



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Interferenz des Hepatitis C Virus mit der
EGF Rezeptor Familie unter besonderer
Berücksichtigung der Neuregulin 1-vermittelten
Herabregulation des ErbB3 Rezeptors**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Sabine Eisenbürger

aus Krefeld

April 2014

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

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2014

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht:als Posterbeiträge

Sabine Eisenbürger, Andreas Pfannkuche, Juliane Karthe, Silke Hoffmann, Dieter Willbold, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *c-Src is required for HCV replication*. BioStruct Masterclass, September 2010, Düsseldorf

Sabine Eisenbürger, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Hepatitis C virus infection results in a reorganization of the expression pattern of ErbB receptor family members on its host cell*. 30th Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver, Januar 2014, Tübingen

Christina Gröpper, Nadja Triller, **Sabine Eisenbürger**, Christoph Seifert, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Hepatitis C Virus modulates TNF α -induced chemokine production and enables EGF to induce chemokine production in its host cell*. 30th Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver, Januar 2014, Tübingen

Sabine Eisenbürger, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Hepatitis C virus suppresses ErbB3 expression via enhanced production of its ligand Neuregulin 1*. 49th International Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2014, London

Christina Gröpper, Nadja Triller, **Sabine Eisenbürger**, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Hepatitis C Virus MEK1- and TC-PTP-dependently converts epidermal growth factor (EGF) into a potent inductor of CXCR2 ligand expression*. 49th International Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2014, London

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	11
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Einleitung	17
1.1 Das Hepatitis C Virus	17
1.1.1 Der virale Zelleintritt	18
1.1.2 Die Virusproteine	21
1.1.3 Die virale Replikation	22
1.2 Die EGF Rezeptor Familie	24
1.2.1 Einfluss des Hepatitis C Virus auf den EGF Rezeptor	30
1.3 Neureguline	31
1.4 Transkriptionsfaktoren	34
1.4.1 Die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3	34
1.4.2 Der Transkriptionsfaktor CREB	35
1.5 Transkriptionelle Regulation des Neuregulins 1	37
1.6 microRNA	39
1.7 Interaktion des Hepatitis C Virus mit der Wirtszelle	40
1.7.1 Die Transkriptionsfaktoren Sp1, AP-1 und NF- κ B	41
1.7.2 Das Chemokin CXCL8	42
1.7.3 Die Tyrosinkinase c-Src	43
1.9 HCV Zellkulturmodelle	45
1.10 Zielsetzung der Arbeit	49
2 Material und Methoden	51
2.1 Material, Substanzen und Lösungen	51
2.1.1 Materialien für die Zellkultur	51
2.1.2 Zellkulturmedien	51
2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien	52
2.1.4 Kits	53
2.1.5 PCR und Klonierung	53
2.1.6 Primärantikörper und Sekundärantikörper	54
2.1.7 Inhibitoren	55

2.1.8 Bakterienstämme	55
2.1.9 Beads	56
2.1.10 Peptide und synthetische Gene	56
2.1.11 Computerprogramme und Datenbanken zur Datenauswertung	56
2.2 Methoden	57
2.2.1 Zellbiologische Methoden	57
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	60
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	69
2.2.4 Hepatitis C Virus-Infektionssystem	79
3 Ergebnisse ErbB3	82
3.1 Der ErbB3 Rezeptor	82
3.2 Der Ligand Neuregulin 1	95
3.2.1 Sheddasen	95
3.2.2 Transkriptionsfaktoren	96
3.3 Die EGF Rezeptor Familie und die Familie der Neureguline	98
3.4 Die ErbB3 Rezeptoraktivierung	103
3.5 Einfluss der ErbB3 Oberflächenexpression auf den EGF Rezeptor	104
3.6 Infektionssystem	106
3.6.1 Effekte im Modell der akuten Infektion	106
3.6.2 Auswirkung der ErbB3 Herabregulation auf den viralen Eintritt	107
3.7 Das Chemokin CXCL8	108
4 Ergebnisse NS5B	110
4.1 Generierung von Mutagenese- und Trunkierungskonstrukten	110
4.2 <i>Pulldown</i> -Experimente und Co-Immunopräzipitation	114
4.2.1 <i>Pulldown</i> mit überexprimierten NS5B-Konstrukten	114
4.2.2 <i>Pulldown</i> mit überexprimierten GST-SH3-Konstrukten der Src-Familie	116
4.2.3. <i>Pulldown</i> mit überexprimierten c-Src- und NS5B-Konstrukten	117
4.2.4 Co-Immunopräzipitation mit c-Src-Antikörper und NS5B Δ 21	119
4.3 HSQC-Messung	120
5 Diskussion	122
5.1 Interferenz von HCV der ErbB Rezeptorfamilie und ihrer Expression	122
5.2 Interaktion der viralen NS5B Polymerase mit der humanen c-Src Kinase	130
6 Zusammenfassung	134

7 Summary	136
Literaturverzeichnis	138
Danksagung	148
Lebenslauf	149

Abbildungsverzeichnis

1 Einleitung

Abbildung 1.1:	Eintritt des Hepatitis C Virus in die Wirtszelle.	20
Abbildung 1.2:	Das virale Genom kodiert in einem offenen Leserahmen ein Polyprotein.	21
Abbildung 1.3:	Aufbau der Rezeptor-Monomere (oben) und Ausbildung eines Rezeptor-Dimers (unten).	25
Abbildung 1.4:	Liganden der ErbB Rezeptorfamilie.	26
Abbildung 1.5:	Vergleich der Aminosäuresequenz der Neureguline.	32
Abbildung 1.6:	Konservierte NRG1 Typ I Promotorsequenz bei verschiedenen Spezies.	37
Abbildung 1.7:	Potentieller Mechanismus einer positiven Rückkopplung des Neuregulin 1.	38
Abbildung 1.8:	Konservierte miRNA-Bindungsstellen innerhalb der 3'UTR des humanen ErbB3 Rezeptors.	40
Abbildung 1.9:	NS5A interagiert über ein PxxP-Motiv mit der SH3-Domäne verschiedener Src-Kinasen, jedoch nicht mit c-Src.	44
Abbildung 1.10:	Die Chimärisierung verschiedener Genotypen ermöglicht eine Optimierung des Infektionsmodells.	47
Abbildung 1.11:	Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen Pseudopartikeln (HCVpp), Replikon- und Infektionssystem (HCVcc).	49

2 Material und Methoden

Abbildung 2.1:	Fraktionierung der freien c-Src-SH3-Domäne und GST-Tag über eine Größenausschlusschromatographie.	74
----------------	---	----

3 Ergebnisse ErbB3

Abbildung 3.1:	HCV hemmt die Expression des Neuregulin-Rezeptors ErbB3 auf Protein- und Transkriptionsebene.	83
Abbildung 3.2:	Die Herabregulation des ErbB3 Rezeptors verläuft nicht über die miRNA hsa-mir-125.	85
Abbildung 3.3:	HCV hemmt die Expression des ErbB3 Rezeptors bereits auf Transkriptionsebene.	87
Abbildung 3.4:	HCV induziert die Expression von NRG1 und hemmt NRG1-abhängig die Expression von ErbB3.	89
Abbildung 3.5:	cAMP-Stimulation in Huh7 Zellen simuliert den regulatorischen Effekt des Liganden NRG1 auf den ErbB3 Rezeptor.	91
Abbildung 3.6:	Die Proteinkinase A ist nicht an der Herabregulation des ErbB3 Rezeptors beteiligt.	92
Abbildung 3.7:	HCV verändert die Expression der verschiedenen CREB-Isoformen.	94
Abbildung 3.8:	Das Hepatitis C Virus verändert die mRNA-Expression der Sheddasen nicht.	95
Abbildung 3.9:	Die Hochregulation des ErbB3-Liganden NRG1 durch das Hepatitis C Virus erfolgt auf transkriptioneller Ebene.	97
Abbildung 3.10:	Die Hochregulation des ErbB3-Liganden NRG1 erfolgt unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors Sp1.	98
Abbildung 3.11:	HCV verändert die Expression des EGF Rezeptors sowie die Oberflächenexpression des bevorzugten Dimerisierungspartners ErbB2.	100
Abbildung 3.12:	HCV modifiziert die Expression verschiedener Regulatoren, die an Expression und Abbau des EGF Rezeptors beteiligt sind.	101
Abbildung 3.13:	Die Expression des ErbB4 Rezeptors wird durch das Hepatitis C Virus fast vollständig supprimiert.	102

Abbildung 3.14:	Das Hepatitis C Virus greift in die Regulation weiterer Mitglieder der NRG-Familie ein.	103
Abbildung 3.15:	Die durch HRG1 β vermittelte Signaltransduktion bleibt durch die Herabregulation des ErbB3-Rezeptors in Folge einer vergleichweisen Hyperphosphorylierung unbeeinträchtigt.	104
Abbildung 3.16:	Die Oberflächenexpression des EGF Rezeptors ist verstärkt, wenn die Expression des ErbB3 Rezeptors reduziert ist.	105
Abbildung 3.17:	HCV induziert die Expression von NRG1 und CREB5.	106
Abbildung 3.18:	Vorstimulation mit HRG1 β bewirkt eine gesteigerte virale Replikation.	107
Abbildung 3.19:	Die basale Hochregulation des Chemokins CXCL8 wird nicht durch NRG1 vermittelt.	109

4 Ergebnisse NS5B

Abbildung 4.1:	Strukturanalyse der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B mittels PyMOL Software.	110
Abbildung 4.2:	Expressionskontrolle und Aufreinigung der NS5B-Mutagenesekonstrukte über Glutathion Sepharose 4B im Batchverfahren.	111
Abbildung 4.3:	Trunkierte Konstrukte der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B.	112
Abbildung 4.4:	Expressionskontrolle der synthetisch hergestellten NS5B-Konstrukte.	113
Abbildung 4.5:	Expressionskontrolle des Konstruktes GST-NS5B Motiv 1/2 (341-397).	114
Abbildung 4.6:	<i>Pulldown</i> der GST-NS5B-Konstrukte mit Huh9-13 Zelllysaten.	115
Abbildung 4.7:	<i>Pulldown</i> der GST-Src-SH3-Konstrukte mit Huh9-13 Zelllysaten.	117

Abbildung 4.8:	<i>Pulldown</i> von GST-c-Src mit überexprimierten 6xHis-NS5B-Trunkierungskonstrukten.	118
Abbildung 4.9:	Co-Immunopräzipitation von c-Src aus Huh7 Zelllysaten mit überexprimiertem 6xHis-NS5B Δ 21	119
Abbildung 4.10:	HSQC-Messung der freien c-Src-SH3 Domäne mit NS5B Motiv 1 oder Motiv 2 enthaltenden Peptiden.	121

5 Diskussion

Abbildung 5.1:	Schematische Darstellung der Herabregulation des ErbB3 Rezeptors und der Hochregulation seines Liganden NRG1.	129
Abbildung 5.2:	Potentielle Interaktionsmotive mit SH3-Domänen innerhalb der Aminosäuresequenz von NS5B.	133

Tabellenverzeichnis

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1:	Zelllinien	57
Tabelle 2.2:	Primer für die RT-PCR	62
Tabelle 2.3:	Intron-Exon-Primer für die RT-PCR	64
Tabelle 2.4:	Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion	65
Tabelle 2.5:	<i>Escherichia coli</i> - Klonierungsstämme	67
Tabelle 2.6:	Peptidsequenzen	75
Tabelle 2.7:	<i>Escherichia coli</i> - Expressionsstamm	76
Tabelle 2.8:	Plasmide	79

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
A.E.	Arbiträre Einheiten
Amp ^R	Ampicillin-resistent
AP	activator protein
APC	Allophycocyanin
ATF	<i>cyclic AMP-dependent transcription factor</i>
BACE	<i>β-site of amyloid precursor protein cleaving enzyme</i>
bp	Basenpaar/e
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cbl	<i>Casitas B-lineage Lymphoma</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLDN	Claudin
COP	<i>coat protein</i>
CRE	<i>cAMP-responsive element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CREBBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DAAD	<i>direct acting antiviral drugs</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ds	<i>double strand</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>

EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
Egr	<i>early growth response protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB	<i>avian erythroblastosis oncogene B</i>
Erk	<i>extracellular-regulated protein kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
GAB	<i>Grb2-associated binding protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Grb	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HB	<i>Heparin-binding</i>
HBV	Hepatitis B
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	<i>cell culture derived HCV</i>
HCVpp	HCV Pseudopartikel
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
His	Histidin
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRG	Heregulin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hsa	<i>homo sapiens</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
Huh	Humane Hepatomazellen
HVR	hypervariable Region
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin

Ig	Immunglobulin
IKK	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JFH	<i>japanese fulminant hepatitis</i>
JNK	<i>c-JUN N-terminal protein kinase</i>
kD	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LRIG	<i>leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
miRNA	microRNA
mir	microRNA (in der microRNA-Nomenklatur)
MKK	<i>dual specificity mitogen-activated protein kinase kinases</i>
MOI	<i>multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSK	<i>mitogen- and stress-activated protein kinase</i>
mTLP	modifizierter Triton-Lyse-Puffer
MW	Molekulargewicht
myrPKI	myristoylierter Proteinkinase A Inhibitor
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NRG	Neuregulin
NS	nicht strukturell
NTP	Nukleosidtriphosphat
OCLN	Occludin
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>

PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRKAC	katalytische Untereinheit der Proteinkinase A
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>realtime PCR</i>
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH	<i>Src homology</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain-containing</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
Sp	<i>specificity protein</i>
SP	Signalpeptidasen
SPP	Signalpeptidpeptidasen
SR-BI	<i>scavenger receptor B1</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TACE	<i>tumor necrosis factor – alpha converting enzyme</i>

TCID ₅₀	<i>tissue culture infection dose</i>
TC-PTP	<i>T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLP	<i>Triton-Lyse-Puffer</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TORC	<i>transducer of regulated CREB activity</i>
Tris	<i>Trishydroxy-Aminomethan</i>
USP	<i>Ubiquitin-specific protease</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VAP	<i>vesicle-associated membrane protein-associated protein</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
w/o	<i>without</i>

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

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist eine der führenden Ursachen für chronische Lebererkrankungen. Weltweit sind nach Angaben der *World Health Organisation* (WHO) etwa 150 Millionen Menschen infiziert. Bei mehr als 70% aller Infizierten bildet sich unter anhaltender Virusreplikation eine chronische Infektion mit einem über Jahrzehnte andauernden Krankheitsverlauf. Jährlich kommen 3-4 Millionen Neuinfektionen hinzu und 350.000 Menschen sterben an Lebererkrankungen, die in direktem Zusammenhang mit einer HCV-Infektion stehen [1]. Etwa 5-20% aller Infizierten entwickeln eine Leberzirrhose und 1-5% aller HCV-Patienten sterben an dieser oder an hepatozellulären Karzinomen. 25% aller Fälle von Leberkrebs treten im Rahmen einer HCV-Infektion auf.

Im Jahre 1989 wurde das zuvor als Erreger der Non A-Non B Hepatitis deklarierte Virus als Hepatitis C Virus (HCV) identifiziert [2, 3]. Es gehört zur Familie der *Flaviviridae*. Namensgebend für diese Familie ist das Gelbfieber-Virus (lat. *flavus* = gelb). Neben dem *Hepacivirus* Hepatitis C gehören auch andere Flaviviren (Gelbfieber, FSME) und Pestiviren zu dieser Familie einzelsträngiger RNA-Viren. Das Hepatitis C Virus kann in 7 Genotypen unterteilt werden [4], wobei sich die Nukleotidsequenz der Genotypen um bis zu 33% voneinander unterscheidet [5] und die geographische Verteilung der Genotypen variiert. In Europa sind vor allem die Genotypen 1-3 vertreten [6]. Insbesondere die Genotypen 1 und 4 sind schlecht therapierbar, wobei die Entwicklung sogenannter *direct acting antiviral drugs* (DAAD) in den letzten Jahren verglichen mit der Standardtherapie unter pegyliertem Interferon alpha und Ribavirin die Heilungschancen verbessert hat. Die DAAD hemmen virusspezifische Enzyme, insbesondere die NS3/4A-Protease, NS5A und die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B, so dass die Virusreplikation zum Erliegen kommt.

Der Verlauf einer Hepatitis C Infektion ist schleichend, häufig treten über Jahrzehnte keinerlei oder nur unspezifische Symptome auf, so dass die Erkrankung oft erst spät durch die dann bereits massiven Schädigungen erkannt wird. Dies legt nahe, dass HCV im Laufe der Koevolution mit dem menschlichen Wirt Mechanismen entwickelt hat, um dessen Immunantwort zu umgehen, Entzündungsreaktionen zu manipulieren

und die Infrastruktur der Wirtszelle für seinen Lebenszyklus zu nutzen, ohne die Zelle dabei massiv in ihrer Viabilität zu beeinflussen. Dennoch kommt es im Laufe von Jahrzehnten durch die chronische Entzündung zu massiven Schäden des Lebergewebes (Leberzirrhose) und damit zu dessen funktionaler Beeinträchtigung. Diese Schädigung wird insbesondere durch die kontinuierliche Immunantwort des Wirts verursacht, die zur Viruselimination jedoch nicht ausreicht. Hinzu kommen jedoch auch direkte Schädigungen durch die Expression viraler Proteine sowie oxidativen Stress [7].

1.1.1 Der virale Zelleintritt

Der virale Eintritt des Hepatitis C Virus in den Hepatozyten ist ein dreistufiger Prozess bestehend aus Bindung an die Zelloberfläche, Internalisierung und Freisetzung ins Zytosol (Abb. 1.1).

Die Hepatitis C Viren liegen im Blut zunächst als sogenannte lipovirale Partikel, also an Lipoproteine wie LDL und VLDL assoziiert, vor [8]. Als initiale Anhaftungsfaktoren für die viruseigenen Glykoproteine dienen Glykosaminoglykane oder der LDL-Rezeptor auf der Hepatozytenoberfläche [9, 10]. Die Internalisierung erfolgt über einen rezeptorvermittelten, endozytotischen Prozess, an dessen Verlauf unter anderem die Oberflächenmoleküle *cluster of differentiation 81* (CD81) und *scavenger receptor B1* (SR-B1) sowie die *tight junction* Proteine Claudin-1 (CLDN) und Occludin (OCLN) beteiligt sind [10]. Im Anschluss an die Endozytose kommt es zu einer pH-abhängigen Fusion der viralen Membran mit der nun endosomalen Membran und der anschließenden Freisetzung des Nukleokapsids ins Zytosol [11]. Die viruseigenen Glykoproteine E1 und E2 spielen eine wichtige Rolle für den Eintritt des Virus in den Hepatozyten. Sie benötigen für ihre Bindung an die Wirtszelloberfläche leberspezifisches hochsulfatiertes Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) [12]. Da sich Heparansulfate je nach Gewebe, Zelltyp und zellulärem Entwicklungsstadium voneinander unterscheiden, könnte in dieser Spezifität eine Ursache für die Hepatotropie des Hepatitis C Virus liegen [13].

Der *scavenger receptor B1* dient unter physiologischen Bedingungen vor allem dem reversen Cholesterintransport und wird hauptsächlich in der Leber exprimiert [13]. Er bindet HDL aus dem Blut mit hoher Affinität, internalisiert es über eine Clathrin-

unabhängige Endozytose und vermittelt so die Cholesterinaufnahme in die Hepatozyten [14]. Im Falle einer Hepatitis C Infektion vermittelt SR-BI die Bindung an Viruspartikel, welche im Blut an Lipoproteine gekoppelt vorliegen. Dies geschieht E2-unabhängig unter Beteiligung von Apolipoprotein E, einem vom Wirt im Rahmen des viralen Zusammenbaus erworbenen und auf der Oberfläche der Viruspartikel befindlichen SR-BI-Liganden [15, 16]. Zu einem späteren Zeitpunkt des Eintritts interagiert SR-BI mit der hypervariablen Region I (HVR1) des Glykoproteins E2 [15]. Ein weiterer Rezeptor, welcher unter physiologischen Bedingungen am Fettstoffwechsel beteiligt ist und eine Rolle beim Eintritt des Hepatitis C Virus in die Wirtszelle spielt, ist der *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1) Cholesterinaufnahme-Rezeptor [17].

E2 interagiert zudem direkt mit dem zur Familie der Tetraspanine gehörenden Protein CD81 [18], welches auf der Oberfläche von Hepatozyten sowie T- und B-Lymphozyten exprimiert wird [13]. CD81 spielt erst als Post-Bindungsfaktor nach der initialen Interaktion des Virus mit der Wirtszelloberfläche eine Rolle [19], indem es eine Relokalisation des Virus zum *tight junction* Protein CLDN1 bewirkt [9]. CD81 ist aufgrund seines Vorkommens auf der Oberfläche immunkompetenter Zellen möglicherweise an der Modulation der adaptiven Immunantwort des Wirts beteiligt, wodurch die Chronifizierung der Infektion ermöglicht wird [13]. Eine direkte Interaktion zwischen CLDN1 und Hüll-Glykoproteinen findet nicht statt [20], sondern eine Komplexbildung zwischen CD81 und CLDN1.

Der EGF Rezeptor sowie der Ephrin Rezeptor A2 dienen aufgrund ihrer Tyrosinkinase-Aktivität als Kofaktoren für den viralen Eintritt, indem sie regulatorischen Einfluss auf den intrazellulären Transport von CD81, CLDN1 oder beiden Proteinen sowie deren Transport an die Zelloberfläche nehmen und damit auf die Komplexbildung zwischen CD81 und CLDN1 sowie die Glykoprotein-abhängige Membranfusion des Virus. Eine Liganden-vermittelte Aktivierung des EGF Rezeptors bewirkt eine Verstärkung des Viruseintritts, ist jedoch keine Voraussetzung hierfür [10, 21].

Die Lokalisierung von CLDN1 und OCLN in den *tight junctions* ist Voraussetzung für den viralen Eintritt. Beide *tight junction* Proteine sind offenbar an späten Schritten des viralen Eintritts beteiligt, wie z.B. der HCV Glykoprotein-abhängigen Zellfusion. Zur Verhinderung der Infektion einer bereits infizierten Zelle, also einer sogenannten Superinfektion, reguliert HCV die CLDN1 wie auch die OCLN Expression herab.

Diese Herabregulation hat einen entscheidenden Einfluss auf die Polarität der Hepatozyten und dadurch bedingt auf das gerichtete *trafficking* vieler Proteine und die Gallensekretion. Des Weiteren kommt es hierdurch zu morphologischen Veränderungen am Hepatozyten in dessen Folge Symptome wie z.B. cholestatische Funktionsstörungen aufgrund einer veränderten Expression spezifischer hepatozellulärer Transportproteine und damit verbundener Reduktion des Gallensäureflusses auftreten [9, 22].

Ebenfalls eine Rolle beim viralen Eintritt spielen auch der Botenstoff cAMP sowie die Proteinkinase A. Eine HCV Infektion erhöht den cAMP-Spiegel und verstärkt die Aktivierung von Substraten der Proteinkinase A. Die Lokalisierung von CLDN1 auf der Plasmamembran und die damit verbundene Fähigkeit zur Komplexbildung mit CD81 ist PKA-abhängig und essentiell für den viralen Eintritt. HCV aktiviert die Proteinkinase A auf einem cAMP-abhängigen Weg und erhöht somit die Infektiosität freier Viren sowie die virale Transmission [23].

Der CD81-CLDN1-Komplex wird über einen Clathrin- und Dynamin-abhängigen Prozess endozytiert, das Virus gelangt auf diesem Weg ins Innere der Zelle [24, 25]. Dort angelangt kommt es zur pH-abhängigen Fusion des Virus in frühe Endosomen, wobei eine Beteiligung der viralen Glykoproteine E1 und E2 aufgrund ihrer potentiellen Fusionsdomänen angenommen wird [26]. Ein Eintritt des Virus in benachbarte Zellen kann ebenfalls über direkte Zell-Zell-Transmission erfolgen [27].

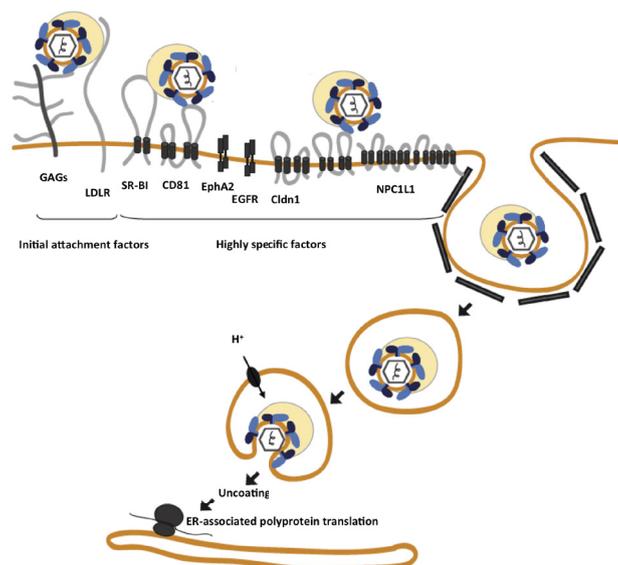


Abbildung 1.1: Eintritt des Hepatitis C Virus in die Wirtszelle. Der virale Eintritt in die Zelle verläuft dreistufig. Zunächst bindet das Virus an die Oberfläche der Wirtszelle und wird dann unter Beteiligung der Oberflächenrezeptoren CD81 und SR-BI sowie den *Tight junction* Proteinen CLDN1 und OCLN internalisiert. Schließlich wird das Nukleokapsid in einem pH-abhängigen Fusionsprozess ins Zytosol freigesetzt (modifiziert nach Yang *et al.*, 2008).

1.1.2 Die Virusproteine

Das Hepatitis C Virus besitzt ein einzelsträngiges RNA Genom positiver Polarität mit einer Größe von etwa 9,5 kb. Es kodiert einen einzigen offenen Leserahmen (ORF), der am 3'- wie auch am 5'-Ende von nicht-kodierenden Regionen (NTRs) flankiert wird. Am 5'-Ende der viralen mRNA befindet sich eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), welche die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermittelt und so die Translation initiiert. Im Anschluss an die Translation wird das Polyprotein durch wirtsspezifische Proteasen im Bereich der Strukturproteine sowie durch die viruskodierte NS3/4A Protease im Bereich der Nicht-Strukturproteine prozessiert [28]. Die Strukturproteine Core bis E2 bilden die Virushülle, während die Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B eine Rolle bei der viralen Replikation spielen.

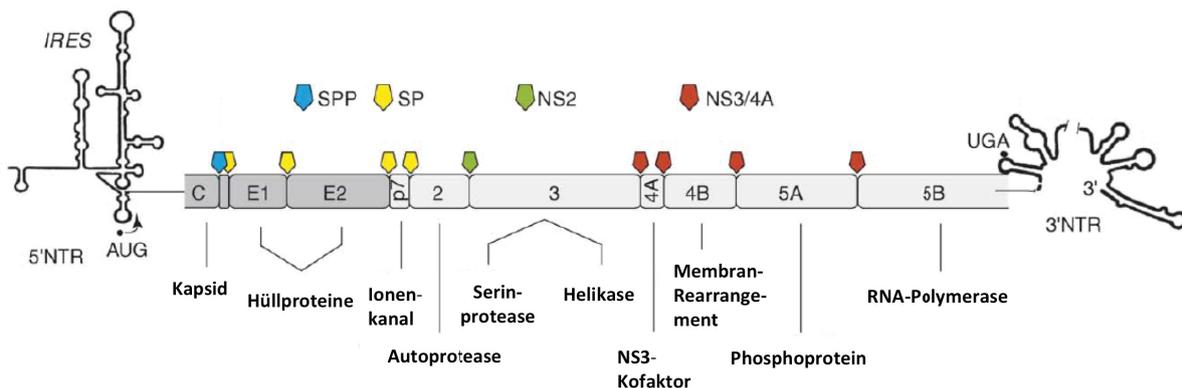


Abbildung 1.2: Das virale Genom kodiert in einem offenen Leserahmen ein Polyprotein. Die posttranslationale Prozessierung erfolgt durch Signalpeptidasen (SP) und Signalpeptidpeptidasen (SPP) im Bereich der Strukturproteine, Core bis p7, sowie durch die Serinprotease-Aktivität des Nicht-Strukturprotein-Komplexes NS3/4A im Bereich der sechs Nicht-Strukturproteine, NS3 bis NS5B. NS2 schneidet das Polyprotein im Bereich zwischen Struktur- und Nicht-Struktur-Proteinen. Abkürzungen: IRES: *internal ribosome binding site*; NTR: *nontranslated region*; RdRp: *RNA-dependent RNA-polymerase* (modifiziert nach Bartenschlager, 2006).

Das **Core** Protein ist das erste Strukturprotein des Hepatitis C Virus und bildet das virale Nukleokapsid [28]. Die Funktion der Hüllproteine **E1** und **E2** liegt in ihrem Beitrag zum viralen Eintritt (siehe 1.1.1). Das Nicht-Strukturprotein **NS3** trägt N-terminal eine Protease Domäne vom Serin-Typ und C-terminal eine RNA Helikase/NTPase Domäne. NS3 liegt in Assoziation mit **NS4A** vor, welches als Kofaktor die Protease-Aktivität von NS3 unterstützt. Der Membrananker von NS4A bewirkt eine Lokalisierung des Komplexes am Endoplasmatischen Retikulum, wo die

Spaltung der Nicht-Strukturproteine NS4B bis NS5B stattfindet. Die Aktivität der NS3/4A Protease ist somit ebenfalls für die Ausbildung des Replikationskomplexes entscheidend [28]. **NS5A** ist ein Phosphoprotein, welches in zwei verschiedenen Phosphorylierungsvarianten vorliegt: eine basal (hypo-) phosphorylierte Form (p56), welche für die Replikation von Bedeutung ist, sowie eine hyperphosphorylierte Form (p58), die beim *viral assembly* eine Rolle spielt [29]. Aufgrund seiner Fähigkeit zur RNA-Bindung ist NS5A für die virale Replikation essentiell [30]. Über einen Membrananker ist das Protein mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert und interagiert mit der ebenfalls membrangebundenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase **NS5B**, dem wichtigsten Enzym der viralen Replikation [28, 31].

1.1.3 Die virale Replikation

Alle viralen Nicht-Strukturproteine sind direkt oder indirekt, wie zum Beispiel der Kofaktor NS4A über NS3, an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gebunden. Hier finden sowohl Genomreplikation als auch Translation sowie posttranslationale Modifikation des Polyproteins statt [32]. Nach der Freisetzung der viralen RNA ins Zytoplasma wird diese über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) an die Ribosomen des rauen ER gebunden, ohne dass weitere Initiationsfaktoren benötigt werden [32].

NS4B bewirkt durch seine GTPase-Aktivität massive Membranveränderungen und damit die Entstehung des sogenannten membranösen Netzwerkes, zu dessen Bestandteilen unter anderem das raue ER, späte Endosomen, *coat protein* (COP) Vesikel, Mitochondrien und *lipid droplets* gehören. Den Hauptbestandteil machen jedoch Einzel- und Doppelmembranvesikel aus [33, 34]. Diese intrazellulären Membranen schützen die Proteine des Replikationskomplexes zum Beispiel vor Degradation [32]. Eine Veränderung des Lipidgehalts der Zelle kann einen Einfluss auf die Membranintegrität haben und so die Replikation des Hepatitis C Virus negativ beeinflussen. So ist zum Beispiel die physiologische Funktion des LDL Rezeptors für die virale Replikation von Bedeutung, da dieser starken Einfluss auf die Lipidzusammensetzung der Wirtszelle hat [35].

NS3 besitzt Helikase-Aktivität und ist aktiv an der viralen Genomreplikation beteiligt [31]. NS5A existiert in zwei verschiedenen Phosphorylierungsvarianten, die nach

ihrem Molekulargewicht unterschieden werden können. Die basale Form wird als p56 und die hyperphosphorylierte Form als p58 bezeichnet. Die hyperphosphorylierte Form von NS5A übt einen inhibitorischen Einfluss auf die Replikation aus, wenn sie diese auch nicht vollständig unterbindet. Zellkultursysteme enthalten aus diesem Grund adaptive Mutationen im Bereich des Phosphoproteins NS5A, die die Hyperphosphorylierung verhindern und so die Replikation deutlich verbessern. Die Bildung infektiöser Partikel wird bedingt durch die Beeinflussung der Interaktion von NS5A mit dem viralen Core Protein verhindert [36]. Dies erklärt, warum Vollängenreplikon-Zelllinien zur Replikation, jedoch nicht zur Freisetzung viraler Partikel befähigt sind. NS5A kann damit eine regulatorische Funktion für die virale Replikation wie auch die Zusammensetzung des Virus zugeschrieben werden [29].

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B amplifiziert die RNA unter Beteiligung weiterer viraler Strukturproteine sowie Wirtszellfaktoren [32]. Die hohe genetische Variabilität des Hepatitis C Virus ist bedingt durch die fehlende *proofreading* Funktion von NS5B [37]. Die Replikation verläuft semikonservativ und asymmetrisch. Der positive RNA-Strang wird in einen negativen Strang umgeschrieben, welcher dann für die Bildung positiver RNA-Stränge als Matrize dient. Die entstehende RNA dient als mRNA für die Translation, als Matrize für die Replikation sowie für die Bildung neuer, infektiöser Viren (*viral assembly*) [32]. Neben den viralen Nicht-Strukturproteinen sind auch Wirtsfaktoren wie z.B. VAP A und B, hEF 4AII, die zelluläre RNA Helikase p68 und α -Actinin an der Bildung des Replikationskomplexes beteiligt [37].

Die Degradation der *T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase* (TC-PTP) durch die virale NS3/4A Protease bedingt eine verstärkte Aktivierung des EGF Rezeptors und dadurch vermittelt eine gesteigerte basale Aktivität der Serin-/Threoninkinase Akt, was wiederum für die virale Replikation von großer Bedeutung ist [38].

Ein weiteres Enzym der Wirtszelle, welches an der Replikation beteiligt ist, ist die Tyrosinkinase c-Src. Sie interagiert über ihre SH2-Domäne mit NS5A und über ihre SH3-Domäne mit NS5B. Dadurch vermittelt c-Src die Interaktion zwischen NS5A und NS5B, die wiederum für die Entstehung des Replikationskomplexes entscheidend ist [39].

1.2 Die EGF Rezeptor Familie

Die *epidermal growth factor* (EGF) Rezeptor Familie gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen und besteht aus vier Mitgliedern: EGFR (auch ErbB1/HER1), ErbB2 (Neu/HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Die Rezeptoren bestehen aus einer großen, extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, auch Ektodomäne genannt, welche wiederum aus vier Subdomänen (I-IV) aufgebaut ist, einer alpha-helikalen transmembranären Domäne, sowie einer kleinen intrazellulären Juxtamembran-domäne, einer Kinasedomäne und einem C-Terminus, dessen Phosphotyrosinreste als Bindungsstellen für zahlreiche Effektormoleküle fungieren [40].

Die extrazellulären Subdomänen werden weiter unterteilt in die Leucin-reichen Domänen L1 und L2, die der Ligandenbindung dienen und die Lamin-ähnlichen, Cystein-reichen Domänen CR1 und CR2 [40]. Zwei der vier Familienmitglieder unterscheiden sich in ihrem Aufbau von den übrigen und sind nicht autonom: ErbB2 besitzt keine Ligandenbindungsstelle, ErbB3 hat keine Tyrosinkinaseaktivität, so dass diese Rezeptoren nur zur Ausbildung von Heterodimeren befähigt sind.

Ebenso wie die Rezeptoren sind auch die Liganden der ErbB Rezeptoren glykosylierte Transmembranproteine [40]. Die Ektodomänen der Liganden werden jedoch durch extrazelluläre Proteasen wie z.B. die Metalloproteinase ADAM17 in einem als *ectodomain shedding* bezeichneten Prozess von der Zelloberfläche abgetrennt und so als ausgereifte Effektormoleküle freigesetzt [41]. Insgesamt sind zur Zeit 13 extrazelluläre Liganden beschrieben, die alle eine konservierte EGF-ähnliche Domäne enthalten, welche aus sechs Cysteinresten besteht. Neben der EGF-ähnlichen Domäne, welche spezifische Interaktionen ermöglicht, haben die Liganden zusätzlich potentielle Interaktionsdomänen geringerer Affinität, dafür aber auch geringerer Spezifität. Dies ermöglicht die Rekrutierung unterschiedlicher Dimerisierungspartner [42].

Zur Erlangung ihrer Funktionalität bilden die Rezeptoren Homo- bzw. Heterodimere. ErbB2-haltige Heterodimere sind trotz der fehlenden Ligandenbindungsstelle des Rezeptors bevorzugt, da sie potente Signalübertragung ermöglichen. Besonders Homodimere weisen eine deutlich verminderte Potenz zur Signalübertragung auf, wobei zu berücksichtigen ist, dass gerade die Unterschiede zwischen den

unterschiedlichen Hetero- und Homodimeren eine Feinabstimmung der Signalübertragung ermöglichen [42].

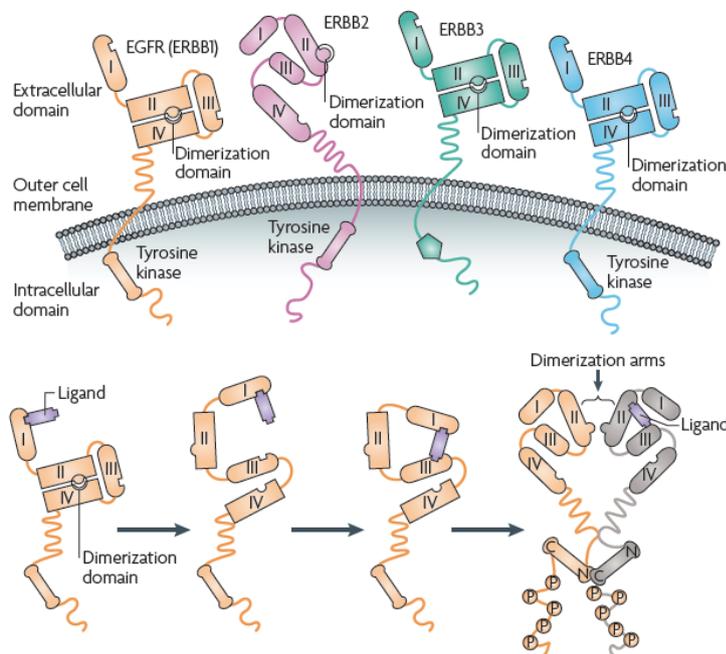


Abbildung 1.3: Aufbau der Rezeptor-Monomere (oben) und Ausbildung eines Rezeptor-Dimers (unten). Oberer Teil der Abbildung: Alle Rezeptoren der ErbB Familie bestehen aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne. Extrazellulär findet sich mit Ausnahme des ErbB2 Rezeptors die Ligandenbindungsstelle, intrazellulär die Kinasedomäne. Der ErbB3 Rezeptor bildet hier die Ausnahme, da er keine Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Unterer Teil der Abbildung: Die Bindung eines Liganden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Bildung von Homo- (im Falle von EGFR und ErbB4) oder Heterodimeren ermöglicht wird. Erst in der dimerisierten Form können die Rezeptoren ihre Funktion entfalten (nach *Baselga and Swain*, 2009).

Die Rezeptoren liegen auch im unstimulierten Zustand teilweise predimerisiert bzw. preoligomerisiert vor [43]. Die Überexpression einzelner Rezeptoren verändert aufgrund der Verschiebung des Heterodimerisierungsmusters die Signalübertragung in der Zelle.

Hepatozyten sind die Zellen, die vergleichsweise die höchste ErbB-Rezeptordichte aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass die EGF Rezeptor Familie für die normale Leberfunktion von Bedeutung ist. Überexpression oder Hyperaktivierung der ErbB Rezeptoren 1, 2 und 3 stehen häufig im Zusammenhang mit Krebserkrankungen und verschlechtern deren Prognose [44].

Liganden der EGF Rezeptor Familie werden in zahlreichen Geweben, unter anderem der Leber produziert. *Transforming growth factor alpha* ($TGF\alpha$), EGF und

Amphiregulin binden ausschließlich an EGFR, die Neureguline nur ErbB3 und ErbB4. Betacellulin und *heparin-binding*-EGF (HB-EGF) hingegen binden an EGFR und ErbB4, Epiregulin an EGFR, ErbB3 und ErbB4 [45].

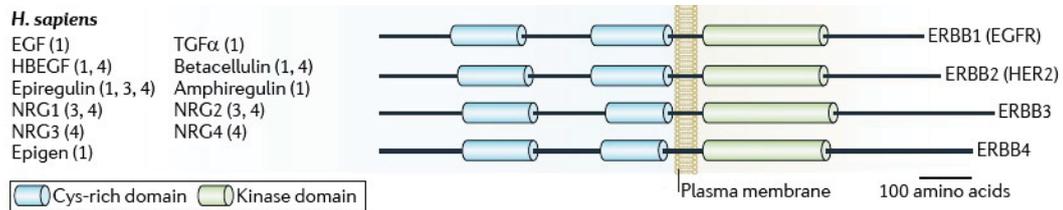


Abbildung 1.4: Liganden der ErbB Rezeptorfamilie. Der klassische Ligand des EGF Rezeptors ist der namensgebende *epidermal growth factor* (EGF), weitere Liganden sind unter anderem HB-EGF, Betacellulin und Amphiregulin. Typische Liganden für den ErbB3 und ErbB4 Rezeptor sind die Neureguline (nach Avraham and Yarden, 2011).

Zwei Signalwege sind im Zusammenhang mit der EGF Rezeptor Familie von besonderer Bedeutung: der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg, dessen Aktivierung proliferationsfördernd wirkt und Einfluss auf Migration, Differenzierung und Angiogenese hat, sowie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg, welcher antiapoptotische Wirkung hat und somit zum Überleben der Zelle beiträgt [46].

Durch seine neun C-terminalen Tyrosinreste vermag der **EGF Rezeptor (ErbB1)** die Rekrutierung einer Vielzahl von Signaltransduktoren zu bewirken. Ein prominentes Beispiel ist die Interaktion des Rezeptors mit *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) und *Src homology 2 domain-containing* (Shc), welche Ras-vermittelt die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Kaskade aktiviert [40]. Über die Aktivierung des Ras-MAPK Signalwegs wird dann ebenfalls der Ras-PI3K-Akt/Proteinkinase B Signalweg aktiviert [40].

Die Liganden-vermittelte Aktivierung des EGF Rezeptors bewirkt außerdem die Bildung von Negativregulatoren, zum Beispiel des *suppressor of cytokine signaling 5* (SOCS5). Letzteres wurde unter anderem als Negativregulator von Rezeptor-Tyrosinkinase beschrieben und enthält eine *Src homology 2* (SH2) Domäne [47], über die SOCS5 an EGFR binden kann. Zusätzlich interagiert SOCS5 über eine sogenannte *SOCS Box* mit dem *ElonginBC* Protein Komplex. Dadurch wird die E3 Ubiquitin Ligase Cbl rekrutiert, welche an den EGF Rezeptor bindet und ihn für den Abbau durch das 26S Proteasom vorbereitet [40, 47].

Ebenfalls an der EGFR-Homöostase beteiligt sind *leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1* (LRIG1) und Sprouty2. LRIG1 wird nach Stimulation des EGF Rezeptors durch einen Liganden verstärkt exprimiert und bewirkt eine gesteigerte Ubiquitinierung und Degradation des EGF Rezeptors. Der Prozess ist c-Cbl abhängig. LRIG1 ist also ein Negativregulator [48]. LRIG1 bewirkt auf dem gleichen Wege eine Reduktion der Rezeptordichte der übrigen ErbB Rezeptoren [49]. Sprouty2 wird durch Aktivierung des EGF Rezeptors an einem konservierten Tyrosin-Rest phosphoryliert und rekrutiert in seiner aktiven Form c-Cbl über die Interaktion mit deren SH2-Domäne. c-Cbl bewirkt eine Polyubiquitinierung von Sprouty2 und vermittelt dadurch dessen Abbau. Die EGFR-vermittelte Aktivierung von Sprouty2 bewirkt so eine Reduktion des c-Cbl-vermittelten EGFR Abbaus. Es handelt sich also um einen c-Cbl Antagonisten, der einen positiven *feedback loop* bewirkt [50].

Der **ErbB2** Rezeptor hat keine Ligandenbindungsstelle, ist jedoch der bevorzugte Heterodimerisierungspartner für die übrigen Mitglieder der EGF Rezeptor Familie. Die basale Tyrosinkinaseaktivität des ErbB2 Rezeptors ist verglichen mit EGFR und ErbB4 deutlich erhöht. Der bevorzugte Dimerisierungspartner von ErbB2 ist ErbB3 [51]. Die extrazelluläre Rezeptordomäne des ErbB2 Rezeptors erinnert strukturell an die ligandengebundene Domäne des EGF Rezeptors, da eine starke Interaktion zwischen Domäne L1 und L2 stattfindet, was auch der Grund dafür ist, dass ErbB2 keine Liganden binden kann. ErbB2 steht also jederzeit für die Interaktion mit Liganden-gebundenen ErbB Rezeptoren zur Verfügung [40]. ErbB2 vermag deutlich mehr Proteine an seine intrazellulären Phosphotyrosinreste zu binden als alle übrigen Familienmitglieder [52]. Weitere Eigenschaften dieses Rezeptors sind die höhere Affinität sowie größere Spezifität, mit der ErbB2-Heterodimere Liganden binden und die verlangsamte Dissoziation dieser Wachstumsfaktoren. Weiterhin werden ErbB2-Heterodimere langsamer endozytiert und schneller an die Oberfläche zurück transportiert (*recycled*). Dies bewirkt eine verlängerte Aktivierung zahlreicher Signalwege. Der Abbau des ErbB2 Rezeptors erfolgt durch das 26S Proteasom, allerdings schützt das Chaperon *heat shock protein 90* (HSP90) gemeinsam mit dem HSP90 Co-Chaperon Cdc37 den Rezeptor durch Komplexierung vor Degradation und stabilisiert ihn in der Membran. Durch die Komplexbildung wird jedoch gleichzeitig die Fähigkeit zur Heterodimerisierung und damit auch die katalytische Funktion des ErbB2 Rezeptors reduziert [40].

Das humane *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3* Gen kodiert den Rezeptor **ErbB3**, welcher als einziger Rezeptor der EGF Rezeptor Familie über keine Tyrosinkinase-Aktivität verfügt und somit nur in heterodimerisiertem Zustand Funktionalität erlangt.

Typische Liganden des ErbB3 Rezeptors sind die verschiedenen Neureguline, insbesondere das Neuregulin 1 (NRG1, Heregulin), sowie Epiregulin [53]. ErbB3 wie auch ErbB4 binden die verschiedenen Neureguline mit unterschiedlicher Affinität. ErbB2 kann die Affinität von ErbB3 für Neureguline drastisch erhöhen, indem es die Liganden-dissoziation vom Rezeptor verlangsamt und ist der bevorzugte Dimerisierungspartner von ErbB3 [54]. ErbB3-haltige Heterodimere sind insbesondere an der Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signalwegs beteiligt und spielen zudem für die Shc-Aktivierung eine Rolle. Eine Interaktion des ErbB3 Rezeptors mit Grb2 findet im Gegensatz zum EGF Rezeptor nicht statt [40].

ErbB3 wird im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktorrezeptoren nicht durch Liganden-vermittelte Internalisierung von der Zelloberfläche entfernt und im Lysosom abgebaut, sondern hauptsächlich durch Rezyklisierung zurück an die Zelloberfläche gebracht. Die Ursache hierfür ist im Bereich des C-Terminus des ErbB3 Rezeptors zu finden. *Waterman et al.* konnten nachweisen, dass ein Austausch des C-Terminus des EGF Rezeptors gegen die entsprechende Domäne des ErbB3 Rezeptors die Endozytose des EGF Rezeptors reduziert. Mittels Immunpräzipitation konnten sie des Weiteren belegen, dass die Ursache hierfür darin liegt, dass der C-Terminus des ErbB3 Rezeptors nicht zur c-Cbl Rekrutierung befähigt ist [54]. Die E3 Ubiquitin Ligase Nrdp1 vermittelt den Abbau des ErbB3 Rezeptors und sorgt so für ein Fließgleichgewicht des Rezeptors auf der Zelloberfläche. Die Stimulation des ErbB3 Rezeptors mit NRG1 bewirkt eine Stabilisierung von *Ubiquitin-specific protease 8* (USP8), einem De-Ubiquitinierungsenzym, welches seinerseits Nrdp1 stabilisiert. Die katalytische Aktivität von USP8 ist hierbei für die NRG1-vermittelte Nrdp1 Stabilisierung entscheidend. Als möglicher Signalweg für die USP8 Stabilisierung wird der Akt Signalweg und eine durch Akt vermittelte Phosphorylierung von USP8 am Threoninrest 907 angenommen. Daraus ergibt sich ein NRG1-vermittelter Abbau des ErbB3-Rezeptors auf Proteinebene unter Beteiligung von USP8 und Nrdp1 [55].

Das humane *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4* Gen kodiert den **ErbB4** Rezeptor, wobei durch alternatives Spleißen der prä-mRNA

verschiedene ErbB4-Isoformen entstehen. Die Rolle des ErbB4 Rezeptors ist noch nicht so detailliert aufgeklärt wie die der übrigen Mitglieder der EGF Rezeptor Familie. Nach derzeitiger Kenntnis scheint die ErbB4 Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion eher einen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum zu haben, während die anderen Mitglieder der ErbB Familie proliferationsfördernde Eigenschaften aufweisen [46].

ErbB4 weist, trotz der infolge der Aktivierung vermittelten unterschiedlichen proliferativen Eigenschaften, in Bezug auf Liganden und aktivierte Signalkaskaden eine große Ähnlichkeit mit dem EGF Rezeptor auf. So binden die Liganden Betacellulin, HB-EGF, Epiregulin und Epigen sowohl ErbB1 als auch ErbB4, wobei jedoch auch Neureguline eine Aktivierung von ErbB4 vermitteln. ErbB4 rekrutiert ebenso wie EGFR Grb2, Shc und *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5). Eine Isoform des Rezeptors vermag außerdem den PI3K-Signalweg zu aktivieren [40]. Im Gegensatz zu EGFR rekrutiert ErbB4 c-Cbl jedoch nicht auf direktem Wege und wird dadurch langsamer abgebaut [40]. Die Aktivierung der Proteinkinase C führt zur proteolytischen Spaltung des ErbB4 Rezeptors, wobei ein extrazelluläres Fragment mit einer Masse von etwa 120 kD sowie ein intrazelluläres 80 kD schweres Fragment entstehen. Die Proteinkinase C hat also einen regulatorischen Einfluss auf die Signalübermittlung des Neuregulins, indem sie die proteolytische Spaltung des ErbB4 Rezeptors vermittelt. Auf den Abbau der übrigen Mitglieder der EGF Rezeptor Familie hat die Aktivierung der Proteinkinase C keinen Einfluss [56]. Eine direkte Stimulation des ErbB4 Rezeptors mit Heregulin bewirkt ebenfalls eine verstärkte proteolytische Spaltung des Rezeptors, im Falle der Ektodomänen-Abspaltung wird eine Beteiligung der Metalloproteinase *A disintegrin and metalloproteinase 17* (ADAM17) angenommen [57]. Die zytoplasmatische Domäne von ErbB4 wird durch γ -Sekretasen proteolytisch gespalten und dient möglicherweise nach Translokation in den Kern als Aktivator der Transkription des humanen *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4* Gens [58].

Die EGF Rezeptor Familie aktiviert auf verschiedenen Wegen den PI3K-Signalweg. Während EGFR und ErbB2 die PI3K über die Adapterproteine *Grb2 und Grb2-associated binding protein 1* (GAB1) aktivieren, haben ErbB3 und ErbB4 Bindungsstellen für die p85 Untereinheit der PI3 Kinase [46].

Auch ohne Aktivierung unterliegen die Rezeptoren einem ständigen Zyklus aus

langsamer Internalisierung in endosomale Kompartimente und schnellem Rücktransport auf die Oberfläche der Plasmamembran. EGFR durchläuft diesen Zyklus langsamer als die übrigen Mitglieder der ErbB Rezeptorfamilie, verändert jedoch als einziger Rezeptor Liganden-abhängig seinen Internalisierungsprozess. Unter Beteiligung von Grb2 kommt es zu einer um den Faktor 5-10 beschleunigten Endozytose. Dies bedingt auch die Tatsache, dass die EGFR-vermittelte Signaltransduktion hauptsächlich vom Endosom ausgeht, während die Signalübertragung der übrigen ErbB Rezeptoren hauptsächlich an der Oberfläche der Zelle ihren Ursprung findet [59]. Die Ursache für die durch Ligandenbindung unbeeinflusste Internalisierung der übrigen Rezeptoren liegt vermutlich darin, dass keine spezifischen Internalisierungssequenzen in den zytoplasmatischen Domänen vorhanden sind. Die Überexpression einzelner Rezeptoren verändert aufgrund der Verschiebung des Heterodimerisierungsmusters die Signaltransduktion in der Zelle [59].

1.2.1 Einfluss des Hepatitis C Virus auf den EGF Rezeptor

Die EGF Rezeptor Familie spielt auch bei einer Infektion mit dem Hepatitis C Virus eine Rolle. Wie bereits unter Kapitel 1.1.1 beschrieben, ist der EGF Rezeptor am Eintritt des Hepatitis C Virus beteiligt [21]. Die Nicht-Strukturproteine des Hepatitis C Virus und insbesondere NS5A modifizieren zudem die Signalübertragung der ErbB Rezeptoren. Nach Stimulation des EGF Rezeptors interagiert NS5A über Prolin-reiche Motive mit der SH3-Domäne von Grb2 [60] und verhindert so die EGFR-vermittelte Aktivierung von *extracellular-regulated protein kinase 1/2* (Erk1/2), was zu einer Hemmung der Mitogen-aktivierten Signalkaskade führt. NS5A interagiert gleichzeitig mit der PI3 Kinase und bewirkt durch eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung an der p85 regulatorischen Untereinheit nach EGF Stimulation eine gesteigerte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs. Dies führt wiederum zu einer Hemmung der Apoptose und einer verbesserten Proliferation, was für die virale Persistenz und Pathogenese entscheidend ist [61]. Infolge der Grb2-Hemmung kommt es NS5A-vermittelt ebenfalls zu einer Hemmung der Ras-Aktivierung und damit der Ras-abhängigen Signalwege [62].

Die Aktivierung des EGFR/Erk-Signalwegs kann durch Gallensalze erfolgen und bewirkt eine Steigerung der viralen Replikation. Inhibitoren gegen EGFR und Erk in Kombination mit Interferon-alpha verbessern die Effizienz der Hepatitis C Therapie durch Hemmung der Gallensalz-vermittelten Steigerung der viralen Replikation. Der Effekt der Gallensalze wird über eine Aktivierung des *activator protein 1* (AP-1) sowie des *serum response element* (SRE) in Zellen, die das subgenomische Replikon des Hepatitis C Virus und damit die viralen Nicht-Strukturproteine einhalten, bedingt. Zusätzlich wird durch Gallensalze die S-Phase des Zellzyklus verlängert, wodurch es zu einer gesteigerten EGFR Phosphorylierung und erhöhten viralen RNA- und Proteinspiegeln in der Zelle kommt [63].

Amphiregulin (AREG) ist ein EGFR Ligand, welcher unter Beteiligung des viralen Nicht-Strukturproteins NS3 verstärkt exprimiert wird. AREG fördert die Zellproliferation durch Stimulation der Erk-, Akt- sowie p38^{MAPK}-Signalwege und schützt die Zelle so vor HCV-vermittelter Apoptose, trägt auf diesem Wege jedoch auch zur Entstehung von Leberzirrhose und hepatozellulären Karzinomen bei. *Pei et al.* konnten belegen, dass eine Reduktion der AREG Expression zwar den viralen Eintritt in die Zelle verbessert, jedoch die Bildung und Freisetzung infektiöser Partikel reduziert und so deren intrazelluläre Anreicherung bewirkt. Die AREG Expression ist demnach für Zusammenbau und Freisetzung viraler Partikel essentiell [64].

1.3 Neureguline

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen werden als Transmembranproteine exprimiert. Dies trifft auch auf die Neureguline, Liganden der ErbB Rezeptorfamilie, zu. Sie werden auch als Neuroreguline bezeichnet, da sie an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt sind [65]. In einem als *shedding* bezeichneten Prozess werden sie auf der extrazellulären Seite enzymatisch abgespalten, im Falle der Neureguline beispielsweise durch ADAM17, auch *Tumor necrosis factor-alpha Converting Enzyme* (TACE) genannt oder ADAM10. Die Abspaltung der Liganden überführt diese lediglich in eine diffusionsfähige Form, ihre volle Aktivität besitzen sie bereits in membrangebundenem Zustand [66]. Die Familie der Neureguline hat vier Mitglieder: NRG1, NRG2, NRG3 und NRG4, wobei teilweise unterschiedliche Isoformen existieren. Das NRG1 Gen kodiert beispielsweise 15

verschiedene NRG1-Isoformen. Die Unterscheidung der Isoformen erfolgt anhand drei verschiedener struktureller Merkmale: die Differenzierung zwischen alpha und beta liegt in der unterschiedlichen Sequenz der EGF-ähnlichen Domäne zwischen dem fünften und sechsten Cystein begründet [67], die N-terminale Sequenz gibt Aufschluss über Typ I, II oder III und schließlich werden noch initial als Transmembranproteine synthetisierte und nicht membranständige Proteine unterschieden [68].

Die EGF-ähnliche Domäne der verschiedenen Neureguline weist eine sehr hohe Sequenzhomologie auf, die sie von anderen EGF Liganden unterscheidet. Die Sequenz der transmembranären Domäne von NRG1 und NRG2 ist zu 92% identisch, NRG1 und NRG3 weisen eine 80%ige Sequenzhomologie der juxtamembranären Domäne auf. Die zytoplasmatischen Domänen aller vier Isoformen unterscheiden sich deutlich [65].

	NRG α/β domains																			
NRG-1 α	HLVKCAEKEKTF	CVNGGEC	FMVKDLSNPSRYL	CKQPGFTG	ARCTEN	VPMKV														
NRG-1 β	HLVKCAEKEKTF	CVNGGEC	FMVKDLSNPSRYL	CKPNEFTG	DRCQNY	VMAF														
NRG-2 α	HARKCNETAKSY	CVNGGV	CYYIEG---	INQLSCK	CPNGFFG	QRCLEK	LPLRL													
NRG-2 β	HARKCNETAKSY	CVNGGV	CYYIEG---	INQLSCK	CPVGYTG	DRCQFAM	VNF													
NRG-3	HFKPCRDKDLAY	CLNDGEC	FVIETLT-	GSHKHC	RCKEGY	QGVRC	DQFLPKTD													
NRG-4	HEQPCGPRHRSF	CLNGGI	CYVIPT---	IPSPFC	RCIENY	TGARCE	EEVFLPSS													

Abbildung 1.5: Vergleich der Aminosäuresequenz der Neureguline. Die Neureguline 1 und 2 haben eine zu 92% identische Aminosäuresequenz, Neuregulin 1 und 3 weisen eine Sequenzhomologie von 80% auf. Grün markiert sind die konservierten Cysteinreste, die entscheidend für die Konformation der Liganden sind. Diese finden sich ebenfalls bei allen EGFR Liganden. Rot markiert sind jene Aminosäuren, die bei allen Neuregulinen identisch sind. Konservativ substituierte Aminosäuren sind gelb hinterlegt (nach *Buonanno et al.*, 2001).

Die Varianz der Neureguline untereinander wird unter anderem durch alternatives Spleißen der prä-mRNA bedingt. Strukturell ähneln sich NRG1 und NRG2, während die Struktur von NRG3 und NRG4 relativ stark abweicht. Die isolierte EGF-ähnliche Domäne der Neureguline ist ausreichend, um ErbB Rezeptoren zu aktivieren und dadurch eine Dimerisierung, Tyrosin-Phosphorylierung und anschließende Aktivierung verschiedener Signalwege zu vermitteln. Die EGF-ähnliche Domäne hat eine Länge von etwa 50 Aminosäuren, wobei immer drei Cystein-Paare vorhanden sind, die für die Tertiärstruktur und die biologische Funktion verantwortlich sind. Dennoch tragen die übrigen Domänen ebenfalls zur biologischen Funktion der

Liganden bei [65].

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei den Neuregulinen um Liganden der EGF Rezeptor Familie. NRG1 und NRG2 interagieren mit ErbB3 und ErbB4, wohingegen NRG3 und NRG4 bevorzugt an ErbB4 binden. Abgesehen davon haben die verschiedenen NRG Isoformen unterschiedliche Affinitäten zu den ErbB Heterodimeren. Dabei ist von Bedeutung, dass die Bindung verschiedener NRG Isoformen an das gleiche Heterodimer unterschiedliche Signalwege aktivieren kann, z.B. durch alternative Tyrosin-Phosphorylierung und die dadurch bedingte Effektormolekül-Rekrutierung. Ebenfalls möglich ist die Aktivierung des gleichen Signalwegs mit variierender Kinetik [65]. Neuregulinen kommt in verschiedenen Organsystemen wie unter anderem Nervensystem, Herz, Magen und Leber eine wichtige Rolle für die Regulation von Zellproliferation, Migration und Differenzierung zu [68]. In Tumorgewebe ist die NRG1-Expression häufig verstärkt und korreliert mit einer progressiven und aggressiven Krebserkrankung.

In Brustkrebs-Zelllinien induziert die NRG1-Isoform Heregulin 1 β (HRG1 β) die Expression des Wachstumsfaktors *vascular endothelial growth factor C* (VEGF C), welcher eine Rolle bei der Bildung von Lymphgefäßen spielt. Ihm wird jedoch auch eine Rolle bei der Metastasierung zugeschrieben [69]. Mittels Inhibitoreinsatz gegen den ErbB2 Rezeptor konnten *Tsai et al.* eine Beteiligung dieses Rezeptors an der HRG1 β -vermittelten Überexpression von VEGF nachweisen und außerdem auch belegen, dass die HRG1 β -bedingte Hochregulierung von VEGF C über einen NF- κ B abhängigen Signalweg erfolgt [69]. HRG1 β vermag des Weiteren den Erk1/2-, PI3K- sowie den p38^{MAPK} Signalweg in Brustkrebszelllinien zu aktivieren. Die spezifische Hemmung der p38^{MAPK} hat eine Normalisierung der VEGF C Expression zur Folge. Die HRG1 β -induzierte NF- κ B Aktivierung kann ebenfalls durch Hemmung der p38^{MAPK} inhibiert werden [69].

Für das ErbB2/ErbB3 Heterodimer ist bekannt, dass es eine Rolle bei der Tumorprogression spielt. *Ueno et al.* haben belegt, dass es durch Stimulation mit Neuregulin 1 zu einer raschen Aktivierung des EGF Rezeptors kommt, was auf eine Heterodimerisierung mit dem ErbB3 Rezeptor schließen lässt. So bewirkt die durch Stimulation hervorgerufene ErbB3-EGFR-Dimerisierung ebenfalls ein gesteigertes Tumorwachstum und Metastasierung [70]. Auch *Ito et al.* haben eine wichtige Rolle für den EGF Rezeptor sowie den Neuregulinrezeptor ErbB3 bei der Progression eines hepatozellulären Karzinoms nachgewiesen [71].

1.4 Transkriptionsfaktoren

1.4.1 Die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3

Bereits vor 30 Jahren beschrieben *Dynan et al.* zum ersten Mal den Transkriptionsfaktor *specificity protein 1* (Sp1) [72]. Sp1 wie auch Sp3 gehören zur Familie der *specificity protein/Krüppel-like factor* (SP/KLF) Transkriptionsfaktoren. Über ein Zinkfinger Proteinmotiv binden Sp1 und Sp3 an ein Guanin- und Cytosinreiches regulatorisches Element (GC Box) und steigern dadurch die Expression verschiedener Gene. Allen Sp-Transkriptionsfaktoren gemein sind die konservierte N-terminale Transkriptions-Aktivierungs-Domäne sowie die konservierte C-terminale Zinkfinger DNA Bindungsdomäne [73]. Im Bereich der DNA-Bindungsdomäne ist die Sequenz von Sp1 und Sp3 zu 90% homolog, was zur Folge hat, dass beide Transkriptionsfaktoren die selben Zielgene mit ähnlicher Affinität binden können [74]. Eine wichtige Rolle für die Sp1-vermittelte Genexpression spielt die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors. Variationen im Phosphorylierungsmuster führen zu Aktivierung oder Hemmung von Sp1 und damit auch der Sp1-vermittelten Genexpression [75]. Die Phosphorylierung von Sp1 erfolgt durch Kinasen an einzelnen oder mehreren Serin- und Threoninresten zeitgleich oder zeitversetzt. Die Phosphorylierungsmuster sind zudem Gewebe- und Zelltypabhängig. Der Transkriptionsfaktor Sp1 wird durch zellulären Stress aktiviert. Die Regulation der Sp1-Aktivierung erfolgt häufig durch Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel EGF und wird über Signalwege wie den *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK)/Erk Signalweg, aber auch über die p38^{MAPK} und die Proteinkinase C vermittelt. *D'Addario et al.* konnten nachweisen, dass die Aktivierung der p38^{MAPK} eine gesteigerte Sp1-Phosphorylierung an Threonin-Resten bewirkt und dadurch insofern Einfluss auf die Regulation der Zielgene von Sp1 ausübt, als dass diese verstärkt exprimiert werden [76]. Auch die Genexpression der Wachstumsfaktoren kann durch Sp1 reguliert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Sp1 Zielgen *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*) [73]. Durch Sp1 regulierte Gene spielen bei zahlreichen Prozessen wie zum Beispiel der Regulierung des Zellzyklus, Angiogenese oder auch Apoptose eine Rolle. Reguliert werden auch Tumorsuppressor- sowie Onkogene.

Im Rahmen einer Krebserkrankung ist das Maß der Sp1 und Sp3 Expression häufig erhöht, so auch beim hepatozellulären Karzinom [74].

Sp1 kann ebenfalls die virale Genexpression oder auch die Virus-induzierte Expression wirtsspezifischer Gene beeinflussen. Eine verstärkte Sp1-Aktivierung wurde im Zusammenhang mit zahlreichen Viruserkrankungen, unter anderem HIV-1 und Hepatitis C, beschrieben [73].

1.4.2 Der Transkriptionsfaktor CREB

Das *cAMP response element binding protein* (CREB) gehört zur Familie der ATF/CREB Transkriptionsfaktoren. Ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Levels bewirkt eine Aktivierung von CREB und dadurch die Transkription von Genen, die ein *cAMP-responsive element* (CRE) in ihrer Promotorregion enthalten. *Lemaigre et al.* konnten nachweisen, dass CREB sowie der nah verwandte Transkriptionsfaktor *cyclic AMP-dependent transcription factor* (ATF1) auch inhibitorischen Einfluss auf die Transkription von Zielgenen haben können [77]. Die Aktivierung der Proteinkinase A erfolgt durch die Bindung von cyclischem AMP an die regulatorischen Untereinheiten. Dies führt dazu, dass die katalytischen Untereinheiten aus dem Komplex heraus dissoziieren und ihre Funktion in Zytoplasma oder Zellkern ausüben. Im Kern binden sie an CREB und aktivieren es durch Phosphorylierung am Serinrest 133. Es kommt zur Interaktion zwischen dem cAMP-responsiven Element (CRE) der Zielgene und CREB. Die Aktivierung von CREB bedingt zudem eine verstärkte Rekrutierung des Koaktivators, bestehend aus *CREB-binding protein* (CBP) und p300, wodurch die Transkription der Zielgene gesteigert oder gehemmt wird. CREB reguliert die Genexpression durch Bindung an konservierte CRE-Elemente, die entweder als palindromische Sequenz (TGACGTCA) oder *half site CRE* (CGTCA / TGACG) vorkommen und gewöhnlich bis zu 200 Nukleotide vor dem Transkriptionsstartpunkt liegen [78]. Eine Vielzahl verschiedener Stimuli bewirkt die Phosphorylierung von CREB. Erfolgt die CREB-Phosphorylierung infolge der durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktivierten Signalwege, so ist meist der MAP Kinase Signalweg und damit Erk beteiligt. Erk aktiviert Kinasen vom Msk-Typ, welche wiederum CREB direkt phosphorylieren. *Herndon et al.* konnten belegen, dass die NRG1-vermittelte Aktivierung von CREB in Muskelzellen

Erk-abhängig ist [79]. Die CREB-Phosphorylierung allein ist nicht ausreichend für die Induktion der Transkription. Im Falle der cAMP-vermittelten CREB-Aktivierung spielt der Koaktivator *transducer of regulated CREB activity* (TORC) eine entscheidende Rolle. Durch Assoziation an CBP/p300 vermittelt TORC die Rekrutierung des Komplexes hin zum aktivierten CREB. Bei cAMP-unabhängigen Vorgängen wird TORC nicht aktiviert. Die entsprechenden Zielgene tragen allerdings im Gegensatz zu den cAMP-vermittelt transkribierten Zielgenen eine *serum response factor* (SRF) Bindungsstelle. Ein Zusammenspiel aus CREB und SRF bewirkt so die transkriptionelle Induktion, wenn auch der genaue Mechanismus noch unklar ist. *Herndon et al.* gehen davon aus, dass cAMP bei der NRG1-vermittelten Induktion der Transkription keine Rolle spielt, zumal das von ihnen untersuchte Zielgen *EGR3* (*early growth response protein 3*) eine Bindungsstelle für SRF besitzt. NRG1 bewirkt durch die Aktivierung von CREB und SRF eine gesteigerte Transkription des *EGR3* Gens [79].

Lemaigre et al. konnten nachweisen, dass die Hemmung der Transkription auch ohne spezifische Promotorelemente und unabhängig von der Proteinkinase A ablaufen kann. CREB und ATF1 sind in der Lage, die Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren zu hemmen. Voraussetzung hierfür ist eine intakte CREB-Dimerisierung sowie funktionsfähige DNA-Bindungsdomänen. Eine Phosphorylierung von CREB durch die PKA hingegen ist nicht notwendig [77].

Das Hepatitis C Virus verstärkt die Aktivierung von CREB. *Quadri et al.* belegten eine Beteiligung von CREB an der Transkription der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), dem für die Glukoneogenese geschwindigkeitsbestimmenden Enzym, sowie einen Einfluss des viralen Nicht-Strukturproteins NS5A auf die PEPCK-Genexpression. Da PEPCK über ein cAMP-responsives Element verfügt und die PEPCK-Transkription durch cAMP-vermittelte Aktivierung von CREB, CREBBP und *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α) induzierbar ist, ist es wahrscheinlich, dass NS5A über eine Aktivierung des cAMP Signalwegs regulatorisch in die PEPCK Transkription eingreift und so die Glukoseproduktion steigert [80].

Insgesamt sind bis heute rund 4000 humane CREB Zielgene bekannt. Die *CREB target gene database* (<http://natural.salk.edu/CREB/>) ermöglicht die Sequenzanalyse von Genen hinsichtlich des Vorhandenseins von putativen CRE-Elementen [78].

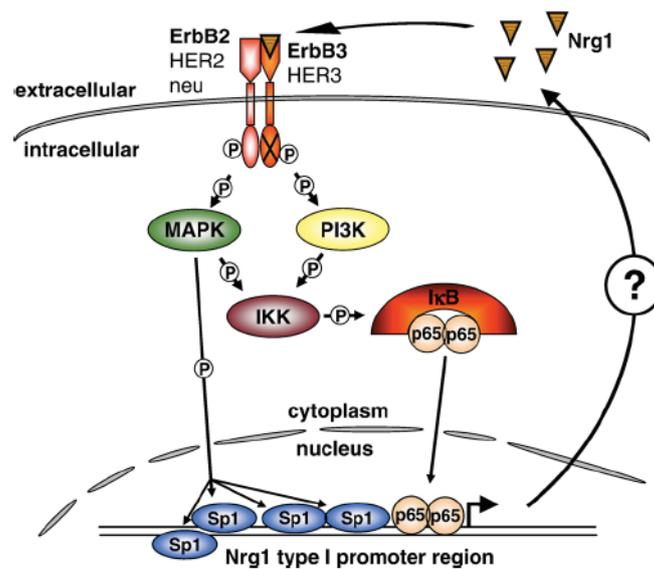


Abbildung 1.7: Potentieller Mechanismus einer positiven Rückkopplung des Neuregulin 1. NRG1 bewirkt über die Bindung an den ErbB3 Rezeptor und der dadurch bedingten Heterodimerbildung mit dem ErbB2 Rezeptor eine Aktivierung des MAPK- sowie des PI3K-Signalwegs. Diese Signalwege sind zur Aktivierung des IκB Kinase Komplexes (IKK) befähigt, wodurch es zum Abbau von IκB und so zur nukleären Translokation von NF-κB kommt. Des Weiteren steigert der p38^{MAPK} Signalweg die transkriptionelle Aktivität von Sp1. Der genaue Rückkopplungsmechanismus ist jedoch noch nicht geklärt (nach *Frensing et al.*, 2008).

Der Transkriptionsfaktor CREB wird unter anderem durch Stimulation mit NRG1 aktiviert. Aktuelle Befunde von *Herndon et al. belegen*, dass diese Aktivierung über eine durch Rezeptortyrosinkinasen vermittelte Aktivierung der MAP Kinase Erk und die dadurch bedingte Aktivierung der *mitogen and stress-activated protein kinase* (MSK) erfolgt, welche CREB am Serinrest 133 phosphoryliert [79]. Dadurch kommt es zur gesteigerten Rekrutierung der Koaktivatoren CBP und p300 und zur Steigerung der transkriptionellen Aktivität. Ein Beispiel für ein durch NRG1-Stimulation verstärkt transkribiertes Zielgen von CREB ist das *early growth response protein 3* (Egr3). *Es wurde* nachweisen, dass nicht die Bindungskapazität an das regulatorische Element des *EGR3* Gens erhöht ist, sondern die transkriptionelle Aktivität von CREB gesteigert wird [79].

1.6 microRNA

Im Jahre 1993 wurde zum ersten Mal eine microRNA (miRNA) von *Lee et al.* beschrieben [82]. Seither sind rund 2000 humane miRNAs entdeckt worden [83]. Bei Micro-Ribonukleinsäuren (miRNA) handelt es sich um nicht kodierende RNA-Stränge, die aus etwa 20-24 Basenpaaren bestehen. Ihre Sequenzen sind hoch konserviert und sie fungieren als Inhibitoren der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene, indem sie an komplementäre mRNA-Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) binden. So wird entweder die Translation gehemmt oder aber die mRNA degradiert, je nachdem ob die Sequenz von miRNA und mRNA partiell oder vollständig komplementär ist [84]. Somit üben sie im gesunden Organismus regulatorische Funktionen aus. Die Transkription der miRNA erfolgt durch die RNA Polymerase II. Dabei entsteht die sogenannte primary-microRNA (pri-miRNA). Die pri-miRNA ist zwischen 500 und 3000 Nukleotiden lang und bildet eine Schleife. Im Nukleus wird die pri-miRNA durch die RNase III (Drosha) weiter prozessiert. Es entsteht die precursor miRNA (pre-miRNA) mit einer Länge von 70-80 Nukleotiden, die eine Haarnadelstruktur bildet. Vermittelt durch Exportin-5 und den Kofaktor Ran-GTP wird die pre-miRNA aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert. Dort wird die pre-miRNA durch das RNase-II-Enzym Dicer geschnitten, es entsteht ds-miRNA mit einer Länge von 20-24 Nukleotiden. Dabei ist ein Strang der sogenannte *mature miRNA guide strand*, der Gegenstrang wird in der Annotation mit einem Stern markiert (miRNA*).

Die reife (*mature*) miRNA wird in einem sogenannten miRISC Komplex aufgenommen. In dieser Form inhibiert die miRNA die Translation der Zielgene. Dazu bindet die miRNA an die Erkennungssequenz im 3'-untranslatierten Bereich ihrer Ziel-mRNA [85].

Nach aktuellem Kenntnisstand binden die miRNAs jeweils an bis zu 200 Zielgene wobei diese ihrerseits Bindungsstellen für verschiedene miRNAs haben. In ihrer Gesamtheit regulieren die miRNAs die Genexpression rund eines Drittels aller humanen mRNAs [84]. Die Expression der miRNAs ist häufig gewebespezifisch.

Durch die Vielzahl der Zielgene spielen die microRNAs eine Rolle bei zahlreichen Prozessen wie Proliferation, Apoptose und der Entstehung sowie Metastasierung von Krebs. Ein Beispiel für die Deregulation von miRNA bei einer Krebserkrankung ist das hepatozelluläre Karzinom (HCC) [83]. Zudem gibt es auch Tumor Suppressor

miRNAs, die die Expression von Onkogenen verhindern. Ein Beispiel hierfür ist die Herabregulation der Rezeptoren ErbB2 und ErbB3 durch die Überexpression der miRNAs hsa-miR-125a und hsa-miR-125b in der Brustkrebszelllinie SKBR3 [84]. *Potenza et al. belegten*, dass die in der Leber exprimierte miRNA hsa-mir-125a-5p negativen Einfluss auf die Replikation des Hepatitis B Virus nimmt, indem sie die Expression des HBV S Gens hemmt. Dies könnte möglicherweise neben der Immunantwort des Wirts eine weitere Ursache für den meist milden Verlauf einer Hepatitis B Infektion sein [86].

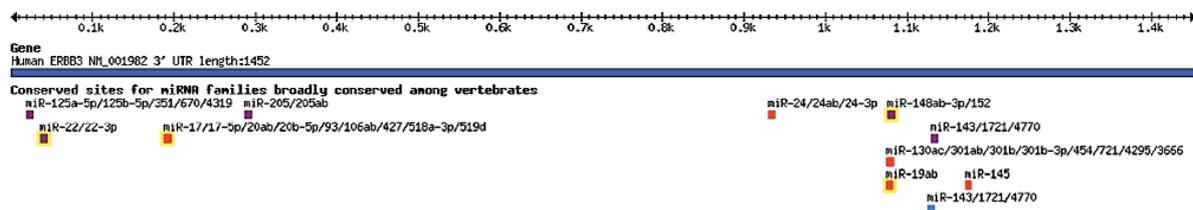


Abbildung 1.8: Konservierte miRNA-Bindungsstellen innerhalb der 3'-UTR des humanen ErbB3 Rezeptors. Die Website www.targetscan.org ermöglicht die Untersuchung humaner Gene auf potentielle miRNA-Interaktionsmotive. Mit Hilfe dieser Datenbank wird die gezielte Analyse einer Beteiligung von miRNAs an der Hoch- bzw. Herabregulierung der Expression verschiedener Gene zum Beispiel im Rahmen einer Erkrankung ermöglicht.

1.7 Interaktion des Hepatitis C Virus mit der Wirtszelle

Das Hepatitis C Virus hat die Fähigkeit erlangt, Wirtsproteine für seinen Lebenszyklus, beginnend mit dem viralen Eintritt bis hin zur Freisetzung zu nutzen, und beeinflusst zahlreiche Vorgänge der Wirtszelle wie die Signalübertragung und die Immunantwort.

Zunächst interagiert das Virus wie bereits unter Kapitel 1.1.1 beschrieben mit Hepatozyten-Oberflächenrezeptoren wie LDL-R, CD81 und SR-BI. So gelangen die viralen Partikel in das Zellinnere [87]. Cholesterol-reiche Domänen innerhalb der Zelle sind für die Ausbildung des Replikationskomplexes erforderlich [88]. Die zelluläre Phosphatidylinositol-4-Kinase III β (PI4KIII β) wird durch das virale Phosphoprotein NS5A rekrutiert und aktiviert. Es ist für die strukturelle Integrität des Replikationskomplexes und damit für die virale Replikation essentiell [89]. Die

Interaktion zwischen NS5A und Apolipoprotein E (ApoE) ist für den viralen Zusammenbau und die Freisetzung notwendig [88].

Die Interaktion zwischen Wirt und Virus beschränkt sich jedoch nicht auf die unmittelbar am viralen Lebenszyklus beteiligten Vorgänge. Der Eintritt der viralen Partikel in den Hepatozyt bedingt eine Immunantwort der Wirtszelle, die unter anderem durch die verstärkte Chemokinproduktion während akuter, aber auch chronischer Infektion deutlich wird [90].

1.7.1 Die Transkriptionsfaktoren Sp1, AP-1 und NF- κ B

Das Hepatitis C Virus greift in zahlreiche Signalwege ein. So kommt es durch eine Infektion zur Aktivierung verschiedener zellulärer Kinasen, wie zum Beispiel *c-JUN N-terminal protein kinase* (JNK), p38^{MAPK}, Erk, Src, PI3K und *Janus kinase* (JAK). Diese Kinasen wiederum phosphorylieren Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1, Sp1 oder auch STAT3 und aktivieren diese dadurch. Die NF- κ B- wie auch die Sp1-Aktivierung wurden als NS5A-abhängiger Vorgang beschrieben, wobei bei der Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren auch Hinweise auf eine Beteiligung von Core und NS3 existieren [91-94]. NS5A ist als Teil des viralen Replikationskomplexes, welcher wie unter Kapitel 1.1.3 beschrieben an die Membran des ER assoziiert vorliegt, an der Auslösung einer ER-Stressantwort maßgeblich beteiligt und verursacht dadurch eine Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER, welche über die Induktion von ROS zu oxidativen Stress führt. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung von I κ B α und damit einhergehend zur Degradation des I κ B Proteins durch Calpain. Dies führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Diese konstitutive NF- κ B Aktivierung durch das Hepatitis C Virus spielt eine Rolle für die Chronifizierung der Erkrankung sowie die Entstehung hepatozellulärer Karzinome, da NF- κ B als sogenannter *pro-survival* Faktor fungiert und regulatorischen Einfluss auf die Proliferation ausübt [95]. Für den Transkriptionsfaktor AP-1, ein Heterodimer aus c-Jun und c-Fos, wurde im Gegensatz dazu ein inhibitorischer Effekt durch NS5A beschrieben. NS5A interagiert mit AP-1 über ein Polyprolin-Motiv [96].

1.7.2 Das Chemokin CXCL8

Chemokine sind chemotaktische Peptide aus der Gruppe der Zytokine, die eine entscheidende Rolle für das Immunsystem spielen. Bekannt sind etwa 50 verschiedene Chemokine, die ihre Wirkung über die Bindung an Chemokinrezeptoren entfalten [97]. Sie vermitteln unter anderem die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in das Gewebe oder sind an Vorgängen wie der Angiogenese beteiligt. Das Hepatitis C Virus moduliert die Chemokinexpression, um so zum Beispiel die Immunantwort des Wirts zu unterlaufen und eine persistierende Infektion zu ermöglichen.

CXCL8 wird insbesondere von Epithel- und Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten produziert. Es fungiert als Entzündungsmediator und ist an der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten und besonders der neutrophilen Granulozyten in das Gewebe beteiligt. CXCL8 interagiert mit den G-Protein gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 und aktiviert so zum Beispiel Adenylatcyclasen und MAPK Signalkaskaden. Im gesunden Gewebe wird das Chemokin CXCL8 nur geringfügig exprimiert. Es spielt eine Rolle bei Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung. Stimuliert wird die Expression durch proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$), Interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$), bakterielle und virale Infektionen sowie zellulären Stress. Das Ausmaß der Chemokin-Expression ist vom Stimulus abhängig. So wird die basale CXCL8 Expression durch $\text{IL-1}\beta$ - und $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation um die bis zu hundertfache Menge gesteigert, während bakterielle oder virale Infektionen sowie EGF einen Anstieg der CXCL8 Expression um das Zehnfache bewirken [98].

Die CXCL8-Expression wird durch drei verschiedene Mechanismen kontrolliert: durch die Derepression des Genpromotors, durch die NF- κ B und JNK Signalwege vermittelte Aktivierung der Transkription sowie die Stabilisierung der mRNA durch den p38^{MAPK} -Signalweg [98]. Neben einer Bindungsstelle für NF- κ B besitzt der CXCL8 Promotor ebenfalls Bindungsstellen für AP-1 und C/EBP, wobei diese nicht für die Induktion der Expression, sondern für eine maximale Genexpression von Bedeutung sind [98]. Aktiviert werden die Transkriptionsfaktoren durch Proteinkinasen. Drei verschiedene MAPK Signalwege sind an der Regulation der CXCL8 Expression beteiligt: ERK, JNK und p38^{MAPK} . All diese MAP Kinasen werden

durch verschiedene *dual specificity mitogen-activated protein kinase kinases* (MKK) phosphoryliert und somit aktiviert [98]. *Hoffmann et al.* konnten nachweisen, dass die Regulierung der CXCL8 Expression ebenfalls posttranslational durch Stabilisierung der CXCL8 mRNA erfolgt. Dieser Prozess verläuft p38^{MAPK}-abhängig unter Beteiligung der *MAPK-activated protein kinase 2* (MK2), dem der p38^{MAPK} nachgeschaltetem Signaltransduktionselement [98].

Im Rahmen einer Hepatitis C Infektion sind auch weitere nicht-parenchymale Zellen der Leber, wie die hepatischen Sternzellen, an der Entzündungsreaktion beteiligt. *Nishitsuji et al.* konnten belegen, dass die hepatischen Sternzellen in Ko-Kultur mit infizierten Hepatozyten eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Chemokine wie Interleukin-8 (IL-8, auch CXCL8) bewirken [99].

1.7.3 Die Tyrosinkinase c-Src

Die Familie der Protein Tyrosinkinasen, zu der auch die Src Familie gehört, spielen eine bedeutende Rolle für Zellproliferation, Migration, Differenzierung und Überleben der Zelle. Der Prototyp der Familie wurde 1977 von *Brugge & Erikson* entdeckt. Es handelte sich um eine Tyrosinkinase des Rous Sarcoma Virus (RSV) die als v-Src bezeichnet wurde. Bei v-Src handelt es sich um eine mutierte Variante der zellulären Tyrosinkinase c-Src, welche ubiquitär exprimiert wird [100]. Erstmals beschrieben wurde die Tyrosinkinase c-Src (cellular Sarcoma) im Jahre 1979 von *Bishop et al.* [101]. Die Familie der Src-Tyrosinkinase, zu der neben der namensgebenden c-Src Kinase außerdem auch die Kinasen Lyn, Hck, Lck, Blk, Yes, Fyn und Fgr gehören, spielen eine bedeutende Rolle für die intrazelluläre Signalübertragung und sind so an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt. Aufgebaut sind die Tyrosinkinasen aus vier Src Homologiedomänen, Unterschiede in der Struktur liegen insbesondere im N-terminalen Bereich vor. Die SH3-Domäne dient insbesondere der Interaktion mit anderen Proteinen über deren Prolin-reiche Motive, SH2 interagiert vorrangig über Phospho-Tyrosin Motive. Die C-terminale SH1-Domäne besitzt enzymatische Aktivität [37]. Die über SH3-Domänen vermittelte Interaktion mit Liganden ist für eine Vielzahl biologischer Prozesse relevant, zum Beispiel für die Regulation von Enzymen, bei der Signalübertragung oder der Vermittlung der Multiprotein-Komplexbildung. SH3 Domänen sowie ihre Interaktionsmotive kommen in hunderten

Proteinen zahlreicher Spezies vor [102].

Tyrosinkinassen sind auch im Rahmen einer viralen Infektion von besonderer Bedeutung. So beschrieben zum Beispiel *Klein et al.* eine Hepatitis B Virus-vermittelte Aktivierung von c-Src und Fyn und eine damit einhergehende Steigerung der virale Replikation [103]. c-Src spielt zudem eine Rolle für den viralen Lebenszyklus des HI-Virus [104], des Herpes Simplex Virus I [105], des Dengue Virus [106] und des Hepatitis C Virus [39]. In all diesen Fällen findet eine direkte Interaktion viraler Proteine mit den Src-Kinasen statt, insbesondere vermittelt über die SH3-Domänen, jedoch auch unter Beteiligung der SH2-Domäne, zum Beispiel im Falle der HCV Replikation. Die Interaktion zwischen NS5A und den Tyrosinkinassen hat mitunter gegenteilige Effekte. So inhibiert NS5A die Aktivität von Hck, Lck und Lyn, während Fyn durch die Interaktion aktiviert wird [107]. Essentiell für die HCV Replikation ist die Interaktion von NS5A mit der SH2-Domäne von c-Src, wobei zusätzlich die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B über eine Interaktion mit c-Src-SH3 an der Komplexbildung beteiligt ist [39].

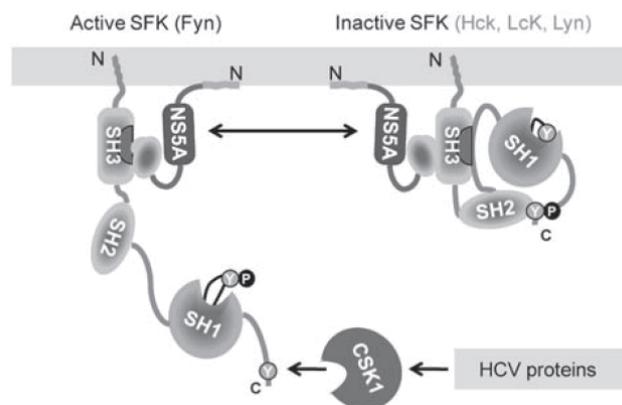


Abbildung 1.9: NS5A interagiert über ein PxxP-Motiv mit der SH3-Domäne verschiedener Src-Kinasen, jedoch nicht mit c-Src. Die Interaktion mit c-Src erfolgt über die SH2-Domäne, während eine Interaktion zwischen der SH3-Domäne und der viralen NS5B Polymerase stattfindet (nach *Bode et al.*, 2009).

Pfannkuche et al. beschrieben 2009 eine Interaktion der c-Src Kinase mit den Nicht-Strukturproteinen NS5A und NS5B des Hepatitis C Virus [39]. Dabei findet die Interaktion mit NS5A über die SH2-Domäne, die Interaktion mit NS5B über die SH3-Domäne statt. Die Sequenzanalyse legte das Vorhandensein zweier PxxP-Motive

(Prolin xx Prolin) innerhalb der Sequenz von NS5B dar. Die Trunkierung des NS5B Proteins brachte einen Hinweis darauf, dass das sogenannte Motiv 2, welches die Aminosäuren 386-393 umfasst, für die Interaktion mit der c-Src-SH3 Domäne notwendig ist. Die Relevanz der Interaktion stand ebenfalls im Fokus der Arbeit von *Pfannkuche et al.* und es konnte nachgewiesen werden, dass c-Src essentiell für die Ausbildung des Komplexes zwischen NS5A und NS5B und damit des viralen Replikationskomplexes ist [39].

NS5A bindet außerdem auch über ein PxxP-Motiv an die SH3-Domäne des *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), einem Adapterprotein, welches mit dem EGF Rezeptor interagiert. Induziert wird die Interaktion zwischen NS5A und Grb2 durch EGF und sie hat eine Störung der Grb2-vermittelten Signalübertragung zur Folge [60].

1.9 HCV Zellkulturmodelle

Das erste Zellkulturmodell für Hepatitis C wurde im Jahre 1999 von *Lohmann et al.* entwickelt. Der Arbeitsgruppe gelang es, aus der RNA chronisch infizierter Patienten Replikonkonstrukte des Hepatitis C Virus zu klonieren, die selbstständig in humanen Hepatomazelllinien replizieren können [108, 109]. Das erste Replikonsystem leitete sich vom Genotyp 1b (Con1) ab. Hier wurde die Region von Core bis p7 durch ein Gen ersetzt, welches die Neomycin-Phosphotransferase (npt) sowie eine heterologe interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) kodiert. Die durch das npt-Gen bedingte Geneticin-Resistenz ermöglichte die Selektion hoch replizierender humaner Hepatomazellen [110]. Ein weiterer Durchbruch gelang mit der Einführung adaptiver Mutationen in das Replikon, wodurch die Replikation erheblich verbessert wurde. Die meisten adaptiven Mutationen liegen im Bereich der Nicht-Strukturproteine. Vier Regionen spielen hierbei eine entscheidende Rolle: der N-Terminus der NS3 Helikase, zwei Positionen in NS4B sowie der zentrale Bereich von NS5A [111]. Die adaptive Mutation einer einzigen Aminosäure im Bereich von NS5A steigerte die Replikation um 10% [112]. Die Mutation mit dem bedeutensten Einfluss auf das Zellwachstum liegt im Bereich der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B. Hier führt die Substitution einer einzigen Aminosäure zu einer Steigerung der Kolonienzahl um das Fünfhundertfache [113].

Die Auswahl geeigneter Zelllinien war ebenfalls von großer Bedeutung. *Blight et al.* identifizierten Huh7 Hepatomazellen als geeignete Zelllinie für das Replikonsystem [108]. Als besonders geeignet haben sich Huh7 Klone herausgestellt, die zuvor durch antivirale Therapie geheilt wurden, sogenannte *cured* Huh7 Zellen, da hier eine signifikante Steigerung des Ausmaßes der viralen Replikation nachgewiesen werden konnte. Ein möglicher Zusammenhang mit einem in diesem System vorliegenden Defekt des *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) Signalwegs wird angenommen, da dieser für die antivirale Immunantwort von Bedeutung ist. Die wichtigsten so entstandenen Zellklone sind die Zelllinien Huh7.5 und Huh7-Lunet [108].

Im Jahr 2002 entwickelten *Pietschmann et al.* das erste Vollängen-Replikonsystem welches Untersuchungen der Strukturproteine und ihren Einfluss auf den Wirt ermöglichte, ohne dass das Virus jedoch zusammengebaut und freigesetzt wird [114]. Dies ist durch die Einführung der adaptiven Mutationen bedingt, welche für die Fähigkeit zur Replikation jedoch unverzichtbar sind [111]. Die Untersuchung des viralen Eintritts sowie Zusammenbau und Freisetzung des Virus waren somit nicht möglich.

Ein Durchbruch in der Hepatitis C Forschung war die Entwicklung sogenannter HCV Pseudopartikel (HCVpp). Diese werden durch Ko-Transfektion von Expressionsvektoren der HCV Glykoproteine E1 und E2 und der gag-pol Proteine des murinen Leukämievirus (MLV) sowie einem retroviralen Genom in 293 T-Zellen hergestellt [115]. Die HCV Pseudopartikel ermöglichten erste Studien zum Eintritt des Virus in die Zelle. Mit Hilfe dieser Methode konnte zum Beispiel die Beteiligung der viralen Glykoproteine E1 und E2 am Viruseintritt gezeigt werden [108, 116]. Noch heute werden Pseudopartikel für die Studien der Anhaftung des Virus an die Zelle und dessen Internalisierung verwendet.

2005 gab es dann einen weiteren Durchbruch in der HCV Forschung. Das sogenannte *Cell Culture Derived HCV* (HCVcc) war das erste verfügbare System, welches die Infektion von humanen Hepatomazellen ermöglichte und bis hin zur Freisetzung infektiöser Partikel die Untersuchung des gesamten viralen Zyklus *in vitro* ermöglichte [117]. *Wakita et al.* gelang die Isolierung viraler RNA aus dem Blut eines japanischen Patienten mit einer fulminanten Hepatitis C und daraus die Konstruktion des HCV Genotyp 2a Klons JFH-1. Die Transfektion der genomischen RNA führte zur Produktion viraler Partikel, welche nicht nur zur Infektion naiver Zellen sondern auch von Schimpansen befähigt waren. Die Transfektion des

Volllängengenoms anderer Klone vom Genotyp 2a sowie anderer Genotypen blieb ohne Erfolg, so dass chimäre Viren generiert wurden, deren Nicht-Strukturproteine sich alle vom JFH-1 Klon ableiten, während die Strukturproteine durch die korrespondierende Sequenz verschiedener Genotypen ersetzt wurden. Die Schnittstelle für die Chimärisierung wurde hinter die erste transmembranäre Domäne von NS2 gelegt, da diese Region bei natürlich vorkommenden rekombinanten Formen des Hepatitis C Virus als Rekombinationsstelle identifiziert wurde [110]. *Lindenbach et al.* entwickelten 2005 die erste Chimäre, bestehend aus den Strukturproteinen des Genotyp 2a Isolats J6 und den Nicht-Strukturproteinen des Genotyp 2a Isolats JFH-1. *Pietschmann et al.* gelang 2006 eine Optimierung dieser Chimäre sowie die Einführung weiterer Chimäre, deren Strukturproteine sich vom Genotyp 1a (isoliert aus HCV-Klon H77), 1b (isoliert aus HCV-Klon Con1) und 3a (isoliert aus HCV-Klon 452) ableiten [111].

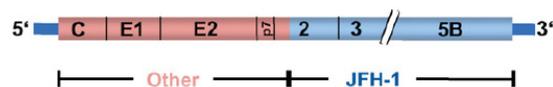


Abbildung 1.10: Die Chimärisierung verschiedener Genotypen ermöglicht eine Optimierung des Infektionsmodells. Zur Bildung infektiöser Partikel befähigte Chimäre bestehen aus Nicht-Strukturproteinen vom Genotyp 2a und Strukturproteinen verschiedener Genotypen. Die bislang effizienteste Chimäre (JC1) setzt sich aus den Strukturproteinen des Isolats J6 (Genotyp 2a), dargestellt in rot, und den Nicht-Strukturproteinen des Isolats JFH-1 (Genotyp 2a), dargestellt in blau, zusammen (nach *Bartenschlager et al.*, 2007).

Auch für das Infektionssystem war die Auswahl geeigneter Zellklone von entscheidender Bedeutung. *Cured* Zelllinien wie Huh7.5 oder Huh7-Lunet, welche nach Transfektion des subgenomischen HCV Replikons durch Behandlung mit Interferon- α wieder von der viralen RNA befreit wurden, weisen wie bereits erläutert eine deutlich verbesserte Virusreplikation und -produktion auf. *Rice et al.* konnten bei diesen Zellen hohe Level an CD81, SR-BI oder auch CLDN1 nachweisen, was die Ursache hierfür sein könnte. Ebenso kann eine gestörte Immunantwort der Zellen die Infizierbarkeit verbessern [108, 118]. Insbesondere die Zelllinie Huh7.5 wies eine deutlich erhöhte virale Replikation verglichen mit anderen Klonen auf. Die Ursache hierfür liegt nach heutigem Wissenstand darin, dass diese Zellen einen defekten

retinoic-acid-inducible gene-1 (RIG-I) Signalweg haben, welche eine bedeutende Rolle für die antivirale Immunantwort spielt [108]. Ein Nachteil der Huh-Zelllinien ist jedoch die geringe Differenzierung der Zellen, welche Auswirkungen auf Proliferation, Genregulation und Signalübertragung haben kann und so die physiologische Relevanz der Befunde in Frage stellt [108].

Zur Verbesserung des Zellkulturmodells entwickelten *Sainz und Chizari* ein Modell, bei welchem die Huh7-Zellen mittels DMSO-Behandlung und dadurch bedingtem Verlust der Teilungsfähigkeit und verstärkter Differenzierung in einen Zustand versetzt werden, der dem physiologischen Zustand der Hepatozyten deutlich näher kommt. Dimethylsulfoxid ist ein dipolares aprotisches Lösungsmittel. Die Behandlung von Tumorzellen mit DMSO bewirkt die Auslösung einer Differenzierung dieser Zellen. Nach aktuellem Kenntnisstand vermittelt DMSO einen Effekt auf die Integrität der Zellmembran und die intrazelluläre Signalübertragung sowie auf die Entstehung alternativer Spleißvarianten [119]. Ein zusätzlicher Vorteil des DMSO-Systems ist die Möglichkeit zur Simulation persistierender HCV Infektionen. Um einen Zustand zu erreichen, der die chronische Erkrankung möglichst gut simuliert, werden die Zellen vor der Infektion zwei Wochen mit 1% DMSO behandelt. Nach der Infektion können die Zellen so bis zu 200 Tage in Kultur gehalten werden [119].

Wildtyp HepG2 Zellen eignen sich nicht für das Infektionssystem, da sie den Rezeptor CD81 nicht exprimieren, welcher für den viralen Eintritt essentiell ist [108]. Das Infektionssystem ist dem Replikonsystem insofern überlegen, als dass es die Möglichkeit bietet, den gesamten viralen Zyklus einschließlich Zusammenbau und Freisetzung viraler Partikel zu untersuchen. Dies war mit keinem der vorherigen Modelle möglich [111]. Neben der Bestätigung der Daten, die bereits mit Hilfe der Pseudopartikel generiert wurden, konnten durch dieses Modell zahlreiche Ko-Rezeptoren identifiziert und neue Erkenntnisse über den viralen Lebenszyklus von HCV gesammelt werden [108].

Das Infektionssystem hat jedoch nach wie vor einige Nachteile. Im Gegensatz zu den nicht teilungsfähigen, differenzierten Hepatozyten sind die Huh7-Zelllinien undifferenziert und teilen sich aktiv. Zudem sind sie im Gegensatz zu Hepatozyten nicht responsiv für doppelsträngige RNA [119]. Der größte Nachteil des Infektionssystems ist die Beschränkung der Nicht-Strukturproteine auf den Genotyp 2a, so dass hier die Replikon-Systeme die einzige Möglichkeit zur Untersuchung Genotyp-spezifischer Unterschiede darstellen [111].

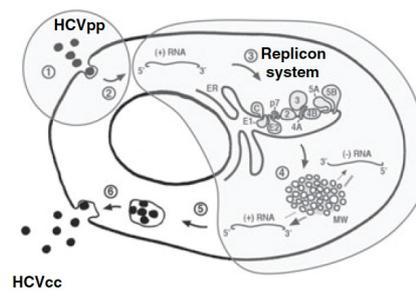


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen Pseudopartikeln (HCVpp), Replikon- und Infektionssystem (HCVcc). Pseudopartikel ermöglichen Studien des viralen Eintritts, das Replikonsystem erlaubt Untersuchungen der Auswirkungen von Nicht-Strukturproteinen auf die Wirtszelle und den genauen Verlauf der Replikation. Das Infektionssystem bietet die Möglichkeit zur Analyse aller ablaufenden Prozesse vom viralen Eintritt bis zur Freisetzung, ist aber im Bereich der Nicht-Strukturproteine auf den Genotyp 2a beschränkt (nach *Woerz et al.*, 2009).

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Das Hepatitis C Virus ist weltweit eine der führenden Ursachen für chronische Lebererkrankungen. Häufig wird die Infektion erst nach Jahrzehnten bemerkt, wenn bereits Schäden wie Leberzirrhose oder Karzinome aufgetreten sind. Die Tatsache, dass das Virus über Jahrzehnte praktisch symptomfrei in den Leberzellen seines Wirts persistiert gibt einen Hinweis darauf, dass es Strategien entwickelt hat, die Infrastruktur der Wirtszelle zu nutzen, ohne jedoch bereits nach kurzer Zeit schwerwiegende Schäden zu verursachen. Daher ist die Aufklärung des Einflusses, den das Virus auf seine Wirtszelle nimmt, von besonderem Interesse. Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Interferenz des Hepatitis C Virus mit der EGF Rezeptor Familie unter besonderer Berücksichtigung des ErbB3 Rezeptors. Vorausgegangene Untersuchungen aus diesem Labor (Dissertation von Patricia Cebula, 2010) haben gezeigt, dass Zellen, die das subgenomische Replikon des Hepatitis C Virus enthalten, eine verringerte Expression des zur Familie der EGF Rezeptoren gehörenden ErbB3 Rezeptors zeigen [120]. Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des Mechanismus, über den HCV eine Herabregulierung des ErbB3 Rezeptors bewirkt und welchem Zweck diese dient. Im

Laufe der Untersuchungen ergaben sich daraus weitere Fragestellungen. So wurde ebenfalls untersucht, welche Rolle die Hochregulation der Expression von Neuregulin 1, dem wichtigsten Liganden des ErbB3 Rezeptors, spielt und auf welchem Weg diese erfolgt. Aufgrund der Relevanz des EGF Rezeptors für den viralen Eintritt in die Wirtszelle wurden schließlich neben ErbB3 auch alle weiteren Mitglieder der ErbB Familie hinsichtlich ihrer Expression in Huh9-13 Replikonzellen untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Interaktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B des Hepatitis C Virus mit der humanen Tyrosinkinase c-Src, basierend auf den Vorbefunden von Katrin Büther und Andreas Schäfer [39], genauer untersucht. Es wurden Trunkierungs- sowie punktmutierte Konstrukte entwickelt, um das Bindemotiv innerhalb der Polymerase einzugrenzen. Diese Konstrukte wurden überexprimiert und über *Pulldown*-Experimente hinsichtlich ihrer Interaktion mit c-Src untersucht. Parallel dazu wurden Peptide, die das potentielle Bindemotiv enthalten, hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit der SH3-Domäne von c-Src mittels HSQC-Messungen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material, Substanzen und Lösungen

2.1.1 Materialien für die Zellkultur

75 cm ² Gewebekulturflaschen	Greiner; Solingen, Deutschland
6 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
10 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
15 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
6- <i>well</i> -Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
12- <i>well</i> -Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
96- <i>well</i> -Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
Minisart Plus Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius; Göttingen, Deutschland

2.1.2 Zellkulturmedien

DMEM (4,5 g/l Glukose)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMEM/Nutrient Mix F-12	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma; München, Deutschland
FCS	Perbio; Bonn, Deutschland
G418 (Geneticin)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Glutamin	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
PBS	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Cytogen; Sinn-Fleisbach, Deutschland

2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien

Ampicillin	Sigma; München, Deutschland
Aprotinin	Sigma; München, Deutschland
ATP	Sigma; München, Deutschland
Benzamidin	Sigma; München, Deutschland
β -Glycerolphosphat	Sigma; München, Deutschland
Bradford Protein-Assay	BioRad; Hercules, USA
8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate	Sigma; München, Deutschland
BSA	PAA-Laboratories; Linz, Österreich
Dharmafect 4	Dharmacon; Colorado, USA
DNase	Qiagen; Hilden, Deutschland
DTT	Sigma; München, Deutschland
EDTA	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Forskolin	Sigma; München, Deutschland
L-Glutathion, reduced	Sigma; München, Deutschland
HiPerFect™ Transfection Reagent	Qiagen; Hilden, Deutschland
Kanamycin	Sigma; München, Deutschland
Leupeptin	Sigma; München, Deutschland
Lipofectamine 2000™	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Na-Pyrophosphat	Sigma; München, Deutschland
NRG1- β 1/HRG1- β 1 EGF Domain	BioRad; Hercules, USA
Pefabloc	Fluka; St. Gallen, Schweiz
ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution	Merck Millipore; Billerica, USA
siGenome Non-Targeting siRNA Mix	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human ErbB3 siRNA	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human NRG1 siRNA	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human CREB5 siRNA	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human PRKAC A siRNA	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human PRKAC B siRNA	Dharmacon; Colorado, USA

siGenome SMARTpool Human PRKAC G siRNA	Dharmacon; Colorado, USA
Spermidine	Sigma; München, Deutschland
Triton X-100	Merck; Darmstadt, Deutschland
WL Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer; Rodgau-Jügesheim, Deutschland

2.1.4 Kits

Human IL-8 ELISA Ready-SET GO! (2nd Generation)	eBiosciences, San Diego, USA
miRNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
miScript II RT Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
NRG1 beta 1 Human ELISA Kit	Abcam; Cambridge, UK
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAshredder Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
VenorGeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs; Berlin, Deutschland

2.1.5 PCR und Klonierung

dNTP Mix	Roche; Mannheim, Deutschland
rNTP Mix	Roche; Mannheim, Deutschland
High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs; Ipswich, USA
IPTG	Promega; Madison, USA
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Oligonukleotide	MWG; Ebersberg, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs; Ipswich, USA

RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega; Madison, USA
Sequenzierungen	MWG; Ebersberg, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec; Köln, Deutschland
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems; Foster City, USA
T4-DNA Ligase	Promega; Madison, USA
T7-RNA-Polymerase	Promega; Madison, USA
Taq-Polymerase	Roche; Mannheim, Deutschland

2.1.6 Primärantikörper und Sekundärantikörper

Primärantikörper

Anti-26S Proteasome	Abcam; Cambridge, UK
β-Aktin	Abcam; Cambridge, UK
c-Src	Cell Signaling; Danvers, USA
EGFR	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
EGF R-Phycoerythrin	R&D Systems; Minneapolis, USA
EGF R-Allophycocyanin	R&D Systems; Minneapolis, USA
EGFR pTyr845	Cell Signaling; Danvers, USA
ErbB2 (29D8)	Cell Signaling; Danvers, USA
ErbB2 pTyr877	Cell Signaling; Danvers, USA
ErbB2 pTyr1221/1222	Cell Signaling; Danvers, USA
ErbB3 (1B2)	Cell Signaling; Danvers, USA
ErbB3/HER3 Allophycocyanin	R&D Systems; Minneapolis, USA
ErbB3 pTyr1289	Cell Signaling; Danvers, USA
GAPDH	Bioscience Resource Project; Saco, USA
GST (26H1)	Cell Signaling; Danvers, USA
HCV NS3	Abcam; Cambridge, UK
HCV NS5A [H26]	Abcam; Cambridge, UK
HCV NS5B (5B-3B1)	Alexis; San Diego, USA
HER-2 (c-new) FITC	eBiosciences; Wien, Österreich
p38 (C-20)	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
p38 p-Thr180/Tyr182	Cell Signaling; Danvers, USA

Sekundärantikörper

HRP-anti-Kaninchen	DAKO; Hercules, USA
HRP-anti-Maus	DAKO; Hercules, USA
Mouse IgG1 Allophycocyanin	R&D Systems; Minneapolis, USA
Mouse IgG1 FITC	eBiosciences; Wien, Österreich
Rat IgG2a Allophycocyanin	R&D Systems; Minneapolis, USA
Rat IgG2a Phycoerythrin	R&D Systems; Minneapolis, USA

2.1.7 Inhibitoren

3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX)	Sigma; München, Deutschland
Actinomycin D	Sigma; München, Deutschland
H-89, Dihydrochloride	Merck; Darmstadt, Deutschland
Mithramycin A	Sigma; München, Deutschland
PKA Inhibitor 14-22 Amide, Cell-Permeable, Myristoylated	Merck; Darmstadt, Deutschland
IKK-2 Inhibitor IV (IKK2)	Merck; Darmstadt, Deutschland
SB203580, Hydrochloride	Merck; Darmstadt, Deutschland
miScript miRNA Inhibitoren	Qiagen; Hilden, Deutschland

2.1.8 Bakterienstämme

One Shot [®] TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> JM109	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
BL21 (DE3)	Promega; Madison, USA

2.1.9 Beads

<i>DynaBeads</i>	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Glutathion Sepharose™ 4B	GE Healthcare; Freiburg, Deutschland
Ni-NTA Agarose	Qiagen; Hilden, Deutschland

2.1.10 Peptide und synthetische Gene

Synthetische Peptide	JPT; Berlin , Deutschland
Synthetische Gene	Geneart; Darmstadt, Deutschland

2.1.11 Computerprogramme und Datenbanken zur Datenauswertung

SciEd	www.scied.com
miR-Base	www.mirbase.org
Targetscan	www.targetscan.org
Primer Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/
CREB Target Gene Data Base	http://natural.salk.edu/CREB/
SPSS Statistics	

Hier nicht aufgeführte Chemikalien zur Herstellung von Pufferlösungen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Taufkirchen, Deutschland) oder Fluka (St. Gallen, Schweiz) in pro analysi (p.a.)-Qualität bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert.

Die Abwesenheit von Mykoplasmen wurde durch regelmäßige Testung der Zellkulturüberstände mittels PCR überprüft.

Das Einfrieren erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 50% in Einfriermedium (DMEM mit 10% DMSO, 20% FCS). Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Aufgetaut wurden die Zellen durch rasches Erwärmen auf 37°C und Einbringen in frisches Medium, nach 4 Stunden wurde das Medium gewechselt um DMSO-Rückstände zu entfernen. Eine Ausnahme stellen die Zelllinien Huh7.5 und Huh21-5 dar, bei welchen DMSO durch Zentrifugieren unmittelbar nach dem Auftauen und Aufnahme des Pellets in frisches Medium entfernt wurde.

Tabelle 2.1: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Zusätze
Huh7	Humane Hepatomazelllinie	DMEM/Nutrient Mix F-12	10% FCS
Huh9-13*	Humane Hepatomazelllinie Huh7, in die das subgenomische Replikon (NS3-NS5B) eingebracht wurde	DMEM/Nutrient Mix F-12	10% FCS 1mg/ml Geneticin
Huh5-15*	Humane Hepatomazelllinie Huh7, in die das subgenomische Replikon (NS3-NS5B) eingebracht wurde	DMEM/Nutrient Mix F-12	10% FCS 1mg/ml Geneticin

Huh21-5*	Humane Hepatomazelllinie Huh7, in die das HCV Voll-längen-Genom eingebracht wurde	DMEM (4,5g/l Glukose)	10% FCS 2mM Glutamin 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin 1xNEAA 0,1mg/ml Geneticin
Huh7.5**	Humane Hepatomazelllinie, die nach Einbringung des subgenomischen Replikons durch IFN-Behandlung geheilt wurde	DMEM (4,5g/l Glukose)	9% FCS 2mM Glutamin 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin 1xNEAA

* zur Verfügung gestellt von Ralf Bartenschlager, Heidelberg, Deutschland

** zur Verfügung gestellt von der Firma Apath, New York, USA

Transfektion von siRNA

Das Ausschalten von Zielgenen wird durch die Anwendung von siRNA ermöglicht. Hierbei handelt es sich um kleine synthetische Moleküle, die durch Transfektion in Zellen eingebracht werden und durch Bindung an komplementäre Sequenzen der mRNA die Expression von Zielgenen herabregulieren.

Das Aussäen der Zellen für eine Transfektion erfolgte am Vortag in 6-well-Platten. Für die Transfektion wurden zunächst die spezifische siRNA sowie ein Mischung aus drei Kontroll-siRNAs zu 5µM in 1x siRNA-Puffer verdünnt. Anschließend gab man die siRNAs sowie das Transfektionsreagenz Dharmafect 4 in vom Hersteller vorgeschriebenem Verhältnis zu antibiotikafreiem OptiMEM und inkubierte die Mischung für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das mit Dharmafect 4 versetzte Medium in vorgeschriebener Menge zu den siRNA-Ansätzen sowie zu einem siRNA-freien Kontrollansatz gegeben. Nach weiteren 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit antibiotikafreiem Kulturmedium versetzt und auf die Zellen gegeben. Nach 6 Stunden wurde das Medium gegen

antibiotikafreies Kulturmedium ausgetauscht. Die Ernte der transfizierten Zellen erfolgte nach 72 Stunden.

Transfektion von Plasmid-DNA

Die transiente Transfektion von Plasmid-DNA bewirkt die Überexpression gewünschter Proteine und ermöglicht die Untersuchung des Einflusses dieser Proteine auf die Zelle. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamin[®] 2000. Bei diesem Verfahren, welches als Lipofektion bezeichnet wird, wird die DNA zunächst an Liposomen gebunden, welche dann endozytiert werden.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden Zellen am Vortag auf 6cm-Schalen ausgesät.

Für die Transfektion wurden 2,5µg Plasmid-DNA in 50µl serumfreien OptiMEM aufgenommen und 4µl Lipofectamin[®] 2000 mit 246µl serumfreiem OptiMEM gemischt. Beide Ansätze wurden vereinigt und für 30 Minuten inkubiert, um die Bindung der DNA an die Liposomenoberfläche zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Zugabe von antibiotikafreiem Medium und die Transfektion der adhärennten Zellen mittels Zugabe des Transfektionsansatzes und Inkubation der Zellen bei 37°C. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 6 Stunden sowie nach 24 Stunden. Die transfizierten Zellen wurde nach 48 Stunden geerntet.

Transfektion von miScript miRNA Inhibitoren

Die Transfektion von miScript miRNA Inhibitoren verläuft nach dem Prinzip der Lipofektion. Die Zellen wurden am Vortag auf 6-*well*-Platten ausgesät. Der miRNA-Inhibitor beziehungsweise die Negativkontrolle wurden mit einer Konzentration von 50nM eingesetzt. Dazu wurden 5,75µl eines 20µM Stocks mit 100µl OptiMEM pro *well* sowie 12µl HiPerFect Transfektionsreagenz pro *well* zusammen pipettiert, gevortext und nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 48 Stunden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Isolierung von mRNA

Zur Ernte der mRNA wurden die in 6cm-Schalen oder 6-*well*-Platten kultivierten Zellen in 350µl RLT Puffer + β-Mercaptoethanol (1:100) lysiert. Die Lysate wurden mit Hilfe des QIAshredders homogenisiert und anschließend über das Säulensystem des RNeasy Mini Kit isoliert und aufgereinigt. Die Bestimmung der mRNA-Konzentration erfolgte anschließend spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260nm/280nm.

cDNA-Synthese aus mRNA

Nach erfolgter mRNA-Aufreinigung wurde die cDNA aus 1000ng mRNA mittels Reverser Transkriptase Reaktion synthetisiert. Im ersten Schritt wurden DNA-Kontaminationen durch gDNA *Wipe out*-Puffer entfernt. Anschließend wurde die mRNA bei 42°C durch die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz wurde anschließend mit 100µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Als Kontrolle für die Reinheit der Synthese diente ein Ansatz ohne Zugabe des Enzyms.

Isolierung von miRNA

Für die Isolierung von miRNA aus Zellen wurde das miRNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Ernte der miRNA erfolgte nach Kultivierung der Zellen in 6cm-Schalen oder 6-*well*-Platten in 700µl QIAzol Lysis Reagenz. Dabei handelt es sich um eine Phenol- und Guanidinthiocyanat-haltige Lösung, die neben ihrer lysierenden Funktion auch als RNase-Inhibitor fungiert und zelluläre DNA sowie Proteine aus dem Lysat zu entfernen vermag. Dies gelingt über einen Zentrifugationsschritt nach Chloroform-Zugabe, wobei zwei Phasen entstehen. Die miRNA enthaltende, wässrige Phase wird abgenommen und zur weiteren Isolierung verwendet.

Die Reinigung der miRNA erfolgt über eine Silicamembran nach Vorschrift des Herstellers.

cDNA-Synthese aus miRNA

Nach erfolgter miRNA-Aufreinigung wurde die cDNA aus 1000ng miRNA mittels Reverser Transkriptase Reaktion unter Verwendung des miScript II RT Kits (Qiagen) synthetisiert. Hierfür wurde die miRNA für 60 Minuten bei 37°C durch die miScript Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz wurde anschließend mit 80µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Als Kontrolle für die Reinheit der Synthese diente ein Ansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase. Für die RT-PCR wurde die cDNA ein weiteres Mal im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

Quantitative *Real-Time* PCR

Die quantitative *Real-Time* Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von DNA, die auf dem Prinzip der normalen Polymerasekettenreaktion beruht. Gemessen wird die Fluoreszenz, die proportional zur Zunahme der PCR-Produkte in Echtzeit zunimmt. Dazu verwendet man den Cyanin-Farbstoff *Sybr Green I*, der an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet und so einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex bildet. Quantifiziert werden die Fluoreszenzsignale in der exponentiellen Phase der PCR, da in dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen.

Da der Farbstoff unspezifisch vorhandene Doppelstrang-DNA erkennt ist es von größter Bedeutung, Oligonukleotide (Primer) zu designen, die spezifisch für das gewünschte DNA-Produkt sind und eine geringe Neigung zur Bildung von Primer-Dimeren zeigen. Mit Hilfe der Primer-Blast Funktion der *pubmed* Datenbank bekommt man Informationen zu Spezifität und Hybridisierungsgefahr der Primer durch komplementäre Basen. Des Weiteren sind Faktoren wie Schmelztemperatur ($T_m \sim 59^\circ\text{C}$) und GC-Gehalt ($\sim 50\%$) sowie die Länge des Amplikons ($\sim 90\text{-}120\text{bp}$) zu berücksichtigen. Die gewählten Primer wurden durch eine Schmelzkurvenanalyse in der RT-PCR auf ihre Eignung untersucht.

Für die RT-PCR wurden 1,2µl cDNA und 12,5µl *Sybr Green* sowie je 1µl (10pmol) *Forward*- und *Reverse*-Primer pro Kavität in der 96-well-Platte eingesetzt.

In der RT-PCR wurde die cDNA zunächst für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Im weiteren Verlauf erfolgte die Amplifizierung der DNA zweistufig, das heißt es wurde bei 95°C für 15 Sekunden denaturiert und anschließend erfolgten die Hybridisierung

des Primers an die DNA und die Elongation bei 60°C für 1 Minute. Dieser Zyklus wurde 40 Mal durchlaufen. Zur Auswertung der Daten wurde die ViiA™7 RUO Software (2010) benutzt und das $\Delta\Delta C_T$ -Verfahren angewendet [121]. Der C_T -Wert (*cycle threshold*) beschreibt den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz des DNA-Farbstoffkomplexes erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Der C_T -Wert der Referenz (*Housekeeping-Gen*), wird vom C_T -Wert des Amplikons subtrahiert. Als Referenz diente humanes SDHA (Succinatdehydrogenase Komplex, Untereinheit A).

Die Messung der aus miRNA gewonnenen cDNA in der RT-PCR unterscheidet sich in einigen Punkten von der oben beschriebenen RT-PCR. Einem 15 minütigem Aktivierungsschritt folgten 40 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt bei 94°C, der Anlagerung der Primer für 30 Sekunden bei 55°C und schließlich der Extension für 34 Sekunden bei 70°C. Für die Auswertung wurde der C_T -Wert den Angaben des miRNA-Kit Herstellers Qiagen für die Verwendung des Gerätes der Firma Applied Biosystems für 1-3ng miRNA manuell auf 0,02 eingestellt.

Tabelle 2.2 Primer für die RT-PCR

Primer-Name	Sequenz
ADAM17 for ADAM17 rev	5' agtgcagtgacaggaacagtcctt 3' 5' ggacacgcctttgcaagtagcatt 3'
ADAM19 for ADAM19 rev	5' gaggggcgagaactgatcct 3' 5' ccaattccgtgtggtggtt 3'
BACE1 for BACE1 rev	5' gcagtaactttgcagtggtg 3' 5' ccctgggtgtagggcacata 3'
CREB1 for CREB1 rev	5' tccacaagtccaaacagttcag 3' 5' tcccttcgctttgggaatca 3'
CREB3 for CREB3 rev	5' gtagaaaagaggggaccaga 3' 5' aataagcccctccttctccaa 3'
CREB5 for CREB5 rev	5' gcagaagaactcaccagaca 3' 5' tggctgttattgggcagtct 3'

CREBBP for CREBBP rev	5' ggtttccccgcaaatactg 3' 5' gcttgactaaagggctgtcca 3'
CXCL8-2 for CXCL8-2 rev	5' agaagttttgaagagggctgaga 3' 5' cagaccacacaatacatgaagtg 3'
EGFR for EGFR rev	5' catccagtggcgggacatag 3' 5' gggacagcttgatcacact 3'
ErbB2 for ErbB2 rev	5' tgccgttggggttctctct 3' 5' aggactggcagggagtcgca 3'
2ErbB3 for 2ErbB3 rev	5' gcgccagctccgcttgactc 3' 5' tcggtccctcacgatgtccct 3'
ErbB4 for ErbB4 rev	5' tgggcaacctggagataacc 3' 5' ccagaggcaggtaacgaaact 3'
hsa-mir-125a-5p	5' tccctgagacccttaacct 3'
hsa-mir-125b-5p	5' tccctgagaccctaactgt 3'
hsa-mir-205-5p	5' tccttcattccaccggagtc 3'
hSDHA for hSDHA rev	5' agatgtggtgtctcggtcgat 3' 5' cgtgatctttctcagggcca 3'
NGR1 for NRG1 rev	5' tcaagtgggtcaagaatgggaa 3' 5' atcagccagtgatgctttgt 3'
NRG2 for NRG2 rev	5' gcccttctaccgttgggtca 3' 5' tcctccaccttcacctgttg 3'
NRG3 for NRG3 rev	5' gtctcaatgatggcgagtgtct 3' 5' aacggactccttggtagcct 3'
NRG4 for NRG4 rev	5' aagtcgtttgcctgaatggg 3' 5' agcctgggagaaaaacctct 3'
NS3 JFH-1 for NS3 JFH-1 rev	5' ctacggtgtgcgccagag 3' 5' cccaaacggtacaggagagg 3'

NS5A JFH-1 for NS5A JFH-1 rev	5' ccgttgctggttgctct 3' 5' gttgctggagggcttctgat 3'
PRKAC A for PRKAC A rev	5' aaatgggaaagtcccgtca 3' 5' gttcccggctccttggtt 3'
PRKAC B for PRKAC B rev	5' ctagccaaagccaaagaagact 3' 5' caaatgaacctgtccaaggg 3'
4PRKAC G for 4PRKAC G rev	5' gggttggcgacatcaagaac 3' 5' gcctgtgtacttcgggatgaa 3'
Sp1 for Sp1 rev	5' gcacctgccctactgtaaa 3' 5' cactttcccacagccttga 3'
Sp3 for Sp3 rev	5' catccaggagagaatgctgaca 3' 5' agaatcaccactgagctgcc 3'

Tabelle 2.3 Intron-Exon-Primer für die RT-PCR

Primer-Name	Sequenz
Intron12Exon2 f Intron12Exon2 r	5' gctgagaatttggtccagcc 3' 5' ggtattggttctcagcatcgc 3'
Exon2Intron23 f Exon2Intron23 r	5' cttgagattgtgctcacggg 3' 5' aaggaaggagggttctagggg 3'
Intron45Exon5 f Intron45Exon5 r	5' acaagcctttcttagccctga 3' 5' agtcttctgatccaggacccc 3'
Exon7Intron78 f Exon7Intron78 r	5' gtccacagcctctgtctac 3' 5' ccttcccctcagacacttacg 3'
Intro1011Exo11f Intro1011Exo11r	5' aagaaggctccctgccata 3' 5' aactgaagttgtgcatgtgg 3'
Exo18Intro1819f Exo18Intro1819r	5' gcttaaagtgcttggtcgg 3' 5' cccttgccttagatgcctt 3'

Intro2021Exo21f	5' gtgactgattcccccaacctt 3'
Intro2021Exo21r	5' ttgagtagcacgtttcgggc 3'
Exo22Intro2223f	5' gtggatggccttgagagat 3'
Exo22Intro2223r	5' gggccagtgatggtagagag 3'

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion. Hierfür wurde die hitzestabile Taq-Polymerase der Firma Roche verwendet. Für die PCR Reaktion wurden je 2,5mM dNTPs, 10pmol *sense*- und *antisense*-Primer, 1-2,5 Einheiten der Polymerase und 10-80ng Template zusammen pipettiert. Die PCR-Reaktionen wurden mit Mg²⁺-haltigem Puffer und sterilem H₂O auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt. Der PCR-Zyklus erfolgte in den Schritten: Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges (94°C), Primer-Hybridisierung (*annealing*) an der einzelsträngigen DNA (Temperatur anhängig von der Primer-Sequenz) und anschließender Verlängerung der Primer (*extension*, 72°C). Die Vervielfältigung der DNA-Matrize wurde durch mehrfaches Wiederholen der einzelnen Zyklen (20-35 Zyklen) erreicht. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler PTC-200 der Firma MJ-Research durchgeführt.

Tabelle 2.4 Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion

Primer-Name	Sequenz
NS5B M1/2 sense	5' cgaattcggctatgactagataactctgc 3'
NS5B M1/2 antisense	5' actcgaggtagctaccacgcagcccgcgcaa 3'
NS5B M1 sense*	5' ctgcccccgctggggacgcgccc aaa 3'
NS5B M2 sense*	5' gaggaggagggggaagaagt 3'
NS5B 461-488*	5' gcaagccagctcgccttatcgtattccc 3'

* Primer für die Mutagenese-PCR

Elektrophoretische Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion wurde die amplifizierte DNA zu Kontrollzwecken im 1-1,5% Agarose-Gel, je nach Größe, aufgetrennt. Als Puffer für die Herstellung der Gele wie auch als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (242g/l Tris, 100ml/l EDTA 0,5M pH 8,0, 57,1ml/l Essigsäure) verwendet. Das Anfärben der DNA in den Agarosegelen erfolgte durch Zugabe von 5µl Ethidiumbromid (10mg/ml) unmittelbar vor dem Gießen des Gels. Als Größenmarker wurde *SmartLadder* der Firma Eurogentec mit aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Orange G-haltigem Auftragspuffer (3,7g/l EDTA, 150g/l Ficoll, 1g/l Orange G) in einem Verhältnis von 1:5 versetzt. Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte mit Hilfe des Doc-Print-Geldokumentationssystems der Firma Peqlab.

Aufreinigung und Extraktion von DNA

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte je nach Reinheit im Kontrollgel entweder direkt durch das QIAquick PCR Purification Kit oder nach elektrophoretischer Auftrennung des gesamten PCR-Ansatzes mittels QIAquick Gel Extraction Kit nach Vorschrift des Herstellers.

Restriktion

Der Restriktionsverdau bietet die Möglichkeit zur Umklonierung eines Konstruktes in einen anderen Vektor oder zur Kontrolle vorhandener Plasmide hinsichtlich der Größe ihres Inserts. Verwendet wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II, die palindromische Sequenzen schneiden. Alle eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen und die Reaktionsbedingungen (Puffer, Zusatz von BSA) nach Herstellerangaben gewählt.

Die Hydrolyse der Plasmid-DNA erfolgte entweder im analytischen oder im präparativen Maßstab. Für analytische Ansätze wurden 0,5-1µg DNA und 10-20 Einheiten Enzym mit dem entsprechenden Puffer auf ein Endvolumen von 10µl aufgefüllt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Für präparative Reaktionsansätze wurden 10µg DNA und 30-40 Einheiten des Restriktionsenzym verwendet, auf ein Endvolumen von 100µl aufgefüllt und 3-4 Stunden inkubiert. Zur Überprüfungen des

Restriktionsverdau wurden die Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt und wie oben beschrieben analysiert. Der präparative Ansatz wurde vollständig aufgetragen und das Fragment gewünschter Größe über ein Gelextraktion aufgereinigt.

Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach Herstellerangaben 50ng Insert und 50ng Vektor nach vorherigem Restriktionsverdau mit identischen Enzymen in einem Ansatz mit der T4 Ligase der Firma New England Biolabs und entsprechendem Ligationspuffer vereinigt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz über das PCR Purification Kit aufgereinigt.

Kultivierung von Bakterienstämmen für die Plasmidisolierung

Für die Kultivierung der Bakterienstämme Top10 und JM109 wurde LB-Medium verwendet (5g/l Hefeextrakt, 10g/l Trypton, 5g/l Natriumchlorid). Für Agarplatten wurde noch 15g/l Agar hinzugefügt. Selektionsmedien enthielten zusätzlich Ampicillin (50mg/l) oder Kanamycin (25mg/l). Zwecks Kroykonservierung wurden Glycerolstocks für die Lagerung bei -80°C aus 800µl Übernachtkultur und 200µl Glycerol hergestellt.

Tabelle 2.5 *Escherichia coli* - Klonierungsstämme

Bakterienstamm	Genotyp
Top10	F^- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
JM109	<i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk.</i> , <i>mk</i> +) <i>relA1</i> <i>supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>laqlqZ</i> Δ M15]

Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Da *Escherichia coli* Bakterienstämme keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Plasmiden haben, ist eine Vorbereitung auf die Transformation erforderlich.

Zunächst wurde ein Verdünnungsausstrich aus einem Glycerolstock auf LB-Agar angelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus einem Klon wurde dann eine Übernachtskultur in 2,5ml LB-Medium angelegt, die am nächsten Tag der Animpfung von 250ml LB-Medium diente, welches mit 20nM MgSO₄ versetzt war. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4–0,6 wurden die Zellen bei 4.000rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 100ml TFB1-Puffer (30mM Kaliumacetat, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 100mM RbCl, 15% Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei gleicher Einstellung und die Resuspendierung des Pellets in 10ml TFB2-Puffer (100mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl, 15% Glycerin, pH 6,5). Nach weiteren 15 bis 60 Minuten Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Die kompetenten JM109-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, wenige Nanogramm DNA zugegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden, welcher die Entstehung von Poren in der Membran und somit die Aufnahme der DNA bewirkte. Nach dem Hitzeschock wurde der Transformationsansatz sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt und anschließend zu 900µl vorgewärmten SOC-Medium (0,5g/l Hefeextrakt, 2g/l Trypton, 2,5mM KCl, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 20mM Glukose, pH 7,0) gegeben und unter Schütteln für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 100µl des Ansatzes wurden dann auf eine LB-Agarplatte mit erforderlichem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformation in One Shot[®] TOP10 erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen).

Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgte je nach Maßstab mittels QIAprep Spin Miniprep oder Maxiprep Kit (Qiagen).

Konzentrationsbestimmungen wurden unter Verwendung eines *NanoDrop™ Spectrophotometers* bei einer Extinktion von 260nm durchgeführt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Zelllyse

Für den Aufschluss der Zellen und die Isolation der zytoplasmatischen Fraktion wurden die kultivierten Zellen zunächst mit eiskaltem PBS (w $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 0,1mM Natrium-ortho-vanadat) gewaschen. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte in modifiziertem Triton-Lyse-Puffer (1% Triton X-100, 20mM Tris/HCl pH 7,4, 5µg/ml Aprotinin, 4mM Benzamidin, 2mM EDTA, 10% Glycerol, 50mM β -Glycerolphosphat, 5µg/ml Leupeptin, 136mM NaCl, 20mM Natrium-Pyrophosphat, 1mM Na_3VO_4 , 0,2mM Pefabloc, 0,2% SDS), wobei das Volumen des Lysepuffers in Abhängigkeit von Größe der Gewebekulturschale und Konfluenz der Zellen zwischen 80µl und 150µl variierte. Nach der Ernte der Zellen wurden diese gevortext und 10 Minuten auf Eis inkubiert um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurde der Zelltrümmer durch einen 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 14.000rpm und 4°C entfernt. Die Überstände konnten dann mittels Bradford-Test auf ihren Proteingehalt untersucht und für die SDS-Page verwendet werden.

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test ist ein photometrisches Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen und wurde nach Angaben des Herstellers BioRad durchgeführt. Der Triphenylmethanfarbstoff *Coomassie-Brilliant-Blau G-250* bildet mit kationischen, unpolaren Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung Komplexe, wodurch sich der ursprünglich rote Farbstoff in seiner blauen, anionischen Sulfonatform stabilisiert und sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470nm auf 595nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption verglichen mit dem freien Farbreagenz ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration.

SDS-Page und Western Blot

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse in einem elektrischen Feld. Jeweils 30µg Protein pro Probe wurden durch mTLP im Volumen angepasst und vor der Auftrennung im Gel mit 4x Lämmli-Puffer (250mM Tris/HCl pH 6,8, 40% Glycerol, 5% SDS, 0,002% Bromphenolblau, 8% β-Mercaptoethanol) im Verhältnis 3:1 versetzt. Die Proben wurden dann 5 Minuten bei 95°C denaturiert, anschließend kurz zentrifugiert und dann auf das Gel aufgetragen. Der prozentuale Acrylamid-Gehalt im Gel variierte nach Größe der zu detektierenden Proteine zwischen 10% und 12%. Als Größenstandard wurde Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard (BioRad) mit aufgetrennt. Im Gelektrophoresesystem der Firma Biometra wurde im Sammelgel eine Spannung von 100V angelegt, welche zur Auftrennung der Proteine im Trenngel auf 160V erhöht werden konnte.

Zur späteren Immundetektion wurden die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine zunächst auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen mittels Semi-Dry-Verfahren in einer Elektroblotting-Apparatur (Biometra) übertragen. Dabei wurde eine Stromstärke von 1mA/cm² angelegt, die Dauer des Vorgangs variierte je nach Größe der Proteine zwischen einer und zweieinhalb Stunden. In Anodenpuffer (Anodenpuffer 1: 0,3M Tris, 20% Methanol; Anodenpuffer 2: 0,025M Tris, 20% Methanol) und Kathodenpuffer (0,04M 6-Aminocaprinsäure, 20% Methanol) getränktes *Whatman*-Papier (Schleicher & Schuell) sicherte den Stromfluss zwischen den Elektroden und somit den Transfer der Proteine.

Das Blockieren der freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran erfolgte in 5% BSA/TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Primärantikörper über Nacht bei 4°C (schüttelnde Inkubierung) auf die Membran gegeben. Drei zwanzigminütige Waschschrte mit einem Detergenz-haltigen Puffer (TBS-T) sorgten für die Entfernung unspezifisch gebundenen Antikörpers. Anschließend wurde für eine Stunde der zum Primärantikörper spezifische Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Nach weiteren drei zwanzigminütigen Waschschrten konnten die Proteine durch Zugabe von WL Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer) und Auflegen von ECL-Filmen (GE Healthcare) in einer Entwicklermaschine der Firma Kodak detektiert werden. Zur Vorbereitung für eine weitere Immundetektion wurden die Membranen mit *ReBlot*

Plus Strong Antibody Stripping Solution (Millipore) von Antikörperrückständen befreit.

ELISA

Der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Proteinen. Dabei wird zunächst eine Mikrotiterplatte mit einem Primärantikörper beschichtet und anschließend das gewünschte Protein mittels Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Oberfläche immobilisiert. Ein Enzymgekoppelter Zweitantikörper setzt dann einen Farbstoff um, welcher photometrisch gemessen wird und so die Berechnung der Antigenmenge durch die vorherige Berechnung der Regression eines durch den Hersteller zu Verfügung gestellten Standards ermöglicht.

Zur Vorbereitung des ELISAs wurden Zellen auf 6-well-Platten ausgesät. Nach definierten Zeitpunkten wurden Überstände abgenommen, für 20 Minuten bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach Herstellerangaben.

FACS-Analyse

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS: *fluorescence activated cell sorting*) oder auch Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Messung der Expression von Proteinen auf der Oberfläche vitaler Zellen mittels Antikörper-Färbung. Der Einfachheit halber wurden Antikörper verwendet, an welche Fluoreszenzfarbstoffe wie *Allophycocyanin* (APC), *Phycoerythrin* (PE) oder Fluoresceinisotiocyanat (FITC) gekoppelt sind, so dass ein einziger Färbungsschritt ausreichend ist. Zur Vorbereitung der FACS-Analyse wurden die Zellen in 6-well-Platten ausgesät und je nach Versuchsaufbau 48 bis 96 Stunden nach Aussaat für die Messung vorbereitet. Dazu wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (37°C) gewaschen, anschließend wurden 250µl Trypsin pro Kavität zugegeben und die Platten für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 1ml FACS-Puffer (483ml PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 10ml FCS, 2ml EDTA 0,5M, 5ml Natriumazid 10%) abgestoppt. Die Zellen wurden ab gespült und jeweils 500µl der Suspension in ein

FACS-Röhrchen überführt, in welches bereits 1ml FACS-Puffer (4°C) vorgelegt wurde. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 1.500rpm, 4°C) wurde der Überstand dekantiert, die Pellets in 100µl FACS-Puffer versetzt mit Fluoreszenz-markiertem Antikörper nach Herstellerangaben resuspendiert und für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2ml FACS-Puffer erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Danach wurden die Pellets einmal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Für die Messung wurden die Pellets in etwa 250µl FACS-Puffer, abhängig von der Pellet-Größe, resuspendiert. Zunächst werden das Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) und Seitwärtsstreulicht (SSC = *side scatter*) eingestellt für die zu messenden Zelltypen eingestellt. Zellen unterscheiden sich in ihrem Volumen und ihrer Granularität. Das Vorwärtsstreulicht FSC ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht SSC ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel und wird von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns sowie der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst. Anschließend wurde der Laser so eingestellt, dass die ungefärbte Isotypenkontrolle ihr Maximum im Histogramm bei 10^2 A.E. (Arbiträre Einheiten) hat. Danach erfolgte die Messung der Antikörper-gefärbten Proben mit den zugehörigen Isotypenkontrollen. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo-Software (Version 7.6.1) nach Angaben des Herstellers.

Expression und Aufreinigung ^{15}N -markierter c-Src-SH3-Domäne

Die Expression und Aufreinigung sowie alle weiteren Vorbereitungen für die NMR-spektroskopischen Messungen erfolgten in Kooperation mit der AG Willbold im Forschungszentrum Jülich unter Anleitung von Frau Dr. Silke Hoffmann.

Zunächst wurde die GST-c-Src-SH3-Domäne im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) überexprimiert. Hierfür wurde Isotopen-markiertes M9-Medium (9,1g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 3g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5g/l NaCl, 0,5g/l [^{15}N] NH_4Cl (Cambridge isotopes, Andover, USA), 100µM CaCl_2 , 2mM MgSO_4 , 5mg/l Thiaminhydrochlorid, 0,2% (v/v) TS2 (Spurenelemente), 0,1% (v/v) Vitamincocktail, 4g/l Glukose, 10µM Fe(III)-Citrat) verwendet. Der Einbau des Stickstoff-Isotops ^{15}N ermöglicht die NMR-spektroskopische Messung des Proteins. Zunächst wurden Klone von einer LB-Platte in M9-Medium überführt und bei 200rpm und 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8

inkubiert. Dann wurde 1mM IPTG zugefügt und die Kultur für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 5.000xg für 15 Minuten zentrifugiert, das Bakterienpellet einmal mit 1xPBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Zur Kontrolle der Überexpression wurden vor und nach Induktion mit IPTG Proben abgenommen, die dann im 16% SDS Gel aufgetrennt und über eine Coomassie-Färbung analysiert wurden. Für den Aufschluss der Zellen wurden die Pellets auf Eis aufgetaut und in 20ml Lysispuffer resuspendiert (1xPBS pH7,3, 0,5% Triton X 100, 5mM DTT, 1 Complete Tablette, 20µg/ml DNase A, 20µg/ml Lysozym), drei Mal für 20 Sekunden mit Ultraschall behandelt, anschließend für 30 Minuten bei 4°C unter Schütteln inkubiert und schließlich weitere drei Mal für 20 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz bei 50.000xg und 14°C für 45 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend in ein Falcon überführt.

Die Aufreinigung der GST-c-Src-SH3-Domäne erfolgte im Anschluss über GSH-Sepharose. Hierfür wurden zunächst 2ml GSH-Sepharose auf eine Säule gegeben und mit dem 5-fachen Säulenvolumen Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit dem 1-fachen Säulenvolumen 1xPBS äquilibriert, danach wurde der Überstand aus dem Zellaufschluss auf die Säule gegeben. Es folgte ein Waschschrift mit 80ml Bindungspuffer (1x PBS pH7,3, 0,1% Triton X-100) und anschließend die Elution der GST-c-Src-SH3-Domäne mit Elutionspuffer (50mM Tris/HCl pH8, 10mM reduziertes Glutathion). Da die SH3-Domäne für die NMR-spektroskopische Messung verwendet werden sollte, musste schließlich noch das GST-Tag abgespalten werden. Hierfür wurde die Elutionsfraktion für 2 Stunden in 2 Liter *PreScission Cleavage* Puffer (50mM Tris/HCl pH7,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM PMSF) dialysiert und nach Zusatz der *PreScission* Protease über Nacht bei 4°C unter Rühren in *PreScission Cleavage* Puffer inkubiert. Zur Kontrolle der Abspaltung wurde ein Teil der Probe im 14% PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend über eine Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 2.1 rechter Teil).

Der letzte Schritt der Aufreinigung umfasst die Fraktionierung von GST-Tag und freier c-Src-SH3 Domäne durch Größenausschlusschromatographie über eine *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC). Als Laufpuffer wurde entgastes Tris/HCL 50mM pH7,0 mit 150mM NaCl und 1mM EDTA verwendet (Abb. 2.1 linker Teil).

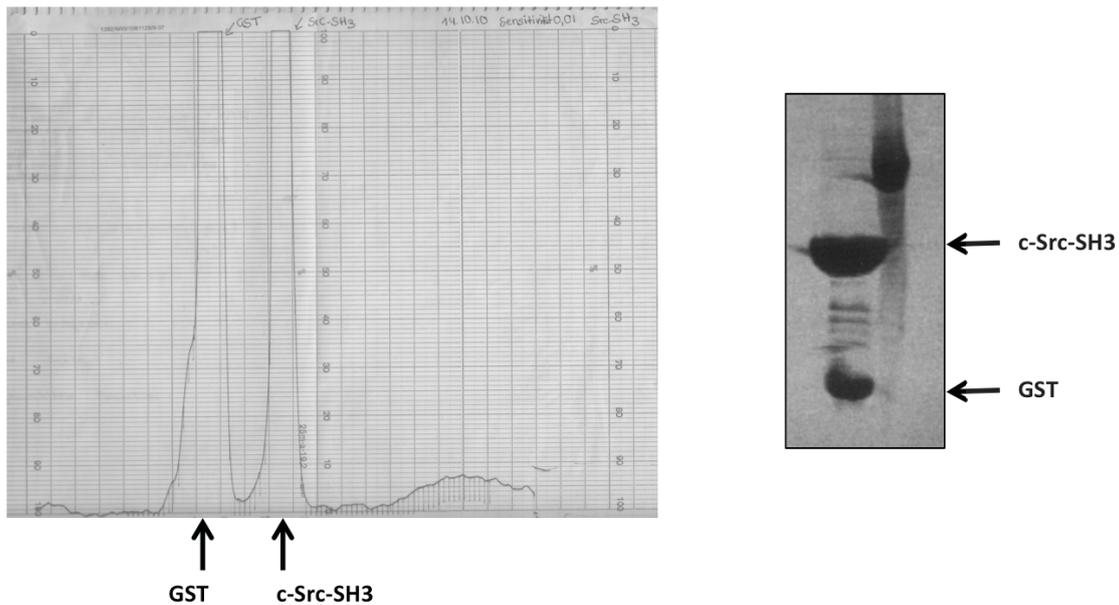


Abbildung 2.1: Fraktionierung der freien c-Src-SH3-Domäne und GST-Tag über eine Größenausschlusschromatographie.

Um den Laufpuffer zu entfernen, wurde die c-Src-SH3-Domäne gegen 20mM Natriumphosphat-Puffer dialysiert und dann mittels Vakuumkonzentrator (SpeedVacTM Concentrator System, Thermo Scientific) lyophilisiert.

Vorbereitung der ¹⁵N-c-Src-SH3-Domäne für die HSQC Messung

4mg der lyophilisierten SH3-Domäne wurden in 5ml Wasser gelöst, die Konzentration bestimmt und über Zentrifugalkonzentratoren auf eine für die NMR-spektroskopische Messung geeignete Konzentration von 100 μ M eingestellt. Bei einer Messtemperatur von 25°C wurde die ¹⁵N-gelabelte SH3-Domäne mit einem 600MHz NMR-Spektrometer gemessen. Die Messung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Willbold im Forschungszentrum Jülich unter Anleitung durch Herrn Dr. Rudolf Hartmann.

Vorbereitung der NS5B-Peptide für die HSQC-Messung

Tabelle 2.6: Peptidsequenzen

Peptid – Name	Peptid - Sequenz	MW (g/mol)	Extinktions- koeffizient
M1 (341 – 360)	TEAMTRYSAPPGDPPKPEYD	2263,50	2980
M2 (384 – 400)	YLTRDPTTPLARAAWET	2203,28	6990
M1_minusPD1_Like	Acetyl- TEAMTAASAAPGDAPKPEYD- NH ₂	2034,21	1490
M1_minus_classII	Acetyl- TEAMTRYSAPAGDAPAPEYD- NH ₂	2154,33	2980
M2_minus_CI_CII_Like	Acetyl- YLTADATTALAAA WET-NH ₂	1780,98	6990
M2_minus_CI_CII_Like	Acetyl- YLTADATTALAAA WET-NH ₂	1780,98	6990

Die in Tabelle 2.6 aufgeführten Peptide wurden in 500µl Wasser gelöst und mittels Vacuum-Konzentrator eingengt. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal wiederholt, um störende TFA-Reste aus der Synthese zu entfernen. Beim letzten Schritt wurden die Peptide in 200µl Wasser aufgenommen, dann im Verhältnis 1:100 in 20mM Natriumphosphatpuffer mit 5mM NaCl verdünnt. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung im UV/VIS-Spektrometer und die Berechnung der in der HSQC-Messung einzusetzenden Menge (200µM).

HSQC-Messung

Die HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)-Messung ist ein NMR-spektroskopisches Verfahren zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei wird zunächst das Spektrum des ersten Interaktionspartners aufgezeichnet, dann der

zweite Interaktionspartner in geeigneter Menge zugegeben und erneut ein Spektrum aufgenommen. Veränderungen im Spektrum weisen darauf hin, dass eine Interaktion stattfindet. Titrations erlauben eine Aussage über die Affinität zwischen den Interaktionspartnern.

Bei der hier beschriebenen HSQC-Messung wurde untersucht, ob eine Interaktion zwischen der isolierten, ^{15}N -markierten SH3-Domäne von c-Src und den PxxP-Motiven 1 (341-360) und 2 (384-400) der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B stattfindet. Dazu wurde zunächst ein HSQC-Spektrums der SH3-Domäne (100 μM) aufgenommen, dann wurde nach Zusatz je eines Peptids (200 μM) erneut gemessen.

Kultivierung von Bakterienstämmen für die Proteinexpression

Für die Kultivierung des Bakterienstammes BL21 (DE3) zur Vorbereitung der Proteinexpression wurde LB-Medium verwendet. Für Plattenkulturen wurde noch 15g/l Agar hinzugefügt. Selektionsmedien enthielten zusätzlich Ampicillin (50mg/l). Zwecks Konservierung wurden Glycerolstocks für die Lagerung bei -80°C aus 800 μl Übernachtskultur und 200 μl Glycerol hergestellt.

Tabelle 2.7: *Escherichia coli* - Expressionsstamm

Bakterienstamm	Genotyp
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F dcm ompT hsdS (r_B - m_B -)gal λ (DE3)

Expression und Aufarbeitung von GST- und His-Fusionsproteinen

Zur Vorbereitung der Expression von Fusionsproteinen wurden Plasmide in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) transformiert. Dafür wurde zunächst eine BL21 (DE3) Kultur über Nacht in antibiotikafreiem LB-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 50ml LB-Medium mit der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,5 unter gleichbleibenden Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 15 Minuten bei 2.500xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4,5ml eiskaltem TSS-Puffer (5g PEG-8000, 1,5ml MgCl_2 , 2,5ml DMSO, LB-Medium ad 50ml, steril filtriert) resuspendiert und auf Eis gelagert. Pro

Transformationsansatz wurde 1ml der kompetenten Zellen in 15ml Falcons überführt und 2-5µl Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde für 45 Minuten auf Eis inkubiert, dann erfolgte ein Hitzeschock für 2 Minuten bei 42°C. Die Proben wurden anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Dann wurden 100µl der Zellen zu 900µl LB-Medium gegeben und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurden 100µl des Ansatzes auf Amp^R-LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Expression wurde zunächst eine Vorkultur in 2ml 2xYT-Medium (10g/l Hefeextrakt, 16g/l Trypton und 5g/l Natriumchlorid) mit Antibiotikum angelegt (Schüttelkultur, 37 °C, 8 Stunden). Als Inokulum diente ein Klon des Plasmid-enthaltenden *E. coli* BL21 (DE3). Diese Vorkultur wurde dann in 150ml 2xYT-Medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ überprüft und bei einer OD₆₀₀ von 1-2 die Proteinexpression mit 0,1-1mM IPTG induziert. Nach 2 bis 4 Stunden bei 30°C wurde die Kultur für 10 Minuten bei 7.700xg und 4°C abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 7,5ml eiskaltem PBS mit Complete Tablette resuspendiert. Als Protease-Inhibitor wurden 750µl Lysozym 10mg/ml in Tris/HCl 25mM pH 8 zugefügt. Nachdem die Proben 30 Minuten auf Eis standen, wurden sie drei Mal für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden 1,2ml Glycerol, 600µl 20% Triton X-100 in PBS und 1,95ml NaCl (210mg in 1,95ml) mit einer Endkonzentration von 300mM zugegeben. Die Proben für 30 Minuten bei 4°C im Überkopffrotor inkubiert, anschließend für 10 Minuten bei 4°C und 12.000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Falcons überführt und bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

GST-Pulldown-Assay

Der *GST-Pulldown* ist ein Verfahren zur Untersuchung der Interaktion eines GST-getaggen Proteins mit einem beziehungsweise mehreren weiteren Proteinen, zum Beispiel aus Zelllysaten. Für den *Pulldown* wurden GST-Fusionsproteine zu 100µl gewaschener Glutathion Sepharose 4B gegeben und für 2 Stunden bei 4°C im Überkopffrotor inkubiert. Zur Kontrolle diente das nicht an ein weiteres Protein fusionierte *GST-Tag*, um eine unspezifische Interaktion auszuschließen. Anschließend wurden die Proben für 1 Minute bei 4.000rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500µg

Zellextrakt zu den Sepharose *Beads*. Die Zellysate wurden zuvor in einem als *Pre-Clearing* bezeichneten Prozess mit gewaschener Sepharose für 2 Stunden inkubiert, so dass unspezifische Bindungspartner der GSH-Sepharose entfernt wurden. Als Kontrolle wurde zusätzlich Zellysat auf 100µl gewaschene Sepharose gegeben, um unspezifische Interaktionen auszuschließen. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden oder über Nacht im Überkopffrotor bei 4°C. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Sepharose *Beads* drei Mal mit je 1ml mTLP gewaschen und anschließend in 40µl 2xLämmli + β-Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 95°C eluiert.

Die Proben wurden anschließend für 1 Minute bei 13.200rpm zentrifugiert und der Überstand im 12% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot konnten dann gezielt Interaktionspartner über Antikörperfärbung untersucht werden.

His-Pulldown-Assay

Der His-*Pulldown* Assay unterscheidet sich nur geringfügig vom GST-*Pulldown* Assay. Anstelle von Glutathion Sepharose 4B wird hier Ni-NTA Agarose verwendet, da eine Kopplung von His-Fusionsproteinen an dieses Material über eine His-Nickel-Interaktion möglich ist.

Co-Immunopräzipitation

Für die Co-Immunopräzipitation wurden die Zellen in 10cm-Schalen für drei Tage ausgesät. Für die Ernte wurden die Zellen zwei Mal mit PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen, in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ aufgenommen und in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäßen für 2 Minuten bei 2.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 300µl TLP resuspendiert. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 20 Minuten bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Je nach Proteinausbeute wurden 300-500µg Protein mit TLP Puffer auf ein Gesamtvolumen von 400µl aufgefüllt und Erst-Antikörper nach Herstellerangaben beziehungsweise IgG zu Kontrollzwecken sowie 1-2µg biotinylierter Zweit-Antikörper (spezifisch gegen den verwendeten Erst-Antikörper) zugefügt. Das Lysat-Antikörpermischung wurde dann für 2 Stunden bei 4°C im

Überkopffrotor inkubiert und anschließend wurden zu jeder Probe 25µl gewaschene und in 100µl TLP resuspendierte Streptavidin-gekoppelte Magnetic *Beads* (*DynaBeads*) zugefügt. Nach weiteren 2 Stunden Inkubation bei 4°C im Überkopffrotor wurden die Magnetic *Beads* mittels Magnet pelletiert und der Überstand nach etwa 30 Sekunden abgenommen. Die *Beads* wurden einmal mit 1ml TLP und anschließend einmal mit 1ml TWP (Triton-Waschpuffer, enthält nur 0,1% Triton X-100, entspricht ansonsten in der Zusammensetzung dem Triton-Lysepuffer TLP) gewaschen, dann in 40µl 2xLämmli versetzt mit β-Mercaptoethanol resuspendiert und für 10 Minuten bei 94°C eluiert. Nach einminütiger Zentrifugation der Proben bei 13.200rpm wurde der Überstand mittels Western Blot analysiert.

2.2.4 Hepatitis C Virus-Infektionssystem

Tabelle 2.8 Plasmide

Name	Beschreibung
JC1	pFK_JH1/J6/C-846_dg
Con1/C3	pFK_JFH1/Con1/C842_dg

In vitro Transkription

Zur Vorbereitung der *in vitro*-Transkription wurden 10µg virale DNA durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym MluI linearisiert und mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte in 60 µl Wasser. Zu diesem Eluat wurden dann 20µl 5x RRL-Puffer (400mM Hepes pH7,5, 60mM MgCl₂, 10 mM Spermidin, 200mM DTT), 12,5µl rNTPs [25mM], 2,5µl RNasin [40U/µl] sowie 4µl T7 / RNA Polymerase [20U/µl] zugefügt. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C wurden weitere 2µl T7 / RNA Polymerase hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der DNA erfolgte die Zugabe von 2,5µl DNase [3U/µl] für 30 Minuten. Die gewonnene RNA konnte dann mittels RNeasy Mini Kit aufgereinigt

werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels spektralphotometrischer Analyse bei einer Extinktion von 260nm (NanoDrop™).

Elektroporation

Huh7.5 Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% verwendet. Nach einem Waschschritt mit PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ und Trypsinierung für 3 Minuten bei 37°C wurden die Zellen in 8ml DMEM je Zellkulturflasche (75 cm²) aufgenommen. $1,5 \cdot 10^7$ Zellen wurden in ein Falcon überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS einmal gewaschen und anschließend in 1ml Cytomix (120 mM KCl, 0,15mM CaCl_2 , 10mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,6, 25mM HEPES pH 7,6, 2mM EGTA, mM MgCl_2) + ATP(1:50)/GSH(1:50) resuspendiert. Für die Elektroporation wurden 400µl Zellsuspension mit 10µg aufgereinigter RNA gemischt, in die Pulschammer eingestellt und mit 975µF und 270V elektroporiert. Die Zeitkonstante lag bei 20ms. Anderthalb Elektroporationsansätze wurden in 18ml Huh7.5-Medium aufgenommen und in eine 15cm-Schale überführt.

Virusernte und PEG-Fällung

48, 72 und 96 Stunden nach Elektroporation der RNA wurde das virushaltige Medium abgenommen, frisches Medium wurde nach 48 und 72 Stunden auf die Zellen gegeben. Unmittelbar nach Abnahme des Mediums wurde dies für 5 Minuten bei 1.000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand in ein Falcon überführt und bei 4°C gelagert. Zur Virusfällung wurden 4,8ml 40% PEG-8000/PBS zu 20ml geerntetem, virushaltigem Medium gegeben. Zur Maximierung der Ausbeute wurden die Überstände mit Fällungsreagenz für drei Tage bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie für 90 Minuten bei 8.000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in DMEM resuspendiert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Bestimmung der TCID₅₀

Die *Tissue Culture Infection Dose 50* (TCID₅₀) beschreibt die Verdünnung eines Virus, welche 50% der vorhandenen Zellen infiziert. Hierfür wurden Zellen auf 96-

well-Platten ausgesät und in Verdünnungen von 1:10 bis 1:50 infiziert. Dabei wurden jeweils sechs *wells* nebeneinander identisch infiziert. Aus jeder Verdünnung wurden sieben 1:6 Verdünnungen angelegt, indem jeweils 40µl von einem *well* in das darunter liegende *well* überführt wurden. Durch Färbung des Nicht-Strukturproteins NS3 mit spezifischem Antikörper und Detektion mittels Anti-mouse-HRP Zweitantikörper sowie einer Carbazol-Substrat-Lösung konnte die TCID₅₀ nach *Spearman & Kärber* [122] bestimmt werden.

3 Ergebnisse ErbB3

3.1 Der ErbB3 Rezeptor

Die Relevanz der EGF Rezeptor Familie für die physiologische Leberfunktion (Kapitel 1.2) sowie die Beteiligung des EGF Rezeptors am Eintritt des Hepatitis C Virus in die Wirtszelle (Kapitel 1.1.1) führte zu der Überlegung, ob sich das Virus auch weitere Mitglieder der ErbB Familie zu Nutze macht und möglicherweise deren Expression verändert.

In einer vorausgehenden Studie, in der das Maß der Proteinexpression der ErbB Familienmitglieder untersucht wurde, konnte in der Arbeitsgruppe durch Arbeiten von Frau Dr. Patricia Cebula eine Herabregulation des ErbB3 Rezeptors in Anwesenheit des subgenomischen HCV Replikons um etwa 50% belegt werden [120]. Basierend auf diesem Vorbefund wurden weitere Untersuchungen zur Expression des ErbB3 Rezeptors mittels Western Blot Analyse auf Proteinebene sowie mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene durchgeführt (Abb. 3.1). Dabei bestätigte sich der Vorbefund auf Proteinebene (Abb. 3.1 A, B) und es wurde deutlich, dass bereits auf mRNA-Ebene eine Herabregulation des Rezeptors um ebenfalls etwa 50% vorliegt (D). Weitergehende Untersuchungen mittels FACS-Analyse belegten die Befunde der Immunoblotanalysen und legen nahe, dass es führend zu einer Reduktion der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche kommt (C). **Die ErbB3 Rezeptorexpression auf der Oberfläche von Huh9-13 Zellen ist deutlich reduziert und diese Herabregulation findet bereits auf Transkriptebene statt.**

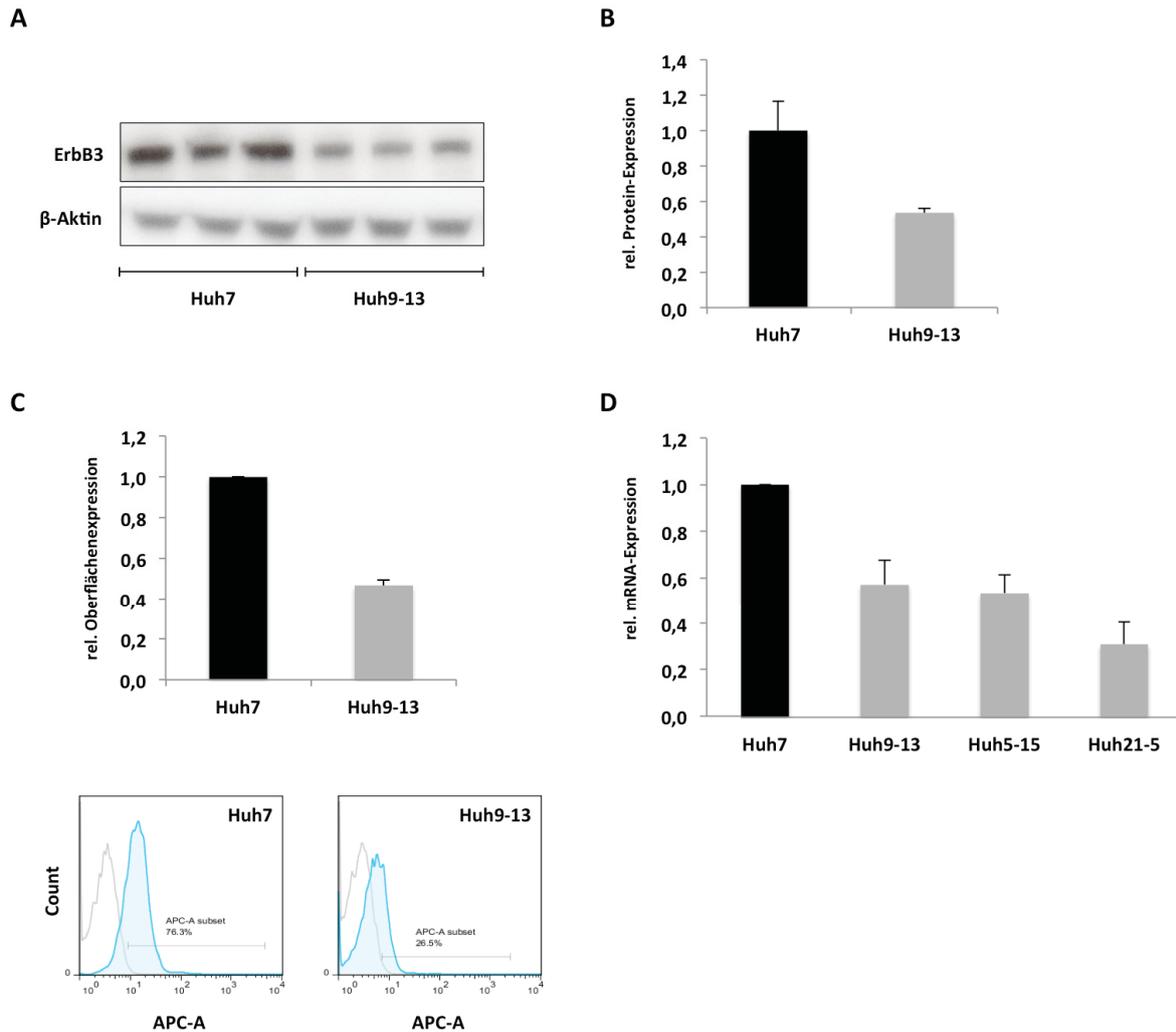


Abbildung 3.1: HCV hemmt die Expression des Neuregulin-Rezeptors ErbB3 auf Protein- und Transkriptionsebene. In den Säulendiagrammen wurden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **A** Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot auf die Expression von ErbB3 analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Vor der zweiten Detektion mit β-Aktin Antikörper wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt. **B** Densitometrische Analyse der Proteinexpressionsdaten von ErbB3 in Huh7 und Huh9-13 Zellen aus A. **C** Zytometrische Analyse der Oberflächenexpression von ErbB3 auf Huh7 und Huh9-13 Zellen mittels APC-konjugierter ErbB3 Antikörper (FACS Canto II), ausgewertet über die FlowJo-Software gegen die entsprechende Isotypenkontrolle. Oberer Teil der Abbildung: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten (*geoMean*). Unterer Teil der Abbildung: Grau – Histogramm der APC-Kontrollmessung, Blau – Histogramm des ErbB3-Messung. **D** Analyse der ErbB3 mRNA-Expression mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode (Kapitel 2.2.2). Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben.

Es stellte sich also die Frage nach dem molekularen Mechanismus, über den HCV die Expression des ErbB3 Transkriptes herabreguliert. Eine Möglichkeit ist in diesem Kontext die Induktion ErbB3-spezifischer miRNAs, die als Inhibitoren der Genexpression fungieren. Wie einleitend aufgeführt, sind miRNAs kurze, nicht-kodierende RNA-Stränge, die über die Komplementarität zur 3'-UTR ihrer Ziel-mRNA diese erkennen, binden und die Translation hemmen bzw. den Abbau des Transkriptes fördern. Untersucht wurde zunächst die Expression von hsa-mir-125a und -125b, die bereits in der Brustkrebszelllinie SKBR3 als Regulatoren der ErbB3 Expression identifiziert wurden [84] sowie die Expression von hsa-mir-205, da hierfür konservierte miRNA-Bindungsstellen innerhalb der 3'-UTR des humanen ErbB3 Rezeptors beschrieben sind [123]. *Potenza et al.* konnten zudem einen inhibitorischen Effekt der hsa-mir-125a-5p auf die Replikation des Hepatitis B Virus belegen [86].

Bei der Überprüfung der HCV abhängigen Expression dieser miRNAs mittels geeignetem PCR-Verfahren konnte nachgewiesen werden, dass es in Gegenwart des HCV Replikons zu einer Hochregulation der Expression von hsa-mir-125a-5p und -125b-5p in Huh9-13 Replikonzellen kommt (Abb. 3.2 A). Mittels Transfektion von spezifischen komplementären Oligonukleotid-Inhibitoren (sog. *antagomirs*) wurde anschließend die Relevanz dieser beiden miRNAs für die Regulation der ErbB3 Expression durch HCV untersucht (B - E). Trotz einer deutlichen Herabregulation der miRNAs durch die jeweils spezifische *antagomir* (B, C) wurde die ErbB3 Expression in Huh9-13 Zellen weder auf mRNA- (D) noch auf Proteinebene (E) wiederhergestellt. Die Hemmung der miRNAs 125a-5p und 125b-5p hatte zudem keinen Einfluss auf die virale Replikation: die Expression der viralen Nicht-Strukturproteine NS3 und NS5B blieb verglichen mit der Kontrolle unverändert (E). **Die ErbB3 mRNA wird in Huh9-13 Zellen also nicht durch miRNAs herabreguliert.**

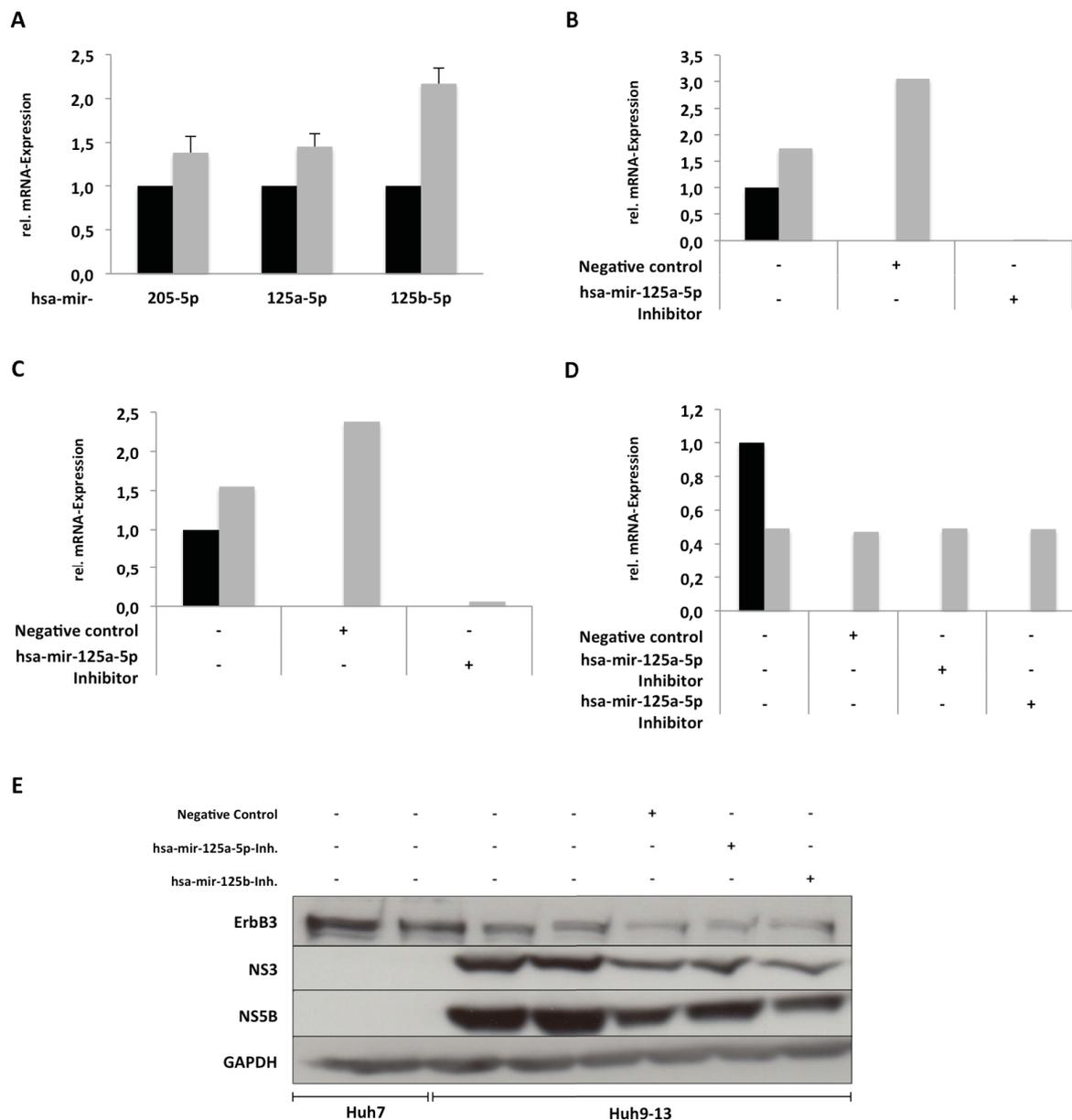


Abbildung 3.2: Die Herabregulation des ErbB3 Rezeptors verläuft nicht über die miRNA hsa-mir-125. In den Säulendiagrammen werden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **A - C** Analyse der isolierten miRNA aus Gesamt-Zelllysaten auf **A** Expression von hsa-mir-205-5p, -125a-5p und 125b-5p mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer, **B** Expression von hsa-mir-125a in Huh9-13 Zellen mit einem Inhibitor gegen hsa-mir-125a und **C** Expression von hsa-mir-125b mit einem Inhibitor gegen hsa-mir-125b. **D** Analyse der aus, wie in B und C transfizierten Zellen isolierten Gesamt-mRNA auf Expression von ErbB3 mittels RT-PCR. **E** Zellen wurden wie in D beschrieben transfiziert, Proteinlysate hergestellt und die Expression des ErbB3 Rezeptors sowie der viralen Nicht-Strukturproteine NS3 und NS5B mittels spezifischer Antikörper im Western Blot untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt.

Im nächsten Schritt wurde die mRNA-Stabilität über die Zugabe von Actinomycin D untersucht. Actinomycin D ist ein Zytostatikum, welches mit der DNA interkaliert und so die DNA-abhängige RNA-Polymerase hemmt. Dadurch verhindert es die *de novo* mRNA-Synthese. Anhand einer Zeitreihe von 40 bis 200 Minuten wurde die Abnahme der bestehenden ErbB3 mRNA-Menge verfolgt. Hier ergaben sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Huh7 Kontrollzellen und den Huh9-13 Replikonzellen, so dass kein Stabilitätsunterschied der ErbB3 mRNA in Zellen, die das subgenomische Replikon exprimieren, anzunehmen ist (Abb. 3.3 A). Um zu prüfen, ob Unterschiede in der transkriptionellen Regulation für die Reduktion der ErbB3 mRNA verantwortlich sind, wurde im nächsten Schritt mittels Intron-Exon-überspannenden Primerpaaren untersucht, ob Differenzen auf Ebene des unreifen Transkripts bestehen. Intron-Exon-Primer wurden dazu so gewählt, dass der *Forward*-Primer im Exon und der *Reverse*-Primer im unmittelbar darauf folgenden Intron liegt, oder umgekehrt. Dadurch wird eine Analyse der unreifen prä-mRNA möglich und damit indirekt eine Aussage über die transkriptionelle Regulation. Wie in Abbildung 3.3 B dargestellt kommt es bereits auf prä-mRNA Ebene in HCV Replikon exprimierenden Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Expression des ErbB3 Transkripts. **So ist anzunehmen, dass HCV die Expression von ErbB3 auf transkriptioneller Ebene reguliert.**

Cao *et al.* beschrieben bereits 2007 einen Zusammenhang zwischen der Herabregulation des ErbB3 Rezeptors auf Proteinebene und seinem Liganden Neuregulin 1 (NRG1) unter Beteiligung von USP8 und Nrdp1 (Kapitel 1.2). Aus diesem Grund wurde die Expression des Liganden genauer untersucht. Wie aus Abbildung 3.4 A hervorgeht, kommt es in Huh9-13 Replikonzellen sowie Huh21-5 Vollängenreplikonzellen zu einer Hochregulation von NRG1 auf mRNA-Ebene. Diese Ergebnisse konnten auf Proteinebene mittels spezifischem NRG1 ELISA belegt werden (Abb. 3.4 B). Dies warf die Frage auf, ob die Hochregulation des Liganden durch HCV in Zusammenhang mit der HCV-induzierten Herabregulation des Rezeptors bereits auf Transkriptebene steht. Es wurde eine posttranskriptionelle Hemmung der NRG1-Ligandenexpression mittels siRNA (*Knockdown*) durchgeführt und anschließend die mRNA-Expression von Ligand (C) und Rezeptor (D) mittels RT-PCR untersucht. Der *Knockdown* des Liganden führte auf mRNA-Ebene zu

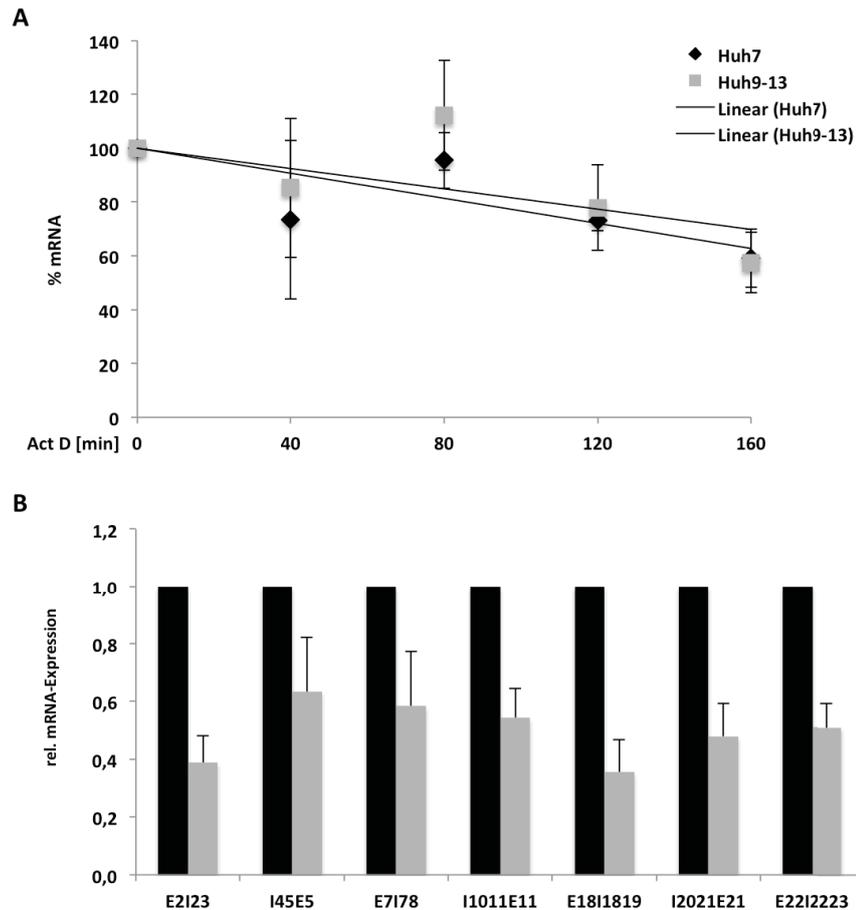


Abbildung 3.3: HCV hemmt die Expression des Erb3 Rezeptors bereits auf Transkriptebene.

A Zellen wurden mit 5 µg/ml Actinomycin D (Act D) für 40 bis 200 Minuten behandelt. Anschließend wurde die mRNA aus Gesamt-Zelllysaten isoliert. Die Abnahme der ErbB3 Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode (siehe 2.2.2). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **B** Analyse der ErbB3 mRNA-Expression aus Gesamt-Zelllysaten von unstimulierten Zellen unter Verwendung von Intron-Exon-Primern mittels RT-PCR. Huh7 Kontrollzellen sind als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Legende: E2I23: Übergang Exon 2 – Intron 2/3, I45E5: Intron 4/5 – Exon 5, etc.

einem Wiederanstieg des Rezeptors auf das Maß der Huh7 Kontrollzellen (D) und ebenfalls zu einem Anstieg der Proteinexpression von ErbB3, wenn auch hier der Kontrollzelllevel nicht vollständig erreicht wurde (E, Spur 3 und 4 im Vergleich mit Spur 1 und 2). Der *Knockdown* von Neuregulin 1 hat keinen Einfluss auf die virale Replikation, was an der gleichbleibenden Expression der Nicht-Strukturproteine NS3, NS5A und NS5B im Western Blot (E) erkennbar ist. Zur Verifizierung der These, dass das durch das HCV Replikon verstärkt exprimierte NRG1 ursächlich für die

Herabregulation des ErbB3 Rezeptors ist, wurde des Weiteren der Virus-vermittelte Effekt auf den Liganden NRG1 durch Zugabe von rekombinantem HRG1 β , eine Isoform des Neuregulin 1, zu Huh7 Kontrollzellen simuliert (Abb. 3.4 F, G). Bereits unter Stimulation mit 25 ng/ml HRG1 β kam es nach 120 Minuten zu einem Abfall der ErbB3 mRNA Expression auf etwa 50% (F), während der Effekt auf Proteinebene erst nach 360 Minuten eindeutig erkennbar war (G). Die funktionale Interaktion des HRG1 β Liganden mit seinem Rezeptor konnte durch die Phosphorylierung von ErbB3 an Tyrosinrest 1289 belegt werden. **Der ErbB3 Rezeptorligand Neuregulin 1 sowie seine Isoform HRG1 β verringern die ErbB3 Expression auf transkriptioneller Ebene.**

Die Suche nach Transkriptionsfaktoren, über die NRG1 die Expression des ErbB3 Rezeptors reguliert und so die Expression von *ERBB3* supprimiert, führte zu den *cAMP-responsive element binding proteins* (CREB), da das *ERBB3* Gen eine sogenannte *half CRE site* (TGACG) in seiner regulatorischen Sequenz aufweist. Eine mögliche Beteiligung dieser Transkriptionsfaktoren wurde zunächst über eine künstliche Induktion der cAMP-Produktion untersucht. Die Induktion des cAMP-Signalwegs in Huh7 Kontrollzellen erfolgte mittels Forskolin, einem Diterpen, welches Adenylatcyclasen aktiviert. Dadurch wird die Umwandlung von ATP in cyclisches AMP (cAMP) katalysiert. cAMP ist ein *second messenger*, welcher die Proteinkinase A aktiviert. Diese Serin/Threonin-Kinase wiederum führt zu einer Phosphorylierungs-abhängigen Aktivierung von CREB-Transkriptionsfaktoren und unter Beteiligung des Co-Aktivators *CREB Binding Protein* (CBP) kommt es zur Induktion der Transkription von Genen, die ein CRE Bindemotiv in der 5'-regulatorischen Region tragen (Abb. 3.5 D). Die Stimulation des cAMP-Signalwegs in Huh7 Kontrollzellen führte wie bereits die Stimulation mit HRG1 β (Abb. 3.4 F) zur Abnahme der Expression des ErbB3 Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene (Abb. 3.5 A und B). Ebenfalls führte die Induktion der cAMP Signalübertragung über das cAMP-Analogon 8-Bromo-cAMP und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), einem Inhibitor der Phosphodiesterase, die für den Abbau von cAMP zu AMP verantwortlich ist, in abgeschwächter Form zu einer Hemmung der ErbB3 auf mRNA-Expression (C). **Diese Daten belegen, dass die Aktivierung der cAMP-abhängigen Signalübertragung zu einer Hemmung der ErbB3 Expression führt, so dass NRG1 möglicherweise über die Induktion der cAMP-Bildung die Expression des ErbB3 Rezeptors herabreguliert.**

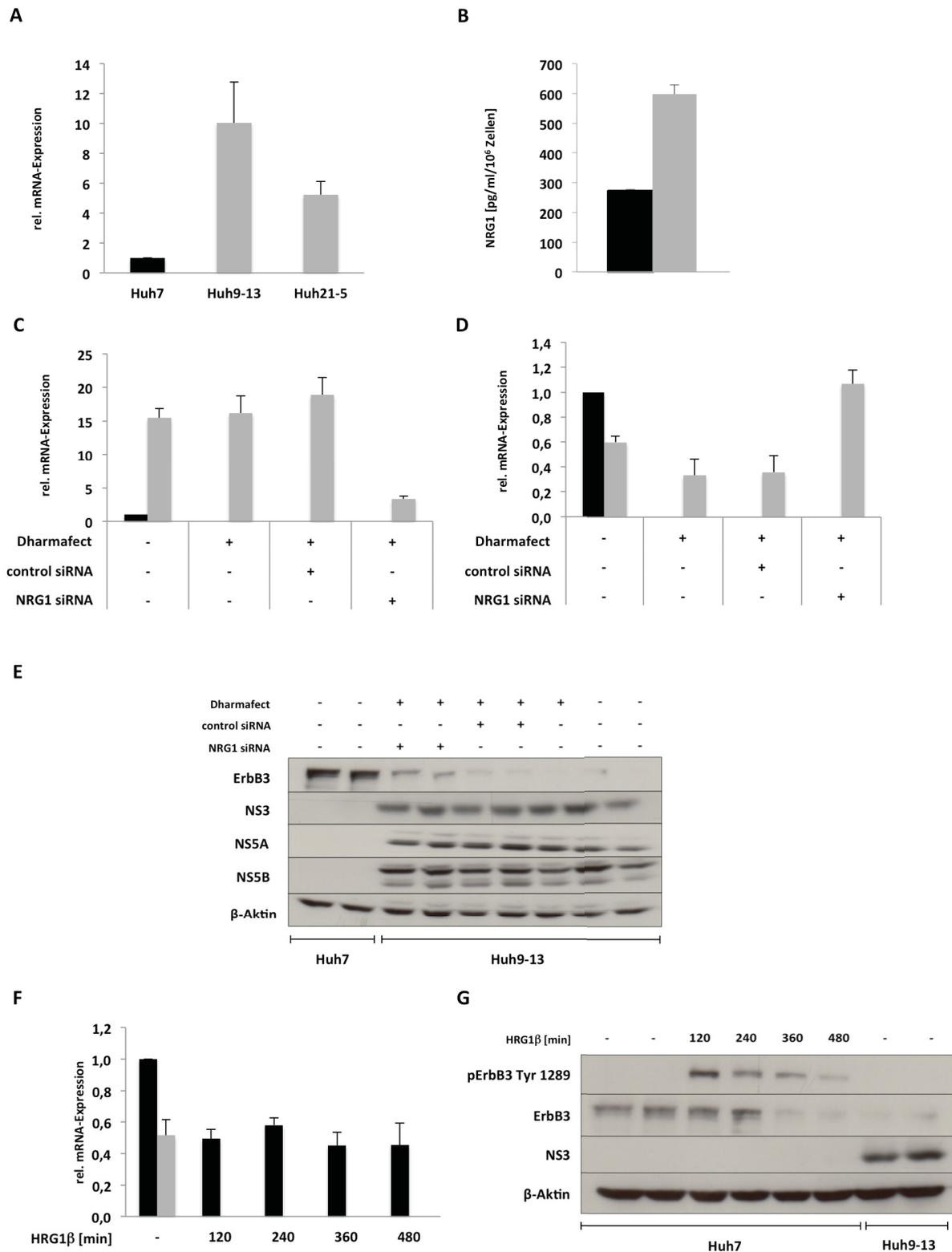


Abbildung 3.4: HCV induziert die Expression von NRG1 und hemmt NRG1-abhängig die Expression von ErbB3. In den Säulendiagrammen werden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **A** Analyse der NRG1 mRNA-Expression aus Gesamt-Zelllysaten von Huh7 Kontrollzellen, Huh9-13 Replikonzellen sowie Huh21-5 Vollängenreplikonzellen mittels spezifischer Primer in der RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt

wurde, wiedergegeben. **B** Analyse der NRG1-Proteinkonzentration in unstimulierten Überständen von Huh7 und Huh9-13 Zellen mittels spezifischem NRG1 ELISA. **C bis E** Transfektion von Huh9-13 Zellen mit Kontroll-siRNA (50 nM) bzw. NRG1-siRNA (50 nM) für 72 Stunden. Analyse der aus Gesamtzelllysaten isolierten mRNA auf **C** die Expression von NRG1 und **D** die Expression von ErbB3 mittels RT-PCR. **E** Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot auf die Expression von ErbB3 sowie die Expression der viralen Nicht-Strukturproteine NS3, NS5A und NS5B analysiert. Die Bestimmung von β -Aktin erfolgte zur Beladungskontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt. Für **F** und **G** wurden Huh7 Zellen mit 25 ng/ml HRG1 β stimuliert bzw. unstimulierte Huh9-13 Zellen zur Kontrolle eingesetzt. **F** Aus Gesamt-Zelllysat isolierte mRNA wurde hinsichtlich der ErbB3 Expression mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer bestimmt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. **G** Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot auf die Phosphorylierung von ErbB3 am Tyrosinrest 1289 bzw. auf die Proteinexpression von ErbB3 und NS3 analysiert. Die Bestimmung von β -Aktin erfolgte zur Beladungskontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt.

Im nächsten Schritt wurde dann untersucht, ob die Herabregulation des ErbB3 Rezeptors von der Proteinkinase A abhängig ist oder ob der Ligand NRG1 über einen anderen Mechanismus die Rezeptorexpression reduziert (Abb. 3.6). Die Hemmung der Proteinkinase A durch den Inhibitor H-89 ergab keinen Hinweis auf einen Einfluss der PKA auf die ErbB3 Expression (A). H-89 blockiert reversibel die ATP-Bindestelle der Proteinkinase A und hemmt so die katalytische Aktivität der Kinase. Da jedoch ein relativ großer Effekt durch das Lösungsmittel DMSO erkennbar war, wurde das Ergebnis mittels myristoylierten und dadurch zellpermeablen Proteinkinase A Inhibitor (myrPKI) verifiziert (B). Dieser weist zudem eine höhere Spezifität für die Proteinkinase A auf. Auch der *Knockdown* der drei katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase, alpha, beta und gamma (PRKAC A, B und G, Abb. 3.6 C, D und E) ließ keinen Einfluss der PKA auf die ErbB3-Expression annehmen (F). Der Erfolg des *Knockdowns* wurde mittels spezifischer Primer gegen die einzelnen Untereinheiten belegt. **Ein Zusammenhang zwischen der Verringerung der ErbB3 Rezeptorexpression und der PKA konnte nicht belegt werden.**

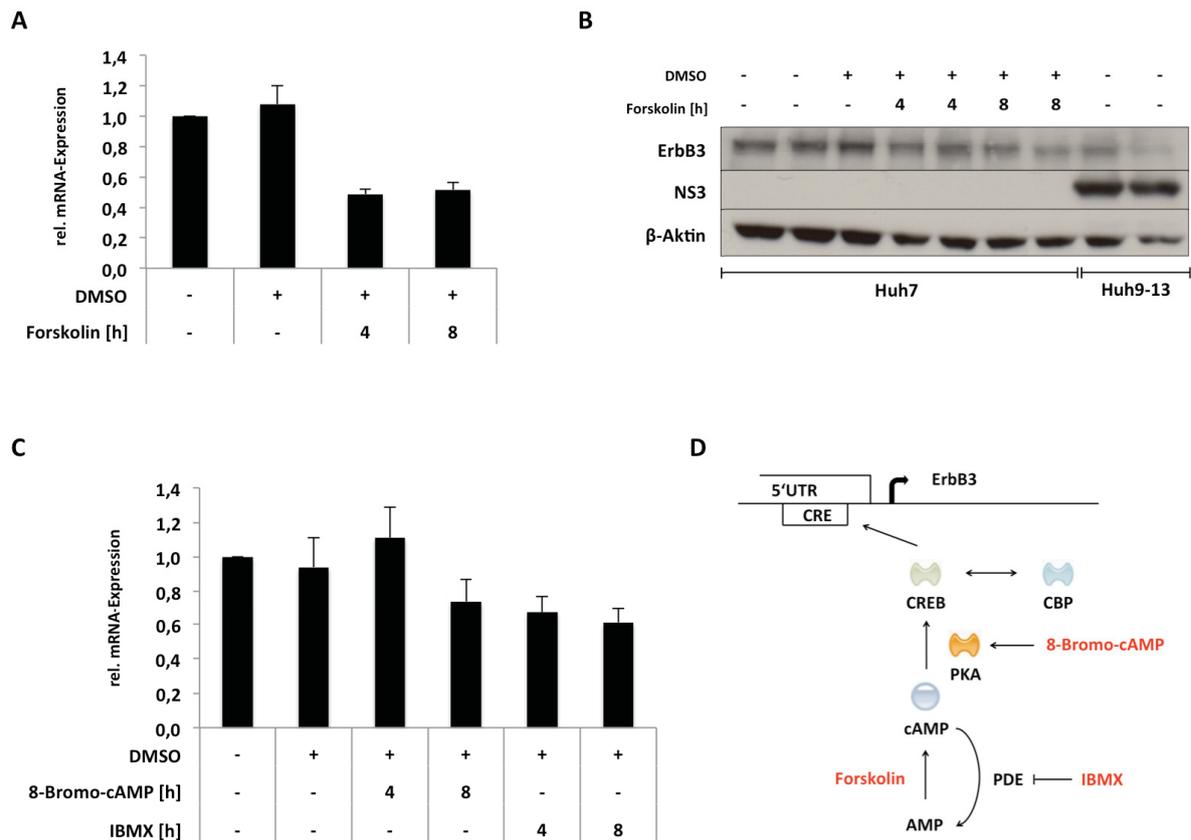


Abbildung 3.5: cAMP-Stimulation in Huh7 Zellen simuliert den regulatorischen Effekt des Liganden NRG1 auf den ErbB3 Rezeptor. Für **A** und **B** wurden Huh7 Zellen mit 10 μ M Forskolin für 4 und 8 Stunden stimuliert. **A** Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von ErbB3 mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta$ CT Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **B** Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot auf die Expression von ErbB3 und NS3 analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt. Für **C** wurden Huh7 Zellen mit 10 μ M 8-Bromo-cAMP und 500 μ M IBMX für 4 und 8 Stunden stimuliert. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von ErbB3 mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta$ CT Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **D** Schematische Darstellung des cAMP-Signalwegs. Legende: AMP: Adenosinmonophosphat, PDE: Phosphodiesterase, cAMP: zyklisches AMP, IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthin, PKA: Proteinkinase A, CREB: cAMP responsive element binding protein, CBP: CREB binding protein, CRE: cAMP responsive element, UTR: untranslated region.

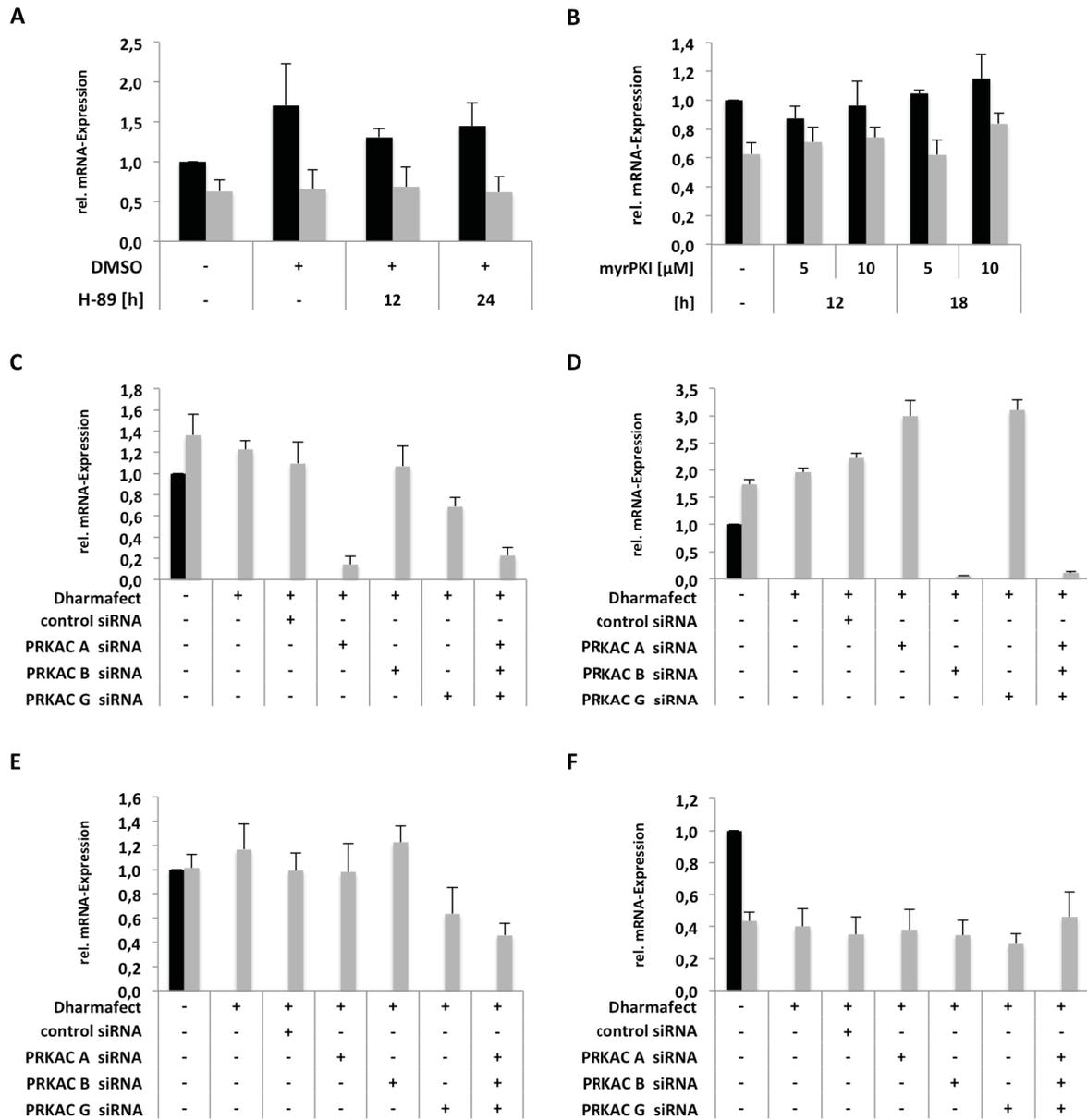


Abbildung 3.6: Die Proteinkinase A ist nicht an der Herabregulation des ErbB3 Rezeptors beteiligt. In den Säulendiagrammen wurden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Die Auswertung der Messergebnisse aus der RT-PCR erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Für **A** wurden die Zellen mit 10 μM H-89 für 12 und 24 Stunden behandelt. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von ErbB3 mittels RT-PCR. Für **B** wurden Huh7 und Huh9-13 Zellen mit 10 μM myristoyliertem PKA Inhibitor für 24 und 48 Stunden behandelt. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von ErbB3 mittels RT-PCR. Für **C bis F** wurden Huh9-13 Zellen mit Kontroll-siRNA (50 nM) bzw. siRNA gegen die drei katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PRKAC A, B und G, je 50 nM) für 72 Stunden transfiziert. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf **C** die Expression von PRKAC A, **D** die Expression von PRKAC B, **E** die Expression von PRKAC G und **F** die Expression von ErbB3 mittels RT-PCR.

In Anbetracht der vorhandenen *half CRE site* innerhalb der 5'-regulatorischen Region des *ERBB3* Gens wurde des Weiteren eine Untersuchung der Expression der verschiedenen *cAMP-responsive element binding proteins* (CREB) sowie des CREB Bindungsproteins (CREBBP) auf mRNA-Ebene durchgeführt. Wie in Abbildung 3.7 dargestellt, wird CREB5 in Anwesenheit des subgenomischen HCV Replikons deutlich verstärkt exprimiert (Abb. 3.7 A), während CREB1 und CREB3 sowie CREBBP schwächer exprimiert werden. Da CREBs nicht nur aktivierend, sondern auch inhibitorisch auf die Transkription ihrer Zielgene wirken können und die CREB5 Überexpression somit eine potentielle Ursache für die verringerte *ERBB3* Transkription darstellt, wurde zunächst untersucht, ob die Hochregulation von CREB5 durch die verstärkte Expression des Liganden NRG1 bedingt ist. Dazu wurde der Einfluss des NRG1-*Knockdowns* auf CREB5 in der RT-PCR untersucht (B). Hier ergab sich 72 Stunden nach Transfektion kein Hinweis auf einen Einfluss des NRG1 auf die CREB5 Expression. Zudem sollte geklärt werden, ob die Proteinkinase A an der verstärkten Expression von CREB5 in Huh9-13 Replikonzellen beteiligt ist. Der *Knockdown* der katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A einzeln sowie gemeinsam ließ keinerlei Einfluss auf die CREB5 Expression annehmen (C). Außerdem galt es zu klären, ob CREB5 einen Einfluss auf die Expression des ErbB3 Rezeptors hat. Durch *Knockdown* des Transkriptionsfaktors CREB5 in Huh9-13 Replikonzellen konnte belegt werden, dass dies nicht der Fall ist (D und E). **Die Daten lassen annehmen, dass das HCV Replikon zu einer verstärkten Expression des CREB5 Transkriptes führt, dies jedoch weder über NRG1 noch über die PKA vermittelt wird und hier nicht die Ursache für die verringerte ErbB3 Expression liegt.**

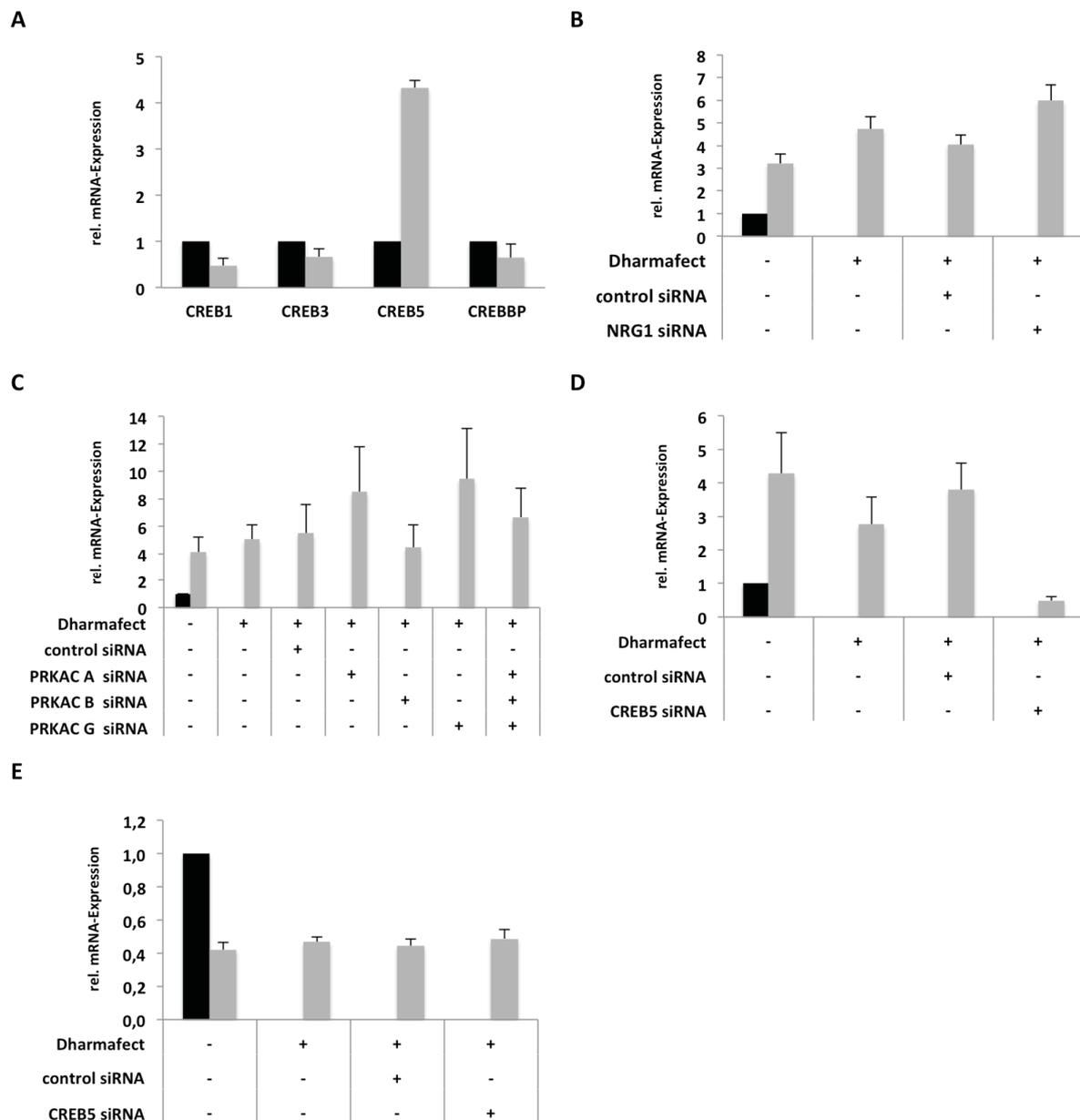


Abbildung 3.7: HCV verändert die Expression der verschiedenen CREB-Isoformen. In den Säulendiagrammen werden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Die Auswertung der Messergebnisse aus der RT-PCR erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **A** Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von CREB1, CREB3, CREB5 und CREBBP (*CREB Binding Protein*) mittels RT-PCR. Für **B** wurden Huh9-13 Zellen wie unter Abbildung 3.3 beschrieben mit Kontroll-siRNA (50 nM) bzw. NRG1 siRNA (50 nM) für 72 Stunden transfiziert. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von CREB5 mittels RT-PCR. Für **C** wurden Huh9-13 Zellen mit Kontroll-siRNA (50 nM) bzw. PRKAC A, B und G siRNA (50 nM) wie unter Abbildung 3.6 beschrieben transfiziert. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von CREB5 mittels RT-PCR. Für **D** und **E** wurden Huh9-13 Zellen mit Kontroll-siRNA (50 nM) bzw. CREB5 siRNA (50 nM) für 72 Stunden transfiziert. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA für **D** auf die Expression von CREB5 und für **E** auf die Expression von ErbB3 mittels RT-PCR.

3.2 Der Ligand Neuregulin 1

3.2.1 Sheddasen

Ein weiterer Punkt, dem im Rahmen dieser Arbeit ein besonderes Interesse zukam, war der molekulare Mechanismus, über den HCV die Expression von NRG1 verstärkt (Abb. 3.4).

NRG1 liegt zunächst im Extrazellärraum an die Zellmembran gebunden vor. Alpha-Sekretasen wie ADAM17 und ADAM19 sowie Beta-Sekretasen wie BACE(1) schneiden den Liganden in einem als *ectodomain shedding* bezeichneten Prozess und setzen ihn so frei. Sie werden aus diesem Grund auch als Sheddasen bezeichnet. Eine Deregulation der Sheddasen-Expression wäre demnach ein potentieller Mechanismus für die Hochregulation des Neuregulin 1 auf Proteinebene. Mittels RT-PCR wurde die Expression der genannten Sheddasen auf mRNA-Ebene untersucht, ein Unterschied zwischen Huh7 Kontrollzellen und Huh9-13 Replikonzellen konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 3.8). Eine Expressionsanalyse auf Proteinebene war nicht möglich, da die zur Verfügung stehenden Antikörper keine eindeutige Proteindetektion zuließen (Ergebnisse nicht dargestellt).

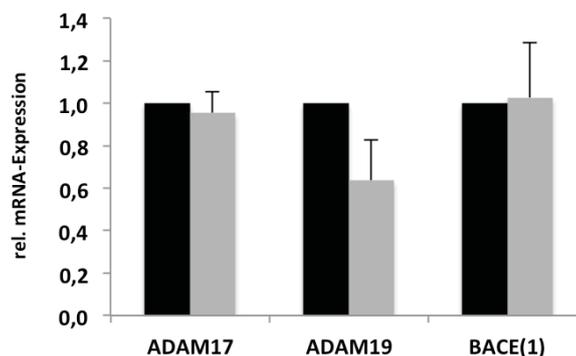


Abbildung 3.8: Das Hepatitis C Virus verändert die mRNA-Expression der Sheddasen nicht. Huh7 Kontrollzellen werden als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Gesamt-RNA wurde aus den Zellen isoliert und die basale RNA-Expression der Sheddasen ADAM17, ADAM19 und BACE(1) mittels RT-PCR analysiert. Die Auswertung der Messergebnisse aus der RT-PCR erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an.

3.2.2 Transkriptionsfaktoren

Da die Hochregulation des Liganden NRG1 bereits auf mRNA-Ebene deutlich erkennbar ist (Abb. 3.4 A), wurde auch hier eine Regulation auf transkriptioneller Ebene in Betracht gezogen. *Frensing et al.* veröffentlichen 2008 eine Promotoranalyse des *NRG1* Gens hinsichtlich potentieller Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und NF- κ B [81]. Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen, die durch eigene Untersuchungen bestätigt werden konnten, belegen, dass es in HCV Replikonzellen zu einer verstärkten Aktivierung der p38^{MAPK} kommt [94] (Abb. 3.15). Zudem legen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen nahe, dass die Aktivierung der p38^{MAPK} zu einer verstärkten Expression von Sp1 Zielgenen über die Phosphorylierung von Sp1 an einem Threonin-Rest führt [76], so dass untersucht werden sollte, ob die Hemmung der p38^{MAPK} in Anwesenheit des HCV Replikons zu einer reduzierten Expression von NRG1 führt. Wie in Abbildung 3.9 A dargestellt, führt die Hemmung der p38^{MAPK} zu einer Reduktion der HCV-induzierten NRG1 Expression um etwa 40%, so dass die konstitutive Aktivierung der p38^{MAPK} möglicherweise für die Induktion der NRG1 Expression durch HCV von Bedeutung ist.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors Sp1 auf die Expression von NRG1 weiter untersucht. Mithramycin A hemmt die Transkription von Genen mit GC-Boxen in der Promotorsequenz durch Bindung an diese, so dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie an dieses Motiv nicht mehr möglich ist. Die Behandlung von Huh7 Kontrollzellen sowie Huh9-13 Replikonzellen mit Mithramycin A für 4 und 16 Stunden führte zu einer signifikanten Abnahme der NRG1 Expression in Huh9-13 Replikonzellen auf mRNA-Ebene (Abb. 3.9 B).

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss des IKK-2 Inhibitors IV auf die NRG1 Expression und dadurch eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (IKK-2) an der Hochregulation des Liganden. Hier ergab sich jedoch nach 24 und 48 Stunden kein Hinweis auf eine Beteiligung an der NRG1 Expression (C). **Diese Daten lassen annehmen, dass Sp1 und die Aktivierung der p38^{MAPK}, nicht aber NF- κ B, für die Hochregulation der NRG1 Expression durch HCV mitverantwortlich sind.**

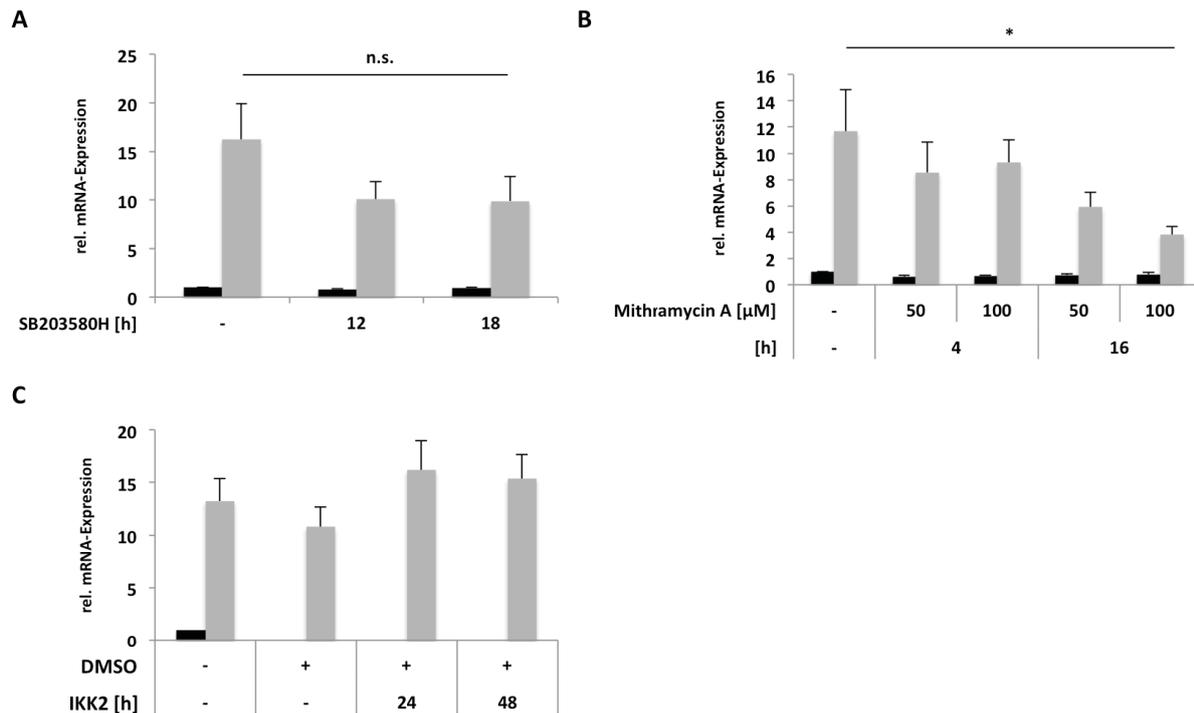


Abbildung 3.9: Die Hochregulation des ErbB3-Liganden NRG1 durch das Hepatitis C Virus erfolgt auf transkriptioneller Ebene. In den Säulendiagrammen werden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von NRG1 mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test. Für **A** wurden Huh7 und Huh9-13 Zellen für 12 und 18 Stunden mit 10 μM SB203580 Hydrochloride, einem Inhibitor der $\text{p}38^{\text{MAPK}}$ behandelt. Für **B** wurden Huh7 und Huh9-13 Zellen mit 50 und 100 μM Mithramycin A, einem Inhibitor des Transkriptionsfaktors Sp1, für 4 und 16 Stunden behandelt. Für **C** wurden Huh7 und Huh9-13 Zellen mit dem NF- κB -Inhibitor IKK2 (25 μM) für 24 und 48 Stunden behandelt.

Um eine Beteiligung von Sp1 an der verstärkten NRG1 Expression durch das virale Replikon nochmals direkt zu belegen, wurden Sp1 sowie auch Sp3 als weiterer potentiell beteiligter Transkriptionsfaktor in Huh7 Kontrollzellen transient transfiziert (Abb. 3.10). Nach 48 Stunden wurde der Einfluss vermehrter Sp1- (A) bzw. Sp3-Expression (B) auf die Expression des Liganden NRG1 (C) sowie des Rezeptors ErbB3 untersucht (D). Die in Abbildung 3.10 dargestellten Daten lassen annehmen, dass Sp1 und Sp3 die Expression von NRG1 kontrollieren und dass dies mit einer Suppression der Expression des ErbB3 Rezeptors einhergeht. **Die NRG1 Expression wird in Huh7 Zellen unter Überexpression der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 erhöht.**

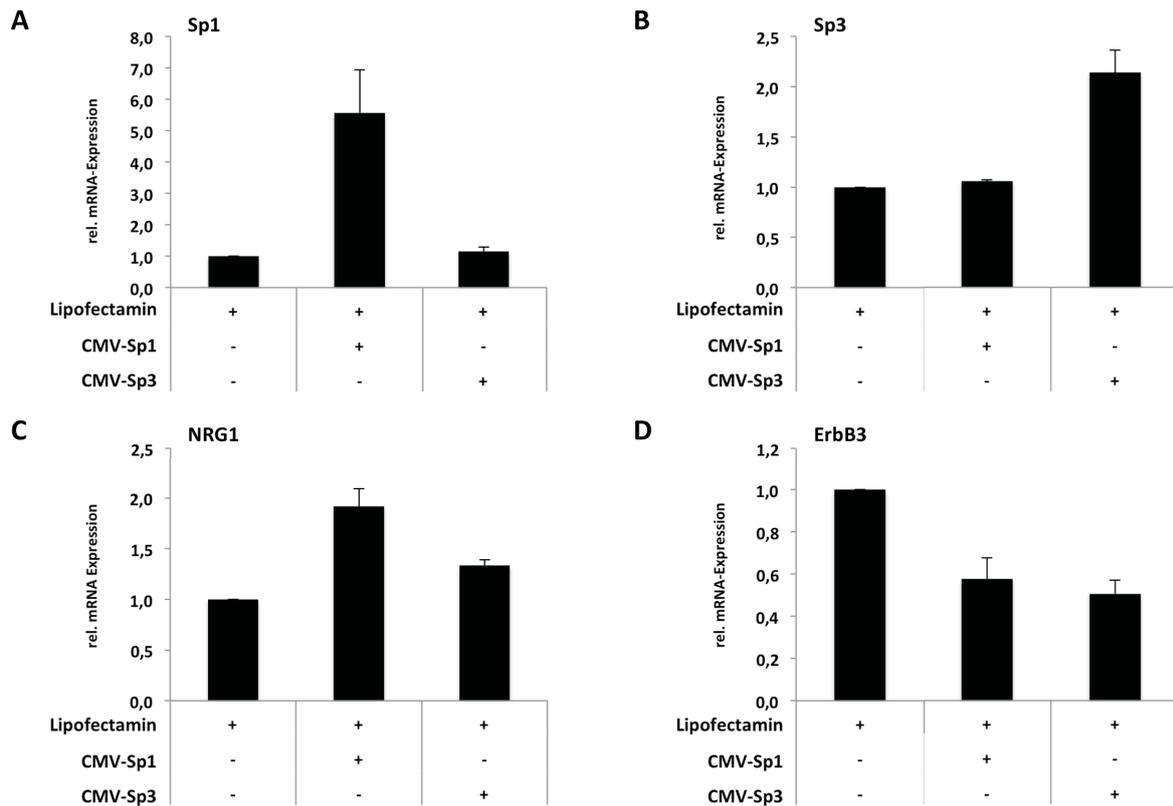


Abbildung 3.10: Die Hochregulation des ErbB3-Liganden NRG1 erfolgt unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors Sp1. Für A bis D wurden Huh7 Zellen mit einem CMV-Sp1- und einem CMV-Sp3-Plasmid (je 2,5 µg) transient transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA bezüglich der Expression des Transkriptionsfaktors Sp1 (A), der Expression des Transkriptionsfaktors Sp3 (B), der Expression des Liganden NRG1 (C) sowie der Expression des ErbB3 Rezeptors (D) mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an.

3.3 Die EGF Rezeptor Familie und die Familie der Neureguline

Die Ergebnisse der vorangehenden Untersuchungen legen nahe, dass HCV ErbB3 NRG1-abhängig supprimiert. Da mit EGFR mindestens ein Mitglied der ErbB Familie für den Zelleintritt von HCV relevant ist, sollte im Folgenden geklärt werden ob HCV abgesehen von ErbB3 auch Einfluss auf die Expression der übrigen Mitglieder der EGF Rezeptor Familie hat.

Die Untersuchung der mRNA Expression ergab keinen Hinweis auf eine Deregulation der EGFR und ErbB2 Expression in Huh9-13 Replikonzellen (Abb. 3.11 A). Auf Proteinebene konnte mittels Immunoblot eine verstärkte Expression des EGF Rezeptors in Huh9-13 Replikonzellen belegt werden und es ergaben sich Hinweise

auf eine verstärkte Aktivierung des EGF Rezeptors nach Stimulation mit HRG1 β (B). Zu Kontrollzwecken wurde ebenfalls mit EGF stimuliert. ErbB2 dagegen ist in Huh9-13 Replikonzellen weder auf mRNA- noch auf Proteinebene dereguliert (A, B). Die FACS-Analyse belegte eine signifikant verstärkte Oberflächen-expression des EGF Rezeptors auf Huh9-13 Replikonzellen um 16 Prozent (C), die Oberflächen-expression des ErbB2 Rezeptors wird in Anwesenheit des HCV Replikons um 30 Prozent erhöht (D). Wie weiter unten aufgeführt ändern sich diese Verhältnisse für den EGF Rezeptor drastisch, wenn man nur die Zellpopulation untersucht, bei denen ErbB3 supprimiert ist (Abb. 3.16 A).

Da der EGF Rezeptor für den Eintritt des Hepatitis C Virus in die Zelle von Bedeutung ist, wurde untersucht, ob entsprechende Regulatorproteine beziehungsweise für den direkten Abbau des Rezeptors verantwortliche Proteine in den Huh9-13 Replikonzellen vermindert oder verstärkt exprimiert werden. Auf mRNA-Ebene wurden zunächst die Negativregulatoren SOCS5 und LRIG1, der Positivregulator Sprouty2 sowie die E3 Ubiquitin Ligase c-Cbl hinsichtlich ihrer Expression analysiert (Abb. 3.12 A). Dabei ergaben sich erste Hinweise auf eine Herabregulation von Sprouty2 sowie des Negativregulators LRIG1 und eine leichte Hochregulation der E3 Ubiquitin Ligase c-Cbl, die auf Proteinebene noch verifiziert werden müssen. Die Analyse der Proteinexpression des 26S Proteasoms, welches unmittelbar für den Abbau des EGF Rezeptors verantwortlich ist, belegte eine durch das HCV Replikon unbeeinflusste Expression (B).

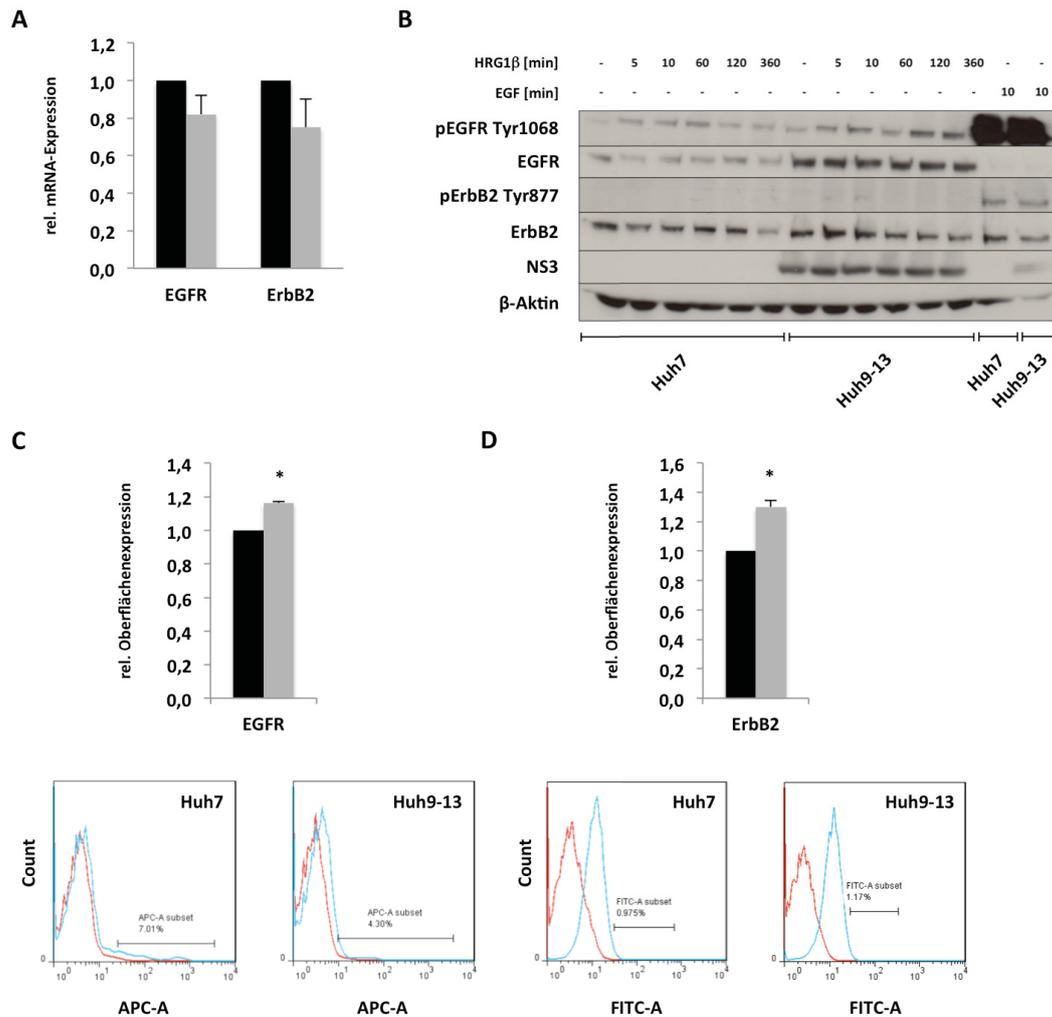


Abbildung 3.11: HCV verändert die Expression des EGF Rezeptors sowie die Oberflächenexpression des bevorzugten Dimerisierungspartners ErbB2. In den Säulendiagrammen werden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. **A** Analyse der aus Gesamtzelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von EGFR und ErbB2 mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Für **B** wurden die Zellen mit 25 ng/ml HRG1 β bzw. 40 ng/ml EGF zu Kontrollzwecken stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt. **C und D** Zytometrische Analyse der Oberflächenexpression von EGFR (**C**) und ErbB2 (**D**) auf Huh7 und Huh9-13 Zellen mittels PE- bzw. FITC-konjugierter Antikörper (FACS Canto II), ausgewertet über die FlowJo-Software gegen die entsprechende Isotypenkontrolle. Oberer Teil der Abbildungen: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten (*geoMean*) mit zugehöriger SEM. Die Ergebnisse sind relativ zur Huh7-Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test. Unterer Teil der Abbildungen: Rot – Histogramm der APC- (**C**) bzw. FITC-Kontrollmessung (**D**), Blau – Histogramm des EGFR- (**C**) bzw. ErbB2-Messung (**D**).

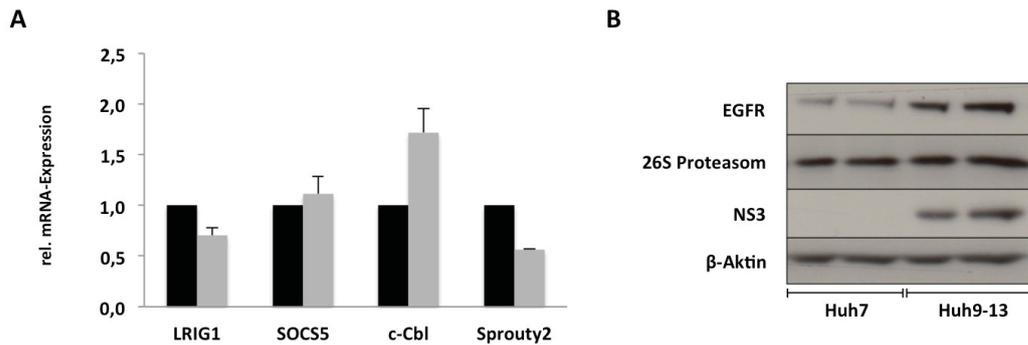


Abbildung 3.12: HCV modifiziert die Expression verschiedener Regulatoren, die an Expression und Abbau des EGF Rezeptors beteiligt sind. **A** Im Säulendiagramm werden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von LRIG1, SOCS5, c-Cbl und Sprouty2 mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **B** Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestriipt.

Der ErbB4 Rezeptor ist ebenfalls ein Mitglied der EGF Rezeptor Familie. Wie in Abbildung 3.13 A dargestellt, ist die ErbB4 mRNA-Expression verglichen mit Huh7 Kontrollzellen in Huh9-13 Zellen um den Faktor 10 reduziert. Da NRG1 ebenfalls den ErbB4 Rezeptor aktivieren kann, wurde überprüft, ob auch in diesem Fall der Ligand für die Herabregulation des ErbB Rezeptors verantwortlich ist (Abb. 3.13 B). Dies bestätigte sich im NRG1 *Knockdown* jedoch nicht. Des Weiteren wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Proteinkinase A sowie CREB5 und dem ErbB4 Rezeptor untersucht. Hier ergab sich ein Hinweis darauf, dass der *Knockdown* der katalytischen Untereinheit G der Proteinkinase A eine gesteigerte Expression der ErbB4 mRNA zur Folge hat, wobei der Wildtyplevel nicht erreicht werden konnte (C). Dieser Effekt wird allerdings nicht oder zumindest nicht allein über CREB5 vermittelt, da der *Knockdown* des Transkriptionsfaktors CREB5 keinen Einfluss auf die mRNA-Expression des ErbB4 Rezeptors hat (D). Die Stimulation von Huh7 Kontrollzellen mit Forskolin bewirkt keine Abnahme der ErbB4 mRNA-Expression (E). **Die Herabregulation des ErbB4 Rezeptors erfolgt unabhängig von NRG1 und CREB5, die Stimulation des cAMP-Signalwegs in Kontrollzellen bewirkt keine Abnahme der Rezeptorexpression, wobei eine Beteiligung der Proteinkinase A nicht auszuschließen ist.**

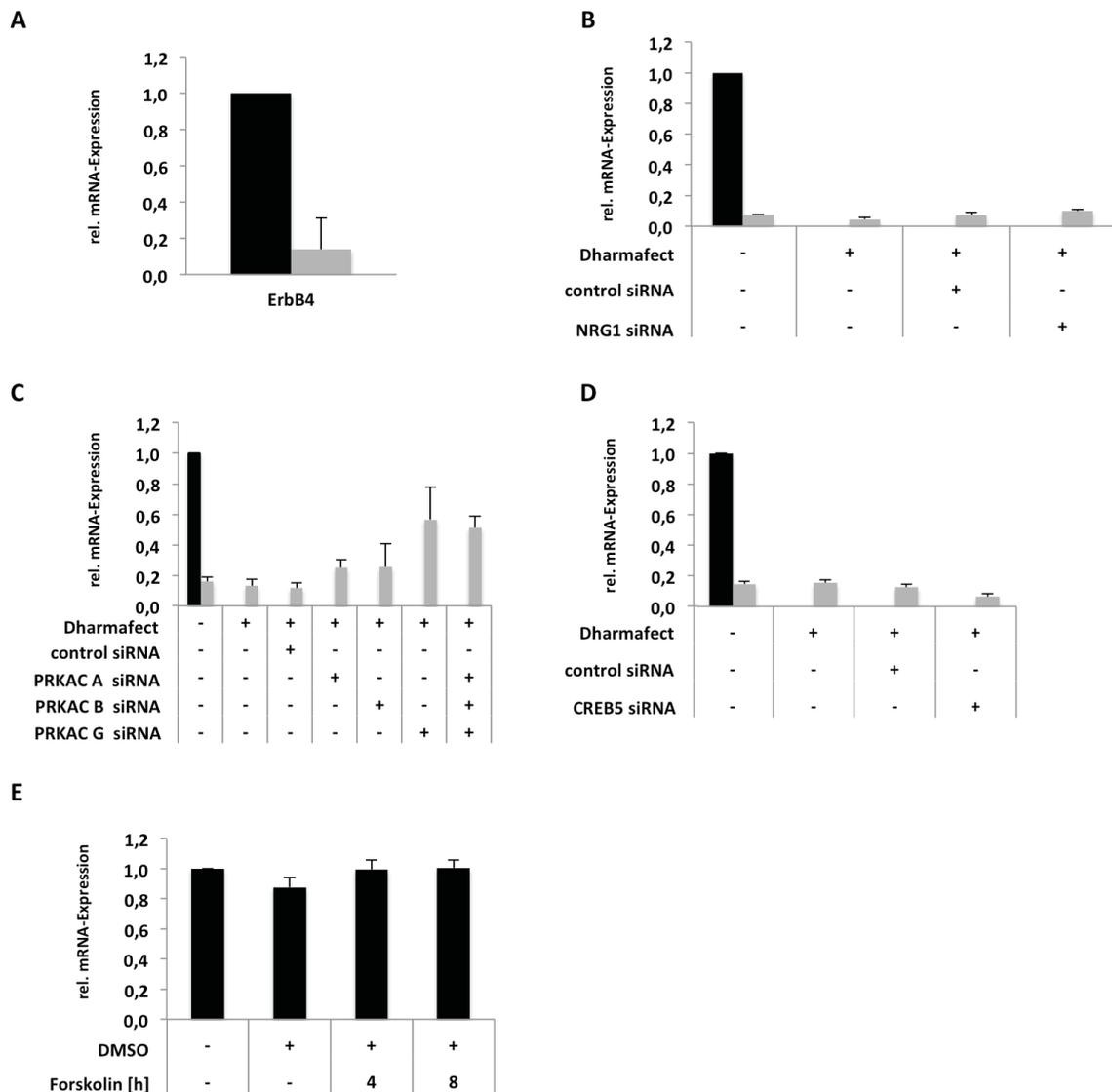


Abbildung 3.13: Die Expression des ErbB4 Rezeptors wird durch das Hepatitis C Virus fast vollständig supprimiert. In den Säulendiagrammen werden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. **A bis E** Analyse der aus Gesamt-Zellysaten isolierten mRNA auf die Expression von ErbB4 mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Für **B** wurden Huh9-13 Zellen wie unter Abbildung 3.3 beschrieben mit Kontroll-siRNA (50 nM) bzw. NRG1 siRNA (50 nM) für 72 Stunden transfiziert. Für **C** wurden Huh9-13 Zellen wie unter Abbildung 3.6 beschrieben mit Kontroll-siRNA (50 nM) bzw. PRKACA, B und G siRNA (50 nM) für 72 Stunden transfiziert. Für **D** wurden Huh9-13 Zellen wie unter Abbildung 3.7 beschrieben mit Kontroll-siRNA (50 nM) bzw. CREB5 siRNA (50 nM) transient transfiziert und für 72 Stunden inkubiert. Für **E** wurden die Zellen wie unter Abbildung 3.5 beschrieben mit 10 μM Forskolin für 4 und 8 Stunden behandelt.

Die Analyse der Neureguline belegt eine gleichmäßige Expression der Neureguline 2 und 3. Die mRNA-Expression des Neuregulin 4 war in Huh9-13 Replikonzellen nicht messbar (Abb. 3.14).

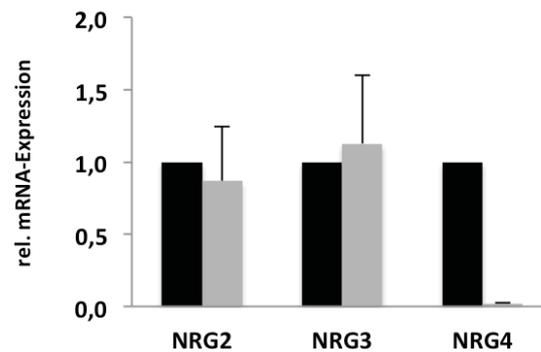


Abbildung 3.14: Das Hepatitis C Virus greift in die Regulation weiterer Mitglieder der NRG-Familie ein. Im Säulendiagramm wurden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Analyse der aus Gesamt-Zellysaten isolierten mRNA auf die Expression von NRG2, NRG3 und NRG4 mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an.

3.4 Die ErbB3 Rezeptoraktivierung

Ebenfalls untersucht werden sollte der Einfluss der verminderten ErbB3 Rezeptorexpression auf die Aktivierbarkeit des Rezeptors durch seinen Liganden HRG1 β sowie auf die HRG1 β -vermittelte Aktivierung des ErbB3 *downstream targets* p38^{MAPK}. Dazu wurden Huh7 Kontrollzellen sowie Huh9-13 Replikonzellen für 5 Minuten mit HRG1 β in verschiedenen Konzentrationen stimuliert und die Aktivierung des Rezeptors sowie der p38^{MAPK} mittels Immunoblot untersucht. Hierbei wurde eine vergleichsweise Hyperphosphorylierung des ErbB3 Rezeptors in Huh9-13 Replikonzelllinien deutlich, so dass trotz der deutlich reduzierten Rezeptorexpression nur einen geringen Unterschied zur ErbB3 Rezeptoraktivierung in Huh7 Kontrollzellen gab. In Folge dessen war auch die HRG1 β -vermittelte Aktivierung des *downstream targets* p38^{MAPK} nicht reduziert, sondern in Gegenwart des HCV Replikons, wie bereits durch andere Stimuli beschrieben [94], verstärkt (Abb. 3.15). **Die ErbB3 Rezeptoraktivierung wird durch die verminderte ErbB3 Expression nur geringfügig beeinflusst.**

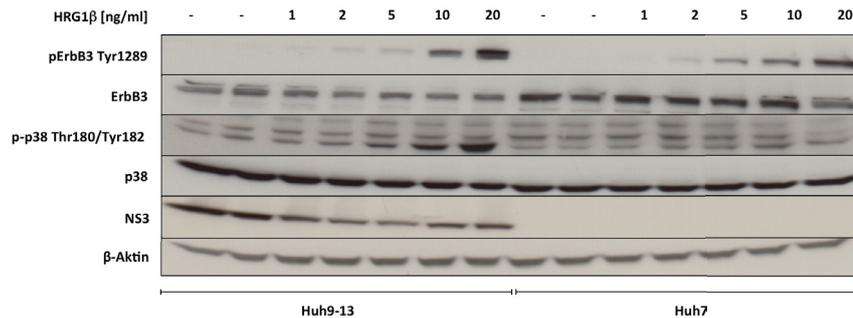


Abbildung 3.15: Die durch HRG1 β vermittelte Signaltransduktion bleibt durch die Herabregulation des ErbB3 Rezeptors in Folge einer vergleichweisen Hyperphosphorylierung unbeeinträchtigt. Huh7 Kontrollzellen und Huh9-13 Replikonzellen wurden für 5 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen HRG1 β stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot analysiert. β -Aktin diene als Ladekontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt.

3.5 Einfluss der ErbB3 Oberflächenexpression auf den EGF Rezeptor

Aufgrund der Beteiligung des EGF Rezeptors am viralen Eintritt in die Wirtszelle sollte die Vermutung überprüft werden, ob HCV die Expression des ErbB3 Rezeptors herunterreguliert um dadurch die Oberflächenexpression des EGF Rezeptors zu verstärken. Die simultane Analyse der Oberflächenexpression beider Rezeptoren belegte, dass Zellen mit reduzierter ErbB3 Expression den EGF Rezeptor verstärkt präsentieren (Abb. 3.16 A, B). Allerdings ist die EGFR Oberflächenexpression auf humanen Hepatomazellen vergleichsweise gering (A, B). Zur weiteren Überprüfung dieses Befundes wurde der ErbB3 Rezeptor in Huh7 Kontrollzellen posttranskriptionell mittels siRNA gehemmt und die Auswirkung auf die EGF Rezeptordichte auf der Zelloberfläche mittels FACS-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 3.16 C dargestellt bewirkt der *Knockdown* des ErbB3 Rezeptors eine signifikant verstärkte EGFR Expression um den Faktor 2. Der *Knockdown* hat keinen Einfluss auf die zelluläre Expression des EGF Rezeptors. Die Analyse des Gesamtzelllysats mittels Western Blot und spezifischer Antikörper gegen ErbB3 und EGFR belegt eine gleichbleibende Expression des EGF Rezeptors nach Behandlung der Zellen mit ErbB3 siRNA (E). **Die EGFR Expression ist unabhängig von der ErbB3 Expression, die Oberflächenpräsentation des EGF Rezeptors nimmt bei reduzierter ErbB3 Expression jedoch signifikant zu.**

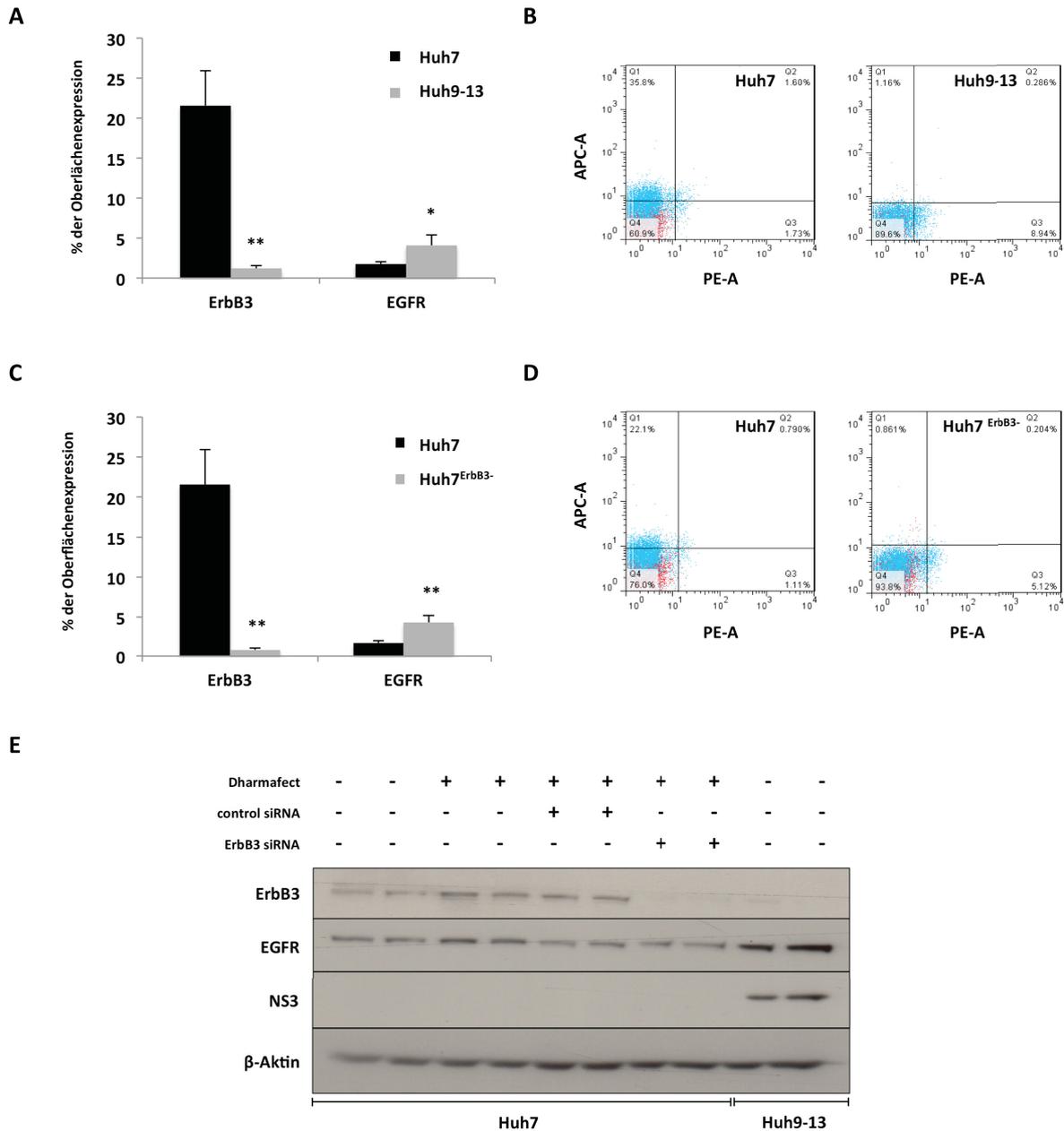


Abbildung 3.16: Die Oberflächenexpression des EGF Rezeptors ist verstärkt, wenn die Expression des ErbB3 Rezeptors reduziert ist. A und B Zytometrische Analyse der Oberflächenexpression von ErbB3 und EGFR auf Huh7 und Huh9-13 Zellen mittels APC- bzw. PE-konjugierter Antikörper (FACS Canto II), ausgewertet über die FlowJo-Software gegen die entsprechende Isotypenkontrolle. **A** gibt den prozentualen Anteil des Rezeptors auf der Zelloberfläche wieder. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. **B** ist der zugehörige Dot Plot. Rot –APC-/PE-Kontrolle, Blau – ErbB3/EGFR. Für **C bis E** wurden Huh7 Zellen mit ErbB3-siRNA (50 nM) für 72 Stunden transfiziert. Für **C** und **D** wurde ebenfalls eine zytometrische Analyse wie für A und B beschrieben durchgeführt. **E** Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot auf die Expression von ErbB3 und EGFR analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt.

3.6 Infektionssystem

3.6.1 Effekte im Modell der akuten Infektion

Alle bisher vorgestellten Daten stammen aus dem Replikon- bzw. Völllängenreplikonsystem (Genotyp 1b). Da sowohl die Herabregulation des ErbB3 Rezeptors als auch die Hochregulation des Liganden NRG1 in diesem System deutlich wurde, ist davon auszugehen, dass die Gegenwart des Replikationskomplexes, also der Nicht-Strukturproteine des Hepatitis C Virus ausreichend ist, um den Mechanismus der Regulation und die Auswirkungen zu klären. Dennoch sollten die Befunde ebenfalls im Infektionssystem verifiziert werden. Hierfür wurden Huh7.5 Zellen mit Hepatitis C Viren vom Genotyp 2a (JC1) infiziert. Im akuten System, das heißt 72 Stunden nach Infektion mit JC1, wird die basal verstärkte Expression des Neuregulin 1 (Abb. 3.17 B) ebenso wie die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors CREB5 (C) deutlich. Ebenfalls erkennbar ist eine tendenzielle Herabregulation des ErbB3 Rezeptors, das Ausmaß der Herabregulation ist 72 Stunden nach Infektion jedoch noch nicht mit den Befunden aus dem Replikonsystem vergleichbar (A). **Die Infektion von humanen Hepatomazellen mit dem HCV JC1 Isolat verursacht nach 72 Stunden einen deutlichen Anstieg der CREB5 sowie NRG1 Expression auf mRNA Ebene, der Einfluss auf die ErbB3 Expression ist im akuten System gering.**

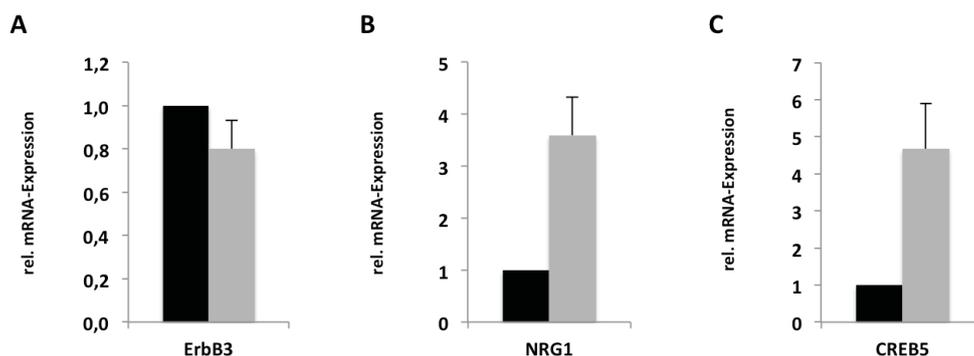


Abbildung 3.17: HCV induziert die Expression von NRG1 und CREB5. Soweit nicht anders vermerkt, werden in den Säulendiagrammen Huh7.5 Kontrollzellen als schwarze Säulen und die für 72 Stunden mit 1 MOI (*multiplicity of infection*) des HCV JC1 Isolats (Genotyp 2a) infizierten Huh7.5 Zellen als graue Säulen dargestellt. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf **A** die Expression von ErbB3, **B** die Expression von NRG1 und **C** die Expression von CREB5 mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an.

3.6.2 Auswirkung der ErbB3 Herabregulation auf den viralen Eintritt

Zur Simulation der durch das Virus vermittelten Deregulation des ErbB3 Rezeptors sowie seines Liganden NRG1 wurden Huh7.5 Zellen 12 Stunden vor Infektion mit 25 ng/ml HRG1 β behandelt. Als Maß für den viralen Eintritt wurde hier die Expression viraler mRNA mittels RT-PCR gemessen. Verwendet wurden Primer die im Bereich der Nicht-Strukturproteine NS3 und NS5A binden. Trotz relativ großer Standardfehler lässt sich eine eindeutige Tendenz hin zur verstärkten viralen Replikation nach Vorstimulation mit HRG1 β erkennen (Abb. 3.18). **Die HRG1 β prä-Stimulation von Huh7.5 Replikonzellen vor Virusinfektion brachte erste Hinweise darauf, dass die Reduktion der ErbB3 Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche einen induktiven Effekt auf die virale Replikation verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen 72 Stunden nach Infektion hat.**

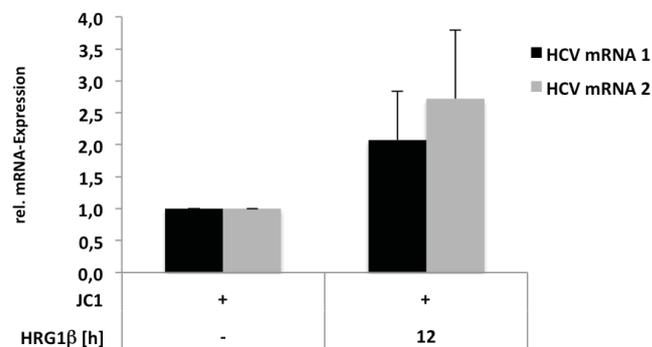


Abbildung 3.18: Vorstimulation mit HRG1 β bewirkt eine gesteigerte virale Replikation. Huh7.5 Kontrollzellen werden als schwarze Säulen und die für 72 Stunden mit einer MOI des HCV JC1 Isolats (Genotyp 2a) infizierten Huh7.5 Zellen als graue Säulen dargestellt. Huh7.5 Zellen wurden nach zwölfstündiger Vorstimulation mit 25 ng/ml HRG1 β mit einer MOI JC1 infiziert. Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression der HCV RNA 1 und HCV RNA 2 mittels spezifischer Primer, die im Bereich der für NS3 und NS5A kodierenden Region spezifisch binden. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an.

3.7 Das Chemokin CXCL8

Innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe wird unter anderem auch der Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Chemokinexpression in Hepatozyten genauer untersucht. Die bereits basal verstärkte Expression verschiedener Chemokine und insbesondere des Chemokins CXCL8 in Huh9-13 Replikonzellen (Abbildung 3.19 A, B) warf die Frage auf, ob dieser Effekt möglicherweise durch die verstärkte Expression des Neuregulins 1 verursacht wird. Zunächst wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR die Auswirkung einer Stimulation mit 10 und 25 ng/ml HRG1 β für 80 und 160 Minuten untersucht. Hier ergab sich ein Hinweis auf eine verstärkte CXCL8 Expression nach Stimulation (Abb. 3.19 A). Ebenfalls untersucht wurde der Effekt der Stimulation mit HRG1 β für 8 und 16 Stunden auf Proteinebene mittels spezifischem CXCL8 ELISA. Die basal verstärkte CXCL8 Expression bestätigte sich, die zusätzliche Stimulation mit HRG1 β hatte jedoch keinen Effekt auf die CXCL8 Sekretion (B). Da man jedoch berücksichtigen muss, dass die NRG1 Expression in den Huh9-13 Replikonzellen bereits deutlich erhöht ist, blieb die Frage nach einer möglichen Beteiligung an der basal verstärkten Expression ungeklärt. Zur weiteren Abklärung wurde daher im NRG1 *Knockdown* mittels RT-PCR überprüft, ob die CXCL8 Expression abnimmt. Dies war nicht der Fall, so dass von einer Beteiligung des Neuregulin 1 nicht auszugehen ist (C). **Die bereits basal verstärkte Expression des Chemokins CXCL8 im Rahmen einer HCV Infektion ist Neuregulin 1-unabhängig.**

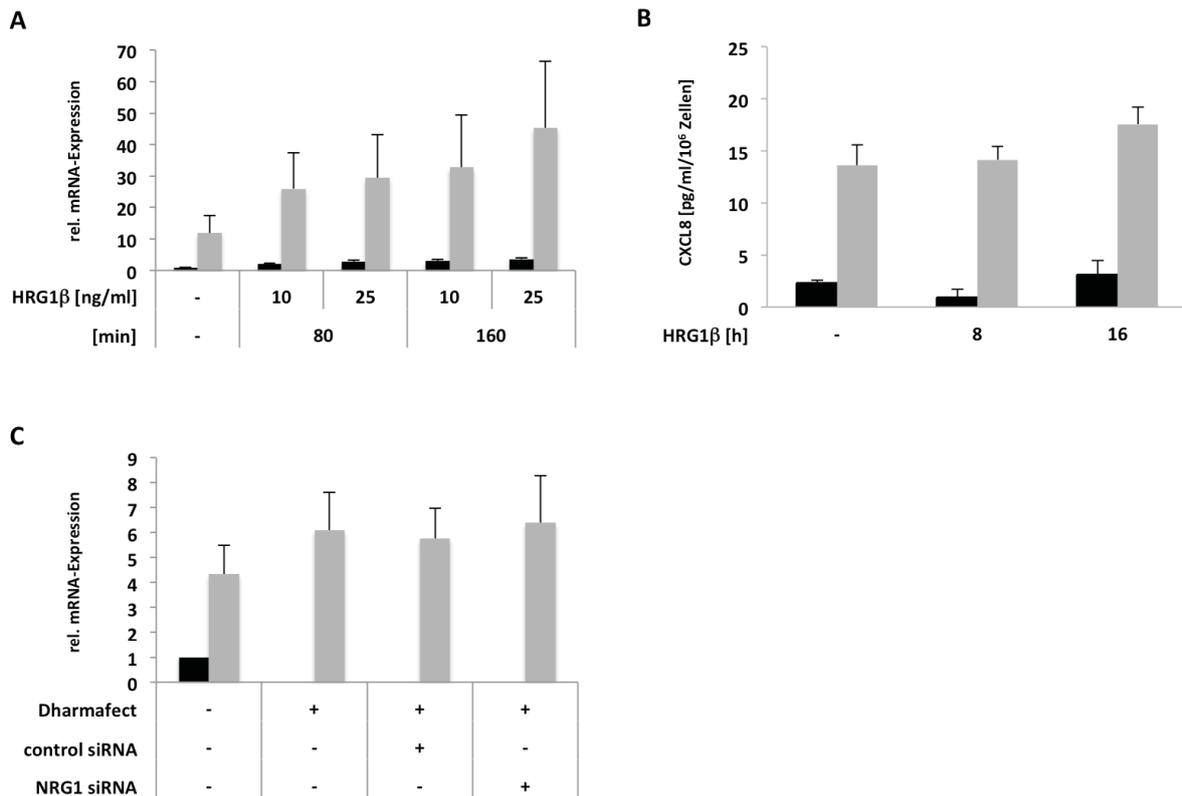


Abbildung 3.19: Die basale Hochregulation des Chemokins CXCL8 wird nicht durch NRG1 vermittelt. In den Säulendiagrammen werden Huh7 Kontrollzellen als schwarze Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als graue Säulen dargestellt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Für **A** wurden die Zellen mit 10 und 25 ng/ml HRG1 β für 80 und 160 Minuten stimuliert. Für **B** wurden die Zellen mit 10 ng/ml HRG1 β für 8 und 16 Stunden stimuliert. Analyse der CXCL8-Proteinkonzentration in Überständen mittels CXCL8 ELISA. Für **C** wurden Huh9-13 Zellen wie unter Abbildung 3.3 beschrieben mit Kontroll-siRNA (50 nM) bzw. NRG1 siRNA (50 nM) für 72 Stunden transfiziert. **A und C** Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von CXCL8 mittels RT-PCR. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben.

4 Ergebnisse NS5B

4.1 Generierung von Mutagenese- und Trunkierungskonstrukten

Das Hepatitis C Virus nutzt für die Ausbildung des Replikationskomplexes wirtsspezifische Proteine. Vorbefunde aus der eigenen Arbeitsgruppe legen nahe, dass HCV-kodierte Proteine mit dem Wirtspotein c-Src einen Komplex ausbilden [39]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte als Nebenprojekt das Interaktionsmotiv der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B mit der c-Src-SH3-Domäne weiter eingegrenzt werden. Im Rahmen einer Sequenzanalyse mittels *SH3-Hunter Software* wurden zwei Prolin-reiche Motive identifiziert, die für eine Interaktion zwischen c-Src und NS5B relevant sein könnten. Diese wurden in der Reihenfolge ihres Auftretens als Motiv 1 (SAPPGDPPK, Aminosäuren 348-356) und Motiv 2 (TRDPTTPL, Aminosäure 386-393) bezeichnet. Die Vorbefunde der eigenen Arbeitsgruppe wiesen darauf hin, dass das Motiv 1 allein nur schwach mit der c-Src-SH3-Domäne interagiert, während das Motiv 2 allein eine ähnlich starke Interaktion wie das Vollängenkonstrukt aufweist. **Eine Strukturanalyse mittels PyMOL Software ergab Hinweise darauf, dass das Motiv 1 wahrscheinlicher für eine Interaktion ist, da es im Gegensatz zu Motiv 2 an der Oberfläche der Polymerase liegt (Abb. 4.1).**

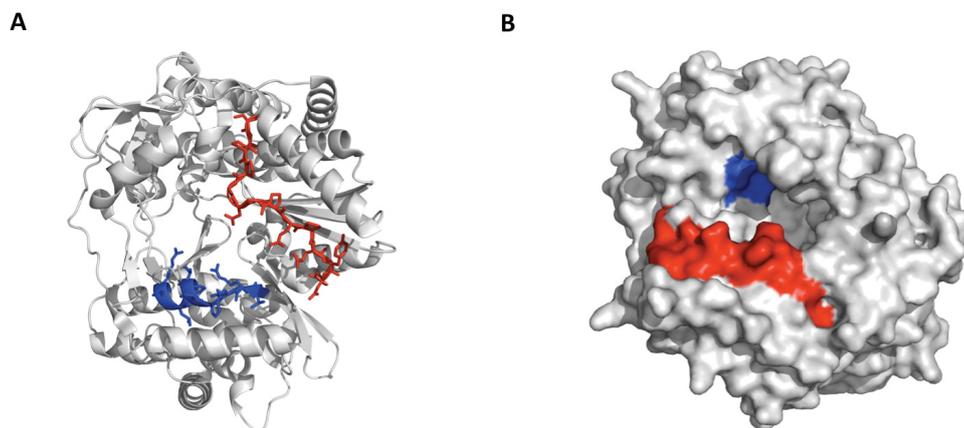


Abbildung 4.1: Strukturanalyse der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B mittels PyMOL Software. In rot dargestellt ist das sogenannte Motiv 1 der viralen NS5B Polymerase, in blau dargestellt das sogenannte Motiv 2 (pdb-Nr. 3mwv). **A** Cartoon der NS5B-Struktur, zusätzlich sind die Seitenketten der potentiellen Motive dargestellt. **B** NS5B in Oberflächendarstellung.

Da durch Trunkierung einzelner Bereiche die Tertiärstruktur des Proteins möglicherweise insofern verändert wird, als dass Bindungsmotive freiliegen, die unter physiologischen Bedingungen nicht zur Interaktion befähigt wären, wurden Punktmutationen in das Vollängen-NS5B-Konstrukt eingebracht. Bei den potentiellen SH3-Bindemotiven handelt es sich um PxxP-Motive, so dass ein Austausch der Proline gegen Alanine vorgenommen wurde. Dies erfolgte für beide Motive einzeln, sowie für beide Motive gleichzeitig. Die entstandenen Konstrukte sind in den Abbildungen als NS5B P350/353A, NS5B P388/391A und NS5B P350/353+388/391A bezeichnet. Die Expression der Konstrukte erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) und die erfolgreiche Expression aller punktmutierten Konstrukte wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 4.2).

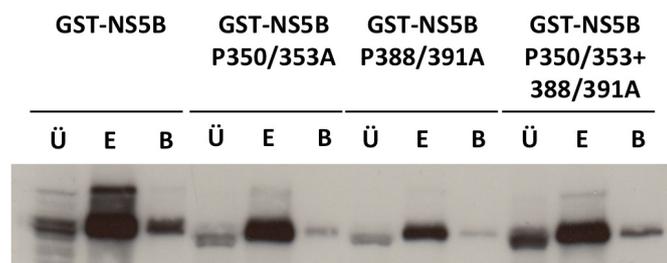


Abbildung 4.2: Expressionskontrolle und Aufreinigung der NS5B-Mutagenesekonstrukte über Glutathion Sepharose 4B im Batchverfahren. Die NS5B-Mutagenesekonstrukte wurden in *E. coli* BL21 überexprimiert. Die Bakterienlysate wurden über Nacht mit Glutathion Sepharose 4B inkubiert, anschließend gewaschen und mit reduziertem Glutathion eluiert. Legende: Ü: Überstand nach Aufreinigung mittels Glutathion Sepharose *Beads*, E: Elution der *Beads* mit reduziertem Glutathion, B: *Beads* nach Elution mit red. Glutathion in 2xLämmli/β-Mercaptoethanol eluiert.

Abgesehen von diesen punktmutierten Proteinen wurden Trunkierungskonstrukte von NS5B hergestellt. So war es notwendig, Proteine ohne C-terminalen Membrananker zu generieren, da dieser zu Löslichkeitsproblemen des exprimierten Proteins führen kann. Im Vorfeld traten zudem häufig Probleme mit unspezifischen Interaktionen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B mit Sepharose und GST-*Tag* auf, so dass die Entfernung des Membranankers auch hier Abhilfe schaffen sollte. Zusätzlich wurden weitere Trunkierungskonstrukte entwickelt, die eine genauere Eingrenzung des Interaktionsmotivs ermöglichen sollten. Zur Optimierung der Voraussetzungen für die Expression wurden synthetische Gene bei der Firma

Geneart bestellt. Diese Gene sind für die Expression in *Escherichia coli* Codon-optimiert und tragen C-terminal einen 6xHis-Tag. PreScission beziehungsweise TEV cleavage sites ermöglichen die Abspaltung des Tags. Geplant war zudem eine Aufreinigung eben dieser Konstrukte, um *in vitro* Studien mit aufgereinigten NS5B-Konstrukten sowie der aufgereinigten c-Src-SH3-Domäne durchzuführen. Ein zusätzliches Konstrukt, das GST-NS5B Motiv 1/2 (341-397), wurde über eine Polymerasekettenreaktion aus dem nicht Codon-optimierten, ursprünglichen GST-NS5B-Plasmid generiert. (Abb. 4.3)



Abbildung 4.3: Trunkierte Konstrukte der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B. Dargestellt sind in grau die NS5B-Turnkierungskonstrukte mit entsprechendem Tag, wobei das Vollängenkonstrukt ohne Tag aus 591 Aminosäuren besteht. Rot markiert ist das PxxP-Motiv 1 (SAPPGDPPK, Aminosäuren 348-356), blau markiert das PxxP-Motiv 2 (TRDPTTPL, Aminosäure 386-393). *Gleiches Konstrukt mit PreScission bzw. Tev Cleavage Site vor dem 6xHis-Tag vorhanden, außerdem auch ohne Motiv 1 und 2 (Punktmutation der Proline), ebenfalls ohne sowie mit *PreScission* bzw. *Tev cleavage site* vorhanden (Punktmutierte Konstrukte wurden nicht verwendet).

Die Konstrukte wurden hinsichtlich ihrer korrekten Größe im Agarose-Gel überprüft (Abb. 4.4 A). Die Expression der Proteine erfolgte wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben. Während die Analyse mittels Western Blot die eindeutige Expression der Proteine (B) ergab, konnte in der Coomassie Färbung (C) keine Expression der Konstrukte NS5B M1/2 (280-460) sowie NS5B M1/2 (121-397) nachgewiesen werden, so dass anzunehmen ist, dass diese Proteine nicht stabil sind oder nur in sehr geringer Menge exprimiert werden, die in der Coomassie-Färbung nicht von unspezifisch exprimierten Proteinen unterscheidbar ist. **Die Überexpression von NS5BΔ21 (1-570) sowie NS5B M1 (1-380) hingegen konnte im Coomassie Gel belegt werden (C).**

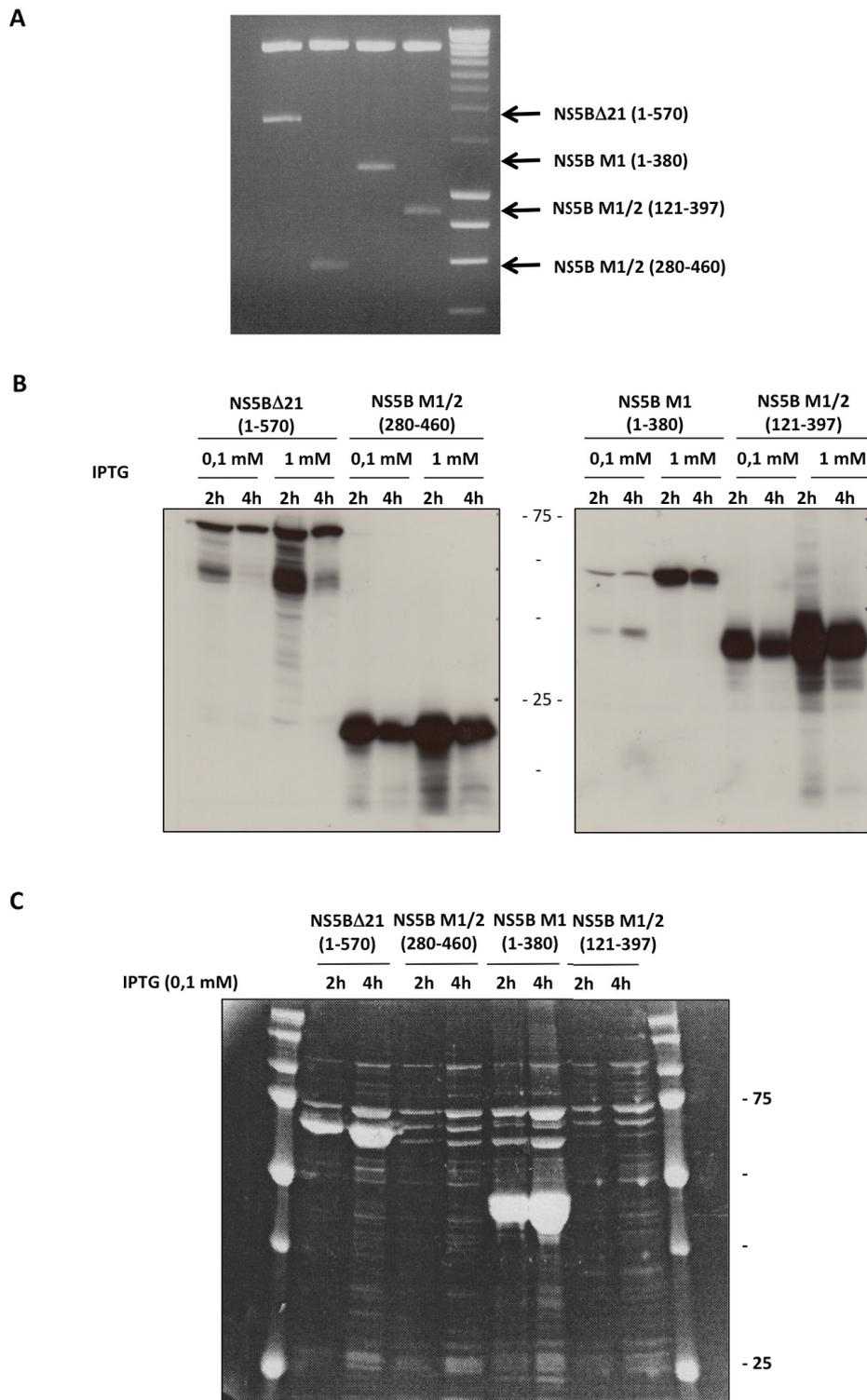


Abbildung 4.4: Expressionskontrolle der synthetisch hergestellten NS5B-Konstrukte. **A** Kontrollverdau der Plasmide NS5BΔ21 (1-570), NS5B M1/2 (280-460), NS5B M1 (1-380) und NS5B M1/2 (121-397) mit den Restriktionsenzymen NdeI und Bpu1102I für 1 Stunde bei 37°C und anschließende Auftrennung des Ansatzes im Agarose Gel. Für **B** wurde die Proteinexpression mit 0,1 mM und 1 mM IPTG induziert und nach 2 bzw. 4 Stunden Inkubation bei 30°C abgestoppt. Die Kontrolle der Proteinexpression erfolgte mittels spezifischem NS5B Antikörper im Western Blot. Für **C** wurde die Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG induziert und nach 2 bzw. 4 Stunden Inkubation bei 30°C abgestoppt. Kontrolle der Proteinexpression im Coomassie Gel.

Die Größenkontrolle GST-NS5B Konstruktes Motiv 1/2 (341-397) erfolgte im Agarose Gel (Abb. 4.5 A), die Kontrolle der Proteinexpression im Western Blot (B).

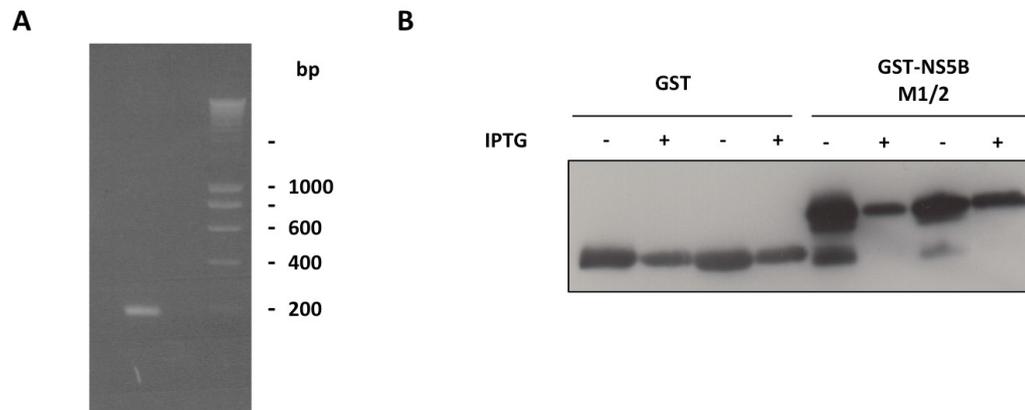


Abbildung 4.5: Expressionskontrolle des Konstruktes GST-NS5B Motiv 1/2 (341-397). **A** Kontrollverdau der Plasmide mit EcoRI und XhoI für 1 Stunde bei 37°C und anschließende Auftrennung des Ansatzes im Agarose Gel. **B** Kontrolle der Proteinexpression ohne und nach Induktion der Proteinexpression durch IPTG (0,1 mM, 4 Stunden) mittels spezifischem GST Antikörper im Western Blot. Legende: bp: Basenpaare.

4.2 Pulldown-Experimente und Co-Immunopräzipitation

4.2.1 Pulldown mit überexprimierten NS5B-Konstrukten

Mit Hilfe der unter Kapitel 4.1 generierten Mutagenese- und Trunkierungskonstrukte von c-Src sollte eine weitere Eingrenzung des Interaktionsmotivs innerhalb der Sequenz der NS5B Polymerase erfolgen. Hierfür wurden die verschiedenen Konstrukte sowie das bereits in vorangehenden Untersuchungen eingesetzte Trunkierungskonstrukt, welches das sogenannte Motiv 2 enthält (Kapitel 2.2.3) in *Pulldown*-Experimenten eingesetzt.

Zunächst wurde das von *Pfannkuche et al.* beschriebene Trunkierungskonstrukt GST-NS5B M2 [39] sowie das Trunkierungskonstrukt GST-NS5B M1/2 (341-397) und zusätzlich die durch Mutagenese-PCR veränderten Konstrukte GST-NS5B P350/353A, GST-NS5B P388/391A und GST-NS5B P350/353+388/391A an Sepharose gekoppelt und mit Huh9-13 Replikonzelllysaten inkubiert. Die Analyse erfolgte im Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die

Tyrosinkinase c-Src sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B. Dabei ergaben sich Hinweise auf eine deutlich reduzierte Interaktion mit GST-NS5B M1/2 (341-397). Die Interaktion der Mutagenese-Konstrukte mit c-Src blieb verglichen mit GST-NS5B unverändert (Abb. 4.6, Vergleich Spuren 6-8 mit Spur 2). **Die Punktmutation der Proline der PxxP-Motive allein ist nicht ausreichend, um die Interaktion von NS5B mit c-Src zu unterbinden.**

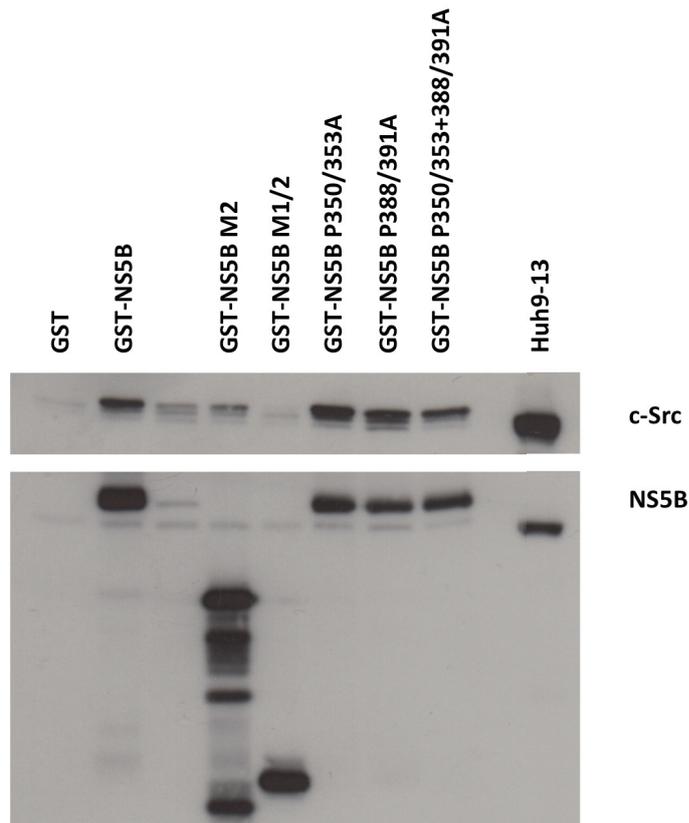


Abbildung 4.6: Pull-down der GST-NS5B-Konstrukte mit Huh9-13 Zelllysaten. Die Kopplung der GST-Konstrukte erfolgte für 2 Stunden bei 4°C an Glutathion Sepharose 4B. Anschließend wurden Interaktionspartner mit Hilfe der an die *Beads* gebundenen GST-NS5B-Konstrukte aus Huh9-13 Zelllysaten gezogen. Die Zellyse erfolgte 48 Stunden nach Aussaat der Zellen in mTLP Lysepuffer. Die Lysate wurden über ein *Pre-Clearing* mittels Glutathion Sepharose 4B für den *Pull-down* vorbereitet. Die Membran wurde zunächst mit c-Src Antikörper inkubiert und detektiert. Vor der zweiten Detektion mit NS5B Antikörper wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestriipt.

4.2.2 *Pulldown* mit überexprimierten GST-SH3-Konstrukten der Src-Familie

Die hier verwendeten GST-Src-SH3-Konstrukte wurden der Arbeitsgruppe von der AG Willbold aus dem Forschungszentrum Jülich zur Verfügung gestellt. Gekoppelt wurden die Konstrukte über ihr GST-Tag an Glutathion Sepharose 4B. Anschließend erfolgte die Inkubation der *Beads* mit Zellysaten aus Huh9-13 Replikonzellen, welche die Nicht-Strukturproteine des Hepatitis C Virus enthalten. Das besondere Augenmerk lag hier auf der Interaktion der verschiedenen SH3-Domänen mit NS5A sowie NS5B.

Verifiziert werden konnte eine Interaktion zwischen der c-Src-SH3-Domäne mit NS5B. Eine Interaktion mit NS5A ist ebenfalls erkennbar, wenn auch vergleichsweise schwächer (Abb. 4.7, Spur 3).

NS5B interagiert gleichermaßen mit den SH3-Domänen von c-Src, Fyn, Lck und Abl, eine reduzierte Interaktion konnte hingegen mit der SH3-Domäne von Hck festgestellt werden. Die Aussage relativiert sich jedoch, wenn man die unspezifische Interaktion von NS5B mit dem GST-Tag allein berücksichtigt. Ein deutlicher Unterschied zu den zuerst genannten SH3-Domänen ist sicherlich erkennbar, jedoch ist auch die Interaktion mit GST-c-Src kaum von der unspezifischen Wechselwirkung mit dem GST-Tag unterscheidbar (Vergleich Spuren 3, 4, 6 und 7 mit Spur 1).

NS5A hingegen wies keine unspezifische Interaktion mit dem GST-Tag auf, jedoch in diesem *Pulldown* auch keine Interaktion mit Gesamt-c-Src. Dass diese Interaktion stattfindet, wurde jedoch über *Pulldown*-Experimente mit überexprimiertem c-Src und Huh9-13 Zellysaten bereits von *Pfannkuche et al.* belegt [39].

Eine geringe Interaktion von NS5A fand mit den SH3-Domänen von c-Src, Lck und Abl statt (Spuren 3, 6 und 7), eine stärkere Interaktion mit Fyn (Spur 4). Eine Interaktion zwischen der SH3-Domäne von Hck und NS5A ist nicht erkennbar (Spur 5). Wichtig zu berücksichtigen ist der Umstand, dass die viralen Proteine aus dem Gesamt-Zellysat gezogen werden, so dass Interaktionen möglicherweise über andere Interaktionspartner vermittelt werden könnten. So könnte zum Beispiel die Interaktion zwischen NS5A und der SH3-Domäne von c-Src über einen Komplex von GST-c-Src-SH3, NS5B und möglicherweise auch Gesamt-c-Src aus dem Zellysat vermittelt werden. **NS5B interagiert mit der isolierten SH3-Domäne der c-Src Tyrosinkinase, ebenso mit den isolierten SH3-Domänen von Fyn, Lck und Abl.**

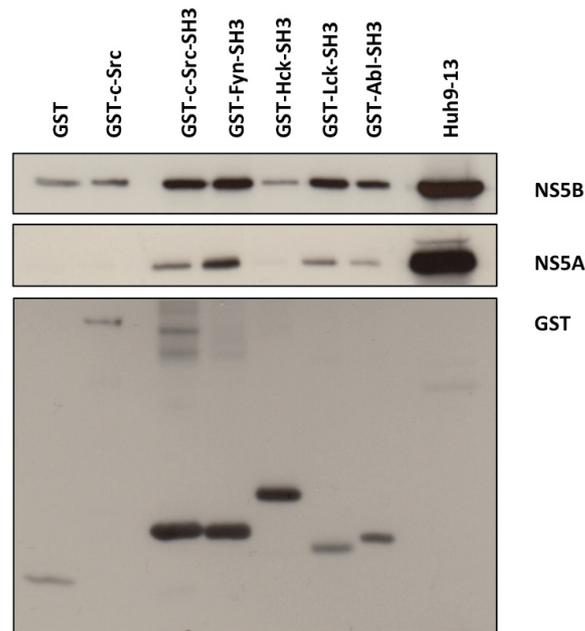


Abbildung 4.7: Pull-down der GST-Src-SH3-Konstrukte mit Huh9-13 Zelllysaten. Die Kopplung der GST-Konstrukte an Glutathion Sepharose 4B erfolgte durch Inkubation der *Beads* mit aufgereinigten GST-Src-SH3 Konstrukten für 2 Stunden bei 4°C. Anschließend wurden Interaktionspartner mit Hilfe der an die *Beads* gebundenen GST-Src-Konstrukte aus Huh9-13 Zelllysaten gezogen. Die Zellyse erfolgte 48 Stunden nach Aussaat der Zellen in mTLP Lysepuffer. Die Lysate wurden über ein *Pre-Clearing* mittels Glutathion Sepharose 4B für den *Pull-down* vorbereitet. Die Membran wurde zunächst mit NS5B Antikörper inkubiert und detektiert. Vor den Detektionen mit NS5A Antikörper und GST Antikörper wurde die Membran jeweils mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestript.

4.2.3. Pull-down mit überexprimierten c-Src- und NS5B-Konstrukten

In einem weiteren Versuch sollten die überexprimierten, synthetischen NS5B-Konstrukte hinsichtlich ihrer Interaktion mit GST-c-Src sowie verschiedenen GST-c-Src-Trunkierungskonstrukten untersucht werden. Die Plasmide hierfür standen der Arbeitsgruppe aus Vorarbeiten zur Verfügung [39], eine Expressionskontrolle im Coomassie-Gel hat die Überexpression der trunkierten Proteine belegt (Daten nicht gezeigt). Für den *Pull-down* wurden die GST-Src-Konstrukte an Glutathion Sepharose 4B gekoppelt und anschließend mit den 6xHis-getaggen Konstrukten NS5B Δ 21 (1-570) sowie NS5B M1 (1-380) über Nacht bei 4°C inkubiert. In diesem Versuch wurden keine Zelllysate sondern ausschließlich überexprimierte Proteine aus Bakterienlysaten verwendet. Auch hier wurde deutlich, dass NS5B trotz der Entfernung des Membranankers eine starke unspezifische Wechselwirkung mit dem

GST-Tag einget. Dennoch konnte belegt werden, dass das c-Src-Trunkierungs-konstrukt, welchem die SH3-Domäne fehlt, eine deutlich schwächere Interaktion mit NS5B aufweist (Abb. 4.8, Spur 6), als die übrigen Trunkierungs-konstrukte und insbesondere auch als die SH3-Domäne allein (siehe Spur 7). Für das NS5B-Konstrukt Motiv 1 (1-380) gibt es keine unspezifische Wechselwirkung mit dem GST-Tag, eine starke Interaktion mit GST-c-Src, GST-c-Src Δ SH2 sowie GST-c-Src-SH3 (rechter Teil der Abbildung 4.8), wohingegen eine nur sehr schwache Interaktion mit dem Trunkierungs-konstrukt zu erkennen ist, welchem die SH3-Domäne fehlt (Spur 13). Auffällig ist die fehlende Interaktion von NS5B M1 (1-380) mit GST-c-Src Δ SH1 (Spur 11), da es sich bei der SH1-Domäne nicht um eine Interaktionsdomäne sondern um die Kinasedomäne handelt. **Die Trunkierungs-konstrukte NS5B Δ 21 sowie NS5B M1 (1-380) interagieren mit GST-c-Src sowie den Trunkierungs-konstrukten GST-c-Src Δ SH2 und GST-c-Src-SH3, nicht jedoch mit dem Trunkierungs-konstrukt GST-c-Src Δ SH3.**

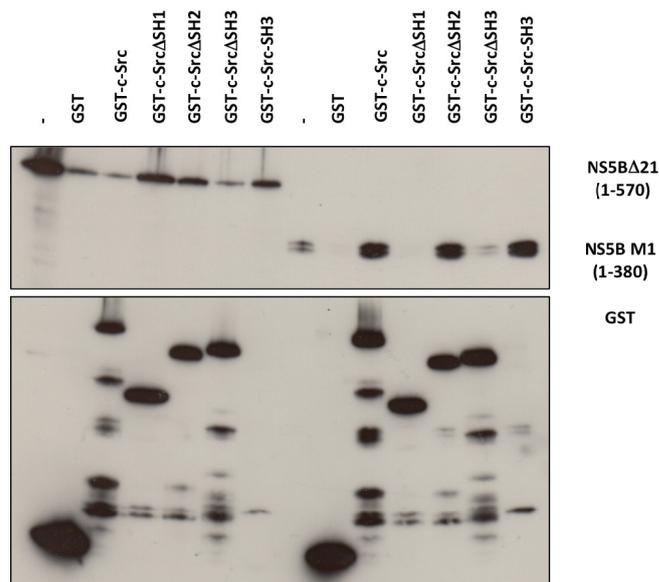


Abbildung 4.8: Pull-down von GST-c-Src mit überexprimierten 6xHis-NS5B-Trunkierungs-konstrukten. Sowohl die GST-c-Src- wie auch die 6xHis-NS5B-Konstrukte wurden in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Nach Vorinkubation der Glutathion Sepharose 4B mit Bakterienlysaten, die die rekombinanten GST-c-Src-Trunkierungs-konstrukte enthielten (2 Stunden bei 4°C im Überkopffrotor) wurden die GST-c-Src-gekoppelten Sepharose *Beads* über Nacht mit Bakterienlysaten inkubiert, die die rekombinanten 6xHis-getaggten NS5B-Trunkierungs-konstrukten enthielten. Die 6xHis-NS5B-Trunkierungs-konstrukte enthaltenden Lysate wurden über ein *Pre-Clearing* mittels Glutathion Sepharose 4B für den *Pull-down* vorbereitet. Vor der Detektion mit GST Antikörper wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestrippt.

4.2.4 Co-Immunopräzipitation mit c-Src-Antikörper und NS5BΔ21

Aufgrund der relativ starken unspezifischen Wechselwirkungen der NS5B Polymerase mit der Glutathion Sepharose 4B sollte die Interaktion von rekombinantem NS5BΔ21 mit zellulärem c-Src durch eine Co-Immunopräzipitation überprüft werden. Die Vorgehensweise ist unter Material und Methoden (Kapitel 2.2.3) erläutert.

Über Western Blot Analyse konnte mittels spezifischer Antikörper gegen die Tyrosinkinase c-Src sowie NS5B die Interaktion von NS5B und c-Src belegt und damit die Befunde aus den vorherigen *Pulldown*-Experimenten bestätigt werden (Abb. 4.9).

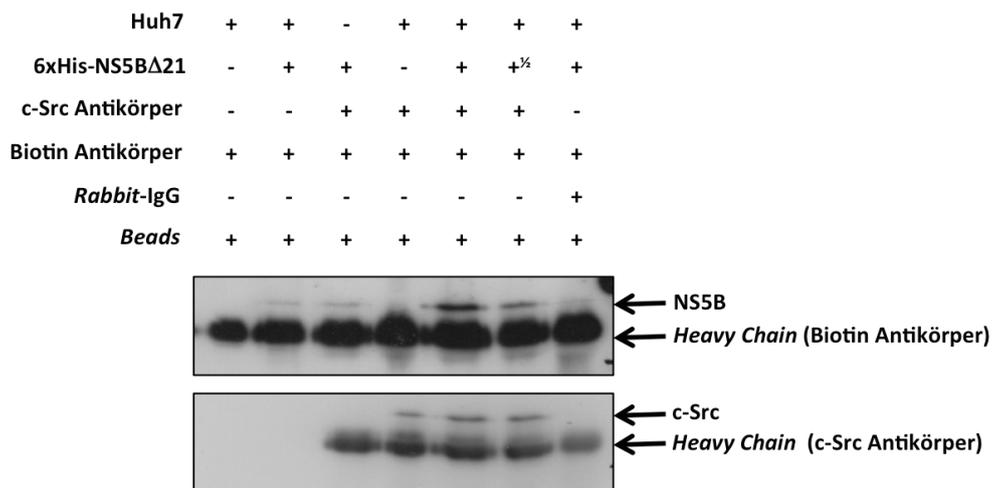


Abbildung 4.9: Co-Immunopräzipitation von c-Src aus Huh7 Zelllysaten mit überexprimiertem 6xHis-NS5BΔ21. Nach Vorinkubation der Streptavidin Magnetic Beads mit Huh7 Zelllysaten sowie polyklonalem c-Src-Antikörper aus dem Kaninchen und biotyniliertem Antikörper aus der Maus gegen Kaninchen wurden die Magnetic Beads über Nacht mit rekombinanten 6xHis-getaggten NS5BΔ21 aus Bakterienlysaten inkubiert. Als Kontrolle wurde statt des c-Src-Antikörpers ein IgG-Antikörper aus der Maus gegen Kaninchen verwendet. Vor der Detektion mit c-Src Antikörper wurde die Membran mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestript.

4.3 HSQC-Messung

In einem weiteren Schritt sollte mittels HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) Messung überprüft werden, in wie weit Peptide, die die prolinreichen Motive 1 und 2 enthalten (Kapitel 2.2.3), mit der SH3 Domäne von c-Src interagieren. Die HSQC Messung ist ein NMR-spektroskopisches Verfahren zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, bei der im Kanal der unempfindlichen Kerne, in diesem Fall ^{15}N , Kohärenzen erzeugt werden, die dann auf den empfindlichen Kern (^1H) übertragen werden. Dessen Resonanzen werden dann gemessen. Man spricht von einem inversen Verfahren. Die HSQC-Spektren sind relativ übersichtlich, da nur Signale von direkt gebundenen N- und H-Atomen erscheinen. Im HSQC-Spektrum ist auf der x-Achse die ^1H -chemische Verschiebung aufgetragen, auf der y-Achse die ^{15}N -chemische Verschiebung. Das Spektrum setzt sich also prinzipiell aus einem H-NMR- und einem breitbandenkoppelten N-NMR-Spektrum zusammen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptide generiert, welche die potentiellen PxxP-Interaktionsmotive der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B mit der SH3-Domäne der c-Src Kinase enthalten. Mit einer Länge von etwa 20 Aminosäuren sind sie für die Messung im NMR-Spektrometer, auch in Verbindung mit der SH3-Domäne der c-Src Kinase geeignet. Das methodische Vorgehen der HSQC-Messung ist in allen Einzelheiten unter Material und Methoden (Kapitel 2.2.3) erläutert und wurde in Kooperation mit der AG Willbold im Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

Die Auswertung der HSQC Messung erfolgt durch das Übereinanderlegen der aufgenommenen Spektren (Konturdiagramme). Findet eine Interaktion zwischen zwei Proteinen bzw. Peptiden statt, so kommt es zu einem *Shift* der Konturdiagramme (Abb. 4.10).

Die voneinander unabhängige Messung der ^{15}N -markierten c-Src-SH3 Domäne mit Peptiden, die Motiv 1 bzw. 2 von NS5B umfassen, ergab geringfügige *Shifts*. Diese *Shifts* weisen zumindest auf eine Interaktion der SH3 Domäne von c-Src mit den beiden Peptiden hin, jedoch ist die Intensität dieser Interaktion nicht für eine Strukturaufklärung ausreichend (B). Darüber hinaus legen diese Befunde nahe, dass es sich bei diesen Motiven nicht um für die beobachtete Interaktion zentrale Regionen handelt.

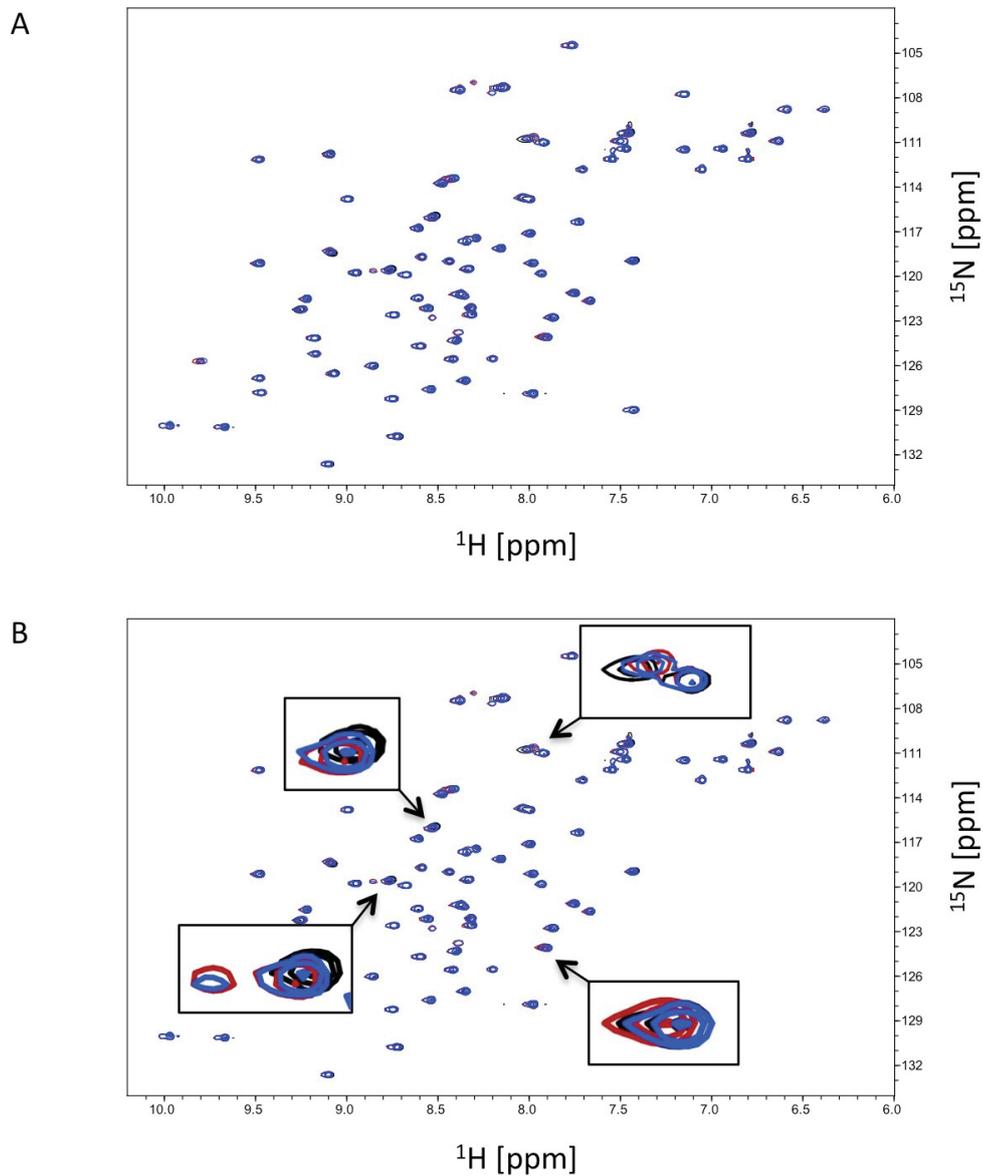


Abbildung 4.10: HSQC-Messung der freien c-Src-SH3 Domäne mit NS5B Motiv 1 oder Motiv 2 enthaltenden Peptiden. Die Proben wurden wie unter 2.2.3 beschrieben vorbereitet und gemessen. **A** Overlay der Spektren der SH3-Domäne (schwarz) alleine und nach Zugabe der Peptide NS5B Motiv 1 (rot) beziehungsweise Motiv 2 (blau). **B** Hervorgehoben wurden *Shifts*, die durch Zugabe der Peptide entstanden sind.

5 Diskussion

5.1 Interferenz von HCV der ErbB Rezeptorfamilie und ihrer Expression

Mit weltweit etwa 150 Millionen Infizierten ist das Hepatitis C Virus eine der führenden Ursachen für chronische Lebererkrankungen. Jedes Jahr treten 3-4 Millionen Neuinfektionen auf, etwa 350.000 Menschen sterben jährlich an Lebererkrankungen, die unmittelbar mit einer HCV-Infektion in Verbindung stehen.

Die Erkrankung verläuft schleichend und mitunter über Jahrzehnte symptomfrei. Bei mehr als 70% aller Infizierten kommt es unter anhaltender Virusreplikation zu einer chronischen Infektion, die meist erst bei massiven Organschäden festgestellt wird. Dies zeigt, dass HCV im Wirt unter Umgehung der Immunantwort persistieren kann und die Infrastruktur der Wirtszelle für seinen eigenen Lebenszyklus nutzt, ohne die Zelle dabei massiv in ihrer physiologischen Funktion zu beeinflussen.

Ein zentrales Anliegen dieser Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses von HCV auf die EGF Rezeptor Familie, bestehend aus den vier Rezeptoren EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3 und ErbB4. Diese Rezeptoren sind für die physiologische Leberfunktion von wesentlicher Bedeutung und Überexpression beziehungsweise Hyperaktivierung der ErbB Rezeptoren 1, 2 und 3 wird häufig in Zusammenhang mit Krebserkrankungen und Prognoseverschlechterung derselben gebracht [44].

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit konnte belegt werden, dass das Hepatitis C Virus tiefgreifend in die Regulation der ErbB Expression eingreift. So konnte nachgewiesen werden, dass es in Gegenwart des HCV Replikons zu einer Heraufregulation der Expression des EGF Rezeptors auf Proteinebene kommt (Abb. 3.11 B), während die Rezeptoren ErbB3 (Abb. 3.1 A) und ErbB4 (Abb. 3.13 A) bereits auf Transkriptebene herabreguliert werden. Der ErbB2 Rezeptor, welcher durch seine fehlenden Ligandenbindungsstelle als bevorzugter Dimerisierungspartner für alle übrigen ErbB Rezeptoren fungiert, wird durch das Hepatitis C Virus verstärkt auf der Oberfläche der Wirtszelle exprimiert, wenn auch die Expression im Gesamt-Zelllysat im Vergleich mit Kontrollzellen unverändert ist (Abb. 3.11 D, B).

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit erfolgte eine detaillierte Untersuchung der Mechanismen, die für die Herabregulation des ErbB3 Rezeptors verantwortlich sind.

Die Herabregulation des ErbB3 Rezeptors erfolgt bereits auf Transkriptionsebene (Abb.3.1 A). Die Analyse der prä-mRNA erbrachte einen Hinweis darauf, dass HCV bereits bei der Initiation der Transkription einen inhibitorischen Einfluss ausübt (Abb. 3.3 B). Ein in der Promotorregion des ErbB3 Gens vorliegendes cAMP-reponsives Element (*half CRE-site*) ließ vermuten, dass die Transkription von ErbB3 CREB-abhängig ist. Zudem wurde bereits beschrieben, dass HCV die Aktivierung von CREB verstärkt [75] und die Stimulation mit Neuregulin 1, dem Liganden des ErbB3 Rezeptors, zu einer Erk-vermittelten CREB-Phosphorylierung am Serinrest 133 führt [74]. CREB kann sowohl hemmend als auch verstärkend auf die Genexpression wirken, wobei im Zusammenhang mit ErbB3 eine Hyperaktivierung des möglichen Transkriptionsfaktors nur dann sinnvoll ist, wenn dieser inhibitorisch auf die Transkription wirkt. Eine Analyse der CREB Isoformen 1, 3 und 5 sowie des CREB Bindeproteins (CBP) belegte eine deutlich verstärkte mRNA-Expression von CREB5 in Huh9-13 Replikonzellen (Abb. 3.7 A), so dass durch CREB5 *Knockdown* Experimente ein Zusammenhang mit der verminderten ErbB3 Expression überprüft wurde. Diese Vermutung bestätigte sich nicht, wenngleich jedoch der Ausschluss der Isoform 5 der *cAMP-responsive element binding proteins* nicht gleichbedeutend mit einem Ausschluss der Beteiligung eben jener Transkriptionsfaktoren an der Herabregulation des ErbB3 Rezeptors durch HCV ist. Dass Aktivierung der cAMP-abhängigen Signalübertragung zu einer Herabregulation des ErbB3 Rezeptors führt, konnte durch Experimente belegt werden, in denen durch Forskolin, 8-Bromo-cAMP sowie IBMX eine cAMP-Akkumulation in den Zielzellen induziert wurde. In allen Fällen konnte nach 8 Stunden eine deutlich Abnahme der Rezeptorexpression auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden, so dass eine verstärkte cAMP-Akkumulation zu einer Herabregulation der Expression des ErbB3 Rezeptors führt (Abb. 3.5). Eine Hemmung der Proteinkinase A, welche durch cAMP aktiviert wird und ihrerseits CREB aktiviert, führte jedoch zu keinem Wiederanstieg der Rezeptorexpression. Dies spricht dafür, dass ein cAMP-Anstieg die Expression von ErbB3 PKA-unabhängig reguliert.

Ebenfalls untersucht wurde die Expression des ErbB3 Liganden NRG1. Auf mRNA- wie auch auf Proteinebene konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.4 A, B), dass HCV eine deutlich verstärkte NRG1 Expression induziert. Eine verstärkte Expression von NRG1 lässt sich sowohl durch das subgenomische Replikon des Hepatitis C Virus

(Genotyp 1b) (Abb. 3.4 A, B) wie auch durch Infektion von Huh7.5 Zellen mit einer MOI des HCV Stranges JC1 (Genotyp 2a) (Abb. 3.17 B) induzieren. Zur Überprüfung der Relevanz dieser Hochregulation für die Regulation des ErbB3 Rezeptors wurden *Knockdown* Experimente durchgeführt die belegen konnten, dass der *Knockdown* von NRG1 den supprimierenden Effekt von HCV auf Transkriptebene vollständig und auf Proteinebene zumindest partiell aufhebt (Abb. 3.4 C-E). Da Neuregulin 1 ErbB3, wie bereits durch eine andere Arbeitsgruppe im Vorfeld beschrieben, auch auf Proteinebene herabreguliert [55] und durch *Knockdown* nur die Neusynthese des Neuregulins verhindert wird, nicht aber das vorhandene NRG1 inhibiert wird, könnte hier die Ursache für die nur partielle Wiederherstellung der ErbB3 Proteinexpression liegen.

Zur weiteren Verifizierung der These, dass die Hochregulation des Liganden die Ursache für die Herabregulation des Rezeptors ist, wurden Huh7 Kontrollzellen mit HRG1 β , einer Isoform des Neuregulin 1 behandelt. Die Expression des Rezeptors nahm sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene um etwa 50% ab, was eindeutig belegt, dass der Ligand ursächlich für die Herabregulation seines Rezeptors ist (Abb. 3.4 F, G).

Bereits veröffentlicht Promotoranalysen des NRG1 Gens legen nahe, dass in der Promotorregion des *NRG1* Gens Sp1- sowie NF- κ B-Bindemotive vorhanden sind. *Frensing et al.* konnten nachweisen, dass die transkriptionelle Aktivität dieser beiden Transkriptionsfaktoren durch Stimulation mit NRG1 gesteigert wird, so dass hier ein potentieller Mechanismus zur Autoregulation oder ein positiver *feedback loop* angenommen werden kann [81].

Eine verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Sp1 im Rahmen einer Hepatitis C Infektion wurde bereits beschrieben [76]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die p38^{MAPK} im Rahmen einer Infektion mit HCV verstärkt aktiviert wird und dass diese wiederum aktivierend auf den Transkriptionsfaktor Sp1 wirkt [76, 94]. Entsprechend könnte HCV über Aktivierung der p38^{MAPK} zu einer verstärkten Aktivierung von Sp1 führen und hierdurch die Expression von NRG1 hochregulieren. Diese Annahme wird durch die hier ausgeführten Befunde gestützt. So führt sowohl die Hemmung der p38^{MAPK} mittels SB203580 HCl sowie des Transkriptionsfaktors Sp1 mittels Mithramycin A zu einer Abnahme der NRG1 Expression auf Transkriptebene (Abb. 3.9 A, B). Dementsprechend führt die Transfektion eines für Sp1-kodierenden

Plasmids in Huh7 Zellen zu einem Anstieg der NRG1 Expression sowie gleichzeitig zu einer Abnahme der ErbB3 Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 3.10). Diese Daten legen insgesamt nahe, dass das Hepatitis C Virus eine Sp1-vermittelte Hochregulation des Liganden NRG1 und dadurch vermittelt eine Herabregulation des ErbB3 Rezeptors bewirkt.

Des Weiteren stellte sich die Frage nach der Relevanz der Herabregulation des Rezeptors. Die Tatsache, dass der EGF Rezeptor am Eintritt des Hepatitis C Virus in die Zelle beteiligt ist [10], führte zu der Überlegung, dass möglicherweise eine Verschiebung des Gleichgewichts der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche eine Verbesserung der Infizierbarkeit zur Folge haben könnte. Zunächst wurde im Rahmen von FACS-Analysen belegt, dass Zellen mit geringer ErbB3 Rezeptor Expression eine vergleichsweise erhöhte Expression des EGF Rezeptors aufweisen und umgekehrt (Abb. 3.16 A). *Knockdown* Experimente mit ErbB3 siRNA in Huh7 Kontrollzellen und anschließender FACS-Analyse ließen den gleichen Schluss zu (Abb. 3.16 C). Zusätzlich wurden Experimente im Infektionssystem durchgeführt, bei welchen die zu infizierenden Zellen für 12 Stunden mit HRG1 β vorinkubiert und erst dann mit einer MOI des HCV Stranges JC1 infiziert wurden. Die Vorstimulation bewirkt eine Herabregulation der ErbB3 Rezeptor Expression und damit, wie im FACS-Versuch belegt, einen Anstieg der EGF Rezeptor Expression. Die Tatsache, dass diese zellulären Veränderungen mit einer verstärkten viralen Replikation einhergehen (Abb. 3.18), stärkt die Überlegung, dass NRG1 im Sinne einer positiv-regulatorischen Schleife die virale Replikation verstärkt. In wie weit dies auf einer verbesserten Infizierbarkeit beruht, muss in weiterführenden Untersuchungen geprüft werden. Dies kann zum Beispiel über die Bestimmung der *tissue culture infection dose 50* (TCID₅₀) als direkteres Maß für die verbesserte Infizierbarkeit der Zellen erfolgen. Ferner wäre zu erwarten, dass eine Herabregulation der ErbB3 Expression durch siRNA ebenfalls die Infizierbarkeit von Huh7.5 Zellen verbessert. Diese Arbeiten sind Gegenstand von Folgeuntersuchungen zu diesem Projekt.

Der EGF Rezeptor, welcher namensgebend für die gesamte Familie der ErbB Rezeptoren ist, wird durch das Hepatitis C Virus verstärkt exprimiert (Abb. 3.11 B), wobei die Analyse der Oberflächenexpression nicht den intrazellulären Expressionslevel widerspiegelt. Der genaue Mechanismus dieser Hochregulation

war nicht Gegenstand der hier ausgeführten Untersuchungen, wird jedoch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Die hier vorgelegten Befunde legen nahe, dass die Regulation nicht auf Transkriptebene erfolgt, so dass eine Beteiligung von Positiv- beziehungsweise Negativregulatoren der EGFR Expression sowie des am Abbau des Rezeptors beteiligten Proteasoms denkbar wäre [40, 47-50]. Entgegen den Erwartungen konnte eine Herabregulation des Positivregulators der EGFR Expression Sprouty2 sowie eine verstärkte Expression der für den Abbau des EGF Rezeptors verantwortlichen c-Cbl Ubiquitin Ligase auf mRNA-Ebene in Huh9-13 Replikonzellen belegt werden (Abb. 3.12 A). Da diese Befunde jedoch keine verstärkte Expression des Rezeptors zu erklären vermögen, kommt hier möglicherweise eine Reaktion der Wirtszelle auf die verstärkte Expression des Rezeptors zum Ausdruck, die darauf abzielt, den physiologischen Zustand aufrecht zu erhalten. SOCS5, welches ebenfalls als Negativregulator des EGF Rezeptors in Frage kommt, weist auf mRNA-Ebene keine veränderte Expression in Huh9-13 Replikonzellen auf (Abb. 3.12 A). Die mRNA-Expression des EGFR Negativregulators LRIG1 hingegen ist auf Transkriptebene in Huh9-13 Replikonzellen um etwa 40% herabreguliert (Abb. 3.12 A). LRIG1 wird unter physiologischen Bedingungen nach Stimulation des EGF Rezeptors verstärkt exprimiert und vermittelt eine gesteigerte Ubiquitinierung und Degradation des Rezeptors [48]. Denkbar wäre hier, dass die reduzierte Expression von LRIG1 für die verstärkte Expression von EGFR verantwortlich ist. Hier sind jedoch noch Folgeuntersuchungen auf Proteinebene sowie funktionelle Untersuchungen mittels *Knockdown* erforderlich.

Die Expression des 26S-Proteasoms ist in Huh9-13 Replikonzellen verglichen mit Kontrollzellen unverändert, so dass der Angriffspunkt des Hepatitis C Virus für die verstärkte Expression des EGF Rezeptors zumindest nicht in einer verstärkten Expression des 26S-Proteasoms liegt (Abb. 3.12 B). Weiterführende Studien bezüglich der Ubiquitinierung des EGF Rezeptors durch die E3 Ubiquitin Ligase in Gegenwart von HCV könnten weiteren Aufschluss über eine mögliche Beteiligung des proteasomalen Abbaus an der verstärkten EGFR Expression auf Proteinebene geben, waren jedoch nicht Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit. Da die Hochregulation des Rezeptors in Replikonzellen eindeutig erkennbar ist, kann nur eines der Nicht-Strukturproteine des Hepatitis C Virus ursächlich für die Deregulation des Rezeptors sein.

Die Relevanz der Hochregulation des EGF Rezeptors ist naheliegend, da bereits bekannt ist, dass der EGF-Rezeptor am viralen Eintritt in die Wirtszelle beteiligt ist [10, 21]. Allerdings ist die Oberflächenexpression des Rezeptors nicht in dem Maße verstärkt, wie die intrazelluläre Expression. Die Ursache hierfür mag darin begründet sein, dass die EGFR-vermittelte Signalübertragung hauptsächlich vom Endosom ausgeht, während die Signalübertragung der übrigen ErbB Rezeptoren hauptsächlich an der Zelloberfläche ihren Ursprung findet [59].

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten belegen, dass das Hepatitis C Virus eine verstärkte Aktivierung des EGF Rezeptors bewirkt. Die NS3/4A Protease des Hepatitis C Virus schneidet die *T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase* (TC-PTP), welche unter physiologischen Bedingungen einen hemmenden Einfluss auf den EGF Rezeptor ausübt. In Folge dessen kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs. Die verstärkte Aktivierung von Akt hat eine anti-apoptotische Wirkung auf die infizierten Zellen und steigert ihre Vitalität. Des Weiteren konnte in der Arbeitsgruppe eine Relevanz der Akt Kinase für die virale Replikation belegt werden [38]. Die verstärkte Aktivierbarkeit des EGF Rezeptors wird ebenfalls nach Stimulation der Zellen mit HRG1 β deutlich (Abb. 3.11 B). Die Aktivierung der ErbB Rezeptoren resultiert in der Entstehung von Rezeptordimeren. Trotz der verminderten Expression des ErbB3 Rezeptors scheint hier eine Aktivierung des EGF Rezeptors durch die Bildung eines EGFR-ErbB3-Heterodimers statt zu finden, zumal der ErbB3 Rezeptor durch Stimulation mit HRG1 β relativ zur Proteinmenge hyperphosphoryliert, also überaktiviert wird (Abb. 3.15). Diese Hyperphosphorylierung bedingt möglicherweise, dass die nachgeschaltete Signalübertragung des ErbB3 Rezeptors nicht relevant durch HCV beeinträchtigt wird.

Die intrazelluläre ErbB2 Rezeptor Expression bleibt durch das Hepatitis C Virus unbeeinflusst (Abb. 3.11 B), jedoch kommt es zu einer verstärkten Oberflächenexpression auf Huh9-13 Replikonzellen (D). Dies mag zum einen durch die Herabregulation des ErbB3 Rezeptors und der damit verbundenen Veränderung der Oberflächenexpression aller weiteren Mitglieder der ErbB Familie bedingt sein, andererseits dient der ErbB2 Rezeptor als bevorzugter Heterodimerisierungspartner für alle übrigen ErbB Rezeptoren, da ErbB2-haltige Heterodimere eine potentere

Signalübertragung ermöglichen [42], so dass die verstärkte Oberflächenexpression des Rezeptors möglicherweise auch direkt durch das Virus bedingt wird.

Die verstärkte ErbB2 Expression auf der Zelloberfläche könnte zudem die Ursache für die Hyperphosphorylierung des ErbB3 Rezeptors sein. ErbB2 kann die Affinität von ErbB3 für Neureguline drastisch erhöhen, indem es die Ligandendissoziation vom Rezeptor verlangsamt [54].

Ein weiteres Mitglied der EGF Rezeptor Familie ist der ErbB4 Rezeptor. In Gegenwart des subgenomischen Replikons des Hepatitis C Virus ist der ErbB4 Rezeptor um den Faktor 10 herabreguliert (Abb. 3.13 A), die Expression seines Liganden, Neuregulin 4, ist praktisch nicht messbar (Abb. 3.14). Interessant ist der Umstand, dass ErbB4 als einziger ErbB Rezeptor eher einen inhibitorischen Einfluss auf das Zellwachstum zu haben scheint, während alle weiteren Mitglieder proliferationsfördernde Eigenschaften aufweisen [46]. Der Mechanismus der Herabregulation des ErbB4 Rezeptors ist noch unaufgeklärt, allerdings führt der *Knockdown* der katalytischen Untereinheit G der Proteinkinase A zu einem Anstieg der ErbB4 mRNA-Expression von etwa 10% auf etwa 40% verglichen mit Kontrollzellen, so dass eine Beteiligung des cAMP-Signalwegs an der Herabregulation dieses Rezeptors möglicherweise von Bedeutung ist (Abb. 3.13 C). Diese Überlegung ließ sich jedoch nicht bestätigen, da die ErbB4 mRNA-Expression nach Stimulation des cAMP-Wegs unverändert blieb (Abb. 3.13 F). Beschrieben wurde zudem, dass eine Stimulation des ErbB4 Rezeptors mit Heregulin, einer Isoform des durch HCV überexprimierten Neuregulin 1, eine verstärkte proteolytische Spaltung des ErbB4 Rezeptors bewirkt [57]. Hier ergab sich kein Hinweis auf einen Wiederanstieg der Rezeptorexpression durch *Knockdown* des Neuregulin 1 (B). Die vergleichsweise geringe Expression des ErbB4 Rezeptors in humanen Hepatomazellen stellt die Relevanz der Herabregulation durch das Hepatitis C Virus jedoch in Frage.

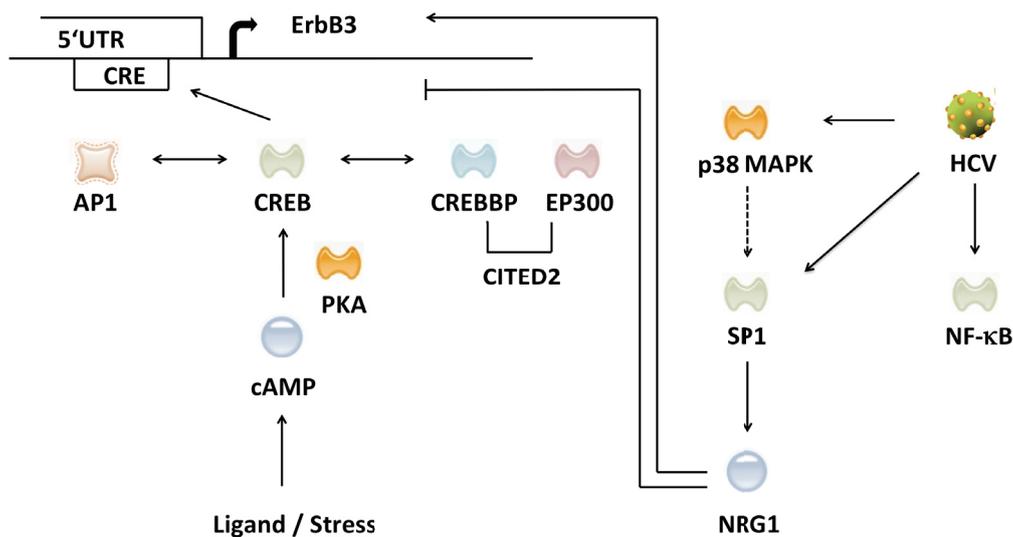


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Herabregulation des ErbB3 Rezeptors und der Hochregulation seines Liganden NRG1. HCV aktiviert, möglicherweise unter Beteiligung der $p38^{\text{MAPK}}$, den Transkriptionsfaktor Sp1 [94]. Dadurch kommt es zu einer verstärkten NRG1 Expression. NRG1 aktiviert den ErbB3 Rezeptor, bedingt durch die verstärkte Expression kommt es jedoch zeitgleich zu einer reduzierten Expression des Rezeptors bereits auf Transkriptebene. Der Neuregulin 1-vermittelte Effekt auf die ErbB3 Expression lässt sich durch Aktivierung des cAMP-Signalwegs simulieren, welcher über eine Aktivierung der Proteinkinase A und CREB Transkriptionsfaktoren verläuft. Als möglicher Angriffspunkt für die Herabregulation durch HCV wird aus diesem Grund die Familie der CREB Transkriptionsfaktoren in Betracht gezogen, da in der untranslatierten Region des *ERBB3* Gens eine *Half-CRE binding site* vorliegt. Legende: NRG1: Neuregulin 1, AMP: Adenosinmonophosphat, cAMP: zyklisches AMP, PKA: Proteinkinase A, CREB: cAMP responsive element binding protein, CBP: CREB binding protein, CRE: cAMP responsive element, UTR: untranslated region.

Ein weiterer Punkt, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, war die durch das Hepatitis C Virus bedingte verstärkte Expression des Chemokins CXCL8 und ein möglicher Zusammenhang mit der Überexpression des Neuregulin 1. CXCL8 fungiert als Entzündungsmediator und ist an der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten und insbesondere der neutrophilen Granulozyten in das Gewebe beteiligt. Es spielt eine Rolle bei Tumorwachstum und Angiogenese.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Chemokinexpression in der Leber kaum nachweisbar. Die Gegenwart des Hepatitis C Virus Replikons, also der Nicht-Strukturproteine des Virus, bewirkt eine basal verstärkte Expression des Chemokins CXCL8 (Abb. 3.19 A). Die Stimulation mit HRG1 β bewirkt einen Anstieg der Chemokinexpression auf mRNA-Ebene (A), welcher sich auf Proteinebene jedoch nicht wiederfindet (B). Untersucht wurde, ob die Hochregulation des Neuregulin 1

durch HCV ursächlich für die bereits basal verstärkte Expression des Chemokins CXCL8 ist. Dies bestätigte sich nicht (C). Eine Beteiligung des Neuregulin 1 an der HCV-vermittelten und bereits basal nachweisbaren Überexpression des Chemokins CXCL8 ist daher nicht anzunehmen.

5.2 Interaktion der viralen NS5B Polymerase mit der humanen c-Src Kinase

Die Ausbildung von Protein-Protein-Komplexen, die virale wie auch Wirtszell-Proteine enthalten, ist ein wichtiger Mechanismus über den HCV mit seinem Wirt interagiert. Arbeiten im Vorfeld zu dieser Arbeit legen nahe, dass die Interaktion der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B mit der SH3-Domäne der Tyrosinkinase c-Src in Verbindung mit der Interaktion von NS5A mit der c-Src-SH2-Domäne für die Ausbildung des viralen Replikationskomplexes von Relevanz ist [39]. Die bisherigen Arbeiten hierzu waren mittels *Pulldown*-Analysen unter Verwendung von GST-gekoppelten Proteinen und Zelllysaten erfolgt. Hierbei war für NS5B ein Konstrukt verwendet worden, welches den Membrananker von NS5B noch enthält. Es wäre daher denkbar, dass die beobachtete Interaktion durch Membrananker-vermittelte Präzipitation auf die Sepharose-Matrix zustande gekommen ist und daher ein Artefakt darstellt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war daher zu überprüfen, in wie weit dieser Membrananker die beobachtete Interaktion bedingt sowie die Generierung verschiedener NS5B-Trunkierungs- und Mutagenese-Konstrukte, die eine weitere Eingrenzung des für die Interaktion mit der c-Src-SH3-Domäne verantwortlichen Motivs zu lassen. Im Fokus stand dabei zunächst die Generierung eines NS5B-Konstruktes ohne Membrananker, da dieser aufgrund seiner Hydrophobizität die Löslichkeit des Proteins verschlechtert und dadurch die Überexpression und Aufreinigung erschwert und wie oben ausgeführt möglicherweise die beobachteten Interaktionen modifiziert. Der Membrananker liegt im Bereich der letzten 21 Aminosäuren des C-Terminus. Um zusätzlich eine optimale Expression der Konstrukte zu ermöglichen, wurden synthetische Gene bei der Firma *Genart* bestellt, die anhand der vorgegebenen Aminosäuresequenz eine Codon-Optimierung für die Expression in *E. coli* vornahm. Leider konnten diese Konstrukte zwar zur

erfolgreichen Überexpression, aber nicht zur Aufreinigung genutzt werden (Abb. 4.4 C). Als Ursache hierfür kann die Ausbildung von *inclusion bodies* angenommen werden, die aus dem fehlgefalteten Protein in unlöslicher Form bestehen. Mit dieser Überlegungen übereinstimmend ließen sich kleine Mengen problemlos überexprimieren, jedoch war eine Aufreinigung im großen Stil nicht möglich. Als wahrscheinliche Ursache für die Bildung der *inclusion bodies* wird die Codon-Optimierung für die Expression in *Escherichia coli* angenommen, die neben einer Expressionssteigerung dazu führen kann, dass sich das Protein während der zu schnell ablaufenden Translation nicht richtig falten kann [124].

Weitere Trunkierungskonstrukte, deren Expression erfolgreich war, sind zum einen das Trunkierungskonstrukt welches den N-Terminus von NS5B inklusive Motive 1 enthält (Abb. 4.4 C) sowie ein Konstrukt, welches nur die beiden Motive 1 und 2 umfasst (Abb. 4.5). Bei den Motiven handelt es sich um die Regionen der NS5B-Sequenz, die das typische putative SH3-Interaktionsmotiv PxxP aufweisen, und ausgehend vom N-terminalen Ende nach der Reihenfolge ihres Auftretens nummeriert wurden.

Da die Interaktionsstudien mit trunkierten Proteinen grundsätzlich die Aussagekraft der Beobachtungen einschränken, wurden zusätzlich Vollängenkonstrukte mit Punktmutationen im Bereich der Proline des Motivs 1, des Motivs 2 beziehungsweise beider Motive gleichzeitig generiert. Dies war von besonderem Interesse, da das in der Arbeit von *Pfannkuche et al.* als wahrscheinlicheres Interaktionsmotiv angenommene Motiv 2 Strukturstudien zur Folge im Inneren des Proteins liegt und somit möglicherweise unter physiologischen Bedingungen keine Möglichkeit zur Interaktion hat. Die beschriebenen Mutagenese-Konstrukte konnten exprimiert und für Interaktionsstudien eingesetzt werden (Abb. 4.2).

Zur Untersuchung der Interaktion der beschriebenen NS5B-Konstrukte mit c-Src wurden insbesondere *Pulldown*-Versuche durchgeführt. Zunächst konnte belegt werden, dass die Mutagenese-Konstrukte, bei denen die Proline durch Alanine ersetzt wurden, eine gleich starke Interaktion mit c-Src aus Zelllysat aufweisen wie das Vollängenkonstrukt (Abb. 4.6). Da in diesen Konstrukten der Membrananker vorhanden ist, durfte hier eine falsch-positive Interaktion jedoch nicht ausgeschlossen werden. Das Trunkierungskonstrukt Motiv 1/2 (341-397) interagiert nicht mit c-Src, was die Prolin-Motive als Interaktionspartner nicht zwangsläufig

ausschließt, sondern lediglich einen Hinweis darauf gibt, dass ein weiterer Bereich ebenfalls für die Interaktion notwendig ist.

Der *Pulldown* von NS5B Δ 21 (1-570) sowie NS5B M1 (1-380) mit c-Src Trunkierungskonstrukten belegte starke Interaktionen zwischen den SH3-Domäne-enthaltenden Trunkierungskonstrukten mit beiden NS5B-Konstrukten (Abb. 4.8). Für NS5B Δ 21 entsprach dies basierend auf den Vorbefunden der Arbeitsgruppe den Erwartungen [39], für NS5B M1 (1-380) jedoch gab es im Vorfeld keine Hinweise auf eine Interaktion, wobei die Strukturanalyse eine Interaktion zwischen diesem Motiv und c-Src als wahrscheinlich darlegte. Die fehlende Interaktion zwischen NS5B M1 (1-380) und c-Src Δ SH1 war unerwartet, da bei dem hier verwendeten c-Src Konstrukt die SH3-Domäne vorhanden ist. Möglicherweise führt die strukturelle Veränderung des Src-Trunkierungskonstruktes dazu, dass keine Interaktion möglich ist. Eine Beteiligung der Kinase-Domäne an der Protein-Protein-Interaktion ist kaum anzunehmen, da Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegt haben, dass die Trunkierung der SH1-Domäne nicht zum Verlust der Interaktion führt [39].

Ein großes Problem, welches bei allen durchgeführten *Pulldown*-Experimenten auftrat, war die unspezifische Interaktion von NS5B mit dem GST-Tag. Stringentes Waschen sowie verkürzte Inkubationszeiten oder alternative Säulenmaterialien brachten keine relevante Reduktion der unspezifischen Interaktion. Als Alternative wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt, die in Übereinstimmung mit vorangehenden Befunden eine Interaktion zwischen c-Src aus Zelllysaten und überexprimierten NS5B Δ 21 ohne vergleichbare unspezifische Interaktionen belegen konnte (Abb. 4.9).

Die Generierung von NS5B-Peptiden durch die Firma JPT ermöglichte die HSQC Messung der freien ^{15}N -markierten c-Src-SH3-Domäne mit den potentiellen Interaktionsmotiven der NS5B Polymerase. Die Auswertung der Messungen im Konturdiagramm zeigte nach Zugabe der Peptide zur SH3 Domäne leichte *Shifts*. Dies gab einen Hinweis auf eine vorhandene Interaktion zwischen c-Src-SH3 und Motiv 1 ebenso wie Motiv 2. Keine der gezeigten Interaktionen war ausreichend stark, um die Struktur des Komplexes aufzuklären (Abb. 4.10).

Insgesamt lassen diese Befunde die Aussage zu, dass das PxxP-Motiv 1 innerhalb der NS5B-Sequenz ebenso wie Motiv 2 zur Interaktion mit der SH3-Domäne von c-Src befähigt sind und dass die Punktmutation der Proline allein nicht ausreichend

ist, um die Interaktion zu stören. Möglicherweise sind die, die Proline umgebenden, basischen Aminosäuren ebenfalls an der Interaktion beteiligt und müssten durch Punktmutationen zusätzlich ausgetauscht werden. Ebenso möglich wäre jedoch auch, dass die Interaktion zwischen c-Src und NS5B zusätzlich über weitere Motive verläuft. Potentielle Bindemotive für die SH3-Domäne wären neben den beschriebenen PxxP-Motiven (R/K)xx(K/R)-Motive, die in der Aminosäuresequenz von NS5B acht Mal auftreten (Abb. 5.2) [125]. Zur Aufklärung einer Beteiligung dieser Arginin-Lysin-Motive sind weitere Untersuchungen erforderlich.

NS5B: Genotyp 1b aus HCV-Replikonzellen (Con1)

SMSYTWGALITPCAAEETKLPINALSNSLLRHHNLVYATTSRSASLRQKKVTFDRLQVLDDHY
 RDVLKEMKAKASTVKAKLLSVEEACKLTPPHSARSKFGYGAKDVRNLSSKAVNHIRSVWKDLL
 EDTETPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGGGRKPARLIVFPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQAVMGSS
 YGFQYSPGQRVEFLVNAWKAKKCPMGFAYDTRCFDSTVTENDIRVEESIQCCDLAPPEARQAI
 RSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTICYLKAAAACRAAKLQDCTMLVC
 GDDLVICESAGTQEDEASLRAFTEAMTRYSAAPPGDPPKPEYDLELITSCSSNVSVAHDASGK
 RYYLTRDPTTPLARAAWETARHTPVNSWLGNIIYAPTLWARMILMTHFFSILLAQEQLKAL
 DCQIYGACYSIEPLDLPQIIQRLHGLSAFSLHSYSPGEINRVASCLRKLGVPPLRVWRHRARSV
 RARLLSQGGRAATCGKYLFNWAVRTKCLKLTPIPAASQLDLSSWVAVAGYSGGDIYHSLSRARPR
 WFMWCLLLLSVGVGIYLLPNR

Motiv 1: SAAPPGDPPK (aa 348 – 356)
 Motiv 2: TRDPTTPL (aa 386 – 393)

Putative SH3-Bindungsmotive laut Literatur:

(R/K)XX(K/R): 8x

Abbildung 5.2: Potentielle Interaktionsmotive mit SH3-Domänen innerhalb der Aminosäuresequenz von NS5B. Die Aminosäuresequenz von NS5B enthält zahlreiche putative SH3-Bindungsmotive. Rot dargestellt ist das PxxP Motiv, welches im Rahmen dieser Arbeit als Motiv 1 bezeichnet wurde, grün dargestellt das sogenannte PxxP Motiv 2. Ein weiteres putatives Bindemotiv für SH3 Domänen ist das (R/K)xx(K/R) Motiv, dargestellt in blau. Abbildungslegende: P: Prolin, R: Arginin, K: Lysin.

6 Zusammenfassung

Ein Schwerpunkt der hier vorgelegten Arbeit ist die Interferenz des Hepatitis C Virus mit der Expression des zur EGF Rezeptor Familie gehörenden ErbB3 Rezeptors. Die erhobenen Daten belegen, dass die Herabregulation des Rezeptors in Gegenwart des HCV Replikons bereits auf Transkriptebene erfolgt und durch die verstärkte Expression seines Liganden NRG1 bedingt ist. Der supprimierende Effekt von NRG1 auf die Expression von ErbB3 konnte durch cAMP-Akkumulation in der Zielzelle simuliert werden. Weiterführende Untersuchungen zur Regulation der NRG1 Expression durch HCV legen nahe, dass HCV die Expression von NRG1 Sp1-abhängig reguliert. Inhibitor Experimente lassen ferner vermuten, dass die HCV-induzierte verstärkte Aktivierung der p38^{MAPK} in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist.

Die vorliegenden Untersuchungen legen weiterhin nahe, dass die NRG1-vermittelte Herabregulation von ErbB3 durch HCV die Oberflächenexpression der anderen ErbB Rezeptorfamilienmitglieder dahingehend verändert, dass sowohl der EGF Rezeptor (EGFR) als auch ErbB2 verstärkt auf der Oberfläche präsentiert werden. Hiermit übereinstimmend führt der *Knockdown* von ErbB3 durch spezifische siRNA zu einer verstärkten Oberflächenexpression des EGF Rezeptors. Diese Beobachtung ist interessant, da Arbeiten anderer Gruppen kürzlich belegen konnten, dass EGFR für den Eintritt von HCV in die Wirtszelle von Bedeutung ist. Es wäre somit denkbar, dass HCV über einen NRG1-vermittelten parakrinen Mechanismus die Rezeptorkonstellation auf der Oberfläche benachbarter Zellen dahingehend verändert, dass ein Viruseintritt begünstigt wird. Diese Überlegungen werden durch eigene Befunde unterstützt. Die Vorbehandlung von Huh7.5 Zellen mit der NRG1 Isoform HRG1 β führt zu einer verstärkten viralen Replikation nach Infektion mit dem HCV Stamm JC1.

In einem zweiten, eher methodisch orientierten Teil der Arbeit wurde die Interaktion der NS5B Polymerase aus HCV mit der wirtsspezifischen Tyrosinkinase c-Src weitergehend untersucht. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war eine Interaktion von c-Src mit dem vollständigen NS5B-Protein bereits beschrieben worden. Da das

vollständige NS5B-Protein am C-Terminus einen Membrananker enthält, sollte hier zunächst ein Präzipitations- oder Aggregationsartefakt des hydrophoben Vollängen-NS5B mit der verwendeten Sepharose bzw. c-Src ausgeschlossen werden. Hierzu wurden trunkierte NS5B Konstrukte ohne Membrananker generiert. Die Ergebnisse der *Pulldown*-Experimente mit diesen Konstrukten legen übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorangehenden Untersuchungen nahe, dass es zu einer Interaktion von c-Src mit NS5B kommt. Weiterführende Untersuchungen lassen hier jedoch annehmen, dass anders als bisher angenommen die in der NS5B Sequenz enthaltenen PxxP-Motive als alleinige Interaktionspartner der c-Src-SH3 Domäne eher nicht in Frage kommen.

7 Summary

The work presented in this thesis focuses on the interference of the Hepatitis C Virus with the expression of the ErbB3 receptor. In summary, data obtained using cells containing a HCV replicon demonstrates that downregulation of ErbB3 which belongs to the EGF receptor family already occurs at the transcript level and is caused by enhanced expression of the ErbB3 ligand NRG1. This suppressive NRG1 effect could be simulated by intracellular cAMP accumulation in the target cells. Further experiments showed that the ligand NRG1 is expressed in a Sp1-dependent manner. Additionally, inhibition studies suggested that this involves a HCV-induced p38^{MAPK} hyperactivation.

The findings also implicate that NRG1-mediated ErbB3 downregulation by HCV ultimately influences ErbB receptor family surface expression to the point where both EGF receptor (EGFR) and ErbB2 are increasingly presented at the cell surface. This is supported by experiments in which EGFR surface expression was increased by siRNA-mediated knockdown of ErbB3. Moreover, it was recently shown by several groups that EGFR plays a role in host cell entry of HCV. It is thus very conceivable that HCV modifies ErbB receptor composition on the surface of neighboring cells via a NRG1-mediated paracrine mechanism, making them more permissive for viral entry and thus spreading infection. This concept is supported by the observation that pretreatment of Huh7.5 cells with the NRG1 isoform HRG1 β leads to increased viral replication upon infection with the HCV strain JC1.

In a secondary project, the mode of interaction of the viral NS5B polymerase with the host specific tyrosine kinase c-Src was investigated in detail. Previously, this lab had demonstrated interaction between c-Src and the full-length NS5B protein containing a membrane anchor at its C-terminus that crosses the lipid bilayer as a transmembrane segment. Since this anchor impairs solubility of NS5B, a false-positive interaction artifact caused by NS5B precipitation onto the sepharose surface or unspecific aggregation with the c-Src bait needed to be excluded. Pulldown experiments with truncated NS5B constructs lacking the membrane anchor confirmed the previous findings supporting a physiological interaction of full-length

NS5B with c-Src. Further experiments, however, suggest that the PxxP motifs found within the NS5B sequence are not likely to be the exclusive sites of interaction with the SH3 domain of c-Src.

Literaturverzeichnis

1. World Health Organisation, *Fact Sheet N°164*. 2012; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
2. Choo QL, K.G., Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M., *Milestones in liver disease*. Science, 1989. **244**: p. 359-362.
3. Bukh, J., R.H. Miller, and R.H. Purcell, *Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes*. Semin Liver Dis, 1995. **15**(1): p. 41-63.
4. Nakano, T., G.M. Lau, G.M. Lau, M. Sugiyama, and M. Mizokami, *An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region*. Liver Int, 2012. **32**(2): p. 339-45.
5. Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J.M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I.T. Shin, L.J. Stuyver, H.J. Thiel, S. Viazov, A.J. Weiner, and A. Widell, *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 962-73.
6. Md Tipo Sultan, M.M.R., Shahana Begum, *Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection*. J Bangladesh Coll Phys Surg, 2009. **27**(3): p. 160-165.
7. Brenner, D.A., *Molecular pathogenesis of liver fibrosis*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2009. **120**: p. 361-8.
8. Nielsen, S.U., M.F. Bassendine, A.D. Burt, C. Martin, W. Pumeechockchai, and G.L. Toms, *Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients*. J Virol, 2006. **80**(5): p. 2418-28.
9. Liu, S., W. Yang, L. Shen, J.R. Turner, C.B. Coyne, and T. Wang, *Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 2011-4.
10. Lupberger, J., M.B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, C. Davis, C.J. Mee, M. Turek, S. Gorke, C. Royer, B. Fischer, M.N. Zahid, D. Lavillette, J. Fresquet, F.L. Cosset, S.M. Rothenberg, T. Pietschmann, A.H. Patel, P. Pessaux, M. Doffoel, W. Raffelsberger, O. Poch, J.A. McKeating, L. Brino, and T.F. Baumert, *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.
11. von Hahn, T. and C.M. Rice, *Hepatitis C virus entry*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 3689-93.
12. Barth, H., E.K. Schnober, F. Zhang, R.J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F.L. Cosset, A.H. Patel, H.E. Blum, and T.F. Baumert, *Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10579-90.
13. Barth, H., T.J. Liang, and T.F. Baumert, *Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications*. Hepatology, 2006. **44**(3): p. 527-35.

14. Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli, *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.
15. Dao Thi, V.L., C. Granier, M.B. Zeisel, M. Guerin, J. Mancip, O. Granio, F. Penin, D. Lavillette, R. Bartenschlager, T.F. Baumert, F.L. Cosset, and M. Dreux, *Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps*. J Biol Chem, 2012. **287**(37): p. 31242-57.
16. Hishiki, T., Y. Shimizu, R. Tobita, K. Sugiyama, K. Ogawa, K. Funami, Y. Ohsaki, T. Fujimoto, H. Takaku, T. Wakita, T.F. Baumert, Y. Miyanari, and K. Shimotohno, *Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms*. J Virol, 2010. **84**(22): p. 12048-57.
17. Sainz, B., Jr., N. Barretto, D.N. Martin, N. Hiraga, M. Imamura, S. Hussain, K.A. Marsh, X. Yu, K. Chayama, W.A. Alrefai, and S.L. Uprichard, *Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor*. Nat Med, 2012. **18**(2): p. 281-5.
18. Olaby, R.A., H.M. Azzazy, R. Harris, B. Chromy, J. Vielmetter, and R. Balhorn, *Identification of ligands that target the HCV-E2 binding site on CD81*. J Comput Aided Mol Des, 2013. **27**(4): p. 337-46.
19. Catanese, M.T., H. Ansuini, R. Graziani, T. Huby, M. Moreau, J.K. Ball, G. Paonessa, C.M. Rice, R. Cortese, A. Vitelli, and A. Nicosia, *Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 34-43.
20. Krieger, S.E., M.B. Zeisel, C. Davis, C. Thumann, H.J. Harris, E.K. Schnober, C. Mee, E. Soulier, C. Royer, M. Lambotin, F. Grunert, V.L. Dao Thi, M. Dreux, F.L. Cosset, J.A. McKeating, C. Schuster, and T.F. Baumert, *Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1144-57.
21. Diao, J., H. Pantua, H. Ngu, L. Komuves, L. Diehl, G. Schaefer, and S.B. Kapadia, *Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry*. J Virol, 2012. **86**(20): p. 10935-49.
22. Trauner, M., P.J. Meier, and J.L. Boyer, *Molecular pathogenesis of cholestasis*. N Engl J Med, 1998. **339**(17): p. 1217-27.
23. Farquhar, M.J., H.J. Harris, M. Diskar, S. Jones, C.J. Mee, S.U. Nielsen, C.L. Brimacombe, S. Molina, G.L. Toms, P. Maurel, J. Howl, F.W. Herberg, S.C. van Ijzendoorn, P. Balfe, and J.A. McKeating, *Protein kinase A-dependent step(s) in hepatitis C virus entry and infectivity*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8797-811.
24. Farquhar, M.J., K. Hu, H.J. Harris, C. Davis, C.L. Brimacombe, S.J. Fletcher, T.F. Baumert, J.Z. Rappoport, P. Balfe, and J.A. McKeating, *Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis*. J Virol, 2012. **86**(8): p. 4305-16.

25. Coller, K.E., K.L. Berger, N.S. Heaton, J.D. Cooper, R. Yoon, and G. Randall, *RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(12): p. e1000702.
26. Lavillette, D., B. Bartosch, D. Nourrisson, G. Verney, F.L. Cosset, F. Penin, and E.I. Pecheur, *Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 3909-17.
27. Zeisel, M.B., I. Fofana, S. Fafi-Kremer, and T.F. Baumert, *Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies*. J Hepatol, 2011. **54**(3): p. 566-76.
28. Dubuisson, J., *Hepatitis C virus proteins*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2406-15.
29. Appel, N., T. Pietschmann, and R. Bartenschlager, *Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 3187-94.
30. Foster, T.L.B., T.; Stonehouse, N. J.; Pearson, A. R.; Harris, M. , *All Three Domains of the Hepatitis C Virus Nonstructural NS5A Protein Contribute to RNA Binding*. Journal of Virology, 2010. **84**(18): p. 9267-9277.
31. Lohmann, V., F. Korner, U. Herian, and R. Bartenschlager, *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.
32. Bartenschlager, R., F.-L. Cosset, and V. Lohmann, *Hepatitis C virus replication cycle*. Journal of hepatology, 2010. **53**(3): p. 583-585.
33. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 933-8.
34. Romero-Brey, I., A. Merz, A. Chiramel, J.Y. Lee, P. Chlanda, U. Haselman, R. Santarella-Mellwig, A. Habermann, S. Hoppe, S. Kallis, P. Walther, C. Antony, J. Krijnse-Locker, and R. Bartenschlager, *Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication*. PLoS Pathog, 2012. **8**(12): p. e1003056.
35. Albecka, A., S. Belouzard, A. Op de Beeck, V. Descamps, L. Goueslain, J. Bertrand-Michel, F. Terce, G. Duverlie, Y. Rouille, and J. Dubuisson, *Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle*. Hepatology, 2012. **55**(4): p. 998-1007.
36. Pietschmann, T., M. Zayas, P. Meuleman, G. Long, N. Appel, G. Koutsoudakis, S. Kallis, G. Leroux-Roels, V. Lohmann, and R. Bartenschlager, *Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000475.
37. Bode, J.G., E.D. Brenndorfer, J. Karthe, and D. Haussinger, *Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication*. Biol Chem, 2009. **390**(10): p. 1013-32.
38. Brenndorfer, E.D., J. Karthe, L. Frelin, P. Cebula, A. Erhardt, J. Schulte am Esch, H. Hengel, R. Bartenschlager, M. Sallberg, D. Haussinger, and J.G. Bode, *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.
39. Pfannkuche, A., K. Buther, J. Karthe, M. Poenisch, R. Bartenschlager, M. Trilling, H. Hengel, D. Willbold, D. Haussinger, and J.G. Bode, *c-Src is required for complex formation between the hepatitis C virus-encoded proteins NS5A and NS5B: a prerequisite for replication.* Hepatology, 2011. **53**(4): p. 1127-36.
 40. Citri, A. and Y. Yarden, *EGF-ERBB signalling: towards the systems level.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 505-16.
 41. Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John, *ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration.* Trends Immunol, 2011. **32**(8): p. 380-7.
 42. Lenferink, A.E., R. Pinkas-Kramarski, M.L. van de Poll, M.J. van Vugt, L.N. Klapper, E. Tzahar, H. Waterman, M. Sela, E.J. van Zoelen, and Y. Yarden, *Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers.* EMBO J, 1998. **17**(12): p. 3385-97.
 43. Gadella, T.W., Jr. and T.M. Jovin, *Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation.* J Cell Biol, 1995. **129**(6): p. 1543-58.
 44. Earp, H.S., 3rd, B.F. Calvo, and C.I. Sartor, *The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4.* Trans Am Clin Climatol Assoc, 2003. **114**: p. 315-33; discussion 333-4.
 45. Carver, R.S., M.C. Stevenson, L.A. Scheving, and W.E. Russell, *Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration.* Gastroenterology, 2002. **123**(6): p. 2017-27.
 46. Baselga, J. and S.M. Swain, *Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(7): p. 463-75.
 47. Kario, E., M.D. Marmor, K. Adamsky, A. Citri, I. Amit, N. Amariglio, G. Rechavi, and Y. Yarden, *Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling.* J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 7038-48.
 48. Gur, G., C. Rubin, M. Katz, I. Amit, A. Citri, J. Nilsson, N. Amariglio, R. Henriksson, G. Rechavi, H. Hedman, R. Wides, and Y. Yarden, *LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation.* EMBO J, 2004. **23**(16): p. 3270-81.
 49. Laederich, M.B., M. Funes-Duran, L. Yen, E. Ingalla, X. Wu, K.L. Carraway, 3rd, and C. Sweeney, *The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases.* J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 47050-6.
 50. Rubin, C., V. Litvak, H. Medvedovsky, Y. Zwang, S. Lev, and Y. Yarden, *Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops.* Curr Biol, 2003. **13**(4): p. 297-307.
 51. Tzahar, E., H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunagaran, S. Lavi, B.J. Ratzkin, and Y. Yarden, *A hierarchical network of interreceptor*

- interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5276-87.
52. Jones, R.B., A. Gordus, J.A. Krall, and G. MacBeath, *A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays.* Nature, 2006. **439**(7073): p. 168-74.
 53. Carraway, K.L., 3rd, M.X. Sliwkowski, R. Akita, J.V. Platko, P.M. Guy, A. Nuijens, A.J. Diamonti, R.L. Vandlen, L.C. Cantley, and R.A. Cerione, *The erbB3 gene product is a receptor for heregulin.* J Biol Chem, 1994. **269**(19): p. 14303-6.
 54. Waterman, H., I. Alroy, S. Strano, R. Seger, and Y. Yarden, *The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing.* EMBO J, 1999. **18**(12): p. 3348-58.
 55. Cao, Z., X. Wu, L. Yen, C. Sweeney, and K.L. Carraway, 3rd, *Neuregulin-induced ErbB3 downregulation is mediated by a protein stability cascade involving the E3 ubiquitin ligase Nrdp1.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(6): p. 2180-8.
 56. Vecchi, M., J. Baulida, and G. Carpenter, *Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation.* J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18989-95.
 57. Zhou, W. and G. Carpenter, *Heregulin-dependent trafficking and cleavage of ErbB-4.* J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34737-43.
 58. Ni, C.Y., M.P. Murphy, T.E. Golde, and G. Carpenter, *gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase.* Science, 2001. **294**(5549): p. 2179-81.
 59. Wiley, H.S., *Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling.* Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 78-88.
 60. Tan, S.L., H. Nakao, Y. He, S. Vijaysri, P. Neddermann, B.L. Jacobs, B.J. Mayer, and M.G. Katze, *NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5533-8.
 61. He, Y., H. Nakao, S.L. Tan, S.J. Polyak, P. Neddermann, S. Vijaysri, B.L. Jacobs, and M.G. Katze, *Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase.* J Virol, 2002. **76**(18): p. 9207-17.
 62. Macdonald, A., J.K. Chan, and M. Harris, *Perturbation of epidermal growth factor receptor complex formation and Ras signalling in cells harbouring the hepatitis C virus subgenomic replicon.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 4): p. 1027-33.
 63. Patton, J.B., D. George, and K.O. Chang, *Bile acids promote HCV replication through the EGFR/ERK pathway in replicon-harboring cells.* Intervirology, 2011. **54**(6): p. 339-48.
 64. Pei, R., H. Chen, L. Lu, W. Zhu, S. Beckebaum, V. Cicinnati, M. Lu, and X. Chen, *Hepatitis C virus infection induces the expression of amphiregulin, a factor related to the activation of cellular survival pathways and required for efficient viral assembly.* J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 10): p. 2237-48.

-
65. Buonanno, A. and G.D. Fischbach, *Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system*. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. **11**(3): p. 287-96.
 66. Arribas, J. and C. Esselens, *ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(20): p. 2319-35.
 67. Wen, D., S.V. Suggs, D. Karunakaran, N. Liu, R.L. Cupples, Y. Luo, A.M. Janssen, N. Ben-Baruch, D.B. Trollinger, V.L. Jacobsen, and et al., *Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(3): p. 1909-19.
 68. Falls, D.L., *Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 14-30.
 69. Tsai, P.W., S.G. Shiah, M.T. Lin, C.W. Wu, and M.L. Kuo, *Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. A critical role of p38/nuclear factor-kappa B signaling pathway*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5750-9.
 70. Ueno, Y., H. Sakurai, S. Tsunoda, M.K. Choo, M. Matsuo, K. Koizumi, and I. Saiki, *Heregulin-induced activation of ErbB3 by EGFR tyrosine kinase activity promotes tumor growth and metastasis in melanoma cells*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(2): p. 340-7.
 71. Ito, Y., T. Takeda, M. Sakon, M. Tsujimoto, S. Higashiyama, K. Noda, E. Miyoshi, M. Monden, and N. Matsuura, *Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma*. *Br J Cancer*, 2001. **84**(10): p. 1377-83.
 72. Dynan, W.S. and R. Tjian, *Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II*. *Cell*, 1983. **32**(3): p. 669-80.
 73. Chu, S., *Transcriptional regulation by post-transcriptional modification--role of phosphorylation in Sp1 transcriptional activity*. *Gene*, 2012. **508**(1): p. 1-8.
 74. Li, L. and J.R. Davie, *The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology*. *Ann Anat*, 2010. **192**(5): p. 275-83.
 75. Chu, S. and T.J. Ferro, *Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation*. *Gene*, 2005. **348**: p. 1-11.
 76. D'Addario, M., P.D. Arora, and C.A. McCulloch, *Role of p38 in stress activation of Sp1*. *Gene*, 2006. **379**: p. 51-61.
 77. Lemaigre, F.P., C.I. Ace, and M.R. Green, *The cAMP response element binding protein, CREB, is a potent inhibitor of diverse transcriptional activators*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(12): p. 2907-11.
 78. Zhang, X., D.T. Odom, S.H. Koo, M.D. Conkright, G. Canettieri, J. Best, H. Chen, R. Jenner, E. Herbolsheimer, E. Jacobsen, S. Kadam, J.R. Ecker, B. Emerson, J.B. Hogenesch, T. Unterman, R.A. Young, and M. Montminy, *Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(12): p. 4459-64.
 79. Herndon, C.A., N. Ankenbruck, B. Lester, J. Bailey, and L. Fromm, *Neuregulin1 signaling targets SRF and CREB and activates the muscle*

- spindle-specific gene Egr3 through a composite SRF-CREB-binding site. Exp Cell Res*, 2013. **319**(5): p. 718-30.
80. Qadri, I., M. Choudhury, S.M. Rahman, T.A. Knotts, R.C. Janssen, J. Schaack, M. Iwahashi, L. Puljak, F.R. Simon, G. Kilic, J.G. Fitz, and J.E. Friedman, *Increased phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and steatosis during hepatitis C virus subgenome replication: role of nonstructural component 5A and CCAAT/enhancer-binding protein beta. J Biol Chem*, 2012. **287**(44): p. 37340-51.
 81. Frensing, T., C. Kaltschmidt, and T. Schmitt-John, *Characterization of a neuregulin-1 gene promoter: positive regulation of type I isoforms by NF-kappaB. Biochim Biophys Acta*, 2008. **1779**(2): p. 139-44.
 82. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
 83. Callegari, E., B.K. Elamin, S. Sabbioni, L. Gramantieri, and M. Negrini, *Role of microRNAs in hepatocellular carcinoma: a clinical perspective. Onco Targets Ther*, 2013. **6**: p. 1167-1178.
 84. Yu, Z., R. Baserga, L. Chen, C. Wang, M.P. Lisanti, and R.G. Pestell, *microRNA, cell cycle, and human breast cancer. Am J Pathol*, 2010. **176**(3): p. 1058-64.
 85. Davis-Dusenbery, B.N. and A. Hata, *Mechanisms of control of microRNA biogenesis. J Biochem*, 2010. **148**(4): p. 381-92.
 86. Potenza, N., U. Papa, N. Mosca, F. Zerbini, V. Nobile, and A. Russo, *Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(12): p. 5157-63.
 87. Samreen, B., S. Khaliq, U.A. Ashfaq, M. Khan, N. Afzal, M.A. Shahzad, S. Riaz, and S. Jahan, *Hepatitis C virus entry: role of host and viral factors. Infect Genet Evol*, 2012. **12**(8): p. 1699-709.
 88. Felmlee, D.J., M.L. Hafirassou, M. Lefevre, T.F. Baumert, and C. Schuster, *Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. Viruses*, 2013. **5**(5): p. 1292-324.
 89. Delang, L., J. Paeshuyse, and J. Neyts, *The role of phosphatidylinositol 4-kinases and phosphatidylinositol 4-phosphate during viral replication. Biochem Pharmacol*, 2012. **84**(11): p. 1400-8.
 90. Kang, W. and E.C. Shin, *Clinical implications of chemokines in acute and chronic hepatitis C virus infection. Yonsei Med J*, 2011. **52**(6): p. 871-8.
 91. Gong, G., G. Waris, R. Tanveer, and A. Siddiqui, *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.
 92. Qadri, I., M. Iwahashi, J.M. Capasso, M.W. Hopken, S. Flores, J. Schaack, and F.R. Simon, *Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1. Biochem J*, 2004. **378**(Pt 3): p. 919-28.

93. Xiang, Z., L. Qiao, Y. Zhou, L.A. Babiuk, and Q. Liu, *Hepatitis C virus nonstructural protein-5A activates sterol regulatory element-binding protein-1c through transcription factor Sp1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **402**(3): p. 549-53.
94. Presser, L.D., S. McRae, and G. Waris, *Activation of TGF-beta1 promoter by hepatitis C virus-induced AP-1 and Sp1: role of TGF-beta1 in hepatic stellate cell activation and invasion*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56367.
95. Waris, G., A. Livolsi, V. Imbert, J.F. Peyron, and A. Siddiqui, *Hepatitis C virus NS5A and subgenomic replicon activate NF-kappaB via tyrosine phosphorylation of IkkappaBalpha and its degradation by calpain protease*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(42): p. 40778-87.
96. Macdonald, A., K. Crowder, A. Street, C. McCormick, K. Saksela, and M. Harris, *The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 17775-84.
97. Fahey, S., E. Dempsey, and A. Long, *The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection*. *Cell Mol Immunol*, 2013.
98. Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht, *Multiple control of interleukin-8 gene expression*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002. **72**(5): p. 847-855.
99. Nishitsuji, H., K. Funami, Y. Shimizu, S. Ujino, K. Sugiyama, T. Seya, H. Takaku, and K. Shimotohno, *Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells*. *J Virol*, 2013. **87**(14): p. 8169-78.
100. Thomas, S.M. and J.S. Brugge, *Cellular functions regulated by Src family kinases*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997. **13**: p. 513-609.
101. Oppermann, H., A.D. Levinson, H.E. Varmus, L. Levintow, and J.M. Bishop, *Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(4): p. 1804-8.
102. Mayer, B.J., *SH3 domains: complexity in moderation*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 7): p. 1253-63.
103. Klein, N.P., M.J. Bouchard, L.H. Wang, C. Kobarg, and R.J. Schneider, *Src kinases involved in hepatitis B virus replication*. *EMBO J*, 1999. **18**(18): p. 5019-27.
104. Saksela, K., *HIV-1 Nef and host cell protein kinases*. *Front Biosci*, 1997. **2**: p. d606-18.
105. Liang, Y. and B. Roizman, *State and role of SRC family kinases in replication of herpes simplex virus 1*. *J Virol*, 2006. **80**(7): p. 3349-59.
106. Chu, J.J. and P.L. Yang, *c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(9): p. 3520-5.
107. Macdonald, A., K. Crowder, A. Street, C. McCormick, and M. Harris, *The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity*. *J Gen Virol*, 2004. **85**: p. 721 - 729.

108. Wilson, G.K. and Z. Stamataki, *In vitro systems for the study of hepatitis C virus infection*. Int J Hepatol, 2012. **2012**: p. 292591.
109. Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager, *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. Science, 1999. **285**(5424): p. 110-3.
110. Bartenschlager, R. and S. Sparacio, *Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture*. Virus Res, 2007. **127**(2): p. 195-207.
111. Woerz, I.V.L., V.; Bartenschlager, R., *Hepatitis C virus replicons: dinosaurs still in business?* J Viral Hepat, 2009. **16**(1): p. 1-9.
112. 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.
113. Lohmann, V., F. Korner, A. Dobierzewska, and R. Bartenschlager, *Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1437-49.
114. Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand, and R. Bartenschlager, *Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4008-21.
115. 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.
116. Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C.M. Rice, and J.A. McKeating, *Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7271-6.
117. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T.J. Liang, *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 791-6.
118. Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wolk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, T. Maruyama, R.O. Hynes, D.R. Burton, J.A. McKeating, and C.M. Rice, *Complete replication of hepatitis C virus in cell culture*. Science, 2005. **309**(5734): p. 623-6.
119. Sainz, B., Jr. and F.V. Chisari, *Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells*. J Virol, 2006. **80**(20): p. 10253-7.
120. Cebula, P., *HCV interferiert mit Ack1-abhängigen Signalwegen durch Herabregulation der TC-PTP*. Dissertation. Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Experimentelle Hepatologie, 2010.
121. 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.
122. Kangro, H.O., *Virology Methods Manual*. 1996: Elsevier Science.

123. Wang, S., J. Huang, H. Lyu, C.K. Lee, J. Tan, J. Wang, and B. Liu, *Functional cooperation of miR-125a, miR-125b, and miR-205 in entinostat-induced downregulation of erbB2/erbB3 and apoptosis in breast cancer cells*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e556.
124. Robins, H., M. Krasnitz, and A.J. Levine, *The computational detection of functional nucleotide sequence motifs in the coding regions of organisms*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(6): p. 665-73.
125. Jia, C.Y., J. Nie, C. Wu, C. Li, and S.S. Li, *Novel Src homology 3 domain-binding motifs identified from proteomic screen of a Pro-rich region*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(8): p. 1155-66.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Johannes Bode, unter dessen Betreuung und Anleitung diese Arbeit angefertigt wurde. Ich danke ihm für seine kontinuierliche Unterstützung, seine Bereitschaft zur Diskussion, seine wertvollen Anregungen und sein Vertrauen.

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

Mein Dank gilt zudem Professor Dr. Dieter Häussinger für die Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe sowie für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in seiner Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. Ralf Bartenschlager und seiner Mitarbeiterin Stefanie Kallis danke ich herzlich für die Bereitstellung verschiedener Zellkultursysteme sowie die kontinuierlich Bereitschaft zur Beantwortung aller auftretenden Fragen sowie die Möglichkeit in den Laboratorien der Universität Heidelberg eine für die Etablierung des Infektionssystems erforderliche Methode zu erlernen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie und insbesondere der AG Bode für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Maïke Talajlo für ihre experimentelle Unterstützung, Sanaz Spitzley, Dr. Ute Albrecht und Dr. Christian Ehltling für ihre Unterstützung und Bereitschaft zur Diskussion sowie Frau Marijana Suzanj für ihre Freundschaft.

Herzlich danken möchte ich zudem Dr. Juliane Karthe für ihre anhaltende Unterstützung, auch noch im Anschluss an ihre Tätigkeit als Post-Doc in der Experimentellen Hepatologie.

Für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der HSQC-Messung bedanke ich mich bei Dr. Silke Hoffmann, Dr. Amine Aladag und Dr. Rudolf Hartmann aus dem Forschungszentrum Jülich.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Jan Stindt für seine Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir immer zur Seite standen, mich unterstützt und stets an mich geglaubt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sabine Eisenbürger
Geburtstag	29.01.1985
Geburtsort	Krefeld
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1995 – 2004	Gymnasium am Stadtpark in Krefeld-Uerdingen Abschluss: Abitur – Gesamtnote 1,9
-------------	---

Studium

2005 – 2007	Grundstudium der Pharmazie (1. Staatsexamen) an der HHU Düsseldorf - Gesamtnote 3,5
2007 – 2009	Hauptstudium der Pharmazie (2. Staatsexamen) an der HHU Düsseldorf - Gesamtnote 1,4
2009 – 2010	Praktisches Jahr in der Ahorn Apotheke in Krefeld und an der HHU Düsseldorf Abschluss: 3. Staatsexamen - Gesamtnote 3,5
2010	Approbation als Apothekerin

Promotion

2009 - 2014	Promotion zum Thema: „Interferenz des Hepatitis C Virus mit der EGF Rezeptor Familie unter besonderer Berücksichtigung der Neuregulin 1-vermittelten Herabregulation des ErbB3 Rezeptors“ in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf und an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
-------------	--

Stipendium

2009 – 2012 Stipendium der NRW Forschungsschule BioStruct

Zusätzliche Qualifikationen

Workshops

Presenting Science
Shaping up teaching
Scientific Writing
Good Scientific Practice
Fundamentals of Project Management
Negotiation

Praktische Kurse

NMR-Spektroskopie biologischer Makromoleküle
X-Ray Kristallographie
Fluoreszenz-Spektroskopie und Mikroskopie: Grundlagen
der Fluoreszenz (CAI)
Fluoreszenz-basierte spektroskopische und calorimetrische
Anwendungen bei der Analyse biomolekularer
Interaktionen

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 10.04.2014

Sabine Eisenbürger