-induzierter EGFR-Aktivierung nachgewiesen (Abbildung 3.19). In Huh 9-13-Zellen war das Protein im Vergleich zu den Kontrollzellen verstärkt phosphoryliert. In diesem Zusammenhang war interessant, dass die Tyrosinphosphorylierung von der Aktivität des EGFR abhängig war (Abbildung 3.20). Aufgrund der Beobachtungen und weiterer Literatur-gestützter Befunde muss postuliert werden, dass die beobachtete Phosphorylierung des Proteins auf eine Isoform von Ack1 im hepatozellulären System zurückzuführen ist. Die Studie von Galisteo *et al.* lässt annehmen, dass in der Leber drei verschiedene Transkripte von Ack1 gebildet werden ^[259]. Allerdings bleibt zu beachten, dass die Untersuchungen im murinen System erfolgten und der Befund daher nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar ist. Weitere publizierte Befunde zur Expression von Ack1 im hepatobiliären System sind bislang nicht verfügbar. Die Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus sowie die Identifizierung putativer Isoformen von Ack1 wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die im dritten und letzten Teil der Arbeit vorgestellten Daten identifizieren Ack1 als Protein, welches in HCV Proteine beherbergenden Zellen (Huh 9-13 und HepG2 NS3/4A) konstitutiv am Tyrosinrest 857/858 phosphoryliert vorliegt. Zudem konnte TC-PTP als diejenige zelluläre Tyrosin-Phosphatase identifiziert werden, welche direkt oder indirekt die Phosphorylierung von Ack1 an den Tyrosinmotiven 857/858 negativ reguliert. Die Phosphorylierung ist unabhängig von der EGFR-Aktivität und übt keinen Einfluss auf die Kinetik der EGFR-Internalisierung nach Ligandenbindung aus. Es konnte belegt werden, dass Ack1 für die virale Replikation nicht essentiell ist. Einen Hinweis auf eine mögliche Rolle von Ack1 für den Viruseintritt ergibt sich aus den erhöhten Proteinleveln von Cdc42, die in Replikon- und HepG2 NS3/4A-Zellen beobachtbar sind. Da Ack1 als Target von Cdc42 fungiert, besteht hier möglicherweise ein wichtiger Zusammenhang zwischen der Hochregulation von Cdc42 und der konstitutiven Phosphorylierung von Ack1. Die Untersuchung der Bedeutung der HCV-bedingten Hochregulation wird Gegenstand zukünftiger Projekte sein.

5. Zusammenfassung

Die Hepatitis C-Virusinfektion stellt heute ein globales Problem dar, da etwa 170 Millionen Menschen als chronisch infiziert gelten. Vor allem die in den letzten Jahren unternommenen experimentellen Anstrengungen führten zu der Annahme, dass HCV mit einer Vielzahl von wirtseigenen Proteinen interferiert und folglich Strategien entwickelt haben muss, um die antivirale Immunantwort zu umgehen. Hierbei ist insbesondere das nichtstrukturelle Protein NS3/4A von Interesse. So konnte belegt werden, dass der NS3/4A-Komplex durch die proteolytische Spaltung von CARDIF und TRIF essentielle Komponenten der angeborenen, antiviralen Immunantwort der Wirtszelle blockiert. Zudem interagiert HCV NS3/4A durch die proteolytische Spaltung der TC-PTP mit dem Liganden-induzierten EGFR-Signalweg und verstärkt damit die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Daraus resultierend wird für das NS3/4A-Protein eine Modulation der Zellproliferation und Apoptoseregulation diskutiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Zelllinien, die HCV *Core* und *NS3/4A* stabil exprimieren, retroviral generiert sowie biochemisch und immunzytochemisch charakterisiert. Parallel zu der Etablierung des Zellkultursystems wurde eine *Targeting*-Strategie zur Generierung einer konditionalen, für HCV NS3/4A transgenen Maus erstellt und der Rekombinationsvektor kloniert. So soll nachfolgend eine Mauslinie mittels des Cre/loxP-Rekombinationssystems generiert werden, die eine zeit- und leberspezifische Expression des HCV *NS3/4A*-Gens und weitere *in vivo* Analysen ermöglicht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde im Rahmen der Rezeptor-vermittelten Apoptose belegt, dass die Stimulation mit TNF- α alleine nicht, in Kombination mit dem Transkriptionseinhibitor Actinomycin D jedoch zur Apoptoseinduktion führt, die durch die proteolytische Spaltung der Caspase-3 und PARP nachgewiesen wurde. In weiterführenden Experimenten konnte allerdings keine Beeinflussung der Apoptoseinduktion durch die Präsenz von HCV Proteinen festgestellt werden. Die Untersuchung der Aktivierung des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors STAT3 führte in der Western Blot-Analyse zur Detektion eines distinkten Bandenmusters in Folge einer Kreuzreaktion mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper (Tyr⁷⁰⁵). Mittels Koimmunopräzipitation konnte die Spezifität der Kreuzreaktion bestätigt werden. Das unbekannte Protein wurde in Gegenwart von HCV Proteinen im konstitutiv phosphorylierten Zustand nachgewiesen. Eine Datenbanksuche identifizierte die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Ack1 als putativen Kandidaten.

Die im dritten und letzten Teil der Arbeit vorgestellten Daten identifizieren Ack1 als Protein, welches in HCV Proteine enthaltenden Zellen konstitutiv am Tyrosinrest 857/858 phosphoryliert vorliegt. Die Tyrosinmotive sind in der EGFR-bindenden Domäne von Ack1 lokalisiert. Durch den Einsatz von siRNA konnte TC-PTP als diejenige zelluläre Tyrosin-Phosphatase identifiziert werden, welche direkt oder indirekt die Phosphorylierung von Ack1 an den Tyrosinmotiven 857/858 negativ reguliert. Die Phosphorylierung von Ack1 ist unabhängig von der EGFR-Aktivität und übt keinen Einfluss auf die Kinetik der EGFR-Internalisierung nach Ligandenbindung aus. Der Einsatz Ack1-spezifischer siRNA legt nahe, dass Ack1 für die Replikation von HCV nicht essentiell ist. Einen Hinweis auf die Beteiligung von Ack1 beim Viruseintritt liefert die Beobachtung, dass Zellen, die das subgenomische HCV-Replikon exprimieren, aber auch Zellen, die HCV NS3/4A exprimieren, einen erhöhten Proteinlevel von Cdc42 aufweisen. Da Ack1 als Target von Cdc42 fungiert, besteht hier möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Hochregulation von Cdc42 und der konstitutiven Phosphorylierung von Ack1. Western Blot-Analysen verdeutlichten einen erniedrigten Ack1-Proteinlevel in Zelllinien, die das subgenomische HCV Replikon exprimieren, nicht aber in Zellen, die HCV NS3/4A-Proteine beherbergen. Möglicherweise ist hierfür der in Huh 9-13-Zellen erhöhte Proteinlevel der Ack1-ubiquitinylierenden E3 Ubiquitin-Ligase Nedd4-1 verantwortlich. Somit wurde mit Ack1 ein weiteres zelluläres Wirtsprotein identifiziert, dessen Funktion durch die NS3/4A-vermittelte Spaltung von TC-PTP moduliert wird.

6. Summary

Infection with Hepatitis C virus (HCV) is a global problem due to the fact that about 170 million people worldwide are chronically infected with the virus. The undertaken experimental efforts in the last years lead to the assumption that HCV interferes with host cell proteins thereby evolved strategies to circumvent the antiviral immune response. HCV NS3/4A blocks the antiviral immune response of the host through proteolytical cleavage of the adapter proteins CARDIF and TRIF which are essential components of the virus-induced innate immunity. Furthermore NS3/4A interferes with the ligand-induced activation of EGFR signaling through the proteolytic cleavage of the TC-PTP thereby enhancing downstream signal-transduction. As a result a role in the modulation of cell proliferation and regulation of apoptosis is discussed for NS3/4A.

In the first part of the thesis stably expressing HCV Core and NS3/4A cell lines were generated by retroviral gene transfer, following biochemical and immunocytochemical characterisation. Parallel to the establishment of cell lines a gene-targeting strategy has been created to generate a conditional, NS3/4A transgenic mouse and the gene-targeting vector has been cloned. The goal of this approach is to provide time- and liver-specific NS3/4A expression using the Cre/loxP recombination system and to enable further *in vivo* analysis in future.

The second part of this thesis confirms that TNF α alone does not induce apoptosis in HepG2 and Huh7 cells but, in combination with the transcriptional inhibitor Actinomycin D, apoptosis can be detected through caspase-3 and PARP-cleavage. However in further experiments a HCV-dependent modulation of the apoptosis was not determined. The analysis of the activation of the anti-apoptotic transcription factor STAT3 led to the detection of a distinct band specimen due to cross reaction of the phosphotyrosine-specific antibody (Tyr⁷⁰⁵). Using coimmunoprecipitation the specificity of the cross reaction could be determined. The unknown protein is constitutively phosphorylated in the presence of HCV proteins. A database search identified the nonreceptor tyrosine kinase Ack1 as a putative candidate.

In the third part of this thesis it could be demonstrated that cells expressing HCV subgenomic replicon display constitutively phosphorylated Ack1 at tyrosine 857/858, which is located in the EGFR-binding domain in the carboxyl terminus of Ack1. The siRNA-based downregulation of the TC-PTP expression strongly suggest that the cellular tyrosine-phosphatase TC-PTP regulates directly or indirectly the phosphorylation at tyrosine 857/858 of Ack1. The enhanced phosphorylation of Ack1 is

independent of the kinase activity of the EGFR and does not alter ligand-induced internalization of EGFR. The use of Ack1 specific siRNA suggests that Ack1 is not essential for the replication of HCV. Due to the fact that Ack1 is a specific downstream target molecule of Cdc42 the upregulation of Cdc42 possibly correlates with the constitutive phosphorylation of Ack1 suggesting a role for Ack1 in virus entry. Western blot analysis reveals a decreased protein level of Ack1 in cells harbouring the subgenomic replicon but not in cells expressing NS3/4A. Interestingly cell lines expressing the subgenomic HCV replicon show an increased protein level of E3 ubiquitin ligase Nedd4-1 which mediates the ubiquitination of Ack1. Hence, Ack1 is a new identified cellular host factor whose function is modulated through the NS3/4A-mediated cleavage of TC-PTP.

7. Literaturverzeichnis

1. Prince, A.M., et al., *Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus*. Lancet, 1974. **2**(7875): p. 241-6.
2. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
3. Cooper, S., et al., *Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus*. Immunity, 1999. **10**(4): p. 439-49.
4. WHO. *Hepatitis C*. 2002 [cited; Available from: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact164.html>].
5. Agostini, C., G. Semenzato, and D.G. James, *Immunological, clinical and molecular aspects of sarcoidosis*. Mol Aspects Med, 1997. **18**(2): p. 91-165.
6. Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice, *Replication of hepatitis C virus*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(6): p. 453-63.
7. Simmonds, P., et al., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 962-73.
8. Ross, R.S., et al., *Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes*. J Med Virol, 2000. **60**(2): p. 122-5.
9. Xu, Z., et al., *Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift*. EMBO J, 2001. **20**(14): p. 3840-8.
10. Brown, E.A., et al., *Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(19): p. 5041-5.
11. Tsukiyama-Kohara, K., et al., *Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1476-83.
12. Kolykhalov, A.A., S.M. Feinstone, and C.M. Rice, *Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 3363-71.
13. Tanaka, T., et al., *A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **215**(2): p. 744-9.
14. Tanaka, T., et al., *Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 3307-12.
15. Yanagi, M., et al., *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 U S A, 1999. **96**(5): p. 2291-5.
16. Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset, *Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes*. J Exp Med, 2003. **197**(5): p. 633-42.
17. Goffard, A., et al., *Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. J Virol, 2005. **79**(13): p. 8400-9.
18. Sakai, A., et al., *The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11646-51.
19. Hijikata, M., et al., *Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4665-75.
20. Jirasko, V., et al., *Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly*. J Biol Chem, 2008. **283**(42): p. 28546-62.
21. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 933-8.

22. Wolk, B., et al., *Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines*. J Virol, 2000. **74**(5): p. 2293-304.
23. Moradpour, D., et al., *Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex*. Antiviral Res, 2003. **60**(2): p. 103-9.
24. Dimitrova, M., et al., *Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5401-14.
25. Gosert, R., et al., *Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5487-92.
26. Macdonald, A. and M. Harris, *Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 9): p. 2485-502.
27. Tan, S.L. and M.G. Katze, *How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A*. Virology, 2001. **284**(1): p. 1-12.
28. Tellinghuisen, T.L. and C.M. Rice, *Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors*. Curr Opin Microbiol, 2002. **5**(4): p. 419-27.
29. Behrens, S.E., L. Tomei, and R. De Francesco, *Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus*. EMBO J, 1996. **15**(1): p. 12-22.
30. Lohmann, V., et al., *Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8416-28.
31. De Francesco, R. and G. Migliaccio, *Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 953-60.
32. Chambers, T.J., et al., *Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(22): p. 8898-902.
33. Kim, J.L., et al., *Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide*. Cell, 1996. **87**(2): p. 343-55.
34. Kim, D.W., et al., *C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **215**(1): p. 160-6.
35. Tai, C.L., et al., *The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3)*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8477-84.
36. Frick, D.N., et al., *The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1269-80.
37. Borowski, P., et al., *Non-structural protein 3 of hepatitis C virus inhibits phosphorylation mediated by cAMP-dependent protein kinase*. Eur J Biochem, 1996. **237**(3): p. 611-8.
38. Borowski, P., et al., *Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30722-8.
39. Borowski, P., et al., *Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 2838-43.
40. Borowski, P., et al., *Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus*. J Clin Virol, 1999. **13**(1-2): p. 61-9.
41. Moudrianakis, E.N. and G. Arents, *Structure of the histone octamer core of the nucleosome and its potential interactions with DNA*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1993. **58**: p. 273-9.
42. Muramatsu, S., et al., *Nuclear localization of the NS3 protein of hepatitis C virus and factors affecting the localization*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 4954-61.

43. Ishido, S. and H. Hotta, *Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor*. FEBS Lett, 1998. **438**(3): p. 258-62.
44. Deng, L., et al., *NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 6): p. 1703-13.
45. Kwun, H.J., et al., *p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 9): p. 2235-41.
46. Fujita, T., et al., *Suppression of actinomycin D-induced apoptosis by the NS3 protein of hepatitis C virus*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **229**(3): p. 825-31.
47. Amundson, S.A., T.G. Myers, and A.J. Fornace, Jr., *Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3287-99.
48. el-Deiry, W.S., *Regulation of p53 downstream genes*. Semin Cancer Biol, 1998. **8**(5): p. 345-57.
49. Ko, L.J. and C. Prives, *p53: puzzle and paradigm*. Genes Dev, 1996. **10**(9): p. 1054-72.
50. Ishido, S., et al., *Wild-type, but not mutant-type, p53 enhances nuclear accumulation of the NS3 protein of hepatitis C virus*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **230**(2): p. 431-6.
51. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
52. Beutler, B., *Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 498.
53. Peters, K.L., et al., *IRF-3-dependent, NFkappa B- and JNK-independent activation of the 561 and IFN-beta genes in response to double-stranded RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6322-7.
54. Grandvaux, N., et al., *Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5532-9.
55. Gale, M., Jr. and E.M. Foy, *Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 939-45.
56. Foy, E., et al., *Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-1 signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2986-91.
57. Brenndorfer, E.D., et al., *Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase*. Hepatology, 2009. **49**(6): p. 1810-20.
58. Tiganis, T., et al., *Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1622-34.
59. Street, A., et al., *The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12232-41.
60. Alisi, A., et al., *Involvement of PI3K in HCV-related lymphoproliferative disorders*. J Cell Physiol, 2008. **214**(2): p. 396-404.
61. Dolganiuc, A., et al., *Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5615-24.
62. Valgimigli, M., et al., *Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation*. Free Radic Res, 2002. **36**(9): p. 939-48.

63. Frelin, L., et al., *The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumour necrosis factor alpha mediated liver disease*. Gut, 2006. **55**(10): p. 1475-83.
64. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 65-91.
65. Frese, M., et al., *Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor-alpha*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 5): p. 1253-9.
66. Lanford, R.E., et al., *Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons*. J Virol, 2003. **77**(2): p. 1092-104.
67. Liu, C., et al., *CD8+ T-cell interaction with HCV replicon cells: evidence for both cytokine- and cell-mediated antiviral activity*. Hepatology, 2003. **37**(6): p. 1335-42.
68. Chevaliez, S. and J.M. Pawlotsky, *Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2461-6.
69. Ploss, A., et al., *Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 882-6.
70. Agnello, V., et al., *Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12766-71.
71. Wunschmann, S., et al., *Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor*. J Virol, 2000. **74**(21): p. 10055-62.
72. Andreo, U., et al., *Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection*. Cell Microbiol, 2007. **9**(10): p. 2445-56.
73. Barth, H., et al., *Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41003-12.
74. Germi, R., et al., *Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption*. J Med Virol, 2002. **68**(2): p. 206-15.
75. Gardner, J.P., et al., *L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4498-503.
76. Lozach, P.Y., et al., *DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 20358-66.
77. Andre, P., et al., *Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 6919-28.
78. Dreux, M., et al., *Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000310.
79. Maillard, P., et al., *The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins*. FASEB J, 2006. **20**(6): p. 735-7.
80. Lupberger, J., et al., *EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 589-95.
81. Dubuisson, J., F. Helle, and L. Cocquerel, *Early steps of the hepatitis C virus life cycle*. Cell Microbiol, 2008. **10**(4): p. 821-7.
82. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
83. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
84. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.

85. Fischer, U., R.U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff, *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 76-100.
86. Janicke, R.U., et al., *Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9357-60.
87. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
88. Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, *The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 2): p. 201-32.
89. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
90. Boldin, M.P., et al., *Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death*. Cell, 1996. **85**(6): p. 803-15.
91. Muzio, M., et al., *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex*. Cell, 1996. **85**(6): p. 817-27.
92. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
93. Salvesen, G.S. and V.M. Dixit, *Caspase activation: the induced-proximity model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10964-7.
94. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
95. Schutze, S., V. Tchikov, and W. Schneider-Brachert, *Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(8): p. 655-62.
96. Patterson, S.D., et al., *Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition*. Cell Death Differ, 2000. **7**(2): p. 137-44.
97. Jiang, X. and X. Wang, *Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31199-203.
98. Rodriguez, J. and Y. Lazebnik, *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3179-84.
99. Kamegaya, Y., et al., *Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis*. Hepatology, 2005. **41**(3): p. 660-7.
100. Machida, K., et al., *Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12140-6.
101. Lee, S.K., et al., *Interaction of HCV core protein with 14-3-3epsilon protein releases Bax to activate apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(3): p. 756-62.
102. Chiou, H.L., et al., *HCV E2 may induce apoptosis of Huh-7 cells via a mitochondrial-related caspase pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(1): p. 453-8.
103. Ray, R.B., et al., *Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 2256-9.
104. Ruggieri, A., et al., *Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein*. Virology, 1997. **229**(1): p. 68-76.

105. Saito, K., et al., *Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4372-9.
106. Otsuka, M., et al., *Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression*. Virology, 2002. **296**(1): p. 84-93.
107. Yoshida, T., et al., *Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation*. J Exp Med, 2002. **196**(5): p. 641-53.
108. Ray, R.B., K. Meyer, and R. Ray, *Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein*. Virology, 1996. **226**(2): p. 176-82.
109. Zhu, N., et al., *Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3691-7.
110. Matsumoto, M., et al., *Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor*. J Virol, 1997. **71**(2): p. 1301-9.
111. Machida, K., et al., *Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation*. J Virol, 2006. **80**(14): p. 7199-207.
112. Okuda, M., et al., *Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein*. Gastroenterology, 2002. **122**(2): p. 366-75.
113. Prikhod'ko, E.A., et al., *The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities*. Virology, 2004. **329**(1): p. 53-67.
114. Siavoshian, S., et al., *Hepatitis C virus core, NS3, NS5A, NS5B proteins induce apoptosis in mature dendritic cells*. J Med Virol, 2005. **75**(3): p. 402-11.
115. Nomura-Takigawa, Y., et al., *Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 1935-45.
116. Lan, K.H., et al., *HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(31): p. 4801-11.
117. Gong, G., et al., *Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9599-604.
118. Ezelle, H.J., et al., *Analyzing the mechanisms of interferon-induced apoptosis using CrmA and hepatitis C virus NS5A*. Virology, 2001. **281**(1): p. 124-37.
119. Montero, C., et al., *Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method*. Clin Chim Acta, 1995. **238**(2): p. 169-78.
120. Hultgren, C., et al., *The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 10): p. 2381-91.
121. Tam, R.C., et al., *Contact hypersensitivity responses following ribavirin treatment in vivo are influenced by type 1 cytokine polarization, regulation of IL-10 expression, and costimulatory signaling*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3709-17.
122. Baron, S., et al., *The interferons. Mechanisms of action and clinical applications*. JAMA, 1991. **266**(10): p. 1375-83.
123. Perry, C.M. and B. Jarvis, *Peginterferon-alpha-2a (40 kD): a review of its use in the management of chronic hepatitis C*. Drugs, 2001. **61**(15): p. 2263-88.
124. Poynard, T., et al., *Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C*. Hepatology, 2003. **38**(1): p. 75-85.
125. Lamarre, D., et al., *An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus*. Nature, 2003. **426**(6963): p. 186-9.

126. Lin, C., A.D. Kwong, and R.B. Perni, *Discovery and development of VX-950, a novel, covalent, and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3.4A serine protease*. Infect Disord Drug Targets, 2006. **6**(1): p. 3-16.
127. Mikkelsen, M. and J. Bukh, *Current status of a hepatitis C vaccine: encouraging results but significant challenges ahead*. Curr Infect Dis Rep, 2007. **9**(2): p. 94-101.
128. Strickland, G.T., et al., *Hepatitis C vaccine: supply and demand*. Lancet Infect Dis, 2008. **8**(6): p. 379-86.
129. Fournier, C., et al., *In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 10): p. 2367-74.
130. Kanda, T., et al., *Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4633-9.
131. Nakabayashi, H., et al., *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
132. Diamond, L., et al., *Metabolic activation of benzo[a]pyrene by a human hepatoma cell line*. Carcinogenesis, 1980. **1**(10): p. 871-5.
133. Windisch, M.P., et al., *Dissecting the interferon-induced inhibition of hepatitis C virus replication by using a novel host cell line*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13778-93.
134. Flint, M., et al., *Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6235-44.
135. Michalak, J.P., et al., *Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 9): p. 2299-306.
136. Pileri, P., et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. **282**(5390): p. 938-41.
137. Scarselli, E., et al., *The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus*. EMBO J, 2002. **21**(19): p. 5017-25.
138. Cocquerel, L., et al., *Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. EMBO J, 2002. **21**(12): p. 2893-902.
139. Lagging, L.M., et al., *Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3539-46.
140. Matsuura, Y., et al., *Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins*. Virology, 2001. **286**(2): p. 263-75.
141. Baumert, T.F., et al., *Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3827-36.
142. Baumert, T.F., et al., *Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate*. Gastroenterology, 1999. **117**(6): p. 1397-407.
143. Baumert, T.F., et al., *Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C*. Hepatology, 2000. **32**(3): p. 610-7.
144. Di Bisceglie, A.M. and J.H. Hoofnagle, *Optimal therapy of hepatitis C*. Hepatology, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S121-7.
145. Lechmann, M., et al., *Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice*. Hepatology, 2001. **34**(2): p. 417-23.
146. Bartenschlager, R. and T. Pietschmann, *Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(28): p. 9739-40.
147. Lohmann, V., et al., *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. Science, 1999. **285**(5424): p. 110-3.
148. Tellinghuisen, T.L., et al., *Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 8853-67.
149. Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice, *Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture*. Science, 2000. **290**(5498): p. 1972-4.

150. Bukh, J., et al., *Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14416-21.
151. Kato, T., et al., *Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1808-17.
152. Date, T., et al., *Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22371-6.
153. Kato, T., et al., *Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon*. J Virol, 2005. **79**(1): p. 592-6.
154. Lindenbach, B.D., et al., *Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3805-9.
155. Sumpster, R., Jr., et al., *Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2689-99.
156. Frese, M., et al., *Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 4): p. 723-33.
157. Guo, J.T., V.V. Bichko, and C. Seeger, *Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon*. J Virol, 2001. **75**(18): p. 8516-23.
158. Lindenbach, B.D., et al., *Complete replication of hepatitis C virus in cell culture*. Science, 2005. **309**(5734): p. 623-6.
159. Pietschmann, T., et al., *Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7408-13.
160. Wakita, T., et al., *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 791-6.
161. Zhang, J., et al., *CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection*. J Virol, 2004. **78**(3): p. 1448-55.
162. Castet, V. and D. Moradpour, *A model for the study of hepatitis C virus entry*. Hepatology, 2003. **38**(3): p. 771-4.
163. Walker, C.M., *Comparative features of hepatitis C virus infection in humans and chimpanzees*. Springer Semin Immunopathol, 1997. **19**(1): p. 85-98.
164. Xie, Z.C., et al., *Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews*. Virology, 1998. **244**(2): p. 513-20.
165. Abe, K., et al., *Lack of susceptibility of various primates and woodchucks to hepatitis C virus*. J Med Primatol, 1993. **22**(7-8): p. 433-4.
166. Garson, J.A., et al., *Lack of susceptibility of the cottontop tamarin to hepatitis C infection*. J Med Virol, 1997. **52**(3): p. 286-8.
167. Sithebe, N.P., et al., *Lack of susceptibility of Chacma baboons (Papio ursinus orientalis) to hepatitis C virus infection*. J Med Virol, 2002. **66**(4): p. 468-71.
168. Bockamp, E., et al., *Of mice and models: improved animal models for biomedical research*. Physiol Genomics, 2002. **11**(3): p. 115-32.
169. Barth, H., et al., *Mouse models for the study of HCV infection and virus-host interactions*. J Hepatol, 2008. **49**(1): p. 134-42.
170. Kremsdorf, D. and N. Brezillon, *New animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2427-35.
171. Asselah, T., et al., *Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter?* Gut, 2006. **55**(1): p. 123-30.
172. Lerat, H., et al., *Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus*. Gastroenterology, 2002. **122**(2): p. 352-65.
173. Moriya, K., et al., *The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1065-7.

174. Moriya, K., et al., *Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis*. Cancer Res, 2001. **61**(11): p. 4365-70.
175. Korenaga, M., et al., *Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37481-8.
176. Alonzi, T., et al., *Steatosis and intrahepatic lymphocyte recruitment in hepatitis C virus transgenic mice*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 6): p. 1509-20.
177. Takaku, S., et al., *Induction of hepatic injury by hepatitis C virus-specific CD8+ murine cytotoxic T lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(2): p. 330-7.
178. Wakita, T., et al., *Possible role of cytotoxic T cells in acute liver injury in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by Cre/loxP system*. J Med Virol, 2000. **62**(3): p. 308-17.
179. Wakita, T., et al., *Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9001-6.
180. Koike, K., et al., *Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice*. J Gen Virol, 1995. **76** (Pt 12): p. 3031-8.
181. Pasquinelli, C., et al., *Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice*. Hepatology, 1997. **25**(3): p. 719-27.
182. Majumder, M., et al., *Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice*. Virology, 2002. **294**(1): p. 94-105.
183. Majumder, M., et al., *Expression of hepatitis C virus non-structural 5A protein in the liver of transgenic mice*. FEBS Lett, 2003. **555**(3): p. 528-32.
184. Perlemuter, G., et al., *Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis*. FASEB J, 2002. **16**(2): p. 185-94.
185. Moriya, K., et al., *Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 7): p. 1527-31.
186. Perlemuter, G., et al., *Alcohol and hepatitis C virus core protein additively increase lipid peroxidation and synergistically trigger hepatic cytokine expression in a transgenic mouse model*. J Hepatol, 2003. **39**(6): p. 1020-7.
187. Tsutsumi, T., et al., *Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein*. Virology, 2002. **304**(2): p. 415-24.
188. Shintani, Y., et al., *Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance*. Gastroenterology, 2004. **126**(3): p. 840-8.
189. Tsutsumi, T., et al., *Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity*. Hepatology, 2002. **35**(4): p. 937-46.
190. Honda, A., et al., *HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice*. J Hepatol, 2000. **33**(3): p. 440-7.
191. Ishikawa, T., et al., *Expression of hepatitis C virus core protein associated with malignant lymphoma in transgenic mice*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2003. **26**(2): p. 115-24.
192. Kawamura, T., et al., *Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse*. Hepatology, 1997. **25**(4): p. 1014-21.
193. Naas, T., et al., *Characterization of liver histopathology in a transgenic mouse model expressing genotype 1a hepatitis C virus core and envelope proteins 1 and 2*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 8): p. 2185-96.

194. Blindenbacher, A., et al., *Expression of hepatitis c virus proteins inhibits interferon alpha signaling in the liver of transgenic mice*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1465-75.
195. Duong, F.H., et al., *Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A*. Gastroenterology, 2004. **126**(1): p. 263-77.
196. Disson, O., et al., *Impaired clearance of virus-infected hepatocytes in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein*. Gastroenterology, 2004. **126**(3): p. 859-72.
197. Lubin, I., et al., *Engraftment and development of human T and B cells in mice after bone marrow transplantation*. Science, 1991. **252**(5004): p. 427-31.
198. Galun, E., et al., *Hepatitis C virus viremia in SCID-->BNX mouse chimera*. J Infect Dis, 1995. **172**(1): p. 25-30.
199. Bosma, G.C., R.P. Custer, and M.J. Bosma, *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse*. Nature, 1983. **301**(5900): p. 527-30.
200. Eren, R., et al., *Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 2654-64.
201. Ilan, E., et al., *The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV*. J Infect Dis, 2002. **185**(2): p. 153-61.
202. Mercer, D.F., et al., *Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 927-33.
203. Sandgren, E.P., et al., *Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene*. Cell, 1991. **66**(2): p. 245-56.
204. Walters, K.A., et al., *Host-specific response to HCV infection in the chimeric SCID-beige/Alb-uPA mouse model: role of the innate antiviral immune response*. PLoS Pathog, 2006. **2**(6): p. e59.
205. Vanwolleghem, T., et al., *Ultra-rapid cardiotoxicity of the hepatitis C virus protease inhibitor BILN 2061 in the urokinase-type plasminogen activator mouse*. Gastroenterology, 2007. **133**(4): p. 1144-55.
206. Kneteman, N.M., et al., *HCV796: A selective nonstructural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity in vitro, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 745-52.
207. Meuleman, P. and G. Leroux-Roels, *The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV*. Antiviral Res, 2008. **80**(3): p. 231-8.
208. Inoue, K., et al., *Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo*. Hepatology, 2007. **45**(4): p. 921-8.
209. Kuhn, R. and F. Schwenk, *Advances in gene targeting methods*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(2): p. 183-8.
210. Nagy, A., *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 99-109.
211. Tronche, F., et al., *When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice*. FEBS Lett, 2002. **529**(1): p. 116-21.
212. Jonkers, J. and A. Berns, *Conditional mouse models of sporadic cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 251-65.
213. Dymecki, S.M., *A modular set of Flp, FRT and lacZ fusion vectors for manipulating genes by site-specific recombination*. Gene, 1996. **171**(2): p. 197-201.
214. Kuhn, R., et al., *Inducible gene targeting in mice*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1427-9.
215. St-Onge, L., P.A. Furth, and P. Gruss, *Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(19): p. 3875-7.

216. Metzger, D., et al., *Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6991-5.
217. Zhang, Y., et al., *Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(4): p. 543-8.
218. Burgess, A.W., *EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets*. Growth Factors, 2008. **26**(5): p. 263-74.
219. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *The EGF receptor family as targets for cancer therapy*. Oncogene, 2000. **19**(56): p. 6550-65.
220. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-37.
221. Guy, P.M., et al., *Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8132-6.
222. Harris, R.C., E. Chung, and R.J. Coffey, *EGF receptor ligands*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 2-13.
223. Karunagaran, D., et al., *ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer*. EMBO J, 1996. **15**(2): p. 254-64.
224. Pawson, T. and J. Schlessingert, *SH2 and SH3 domains*. Curr Biol, 1993. **3**(7): p. 434-42.
225. Oliva, J.L., E.M. Griner, and M.G. Kazanietz, *PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors*. Growth Factors, 2005. **23**(4): p. 245-52.
226. Katz, M., I. Amit, and Y. Yarden, *Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1161-76.
227. Rodrigues, G.A., et al., *A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(4): p. 1448-59.
228. Wymann, M.P. and R. Marone, *Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(2): p. 141-9.
229. Ono, M. and M. Kuwano, *Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(24): p. 7242-51.
230. Biscardi, J.S., et al., *c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 8335-43.
231. Sato, K., et al., *c-Src phosphorylates epidermal growth factor receptor on tyrosine 845*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **215**(3): p. 1078-87.
232. Bowman, T., et al., *STATs in oncogenesis*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2474-88.
233. Kloth, M.T., et al., *STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1671-9.
234. Moon, H.S., et al., *Expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin, beta- and gamma-catenin, and epidermal growth factor receptor in cervical cancer cells*. Gynecol Oncol, 2001. **81**(3): p. 355-9.
235. Silva, C.M. and M.A. Shupnik, *Integration of steroid and growth factor pathways in breast cancer: focus on signal transducers and activators of transcription and their potential role in resistance*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(7): p. 1499-512.
236. Mattila, E., et al., *Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(1): p. 78-85.
237. Kim, S.E. and K.Y. Choi, *EGF receptor is involved in WNT3a-mediated proliferation and motility of NIH3T3 cells via ERK pathway activation*. Cell Signal, 2007. **19**(7): p. 1554-64.
238. Jiang, X. and A. Sorkin, *Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation*. Traffic, 2003. **4**(8): p. 529-43.

239. Levkowitz, G., et al., *Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1*. Mol Cell, 1999. **4**(6): p. 1029-40.
240. Sorkin, A., et al., *Epidermal growth factor receptor interaction with clathrin adaptors is mediated by the Tyr974-containing internalization motif*. J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13377-84.
241. Fazioli, F., et al., *eps15, a novel tyrosine kinase substrate, exhibits transforming activity*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(9): p. 5814-28.
242. Agazie, Y.M. and M.J. Hayman, *Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7875-86.
243. Haj, F.G., et al., *Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum*. Science, 2002. **295**(5560): p. 1708-11.
244. Xu, D., A. Makkinje, and J.M. Kyriakis, *Gene 33 is an endogenous inhibitor of epidermal growth factor (EGF) receptor signaling and mediates dexamethasone-induced suppression of EGF function*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2924-33.
245. Gur, G., et al., *LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation*. EMBO J, 2004. **23**(16): p. 3270-81.
246. Guy, G.R., et al., *Sprouty: how does the branch manager work?* J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 15): p. 3061-8.
247. Anastasi, S., et al., *Loss of RALT/MIG-6 expression in ERBB2-amplified breast carcinomas enhances ErbB-2 oncogenic potency and favors resistance to Herceptin*. Oncogene, 2005. **24**(28): p. 4540-8.
248. Salomon, D.S., et al., *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol, 1995. **19**(3): p. 183-232.
249. Woodburn, J.R., *The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy*. Pharmacol Ther, 1999. **82**(2-3): p. 241-50.
250. Manser, E., et al., *A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42*. Nature, 1993. **363**(6427): p. 364-7.
251. Shen, F., et al., *Activated Cdc42-associated kinase 1 is a component of EGF receptor signaling complex and regulates EGF receptor degradation*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(3): p. 732-42.
252. Teo, M., et al., *The tyrosine kinase ACK1 associates with clathrin-coated vesicles through a binding motif shared by arrestin and other adaptors*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18392-8.
253. Yang, W. and R.A. Cerione, *Cloning and characterization of a novel Cdc42-associated tyrosine kinase, ACK-2, from bovine brain*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 24819-24.
254. Sem, K.P., et al., *ACK family tyrosine kinase activity is a component of Dcdc42 signaling during dorsal closure in Drosophila melanogaster*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3685-97.
255. Hopper, N.A., J. Lee, and P.W. Sternberg, *ARK-1 inhibits EGFR signaling in C. elegans*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 65-75.
256. Hoare, K., et al., *Kos1, a nonreceptor tyrosine kinase that suppresses Ras signaling*. Oncogene, 2003. **22**(23): p. 3562-77.
257. Hoehn, G.T., et al., *Tnk1: a novel intracellular tyrosine kinase gene isolated from human umbilical cord blood CD34+/Lin-/CD38- stem/progenitor cells*. Oncogene, 1996. **12**(4): p. 903-13.
258. Mahajan, K. and N.P. Mahajan, *Shepherding AKT and androgen receptor by Ack1 tyrosine kinase*. J Cell Physiol, 2010. **224**(2): p. 327-33.
259. Galisteo, M.L., et al., *Activation of the nonreceptor protein tyrosine kinase Ack by multiple extracellular stimuli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 9796-801.

260. Satoh, T., et al., *Tyrosine phosphorylation of ACK in response to temperature shift-down, hyperosmotic shock, and epidermal growth factor stimulation*. FEBS Lett, 1996. **386**(2-3): p. 230-4.
261. Lin, Q., et al., *HECT E3 ubiquitin ligase Nedd4-1 ubiquitinates ACK and regulates epidermal growth factor (EGF)-induced degradation of EGF receptor and ACK*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(6): p. 1541-54.
262. Yang, W., et al., *The Cdc42 target ACK2 directly interacts with clathrin and influences clathrin assembly*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17468-73.
263. Lin, Q., et al., *The Cdc42 target ACK2 interacts with sorting nexin 9 (SH3PX1) to regulate epidermal growth factor receptor degradation*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10134-8.
264. van der Horst, E.H., et al., *Metastatic properties and genomic amplification of the tyrosine kinase gene ACK1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15901-6.
265. Eisenmann, K.M., et al., *Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(8): p. 507-13.
266. Modzelewska, K., et al., *Ack1 mediates Cdc42-dependent cell migration and signaling to p130Cas*. J Biol Chem, 2006. **281**(49): p. 37527-35.
267. Kato, J., Y. Kaziro, and T. Satoh, *Activation of the guanine nucleotide exchange factor Dbl following ACK1-dependent tyrosine phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **268**(1): p. 141-7.
268. Kornberg, L.J., et al., *Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8392-6.
269. Petch, L.A., et al., *Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 src substrate*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 4): p. 1371-9.
270. Vuori, K. and E. Ruoslahti, *Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix*. J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22259-62.
271. Mahajan, N.P., et al., *Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox*. Cancer Res, 2005. **65**(22): p. 10514-23.
272. Pao-Chun, L., et al., *Cytoplasmic ACK1 interaction with multiple receptor tyrosine kinases is mediated by Grb2: an analysis of ACK1 effects on Axl signaling*. J Biol Chem, 2009. **284**(50): p. 34954-63.
273. Mahajan, N.P., et al., *Activated Cdc42-associated kinase Ack1 promotes prostate cancer progression via androgen receptor tyrosine phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8438-43.
274. Gregory, C.W., et al., *Heregulin-induced activation of HER2 and HER3 increases androgen receptor transactivation and CWR-R1 human recurrent prostate cancer cell growth*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(5): p. 1704-12.
275. Mahajan, K., et al., *Ack1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9646.
276. Tibes, R., et al., *PI3K/AKT pathway activation in acute myeloid leukaemias is not associated with AKT1 pleckstrin homology domain mutation*. Br J Haematol, 2008. **140**(3): p. 344-7.
277. Klein, R., et al., *Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death*. Cell, 1993. **75**(1): p. 113-22.
278. Kuhn, R., K. Rajewsky, and W. Muller, *Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice*. Science, 1991. **254**(5032): p. 707-10.
279. Tang, K.F., et al., *Knockdown of damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1) enhances the HBx-siRNA-mediated inhibition of HBV replication*. Biologicals, 2008. **36**(3): p. 177-83.

280. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
281. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
282. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol, 1975. **98**(3): p. 503-17.
283. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
284. Horwitz, J.P., et al., *Substrates for Cytochemical Demonstration of Enzyme Activity. I. Some Substituted 3-Indolyl-Beta-D-Glycopyranosides*. J Med Chem, 1964. **7**: p. 574-5.
285. Brouckaert, P.G., et al., *In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma*. Int J Cancer, 1986. **38**(5): p. 763-9.
286. Fransen, L., et al., *Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1986. **22**(4): p. 419-26.
287. Weller, M., et al., *Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 954-64.
288. Kaufmann, S.H., et al., *Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis*. Cancer Res, 1993. **53**(17): p. 3976-85.
289. Beg, A.A. and D. Baltimore, *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death*. Science, 1996. **274**(5288): p. 782-4.
290. Guicciardi, M.E., et al., *Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c*. J Clin Invest, 2000. **106**(9): p. 1127-37.
291. Battle, T.E. and D.A. Frank, *The role of STATs in apoptosis*. Curr Mol Med, 2002. **2**(4): p. 381-92.
292. Takeda, K., et al., *Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 4652-60.
293. Akira, S., *Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2607-11.
294. Grovdal, L.M., et al., *Dysregulation of Ack1 inhibits down-regulation of the EGF receptor*. Exp Cell Res, 2008. **314**(6): p. 1292-300.
295. Bartenschlager, R., et al., *Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5045-55.
296. Bartenschlager, R., et al., *Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7519-28.
297. Failla, C., L. Tomei, and R. De Francesco, *Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3753-60.
298. Lin, C., et al., *Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics*. J Virol, 1994. **68**(12): p. 8147-57.
299. Tanji, Y., et al., *Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1575-81.
300. Butkiewicz, N.J., et al., *Enhancement of hepatitis C virus NS3 proteinase activity by association with NS4A-specific synthetic peptides: identification of sequence and critical residues of NS4A for the cofactor activity*. Virology, 1996. **225**(2): p. 328-38.
301. Koch, J.O., et al., *In vitro studies on the activation of the hepatitis C virus NS3 proteinase by the NS4A cofactor*. Virology, 1996. **221**(1): p. 54-66.

302. Steinkuhler, C., L. Tomei, and R. De Francesco, *In vitro* activity of hepatitis C virus protease NS3 purified from recombinant Baculovirus-infected Sf9 cells. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6367-73.
303. Pannell, D. and J. Ellis, *Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors*. Rev Med Virol, 2001. **11**(4): p. 205-17.
304. Berg, T., et al., *Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters*. J Hepatol, 1997. **26**(3): p. 484-91.
305. Driesel, G., et al., *Hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in German isolates: studies on the sequence variability in the E2 and NS5 region*. Arch Virol, 1994. **139**(3-4): p. 379-88.
306. Held, W.A., et al., *T antigen expression and tumorigenesis in transgenic mice containing a mouse major urinary protein/SV40 T antigen hybrid gene*. EMBO J, 1989. **8**(1): p. 183-91.
307. Postic, C. and M.A. Magnuson, *DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 149-50.
308. Bruning, J.C., et al., *A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance*. Mol Cell, 1998. **2**(5): p. 559-69.
309. Hirota, H., et al., *Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress*. Cell, 1999. **97**(2): p. 189-98.
310. Kulkarni, R.N., et al., *Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes*. Cell, 1999. **96**(3): p. 329-39.
311. Tsujimoto, M., Y.K. Yip, and J. Vilcek, *Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2441-4.
312. Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara, *A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1747-56.
313. Ghosh, A.K., et al., *Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death*. Virus Res, 2000. **67**(2): p. 173-8.
314. Miyasaka, Y., et al., *Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in Huh7 cells*. J Infect Dis, 2003. **188**(10): p. 1537-44.
315. Leist, M., et al., *Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest*. J Immunol, 1994. **153**(4): p. 1778-88.
316. Varfolomeev, E.E. and A. Ashkenazi, *Tumor necrosis factor: an apoptosis* *JuNKie?* Cell, 2004. **116**(4): p. 491-7.
317. Schmich, K., et al., *Tumor necrosis factor alpha sensitizes primary murine hepatocytes to Fas/CD95-induced apoptosis in a Bim- and Bid-dependent manner*. Hepatology, 2011. **53**(1): p. 282-92.
318. Walter, D., et al., *Switch from type II to I Fas/CD95 death signaling on in vitro culturing of primary hepatocytes*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1942-53.
319. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. EMBO J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
320. Kountouras, J., C. Zavos, and D. Chatzopoulos, *Apoptosis in hepatitis C*. J Viral Hepat, 2003. **10**(5): p. 335-42.
321. Badache, A. and N.E. Hynes, *Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(1): p. 383-91.
322. Buettner, R., L.B. Mora, and R. Jove, *Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(4): p. 945-54.

323. Catlett-Falcone, R., et al., *Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 105-15.
324. Grandis, J.R., et al., *Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4227-32.
325. Rajan, P. and R.D. McKay, *Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS*. J Neurosci, 1998. **18**(10): p. 3620-9.
326. Schuringa, J.J., et al., *Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3765-70.
327. James, L.C. and D.S. Tawfik, *The specificity of cross-reactivity: promiscuous antibody binding involves specific hydrogen bonds rather than nonspecific hydrophobic stickiness*. Protein Sci, 2003. **12**(10): p. 2183-93.
328. Nur-e-Kamal, M.S., et al., *Construction of a cell-permeable CDC42 binding fragment of ACK that inhibits v-Ha-Ras transformation*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **886**: p. 285-8.
329. Yokoyama, N. and W.T. Miller, *Biochemical properties of the Cdc42-associated tyrosine kinase ACK1. Substrate specificity, autophosphorylation, and interaction with Hck*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 47713-23.
330. Chan, W., et al., *Down-regulation of active ACK1 is mediated by association with the E3 ubiquitin ligase Nedd4-2*. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 8185-94.
331. Brazzoli, M., et al., *CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8316-29.
332. Berger, K.L., et al., *Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(18): p. 7577-82.
333. Chan, S.C., et al., *Visualization of the structures of the hepatitis C virus replication complex*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **404**(1): p. 574-8.
334. Bost, A.G., et al., *Cytoskeletal requirements for hepatitis C virus (HCV) RNA synthesis in the HCV replicon cell culture system*. J Virol, 2003. **77**(7): p. 4401-8.
335. Lai, C.K., et al., *Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8838-48.
336. Magnifico, A., et al., *WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43169-77.
337. Woelk, T., et al., *Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1246-54.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Johannes G. Bode unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde. Weiterhin möchte ich mich für seine kontinuierliche Unterstützung und seine große Bereitschaft zur Diskussion bedanken.

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

Herrn Professor Dr. med. Dieter Häussinger danke ich für die 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.

Bei Herrn Professor Dr. Stephan Ludwig (Universität Münster) und Professor Dr. Klaus Schulze-Osthoff (Universität Tübingen) danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung von S2-Arbeiten zur Generierung stabiler Zelllinien in ihren Laboratorien.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Experimentellen Hepatologie, insbesondere der AG Bode für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Hierbei danke ich insbesondere Marijana Suzanj, Christian Ehling, Juliane Karthe, Maria Reich, Andreas Kulawik.

Besonders herzlichen Dank an Ute Albrecht für den Feinschliff meiner Arbeit.

Mein allergrösster Dank gebührt meinem Lebensgefährten Ciro Petidis für jede erdenkliche Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen. Ebenso bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich zu jeder Zeit selbstlos unterstützt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Patricia Cebula
Geburtsdatum	27.08.1979
Geburtsort	Peiskretscham
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1990-1999	Städtische Gesamtschule Langerfeld, Wuppertal
-----------	---

Studium

1999-2005	Ruhr-Universität-Bochum Studium der Biologie Diplomarbeit zum Thema „Molekulare Charakterisierung des Lectin-Homologs SMU5651 aus <i>Sordaria macrospora</i> “
-----------	--

Promotion

2006-2011	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf Thema der Promotion „HCV interferiert mit Ack1-abhängigen Signalwegen durch Herabregulation der TC-PTP“
-----------	---

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Düsseldorf, den 30 Mai 2011