hainvie hain HEINRICH HEINE

UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

# Mechanismus und funktionelle Relevanz der Hemmung der IL-1β-induzierten IκΒζ-Expression durch das Hepatitis C Virus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sanaz Spitzley

aus Teheran/Iran

Düsseldorf, November 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 Bode

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2014

Meiner Familie

Die Wissenschaft ist der Verstand der Welt, die Kunst ihre Seele

(Maxim Gorki)

#### Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

#### In Originalarbeiten

Spitzley S., Ehlting C., Bartenschlager R., Häussinger D., Bode J. G. *HCV prevents IL-1* $\beta$ *-induced expression of I* $\kappa$ *B* $\zeta$  *thereby interfering with NF-* $\kappa$ *B-dependent gene expression* (Manuskript in Vorbereitung)

#### als Posterbeiträge

Sanaz Spitzley, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Hepatitis C virus induced* suppression of  $I\kappa B\zeta$  and interference with  $I\kappa B\zeta$  induced Lipocalin2 Expression. 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver, Januar 2014, Tübingen.

Sanaz Spitzley, Ralf Bartenschlager, Dieter Häussinger, Johannes G. Bode. *Hepatitis C virus prevents IL-1* $\beta$ *-induced expression of Lipocalin2 via suppression of I* $\kappa$ *B* $\zeta$ . 49<sup>th</sup> International Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2014, London.

# INHALTSVERZEICHNIS

A	ABBILDUNGSVERZEICHNIS 9			
T/	TABELLENVERZEICHNIS			
A	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 14			
1		EINLEITUNG	21	
1.1		Das Hepatitis C Virus	21	
	1.1.1	Aufbau des Hepatitis C Virus	21	
	1.1.2	HCV-Lebenszyklus	23	
	1.1.3	Wechselwirkung des Hepatitis C Virus mit der Wirtszelle	26	
	1.1.4	Verwendete Modellsysteme zur Untersuchung des Hepatitis C Virus	27	
1.	2	Interleukin-1β	31	
1.	3	Der MAP-Kinase-Signalweg	34	
	1.3.1	Die MAPKAP-Kinasen MK2 und MK3	38	
1.4		Die NF-κB/Rel-Proteinfamilie	40	
	1.4.1	Die Familie der IkB-Proteine	42	
	1.4.2	Das nukleäre IκB-Protein ΙκΒζ	45	
	1.4.3	Aktivierung des NF-κB-Signalweges	49	
	1.4.4	Wechselwirkungen des NF- $\kappa$ B-Signalweges mit Krankheiten		
		und im Besonderen mit dem Hepatitis C Virus	52	
1.	5	Lipocalin-2	53	
1.	6	Calpain-vermittelte Regulation der Protein-Expression	56	
1.	7	Zielsetzung dieser Arbeit	59	
2		MATERIAL UND METHODEN	60	
2.1		Material, Substanzen und Lösungen	60	
	2.1.1	Materialien für die Zellkultur	60	

	2.1.2	Zellkulturmedien und Zusätze	60
	2.1.3	Reagenzien und Feinchemikalien	61
	2.1.4	Kits	62
	2.1.5	PCR und Klonierung	63
	2.1.6	Bakterienstämme	64
	2.1.7	Plasmide	64
	2.1.8	Antikörper	64
	2.1.9	Inhibitoren	66
	2.1.10	Computerprogramme und Datenbanken zur Datenauswertung	66
2.	.2	Methoden	67
	2.2.1	Zellbiologische Methoden	67
	2.2.2	Molekularbiologische Methoden	70
	2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	76
	2.2.4	Hepatitis C Virus Infektionssystem	80
3		ERGEBNISSE	83
3.	.1	Die Expression von I ${}_{\kappa}B\alpha$ und I ${}_{\kappa}B\zeta$ , aber nicht von I ${}_{\kappa}B\beta$ , wird	
		durch HCV supprimiert	84
3.2		Die HCV-vermittelte Suppression von I ${f \kappa}$ B ${f \zeta}$ erfolgt auf der	
		Proteinebene unter Beteiligung von Calpain	87
3.	.3	Die Herabregulierung der l $\kappa$ B $\zeta$ -Expression resultiert in der	
		Hemmung der Lipocalin-2 Expression	104
3.	.4	HCV hemmt die Aktivität der MAPKAP-Kinase-2 und supprimiert	
		somit die IκBζ-Proteinsynthese und die darausfolgende LCN2-	112
			110

3.5	HCV hemmt die Expression von Lipocalin-2, um dessen		
	negativen Effekt auf die Zellproliferation des Hepatozyten zu		
	verringern	123	
4	DISKUSSION	126	
4.1	Die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$ und I $\kappa$ B $\zeta$ , aber nicht von I $\kappa$ B $\beta$ , wird		
	durch HCV supprimiert	126	
4.2	Die HCV-vermittelte Suppression von I ${f \kappa}$ B ${f \zeta}$ erfolgt auf der		
	Proteinebene unter Beteiligung von Calpain	128	
4.3	Die Herabregulierung der I $_{\kappa}$ B $\zeta$ -Expression resultiert in der		
	Hemmung der Lipocalin-2 Expression	132	
4.4	HCV hemmt die Aktivität der MAPKAP-Kinase-2 und		
	supprimiert hierdurch die l ${f \kappa}$ B ${f \zeta}$ -Proteinsynthese und die		
	darausfolgende LCN2-Expression	136	
4.5	HCV hemmt die Expression von Lipocalin-2, um dessen negative	en	
	Effekt auf die Zellproliferation von Hepatozyten zu verringern	138	
4.6	Fazit dieser Arbeit	139	
5	ZUSAMMENFASSUNG	142	
6	SUMMARY	144	
LITERATURVERZEICHNIS 14		146	
DANKS	DANKSAGUNG 10		
LEBENS	LEBENSLAUF 16		

### ABBILDUNGSVERZEICHNIS

# 1 EINLEITUNG

Abbildung 1.1: Genomorganisation des Hepatitis C Virus und		
	Prozessierung des Polyproteins.	22
Abbildung 1.2:	Eintritt des Hepatitis C Virus in den Hepatozyten.	25
Abbildung 1.3:	Verwendete Hepatitis C Virus Zellkultursysteme.	30
Abbildung 1.4:	Interleukin-1 $\alpha$ und 1 $\beta$ : Prozessierung und Rezeptoren.	32
Abbildung 1.5:	Regulierung der Interleukin-1β-Aktivität.	33
Abbildung 1.6:	Die MAP-Kinase Signalkaskaden.	36
Abbildung 1.7:	Die NF-κB-Proteinfamilie.	41
Abbildung. 1.8:	Die IκB-Proteinfamilie.	43
Abbildung 1.9:	Aktivierung des NF-κB-Signalweges.	51

# 3 ERGEBNISSE

Abbildung 3.1:	Ικ B $\alpha$ und Ικ B $\beta$ werden nach IL-1β-, aber nicht TNF $\alpha$ -	
	Stimulation in Hepatozyten degradiert, während I $\kappa$ B $\zeta$	
	induziert wird.	85
Abbildung 3.2:	Die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$ und I $\kappa$ B $\zeta$ , aber nicht I $\kappa$ B $\beta$ ,	
	wird durch HCV supprimiert.	87

Abbildung 3.3:	IκBζ-Suppression durch das Hepatitis C Virus erfolgt	
	weder auf der Ebene der Transkription, noch auf der	
	Ebene der mRNA-Stabilität.	89
Abbildung 3.4:	Iκ Bζ wird in Hepatozyten proteasomal degradiert.	91
Abbildung 3.5:	Der proteasomale Abbau spielt bei der Suppression der	
	IκBζ-Expression durch HCV höchstens eine	
	untergeordnete Rolle.	93
Abbildung 3.6:	HCV-bedingte Suppression von I $\kappa$ B $\zeta$ wird am ehesten	
	durch Calpain-vermittelten Abbau verursacht.	95
Abbildung 3.7:	HCV-vermittelter Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ durch das	
	Proteasom und Regulierung des HCV-unabhängigen	
	$I\kappa B\beta$ durch Calpain.	96
Abbildung 3.8:	HCV hemmt die Expression von miR483-3p, hat aber	
	keinen Einfluss auf miR124a.	99
Abbildung 3.9:	Die HCV-vermittelte Herabregulierung von $I\kappa B\zeta$ wird	
	nicht durch die verstärkte Expression von miR-187 bedingt.	100
Abbildung 3.10:	Inhibitoren des Akt- und p38-Signalweges zeigen keinen	
	Effekt auf die Expression von ΙκΒζ.	102
Abbildung 3.11:	Inhibitoren des MEK1/2- und JNK-Signalweges hemmen die	
	Expression von ΙκΒζ.	103
Abbildung 3.12:	IκBζ-Suppression durch den MEK-Inhibitor U0126 erfolgt	
	nicht durch eine Hemmung der Transkription.	104
Abbildung 3.13:	Erfolgreicher <i>knockdown</i> der ΙκΒζ-Expression sowohl	
	auf Transkript- als auch auf Proteinebene mittels	
	spezifischer siRNA.	107

Abbildung 3.14:	Die Chemokine CXCL8 und CXCL5 werden HCV-abhängig,	
	aber ΙκΒζ- unabhängig, reguliert.	108
Abbildung 3.15:	Die Apoptose-Inhibitoren Birc2 und Birc3 werden HCV-	
	abhängig, aber ΙκΒζ- unabhängig, reguliert.	109
Abbildung 3.16:	CEBP $\delta$ und Gbp1 werden, I $\kappa$ B $\zeta$ -unabhängig, durch das	
	Hepatitis C Virus verstärkt exprimiert.	110
Abbildung 3.17:	Sowohl TNF $\alpha$ als auch das durch TNF $\alpha$ -induzierte	
	Protein TNFAIP3 werden HCV-vermittelt verstärkt exprimiert	,
	sind jedoch IκΒζ-unabhängig.	111
Abbildung 3.18:	Auch IL-18 wird HCV- abhängig, aber I $\kappa$ B $\zeta$ -unabhängig	
	exprimiert. Die Expression von Gbp2, Birc3 und TNFAIP3	
	ist zudem auf Proteinebene verstärkt.	113
Abbildung 3.19:	HCV hemmt die IL-1 $\beta$ -vermittelte Expression von LCN2	
	durch die Suppresion von ΙκΒζ.	115
Abbildung 3.20:	HCV-bedingte Hemmung der LCN2-Expression durch	
	die Suppression von I $\kappa$ B $\zeta$ kann auf der Proteinebene	
	bestätigt werden.	117
Abbildung 3.21:	Die LCN2-Expression wird ebenso wie $I\kappa B\zeta$ durch die	
	Inhibierung des MEK-Signalweges gehemmt.	118
Abbildung 3.22:	Die LPS/IL-1 $\beta$ -vermittelte Expression von LCN2 wird in	
	murinen Makrophagen und Hepatozyten MK2-abhängig	
	reguliert.	120
Abbildung 3.23:	Die Inhibierung der MK2-Aktivität resultiert in der	
	Supppression von $I\kappa B\zeta$ und folglich in der Hemmung der	
	LCN2-Expression.	122
Abbildung 3.24:	Lipocalin-2 hemmt konzentrationsabhängig die	
	Zellproliferation von Hepatozyten.	125

# 4 DISKUSSION

Abbildung 4.1:HCV supprimiert die IL-1β-induzierte IκBζ-Expression<br/>unter Beteiligung von Calpain und durch die Hemmung der<br/>MK2-Aktivität.141

### TABELLENVERZEICHNIS

# 2 MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.1:	Verwendete Escherichia coli-Stämme.	64
Tabelle 2.2:	Verwendete Plasmide.	64
Tabelle 2.3:	Kultivierung der Hepatomazelllinien.	68
Tabelle 2.4:	Für die Real-Time-PCR verwendete Primer.	74

## 2 ERGEBNISSE

Tabelle 3.1:	Im Kontext des Hepatitis C Virus untersuchte miRNAs.	97
Tabelle 3.2:	Im Kontext der HCV-vermittelten Suppression von I $\kappa B\zeta$	
	untersuchte Gene.	105

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
AP-1	activator protein 1
Аро	Apolipoprotein
AR	ankyrin repeats
ATF	activating transcription factor
BAFF	B cells activating factor
Bid	BH3 interacting domain death agonist
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
Calpain	calcium-dependent-papain-like enzyme
САМК	calcium/calmodulin dependent kinase
CANP	calcium-activated neutral protease
CAPNS1	calpain small subunit 1
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
CD81	cluster of differentiation 81
cDNA	complementary DNA
CEBP	CCAAT-enhancer-binding protein
c-Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene
CLDN1	Claudin-1
с-Мус	v-myc myelocytomatosis viral oncogene
Cox-2	Cyclooxygenase-2

CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
Csf2	colony stimulating factor 2
c-Src	cellular sarcoma
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
ds	double strand
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
Elk	ETS domain-containing protein
EMCV	Encephalomyokarditis-Virus
EphA2	ephrin receptor A2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAS	fatty acid synthase
FCS	fetal calf serum

G418	Geneticin 418
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GRR	Glycin-reiche Region
GSK <sub>3</sub> β	glycogen synthase kinase 3 $eta$
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	cell culture derived HCV
HDAC5	histone deacetylase 5
HDL	high-density-lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	horseradish peroxidase
hsa	homo sapiens
HSP	heat shock protein
HVR1	hypervariable Region 1
IBD	inflammatory bowel disease
ΙκΒ	inhibitor of $\kappa B$
IKK	IkB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 receptor antagonist
INAP	IL-1-inducible nuclear ankyrin-repeat protein
INF-γ	Interferon-y

IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRES	internal ribosome entry site
JFH-1	japanese fulminant hepatitis clone 1
JNK	c-Jun amino (N)-terminal kinase
LCN2	Lipocalin-2
LDL	low-density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LRP2	low density lipoprotein receptor-related protein 2
LZ	leucin-zipper domain
MAIL	molecule possessing ankyrin-repeats induced by LPS
МАРК	mitogen-activated protein kinase
МАРКАРК	MAPK activated protein kinase
MEK	mitogen/extracellular signal-regulated kinase
MHC	major histocompatibility complex
miRNA	micro-RNA
MNK	MAPK-interacting kinase
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
MSK	mitogen- and stress-activated kinase
mTLP	modifizierter Triton-Lyse-Puffer
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
NCR	noncoding region

NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NEMO	NF-κB essential modifier
NES	nuclear export signal
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NK-cells	natural killer cells
NLK	Nemo-like kinase
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NLS	nuclear localization signal
nm	Nanometer
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1
NS	Nicht-Strukturell
OCLN	Occludin
OPN	Osteopontin
ORF	open reading frame
PAA	Polyacrylamid
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PEST	Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiche Region

PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B
PKC	Protein-Kinase C
PLA2G4A	phospholipase A2 group IVA
PLC-γ	Phosphoinositid-Phospholipase C-γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly I:C	polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	pattern-recognition receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf-1	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
RHD	Rel-homology domain
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RSK	ribosomal s6 kinase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	realtime-PCR
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser	Serin
siRNA	small interfering RNA
SMRT	silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptor

SOCS	suppressor of cytokine signaling
SP	Signalpeptidase
SPP	Signalpeptidpeptidase
SRB1	scavenger receptor class B type I
SREBP1	sterol regulatory element binding protein 1
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCID50	tissue culture infection dose
TC-PTP	T cell protein tyrosine phosphatase
TAD	Transaktivierungs-Domäne
TD	Todesdomäne
TGF-β1	transforming growth factor beta 1
Thr	Threonin
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptordomäne
TLR	toll-like receptor
ΤΝFα	Tumornekrosefaktor-α
Tpl-2	tumor progression locus 2
TRAF-6	TNF receptor-associated factor-6
Tris	Trishydroxy-Aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	units
UTR	untranslated region
VLDL	very-low-density lipoprotein
w/o	without

#### 1 EINLEITUNG

#### 1.1 Das Hepatitis C Virus

Hepatitis C ist eine weltweit verbreitete Lebererkrankung, die durch das Hepatitis C Virus (HCV) hervorgerufen wird. Eine Infektion mit diesem Virus resultiert in mehr als 70 % der Fälle in einem chronischen Krankheitsverlauf. Derzeit sind etwa 150 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Jedes Jahr sterben 350.000 bis 500.000 Menschen an den Folgen dieser Erkrankung, zu denen Leberzirrhose und Leberkarzinome zählen.<sup>1</sup> Bereits in den siebziger Jahren wurde beobachtet, dass Patienten, die Bluttransfusionen erhielten und eine Hepatitis entwickelten, nicht mit dem Hepatitis A oder B Virus infiziert waren, sondern eine durch ein anderes übertragbares Agens bedingte Lebererkrankung entwickelten.<sup>2</sup> Das Hepatitis C Virus wurde erstmals 1989 aus Blutplasma infizierter Patienten isoliert und als Hepatitis C Virus deklariert.<sup>3</sup>

#### 1.1.1 Aufbau des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist in die Virusfamilie der Flaviviridae und speziell in die Gattung der Hepaciviren einzuordnen. Zu dieser Familie gehören neben den Hepaciviren auch die Pestiviren, wie das Schweinepest-Virus, und die Flaviviren, wie das Gelbfieber-Virus und das Dengue-Virus. Alle Mitglieder dieser Familie, so auch das Hepatitis C Virus, sind einzelsträngige RNA-Viren mit Plusstrangorientierung. <sup>4</sup> HCV kann aufgrund von Unterschieden in der Sequenz in sieben Genotypen unterteilt werden, die unterschiedlich gut auf Therapieversuche reagieren.<sup>5</sup> In Europa sind die Genotypen 1b und 2 am häufigsten vertreten, wobei hiervon oft ältere Patienten betroffen sind, die aufgrund von verunreinigten Bluttransfusionen mit dem Virus infiziert wurden. Dies beruht darauf, dass vor Identifikation der Ursache und der Entwicklung entsprechender Testverfahren die Bluttransfusionen nicht auf das Hepatitis C Virus untersucht wurden, während heutzutage das Risiko einer Infektion

auf diesem Wege durch entsprechende Tests minimiert wurde. Neuinfektionen treten dagegen häufig bei Drogenabhängigen auf, die sich durch die gemeinsame Verwendung von Spritzen mit HCV infizieren und zumeist die Genotypen 3a und 1a aufweisen.<sup>6</sup> Seltener wird HCV auch sexuell, oder post/perinatal übertragen.<sup>1</sup>

Das Hepatitis C Virus Genom hat eine Länge von 9,6 kb und kodiert in einem einzigen offenen Leserahmen (ORF) ein Polyprotein. Die virale RNA weist sowohl am 5'-, als auch am 3'-Ende nicht-kodierende Regionen (NCR) auf. Am 5'-Ende der viralen RNA findet sich zudem eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), die die Bindung der RNA an die Ribosomen vermittelt und somit die Translation unabhängig von zellulären Initiationsfaktoren und einer 5'-Cap-Struktur ermöglicht. Das bei der Translation entstehende Polyprotein wird anschließend zu den viralen Struktur- und Nicht-Strukturproteinen prozessiert. Im Bereich der Strukturproteine Core, E1, E2 und p7 geschieht dies unter Beteiligung von wirtsspezifischen Proteasen. Das Nicht-Strukturprotein NS2 ist eine Autoprotease und an seiner eigenen Prozessierung beteiligt. Die viruskodierte Protease NS3/4A schneidet die übrigen Nicht-Strukturproteine NS4B, NS5A und NS5B (Abb. 1.1).<sup>7,8</sup>



#### Abb. 1.1: Genomorganisation des Hepatitis C Virus und Prozessierung des Polyproteins.

Das 9,6 kb lange Genom des Hepatitis C Virus kodiert in einem einzelnen offenen Leserahmen ein Polyprotein, das post-translational prozessiert wird. Im Bereich der Strukturproteine Core bis p7 geschieht dies durch die wirtsspezifischen Signalpeptidasen (SP) und Signalpeptidpeptidasen (SPP). NS2 wirkt als Autoprotease und die Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B werden durch den viruseigenen Komplex aus der Serinprotease NS3 und dem NS3-Kofaktor NS4A geschnitten. In der nicht-kodierenden Region (NCR) am 5'-Ende befindet sich desweiteren eine IRES-Sequenz (modifiziert nach *Suzuki et al.* 2007).<sup>7</sup>

Während die Strukturproteine an der Bildung der Virushülle beteiligt sind, sind die Nicht-Strukturproteine für die Replikation verantwortlich. Das virale Nukleokapsid wird durch das im N-Terminus hoch konservierte Core Protein gebildet. Die glykosylierten Proteine E1 und E2 liegen im Komplex vor und formen die Virushülle. Sie spielen eine wesentliche Rolle beim Eintritt des Virus in die Zelle. Das virale Protein p7 erzeugt einen Ionenkanal und fungiert möglicherweise als Viroporin, das die Infektiösität des Virus steigert. Das Nicht-Strukturprotein NS3 besitzt neben einer Serinprotease-Domäne am N-Terminus, eine Helikase/NTPase Domäne am C-Terminus. NS3 bildet mit seinem Kofaktor NS4A einen Komplex und wird durch dessen Membrananker an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebunden. Durch die Protease-Aktivität des Komplexes werden die Nicht-Strukturproteine NS4A bis NS5B prozessiert. NS3 ist daher essentiell für die Replikation des Virus. NS4B ist in der Lage die Struktur von Membranen zu verändern und es wird vermutet, dass es an der Schaffung eines membranösen Netzwerkes beteiligt ist, welches die RNA-Replikation unterstützt und den Replikationskomplex vor Proteasen schützt. Das in der Membran verankerte Phosphoprotein NS5A liegt als phosphoryliertes und hyperphosphoryliertes Protein vor und spielt eine essentielle Rolle in der viralen Replikation und im Virusaufbau (viral Assembly), wobei der Phoyphorylierungsstatus von NS5A die Effizienz beeinflusst. Desweiteren wechselwirkt NS5A mit vielen verschiedenen zellulären Proteinen und beeinflusst Signalwege der Wirtszelle. Die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B besitzt eine katalytische Wirkung auf die Replikation der HCV-RNA.<sup>7,8</sup>

#### 1.1.2 HCV-Lebenszyklus

Das HCV Virion wird aus den Strukturproteinen Core, E1 und E2 geformt und hat einen Durchmesser von 50 bis 80 nm. Das aus Core und der viralen RNA gebildete Nukleokapsid ist umhüllt von einer Lipiddoppelschicht, in der die Hüllproteine E1 und E2, als Anhaftungsfaktoren, eingebettet vorliegen. An die Viruspartikel sind die Lipoproteine LDL (*low-density lipoproteins*) und VLDL (*very-low-density lipoproteins*) assoziiert, weshalb die Viruspartikel als Lipoviropartikel bezeichnet werden. Außerdem sind die Apolipoproteine E, C und B (ApoE, ApoC, ApoB) an die Virionen gebunden und beeinflussen deren Eintritt in die Zelle.<sup>9,10</sup> Die initiale Bindung des Hepatitis C Virus an seine Wirtszelle, den Hepatozyten, wird durch die viralen Hüllproteine E1 und E2 vermittelt. An diesem Prozess sind Glykosaminoglykane und der LDL-Rezeptor beteiligt, die sich auf der Hepatozyten-Oberfläche befinden.<sup>11,12</sup> Nach erfolgreicher Bindung an die Zelloberfläche erfolgt die Internalisierung des Virus. Dieser Clathrin-vermittelte endozytotische Prozess wird durch eine Reihe von teilweise spezifische Expression Rezeptoren vermittelt, deren auf der Hepatozytenoberfläche unter anderem die Hepatotropie des Virus erklärt.<sup>13, 14</sup> Die Beteiligung des scavenger receptor class B type I (SRB1), des cluster of differentiation 81 (CD81) und der tight junction Proteine Claudin-1 (CLDN1) und Occludin (OCLN) an der Internalisierung des Virus ist beschrieben. SRB1 wird vorwiegend auf der Oberfläche von Hepatozyten exprimiert und internalisiert seinen Liganden HDL (high-density-lipoprotein) in einem Clathrin-unabhängigen endozytotischen Prozess und spielt somit eine wichtige Rolle im Lipid-Metabolismus. HCV interagiert beim Eintritt in die Zelle mit SRB1, zum einen über die an die Viruspartikel gebundenen ApoE-Moleküle und zum anderen über die hypervariable Region 1 (HVR1) des E2-Proteins.<sup>15,16</sup> Das aus der Tetraspanin-Familie stammende Protein CD81 wechselwirkt ebenfalls mit dem viralen Glykoprotein E2 und vermittelt durch die Bildung eines Ko-Rezeptor-Komplexes mit CLDN1 eine Relokalisation der Viruspartikel zu eben diesem Protein. Dieser Prozess ist von großer Bedeutung, da CLDN1 nicht in der Lage ist die HCV-Partikel selbst zu binden.<sup>17</sup> Desweiteren wurde eine Mitwirkung der Rezeptor-Tyrosinkinasen epidermal growth factor receptor (EGFR) und ephrin receptor A2 (EphA2) beschrieben, die die Interaktion von CD81 und CLDN1 unterstützen.<sup>18</sup> Ein weiterer Rezeptor, der durch die Regulierung der Cholesterinaufnahme sowohl am Fettstoffwechsel der Zelle beteiligt ist, als auch am Eintritt des Virus in die Zelle, ist der Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption *receptor* (NPC1L1).<sup>19</sup> Im Anschluss an die Internalisierung der Viruspartikel kommt es zu einer pH-abhängigen Fusion der viralen Membran mit der Membran früher Endosomen, wobei die viralen Glykoproteine E1 und E2 eine wichtige Rolle spielen sollen. Abschließend werden das Nukleokapsid und dann das virale Genom in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt (Abb. 1.2).<sup>20</sup>

Die Translation der viralen Proteine beginnt mit der Bindung der mRNA über die IRES-Sequenz an das Ribosom und der Translokation des Translationskomplexes

an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Bei der Translation des Virus entsteht ein Polyprotein, das post- und co-translational in zehn virale Proteine geschnitten wird (siehe Abschnitt 1.1.1). NS4B induziert spezifische Veränderungen der ER-Membran und ermöglicht die Replikation des Virus. Hierbei wird eine in Doppel-Membran-Vesikeln Umgebung geschaffen, der in die Nicht-Strukturproteine des Virus, die virale RNA und für die Replikation bedeutsame Wirtsspezifische Faktoren<sup>21</sup> enthalten sind. Die virale RNA wird in dieser Umgebung durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B repliziert. Die replizierte RNA wird entweder zu den viralen Proteinen translatiert, dient als Matrize für die erneute Replikation oder wird zu infektiösen Virionen zusammengesetzt.<sup>14</sup>



Abb. 1.2: Eintritt des Hepatitis C Virus in den Hepatozyten.

Der Eintritt des Hepatitis C Virus in den Hepatozyten beginnt mit der Bindung der viralen Partikel an Glykosaminoglykane und den LDL-Rezeptor. Unter Beteiligung der Rezeptoren SRB1, CD81 und der Tight junction Proteine CLDN1 und OCLN wird das Virus in einem Clathrin-vermittelten Prozess internalisiert. Rezeptor-Tyrosinkinasen unterstützen die Interaktion von CD81 und CLDN1. In einem pH-abhängigen Fusionsprozess wird das Nukleokapsid in das Zytoplasma freigesetzt (modifiziert nach *Lupberger et al.* 2012).<sup>22</sup>

#### 1.1.3 Wechselwirkung des Hepatitis C Virus mit der Wirtszelle

Üblicherweise reagiert ein Wirt auf den Eintritt eines Virus mit der Initiierung der angeborenen oder adaptiven Immunantwort, die die Eliminierung des Virus und die Beseitigung infizierter Zellen sowie die Wiederherstellung physiologischer Funktionsfähigkeit zum Ziel hat. Viren, die eine Persistenz erreichen möchten, müssen dementsprechend im Laufe der Co-Evolution Strategien entwickelt haben, um den Tod der Zelle zu verhindern und gleichzeitig die eigene Replikation zu gewährleisten. Hierzu beeinflusst das Virus wichtige zelluläre Prozesse, wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Auch das Hepatitis C Virus wechselwirkt mit einer Vielzahl von Wirtsproteinen und Signalwegen, um eine Chronifizierung der Infektion zu erreichen. Einige Beispiele für Faktoren der zellulären Signaltransduktion, mit denen HCV-kodierte Proteine interagieren, sind der epidermal growth factor receptor (EGFR), die PI3K/AKT (Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B) und die Src (cellular sarcoma; c-Src)-Proteinfamilie.

In der Literatur finden sich viele Hinweise auf eine verstärkte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und seiner downstream targets, wie der glycogen synthase kinase (GSK)<sub>3</sub>β und mTOR (mechanistic target of rapamycin), durch das Hepatitis C Virus. Verschiedene virale Proteine interagieren hierbei mit dem Signalweg. NS5A interagiert zum Beispiel mit der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3K und aktiviert auf diese Weise die Phosphotransferaseaktivität der katalytischen Untereinheit p110. Dies wiederum führt zu der Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt und schützt die Zelle vor Apoptose.<sup>23</sup> Auch das virale Protein NS4B aktiviert den PI3K/Akt-Signalweg und induziert auf diesem Weg die Expression und Aktivierung des sterol regulatory element binding protein (SREBP)1 und der fatty acid synthase (FAS). So kommt es zur Lipid-Akkumulation im Hepatozyten, was zu der Entstehung einer Steatose führen kann. 24 Außerdem ist auch eine Wechselwirkung der viralen Protease/Helikase NS3/4A mit dem Akt-Signalweg beschrieben. So schneidet NS3/4A sowohl in vitro, als auch in vivo die T cell protein tyrosine phosphatase (TC-PTP). Die Herabregulierung der TC-PTP-Expression resultiert in der verstärkten Phosphorylierung und damit Aktivierung des EGF-Rezeptors und der *downstream targets* PLC- $\gamma$  (Phosphoinositid-Phospholipase C) und Akt. NS3/4A sensibilisiert die Zellen jedoch nicht nur für die EGF-Stimulation,

sondern führt auch zu einer konstitutiven Akt-Aktivierung durch das Ausschalten der TC-PTP. Diese konstitutive Akt-Aktivierung spielt eine bedeutende Rolle in der viralen Replikation.<sup>25</sup>

Ein weiterer Faktor, der mit den viralen Proteinen wechselwirkt und an der HCV-Replikation beteiligt ist, ist die Tyrosinkinase c-Src. Diese interagiert mit NS5A über ihre SH2-Domäne und mit NS5B über ihre SH3-Domäne. Die daraus hervorgehende Interaktion von NS5A und NS5B spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Replikationskomplexes.<sup>26</sup>

Das Hepatitis C Virus nutzt hierbei wirtsspezifische Faktoren nicht nur für seine eigene Replikation, sondern sichert auf diesem Weg auch das Überleben der infizierten Wirtszelle. Durch die Steigerung der Zellproliferation und Hemmung der Apoptose verursacht das Virus jedoch auch ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen und fördert die Entstehung von Hepatozellulären Karzinomen. Weitere wichtige Signalwege, die in Interaktion mit dem Hepatitis C Virus treten, sind zum Beispiel der MAPK (*mitogen-activated protein kinases*)-Signalweg und der NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Signalweg, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

#### 1.1.4 Verwendete Modellsysteme zur Untersuchung des Hepatitis C Virus

Lange Zeit standen der HCV-Forschung keine Systeme zur Untersuchung des gesamten viralen Lebenszyklus zur Verfügung, da aus dem Serum infizierter Patienten isolierte Viren in Zellkultur in der Regel nicht zur Etablierung einer replikativen Infektion führten.<sup>8</sup> So standen als einzige Modellsysteme, welche eine Untersuchung des gesamten Lebenszyklus von HCV zuließen, nur der Schimpanse und im Zellkulturmodell nur Zellen, die einzelne oder mehrere virale Proteine transient oder stabil exprimierten, zur Verfügung. Erst die Entwicklung des 1999 erstmals beschriebenen Replikonsystems erlaubte eine komplexere Analyse der viralen Replikationsmaschinerie im Zellkulturmodell und damit die tiefergehende Analyse der Interaktion von Wirt und Virus. Hierzu wurden aus chronisch mit dem HCV Genotyp 1b infizierten Patienten die Virus-RNA isoliert und Replikonkonstrukte

erstellt, die nur die für die Replikation nötigen Virusproteine NS3/4A bis NS5B enthielten. Die viralen Strukturproteine Core bis p7 dagegen wurden durch ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen, welches eine Geneticin-Resistenz erzeugt, und eine EMCV-IRES (Encephalomyokarditis-Virus-interne ribosomale Eintrittsstelle) ersetzt. Nach der Transfektion dieser Konstrukte in humane Hepatomazellen (Huh7), war es möglich die HCV-positiven Klone durch den Einsatz von Geneticin 418 (G418) zu selektieren (Abb. 1.3).<sup>27</sup> Eine Verbesserung der Virus-Replikation konnte durch die Einführung adaptiver Mutationen erzielt werden. Diese Mutationen liegen vor allem im Bereich der Nicht-Strukturproteine. So sind Replikations-verstärkende Mutationen im N-Terminus der viralen Helikase NS3 und im Zentrum von NS5A beschrieben, die die Replikation des Virus in der Zellkultur verstärken. Der größte Effekt wurde jedoch für eine Mutation in der viralen Polymerase NS5B gefunden, die die Zahl der positiven Kolonien in der Zellkultur auf das 500-fache erhöht.<sup>28,29</sup>

Der nächste Schritt in der Entwicklung von Modellsystemen zur Untersuchung des Hepatitis C Virus war die Herstellung von Volllängen-Replikonsystemen, die das vollständige Genom des Virus mit dem Genotyp 1b (Con1) beinhalten. Somit konnten auch die Wechselwirkungen der Strukturproteine mit der Wirtszelle untersucht werden. Trotz des vollständigen HCV-Genoms und der prinzipiellen Möglichkeit der Erzeugung von infektiösen Virus-Partikeln konnte in diesen Systemen jedoch keine Freisetzung von infektiösen Viren beobachtet werden.<sup>30</sup> Die Ursache für das Ausbleiben der Viruspartikel-Freisetzung und damit für die Infektion, liegt in den zuvor beschriebenen adaptiven Mutationen der Virusproteine, die im Zellkultursystem unerlässlich für eine hohe Replikationsrate sind, aber eine negative Wirkung auf die Infektiösität des Virus haben. Vor allem Mutationen in dem viralen Protein NS5A sind hierbei hinderlich, da dieses Protein eine wichtige Rolle sowohl bei der Replikation, als auch beim Aufbau der Viruspartikel spielt.<sup>31</sup> Im Jahre 2003 gelang es erstmals ein subgenomisches Replikon des HCV Genotyps 2a zu konstruieren, das ohne adaptive Mutationen im Zellkultursystem eine hohe Replikationsrate aufwies. Dieser HCV-Klon wurde aufgrund seiner Isolierung aus einem japanischen Patienten mit einer fulminanten Hepatitis C JFH-1 (japanese fulminant hepatitis clone 1) genannt.<sup>32,33</sup> Dies war der Grundstein für die Entwicklung eines Hepatitis C Virus Infektionssystems, mit dessen Hilfe der vollständige virale Zyklus, vom Eintritt des Virus bis zu seiner Freisetzung, in vitro untersucht werden kann. Wie Wakita et al. beobachteten, führt die Transfektion vollständigen JFH-1-RNA der im Zellkultursystem zu der Ausbildung von viralen Partikeln, die auch im Schimpansen zu einer HCV-Infektion führen. Dieses sogenannte Cell Culture Derived HCV (HCVcc) Infektionssystem wurde erstmals im Jahre 2005 beschrieben (Abb. 1.3).<sup>34</sup> Im selben Jahr zeigten Lindenbach et al. neben der Infektion von Hepatomazellen mit der RNA des JFH-1-Klons auch die Möglichkeit der Verwendung von chimären Viren aus den HCV-Klonen JFH-1 (Genotyp 2a) und J6 (Genotyp 2a). Der Grund für die Entwicklung dieser chimären Viren liegt darin, dass andere HCV-Klone selbst nicht in der Lage sind ohne adaptive Mutationen im Bereich der Nicht-Strukturproteine eine ausreichende Virus-Replikation zu erzeugen und diese Mutationen wiederum die Produktion von infektiösen Viruspartikeln verhindern. Daher wurden die Nicht-Strukturproteine des JFH-1-Klons mit den Strukturproteinen des J6-Klons gekreuzt. Die Schnittstelle hierfür wurde hinter die erste Transmembran-Domäne des NS2-Proteins gelegt, da die Virus Produktion der so entstandenen Chimäre am effizientesten war.<sup>35</sup> Eine Weiterführung dieses Systems gelang Pietschmann et al. 2007 mit der Generierung von HCV-Chimären aus den Strukturproteinen des JFH-1-Klons mit Strukturproteinen der Genotypen 1a (HCV-Klon H77), 1b (HCV-Klon Con1) und 3a (HCV-Klon 452).<sup>36</sup>

Für die Replikation des Hepatitis C Virus sowohl in Replikonsystemen, als auch im HCVcc Infektionssystem, spielt desweiteren die Wahl der Zelllinie eine wichtige Rolle. Die Zelllinie Huh7 ist für die Replikation des Virus am besten geeignet, wobei sowohl die Zellpassage, als auch die Zelldichte hierbei von Bedeutung sind.<sup>37</sup> Die Toleranz der Huh7 Zellen gegenüber viralem Eintritt und viraler Replikation kann dadurch gesteigert werden, dass Replikonzellen durch antivirale Therapie vom subgenomischen Replikon befreit und dann infiziert werden. Hierbei werden Huh7 Zellen, die das HCV-Replikon tragen durch eine Behandlung mit Interferon- $\alpha$  geheilt (cured cells). Diese cured Zellen, zum Beispiel Huh7.5, weisen anschließend eine erhöhte Aufnahmefähigkeit für das Hepatitis C Virus und eine verstärkte Replikation auf.<sup>38</sup> Die diesem Effekt zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise für die Beteiligung des an der angeborenen Immunantwort beteiligten RIG-I- (retinoic acid inducible gene I) Signalweges, welcher in diesen Zellen gestört ist.<sup>39</sup> Außerdem konnte eine verstärkte Oberflächenexpression der für den viralen Eintritt benötigten Rezeptoren SRB1, CD81 und LDLR beobachtet werden.<sup>40</sup> Der Nachteil Huh7 basierter Zelllinien liegt in der geringen Differenzierung der Zellen und den damit verbundenen Einflüssen auf

die Genregulierung, sowie der abnormalen und asynchronen Proliferation und Signaltransduktion der Zelle.<sup>41</sup>

Trotz der großen Vorteile des HCVcc Infektionssystems, hinsichtlich der Untersuchung des Hepatitis C Virus vom Eintritt in die Zelle, über seine Replikation, bis hin zu der Freisetzung des Virus, birgt es auch Nachteile. Neben dem Einsatz der Huh7-Zelllinien ist die Notwendigkeit der Verwendung der Nicht-Strukturproteine des HCV Genotyps 2a der größte limitierende Faktor, durch den eine differenzierte Betrachtung der verschiedenen Genotypen nicht möglich ist.<sup>42</sup>



#### Abb. 1.3: Verwendete Hepatitis C Virus Zellkultursysteme.

(A) Das HCV Replikonsystem ermöglicht eine stabile Expression der Virus-RNA in Zelllinien. Hierzu werden Replikonkonstrukte, die die Nicht-Strukturproteine des Hepatitis C Virus NS3 bis NS5B enthalten, in Huh7-Zellen transfiziert. Die viralen Strukturproteine sind hierbei durch ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*neo*) und eine EMCV-IRES ersetzt. Durch die *neo*-Sequenz wird eine Geneticin-Resistenz erzeugt, aufgrund derer durch Zugabe von Geneticin 418 HCV-positive Klone selektiert werden können. (B) Das HCVcc Infektionssystem ermöglicht die Untersuchung des vollständigen viralen Lebenszyklus vom Eintritt des Virus in die Zelle bis hin zu seiner Freisetzung. Die chimäre genomische HCV RNA, bestehend aus den Strukturproteinen des HCV-Klons J6 und den Nicht-Strukturproteinen des HCV-Klons JFH-1, wird mittels Elektroporation in Huh7.5-Zellen transfiziert. Die entstandenen Virionen werden aus dem Zell-Überstand isoliert und zur Infektion naiver Huh7.5-Zellen verwendet (modifiziert nach *Tellinghuisen et al.* 2007).<sup>43</sup>

30

#### **1.2** Interleukin-1β

Interleukin-1 (IL-1) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches maßgeblich an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist und als Mediator der Entzündungsantwort fungiert. Erstmals wurde IL-1 als Verursacher von Fieber entdeckt und als humanes, von Leukozyten ausgeschiedenes Pyrogen beschrieben. Die IL-1-Proteinfamilie umfasst elf Mitglieder und kann aufgrund der Länge der Vorläufermoleküle in mehrere Subfamilien unterteilt werden. Die IL-1-Subfamilie beinhaltet die längsten Vorläuferproteine und umfasst die Interleukine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-33. In die IL-18-Subfamilie gehören die Interleukine IL-18 und IL-37. Die dritte Subfamilie umfasst die Interleukine mit den kürzesten Vorläuferproteinen IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , IL-38 und IL-36Ra (*Interleukin-36 receptor antagonist*). Der *Interleukin-1 receptor antagonist* (IL-1Ra) beinhaltet als einziges Mitglied der IL-1-Proteinfamilie eine Signal-Peptid Sequenz. In allen Mitgliedern der IL-1-Proteinfamilie ist eine konservierte Konsensussequenz der Form A-X-D (A= Methionin, Leucin, Isoleucin; X= beliebige Aminosäure; D= Aspariginsäure) zu finden, die eine wichtige Rolle in der Bildung der dreidimensionalen Struktur der aktiven Zytokine spielt.<sup>44,45</sup>

Das in dieser Arbeit verwendete Zytokin Interleukin-1 $\beta$  ist das am besten charakterisierte Mitglied der Interleukin-1-Proteinfamilie. Es wird von einer Reihe verschiedener Zelltypen produziert und sezerniert, zu denen vor allem Zellen der angeborenen Immunantwort, wie Monozyten und Makrophagen, zählen. IL-1 $\beta$  wird als ein 31 kDa großes, inaktives Vorläuferprotein pro-IL-1 $\beta$  exprimiert. Die Induktion dieses Zytokins erfolgt durch Pathogene, die sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) tragen. Diese werden wiederum von PRRs (*pattern-recognition receptors*) erkannt und lösen eine Immunantwort aus, zu der auch die Ausschüttung verschiedener Zytokine gehört. Das inaktive pro-IL-1 $\beta$  wird durch die proinflammatorische Caspase-1 prozessiert und dadurch aktiviert. IL-1 $\beta$  wird anschließend von der Zelle sezerniert und kann durch die Bindung an spezifische Rezeptoren verschiedenste Funktionen ausüben.<sup>46</sup>

Die IL-1-Rezeptorfamilie umfasst elf Mitglieder, wobei für die IL-1β-vermittelte Signaltransduktion die Mitglieder IL-1R1 und IL-1R3 eine entscheidende Rolle spielen. Der IL-1-Rezeptor 1 enthält extrazellulär eine Immunoglobulin-artige

Ligandenbindungsstelle Domäne, die als fungiert und intrazellulär eine Toll/Interleukin-1 Rezeptordomäne (TIR), die für die Signalübermittlung verantwortlich ist. Die Bindung von IL-1 an diesen Rezeptor ermöglicht eine Heterodimerisierung mit dem Interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP), auch IL-1R3 genannt. Dieser Rezeptor ist nicht in der Lage selbst IL-1 zu binden, ist jedoch für die Signaltransduktion von IL-1 $\beta$  von entscheidender Bedeutung. Die Rezeptordimere sind im Stande das für die Signaltransduktion verantwortliche Protein MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) zu rekrutieren und das Signal über IRAK-4 (IL-1R-associated kinase 4), TRAF-6 (TNF receptor associated factor-6) und weitere beteiligte Proteine weiter zu geben (Abb. 1.4).<sup>47,48</sup>





Das inaktive Vorläuferprotein von Interleukin-1 $\beta$  wird durch Caspase-1 prozessiert und dadurch aktiviert. Anschließend wird IL-1 $\beta$  von der Zelle sezerniert und bindet spezifisch an seinen Rezeptor IL-1R1, woraufhin es zu einer Heterodimerisierung mit dem *IL-1 receptor accessory protein* (IL-1RAcP) kommt. Die Dimerisierung des Rezeptors ermöglicht eine Signaltransduktion über MyD88. Die Prozessierung von Interleukin-1 $\alpha$  wird hier der Vollständigkeit halber mit aufgeführt, soll allerdings nicht weiter erläutert werden (modifiziert nach *Sims et al.* 2010).<sup>47</sup>

Die Aktivität von Interleukin-1 $\beta$  unterliegt einer starken Regulierung, um die dadurch bedingte Entzündung zu kontrollieren und eine Schädigung des betroffenen Organs zu verhindern. Hierzu nutzt die Zelle unter anderen die folgenden zwei Regulierungsmechanismen. Der IL-1 Rezeptorantagonist IL-1Ra konkurriert mit IL-1 $\beta$  um die Bindestelle am IL-1 Rezeptor 1, wobei Agonist und Antagonist eine vergleichbare Affinität zum Rezeptor aufweisen. Durch die Besetzung der Bindestelle wird die Dimerisierung des Rezeptors mit IL-1R3 verhindert und die IL-1 $\beta$ -vermittelte Signaltransduktion verhindert. Der IL-1Ra wird sowohl durch Induktoren von IL-1 $\beta$ , als auch durch IL-1 $\beta$  selbst induziert. Ein weiterer Mechanismus der IL-1 $\beta$ -Hemmung wird durch den IL-1 Rezeptor 2 ausgelöst. Während die extrazelluläre Domäne dieses Rezeptors äußerst homolog zu der des IL-1R1 ist und IL-1 $\beta$ , aber nicht IL-1Ra, mit hoher Affinität bindet, weist die intrazelluläre Domäne keine TIR/Interleukin-1 Rezeptordomäne auf und kann keine Signale weiterleiten. Außerdem führt die

Bindung von IL-1 $\beta$  an diesen Rezeptor ebenfalls zu einer Dimerisierung mit dem IL-1R3 und verhindert die Bindung dieses Rezeptors an IL-1R1. Somit fängt dieser Täuschungsrezeptor sowohl Interleukin-1 $\beta$ , als auch das Akzessorische Protein ab und wird hauptsächlich von IL-1-produzierenden Zellen exprimiert. (Abb. 1.5).<sup>47</sup>



Abb. 1.5: Regulierung der Interleukin-1β-Aktivität.

Die Regulierung der IL-1 $\beta$ -Signaltransduktion ist von großer Bedeutung, um die dadurch bedingte Entzündung zu kontrollieren. Interleukin-1 $\beta$  bindet nach seiner Aktivierung an den IL-1R1, woraufhin es zu einer Dimerisierung des Rezeptors mit dem Akzessorischen Protein IL-1R3 (IL-1RAcP) kommt. Dies wiederum ermöglicht die Signalweiterleitung über die Rekrutierung von MyD88 und IRAK-4. Negative Regulierungsmechanismen werden durch den IL-1 Rezeptorantagonisten IL-1Ra und dem Rezeptor IL-1R2 aktiviert. Im ersten Fall wird durch die Bindung von IL-1Ra an den IL-1 Rezeptor die Bindungsstelle für IL-1 $\beta$  blockiert und es findet keine Dimerisierung der Rezeptoren statt, so kann die Signalübertragung verhindert werden. Der IL-1R2 besitzt dagegen keine intrazelluläre TIR-Domäne und fängt aktiviertes IL-1 $\beta$  ab. Hierbei kommt es ebenfalls zu einer Bindung des Akzessorischen Proteins IL-1R3, aber es findet aufgrund der fehlenden TIR-Domäne keine Signaltransduktion statt (modifiziert nach *Borashi et al.* 2013).<sup>48</sup>

Interleukin-1 $\beta$  spielt eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunantwort und in der Regulierung von Entzündungsprozessen. So induziert dieses Zytokin unter anderem die Akut-Phase-Reaktion der Leber und fördert die Produktion von proinflammatorischen Genen, wie Cyclooxygenase-2 (Cox-2), induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) und Chemokinen. Eine Fehlregulierung von IL-1 $\beta$  steht im Zusammenhang mit vielen verschiedenen Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis, *Morbus Crohn* und Atherosclerose. Eine erhöhte IL-1 $\beta$ -Aktivität führt in all diesen Erkrankungen zu starken Entzündungen des Gewebes und einer vermehrten Infiltration von Immunzellen, die das Organ weiter schädigen.<sup>44</sup>

Eine chronische Hepatitis C Virus-Infektion führt im schlimmsten Fall zu einer starken Entzündung der Leber, wodurch Leberfibrose, Zirrhose und in der Folge Hepatozelluläre Karzinome entstehen können. Im Serum infizierter Patienten konnte ein starker Anstieg der Interleukin-1ß-Expression beobachtet werden. Die Hauptquelle hierfür konnte in den Makrophagen der Leber, den Kupfferzellen, gefunden werden. HCV wird durch Phagozytose in die Makrophage aufgenommen und induziert dort MyD88 und TLR7 (Toll-like receptor 7)-abhängig die IL-1β-Expression. Gleichzeitig verursacht HCV einen Kalium-Einstrom, der zu einer Aktivierung des NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containig 3)-Inflammasoms führt. Dieser wiederum ist für die Aktivierung der Caspase-1 von großer Bedeutung, die Interleukin-1ß aktiviert, welches dann sezerniert wird.<sup>49</sup> Weitere Studien weisen zudem eine verstärkte Sekretion von IL-1ß durch HCVinfizierte Hepatozyten nach. Auch in diesen Zellen geschieht dies unter Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms und der Aktivierung der Caspase-1, wobei die Aktivierung des Inflammasoms durch reaktive Sauerstoffspezies und der dadurch gesteigerten NF-ĸB-Aktivität vermittelt wird.<sup>50</sup>

#### 1.3 Der MAP-Kinase-Signalweg

Die Familie der MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) besteht aus Serin/Threonin-Kinasen, die in eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimiert werden und an einer Vielzahl von Prozessen in der Zelle beteiligt sind. In Säugetieren konnten bislang vierzehn MAP-Kinasen identifiziert werden, die in zwei Gruppen unterteilt werden können. Die klassischen MAPK umfassen die *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2), *c-Jun amino* (*N*)-*terminal kinases 1/2/3* (JNK 1/2/3), die p38 Isoformen  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  und ERK5. Die Gruppe der atypischen MAP-Kinasen bilden ERK 3/4, ERK 7 und die *Nemo-like kinase* (NLK). Jede der klassischen MAP-Kinasen ist Teil einer dreistufigen Signalkaskade, bestehend aus einer MAPK Kinase Kinase (MAPKKK), einer MAPK Kinase (MAPKK) und einer MAPK. Die Aktivierung der MAPKKK durch extrazelluläre Stimuli erfolgt durch ihre Phosphorylierung unter Beteiligung kleiner GTPasen der Ras/Rho-Familie. Die MAPKKK aktivieren im Anschluss die MAPK Kinasen, die wiederum die MAP-Kinasen durch ihre Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten innerhalb eines Thr-X-Tyr-Motivs im activation loop aktivieren. Die untypischen MAP-Kinasen dagegen besitzen kein Thr-X-Tyr-Motiv und werden nicht durch die für klassiche MAP-Kinasen typische, dreistufige Signalkaskade aktiviert. Unabhängig davon, ob es sich bei der MAP-Kinase um eine klassische oder atypische Variante handelt, phosphorylieren alle Mitglieder ihre Zielgene an Serin- oder Threoninresten, auf die ein Prolinrest folgt. Daher handelt es sich bei MAP-Kinasen um Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinasen. Ihre Substratspezifität wird außerdem durch spezifische Interaktionsdomänen innerhalb ihrer Substrate, sogenannten docking sites, gewährleistet. Zu der weiten Spanne von MAPK-Substraten, gehören auch die MAPKAP-Kinasen (MAPK activated protein kinases). Diese Proteinfamilie umfasst die p90 ribosomal s6 kinases (RSK), mitogen- and stress-activated kinases (MSK), MAPK-interacting kinases (MNK) und den MAPK-activated protein kinases MK2, MK3 und MK5 (Abb. 1.6).<sup>51,52</sup>



#### Abb. 1.6: Die MAP-Kinase Signalkaskaden.

Die klassischen MAP-Kinasen werden in einer dreistufigen Signalkaskade, bestehend aus der MAPKKK, der MAPKK und der MAPK, aktiviert. Die MAPKK-Kinasen werden durch verschiedene extrazelluläre Stimuli phosphoryliert und dadruch aktiviert. Diese wiederum aktivieren die MAPK-Kinasen, die die MAP-Kinasen an ihrem Thr-X-Tyr-Aktivierungsmotiv phosphorylieren. Im Falle von ERK1/2 dient zum Beispiel Raf-1 (rapidly accelerated fibrosarcoma) als MAPKKK, die die MAPK-Kinasen MEK1/2 (mitogen/extracellular signal-regulated kinase) aktivieren, was schlussendlich zu der Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 führt. Der Aktivierung von p38 geht eine Signalkaskade bestehend aus verschiedenen MAPKKK, wie der MEK-Kinase 1 oder dem tumor progression locus 2 (Tpl-2) und der MAPK-Kinasen MKK3 und MKK6 (MAPK-Kinase 3 und 6) voraus. Die gleiche Gruppe der MAPKKK aktiviert auch die MAPKK MEK4 und MEK7, die wiederum die Aktivierung der JNK-Isoformen bedingt. Die Aktivierung der atypischen MAP-Kinasen ist nicht so gut aufgeklärt, wie die der klassischen MAPK. Die nicht näher beschriebenen Signalwege sind hier der Vollständigkeit halber aufgeführt. Die verschiedenen MAP-Kinasen können eine Vielzahl von Substraten aktivieren, wozu die Gruppe der MAPKAP-Kinasen zählt. ERK1/2 aktiviert hierbei sowohl RSKs, als auch MNKs und MSKs. p38 aktivert neben MSKs auch gemeinsam mit JNK die MK2/3. Die MK5 gehört zu den atypischen MAPKAP-Kinasen und wird hauptsächlich von den atypischen MAP-Kinasen ERK3/4 aktiviert (modifiziert nach Cargnello et al. 2011).<sup>51</sup>

Die ersten MAP-Kinasen, die in Säugetieren identifiziert wurden, waren die *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2). Ihre Aktivierung erfolgt durch Mitogene, Wachstumsfaktoren, Insulin oder auch durch Zytokine. Der am besten beschriebene Signalweg für die Aktivierung von ERK1/2 beginnt mit der Rekrutierung
von Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) durch das Proto-Onkogen Ras (*rat sarcoma*), welches durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert wird. Raf wiederum aktiviert die MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 (*mitogen/extracellular signal-regulated kinase 1/2*), welche ERK1 und ERK2 phosphorylieren. ERK1/2 aktiviert eine Reihe von Genen, zu denen unter anderen Elk (*ETS domain-containing protein*), c-Fos (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene*), c-Myc (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene*) und STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) gehören. ERK1/2 ist zum Beispiel an der Regulierung der Zellproliferation beteiligt, hemmt Apoptose und spielt eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen und der angeborenen Immunantwort.<sup>51,52</sup>

Die MAPK-Kinasen 3 und 6 sind sehr spezifische Aktivatoren der p38-MAP-Kinase und phosphorylieren diese an Threonin- und Tyrosinresten. MKK3 und MKK6 werden durch eine Reihe von MAPKK-Kinasen aktiviert, zu denen zum Beispiel die MEK-Kinase 3 und die MEK-Kinase 4 (auch MKK3 und MKK4 genannt) gehören, aber auch der *tumor progression locus 2* (Tpl-2). Diese Signalkaskade kann durch verschiedene Stimuli induziert werden, zu denen Wachstumsfaktoren, Zytokine aber auch oxidativer Stress gehören. Die p38-MAPK ist an zahlreichen Prozessen der Zelle beteiligt. So spielt diese Kinase eine wichtige Rolle in der Induktion verschiedener Zytokine und Chemokine, wie Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und leistet dabei einen großen Beitrag zu der angeborenen Immunantwort und in Entzündungsprozessen. Außerdem ist die Fehlregulierung dieses Signalweges mit Krebserkrankungen, Herzerkrankungen und Neurodegenerativen Erkrankungen korreliert.<sup>53</sup>

Die MAP-Kinase JNK wurde erstmals als Aktivator des Proto-Onkogens c-Jun beschrieben, welches zusammen mit c-Fos den Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein 1*) bildet. JNK kann als Reaktion auf Stress oder durch die Stimulation mit Zytokinen aktiviert werden. Diese Stimuli aktivieren die gleiche Gruppe MAPKK-Kinasen, die auch an der p38-Signalkaskade beteiligt sind. Im Anschluss werden die MAPK-Kinasen MKK4 und MKK7 aktiviert, die spezifisch für JNK sind und diese Kinase an Threonin- und Tyrosinresten phosphorylieren. JNK reguliert neben c-Jun, die Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie Elk, ATF2/3 (*activating transcription factor 2/3*) und p53 (tumor protein 53). Außerdem aktiviert diese Kinase pro-apoptotische Gene und reguliert *pro survival* Signale herab.<sup>54</sup>

Fehlregulierung der MAP-Kinasen-Aktivität geht mit einer Reihe von Die Erkrankungen einher. So spielen ERK1/2, p38 und JNK eine wichtige Rolle in Neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson, aber auch in Artherosklerose und Krebserkrankungen.<sup>55, 56, 57</sup> Der Zusammenhang der MAP-Kinasen mit Krebserkrankungen ist auch für Hepatozelluläre Karzinome (hepatocellular carcinoma; HCC) beschrieben. So sind ERK1 und 2 verstärkt in HCC-Zellen phosphoryliert und fördern deren Zellproliferation und Ausbreitung. JNK trägt mit seiner anti-apoptotischen Wirkung zum Tumorwachstum in Leberkarzinomen bei und auch p38 ist an der Entwicklung von HCC beteiligt.<sup>58</sup> Auch das Hepatitis C Virus tritt in Wechselwirkung mit dem MAPK-Signalweg und nutzt seine Zellproliferationsfördernden Mechanismen unter Teilnahme der verschiedenen viralen Proteine. So konnte beobachtet werden, dass E2 ein effizienter Aktivator der MAP-Kinasen ist. Sowohl die Phosphorylierung von Raf und MEK1/2 wird hierbei verstärkt, als auch die Aktivierung der *downstream* Kinasen ERK1/2 und p38, was wiederum zu einer Zunahme der Zellproliferation führt.<sup>59</sup> In NS3/4A-transgenen Mäusen ist es möglich, durch den Einsatz von p38-Inhibitoren, eine TNF-a-induzierte Apoptose und die damit einhergehende Leberschädigung zu verhindern.<sup>60</sup> Außerdem findet sich eine verstärkte ERK-Aktivierung in NS3-transfizierten Hepatozyten, die in einer Zunahme des Zellwachstums resultiert. Der diesem Effekt zu Grunde liegende Mechanismus basiert auf einer ERK-vermittelten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-KB und AP-1. Durch den Einsatz von ERK-Inhibitoren lässt sich sowohl die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren, als auch die verstärkte Zellproliferation aufheben.<sup>61</sup> Desweiteren ist ERK an der Aktivierung der zytosolischen und Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Phospholipase PLA2G4A (phospholipase A2 group IVA) beteiligt, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Assoziierung des Core-Proteins an Lipide, bei der Bildung der Core-Hülle und bei der Sekretion von infektiösen Viruspartikeln spielt.<sup>62</sup>

#### 1.3.1 Die MAPKAP-Kinasen MK2 und MK3

Die MAP-Kinase-Signalwege nehmen durch die Aktivierung ihrer Substrate Einfluss auf eine Reihe verschiedener Prozesse in der Zelle. Zu diesen Zielgenen gehört auch die Gruppe der MAPKAP-Kinasen (*MAPK activated protein kinases*). Diese Proteinfamilie umfasst insgesamt elf Mitglieder, die Stimulus-abhängig je nach vorgeschalteter MAP-Kinase phosphoryliert und dadurch aktiviert werden (Abb. 1.6). Aufgrund der Homologie ihrer Kinase-Domänen zählen die MAPKAPK zu den Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (*calcium/calmodulin dependent kinase*; CAMK). Im Folgenden soll auf die Aktivierung und die Funktion der MAPKAP-Kinasen MK2 und MK3 näher eingegangen werden.<sup>51,63</sup>

Die MAPKAP-Kinasen 2 und 3 sind hoch homolog zueinander und werden hauptsächlich p38-abhängig reguliert, wobei in vitro, aber nicht in vivo, auch die Aktivierung durch ERK und JNK beobachtet werden konnte. MK2 und MK3 tragen Nterminal eine Prolin-reiche Domäne und C-terminal sowohl ein Kernlokalisierungssignal (NLS; nuclear localization signal), als ein auch Kernexportsignal (NES; nuclear export signal). Im Bereich der NLS findet sich zudem die Bindestelle für die MAP-Kinasen. Die Aktivierung der MK2 erfolgt Stress- und Zytokin-abhängig durch ihre Phosphorylierung im activation loop. Außerdem findet Phosphorylierungsstelle die für eine weitere die Regulierung sich des autoinhibitorischen Effekts der Kinase verantwortlich ist. In einer ruhenden Zelle liegt MK2 in einem inaktiven Komplex mit p38 im Kern vor, wobei eine autoinhibitorische Helix an den katalytischen Kern der Kinase gebunden ist und diese inaktiviert. Innerhalb dieses Komplexes ist die NES der MK2 maskiert. Die Aktivierung der p38 führt zum einen zu der aktivierenden Phosphorylierung der MK2 am Threoninrest 222 und zum anderen zu einer Konformations-ändernden Phosphorylierung an Threonin 334. Diese zweite Phosphorylierung führt zu einer Lösung der Bindung der autoinhibitorischen Helix von der katalytischen Seguenz der Kinase und damit zu der Demaskierung der NES. Der nun aktivierte Komplex aus MK2 und p38 ist daher in der Lage vom Kern ins Zytoplasma zu translozieren. Interessanterweise konnte in MK2-defizienten Zellen eine Herabregulierung der p38-Expression beobachtet werden und umgekehrt in p38-defizienten Mäusen eine Herabregulierung der MK2-Expression. Daher kann von einer Stabilisierung dieser Proteine durch ihre Komplexbildung ausgegangen werden. Aufgrund der Homologie von MK2 und MK3, kann von einem ähnlichen Aktivierungsprozess für die MK3 ausgegangen werden.<sup>51,63</sup> MK2 ist an der Regulierung verschiedener proinflammatorischer Zytokine beteiligt und spielt damit eine wichtige Rolle in der Entzündungsantwort. In MK2-defizienten Mäusen konnte eine Herabregulierung der LPS (Lipopolysaccharide)-vermittelten Expression von TNF $\alpha$  und IL-6 beobachtet werden.

Die Regulierung dieser Zytokine erfolgt post-transkriptionell auf der Ebene der mRNA-Stabilität oder der Translation, durch die Wechselwirkung mit Adenin -Uracilreichen Elementen in 3'-untranslatierten Regionen der Zielgene.<sup>64,65</sup> Auch die Regulierung der TNFα-vermittelten Stabilisierung der SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*)-mRNA in Makrophagen ist p38-MK2-abhängig und führt zu einer Hemmung der STAT3 (*signal tranducer and activator of transcription 3*)-Aktivierung durch dieses proinflammatorische Zytokin.<sup>66</sup> Außerdem spielt MK2 eine bedeutende Rolle bei der Formierung des Aktin-Zytoskeletts durch die Phosphorylierung der Hsp27 (*heat shock protein 27*) und der Zellzyklus-Kontrolle.<sup>67,68</sup> In Mausmodellen konnte zudem beobachtet werden, dass MK2-defiziente Tiere einen milderen Verlauf in entzündlichen Erkrankungen, wie Rheumatoider Arthritis, aufweisen.<sup>69</sup>

#### 1.4 Die NF-κB/Rel-Proteinfamilie

Der als *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) bezeichnete Transkriptionsfaktor wurde erstmals 1986 in B-Lymphozyten entdeckt und bindet an die *Enhancer*-Region der leichten Kette  $\kappa$  der Immunglobuline.<sup>70</sup> Heute ist bekannt, dass NF-κB nicht nur in B-Lymphozyten sondern ubiquitär exprimiert wird. Es reguliert die Expression verschiedenster Gene und spielt somit eine wichtige Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse. So ist der Einfluss von NF-κB nicht nur für die Immunantwort und inflammatorische Prozesse beschrieben, sondern auch die Wirkung des Transkriptionsfaktors auf Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, zelluläre Stressantwort und Apoptose.<sup>71,72</sup> Eine Fehlregulierung von NF-κB führt zu chronischen Entzündungen und ist bei der Entstehung verschiedenster Krebserkrankungen involviert.<sup>73,74</sup>

Die Familie der NF-κB-Proteine besteht in Säugetieren aus fünf beschriebenen Mitgliedern: c-Rel, NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (p65) und RelB (Abb. 1.7). Diese Proteine enthalten alle N-terminal eine stark konservierte *Relhomology domain* (RHD), die 300 Aminosäuren umfasst und für die Dimerisierung, DNA-Bindung, Kernlokalisation und Bindung der NF-κB-Inhibitoren verantwortlich ist. Während RelA (p65), c-Rel und RelB eine Transaktivierungs-Domäne besitzen und somit in der Lage sind die Transkription verschiedenster Gene direkt zu aktivieren, werden die NF-kB-Proteine p50 und p52 aus ihren Vorläuferproteinen p105 und p100 durch proteolytische Spaltung hinter der Glycin-reichen Region gebildet. Hierbei wird die für diese Proteine charakteristische Ankyrin-reiche Region abgespalten. Diese Mitglieder der NF-κB-Familie besitzen daher keine Transaktivierungs-Domäne, können aber trotzdem an DNA binden. Als Homodimere sind sie jedoch nicht in der Lage die Transkription von Genen zu aktivieren und dienen daher eher zur Inhibierung derselben. Als Heterodimere mit NF-κB-Proteinen, die eine Transaktivierungs-Domäne enthalten, können sie dagegen auch an der Aktivierung der Genexpression beteiligt sein.





Die fünf Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Proteinfamilie RelA (p65), c-Rel, RelB, p100/p52 und p105/p50 besitzen N-terminal, eine aus 300 Aminosäuren bestehende, *Rel-homology domain* (RHD), die für die Dimerisierung, DNA-Bindung, Kernlokalisierung und Bindung der NF- $\kappa$ B-Inhibitoren verantwortlich ist. Die Proteine p50 und p52 werden aus ihren Vorläuferproteinen p105 und p100 gebildet und enthalten zusätzlich eine Ankyrin-reiche Region. Die proteolytische Spaltung findet hierbei hinter der Glycin-reichen Region (GRR) statt. Außerdem beinhalten die NF- $\kappa$ B-Proteine RelA, c-Rel und RelB zusätzlich eine Transaktivierungs-Domäne (TD) und RelB als einziges Mitglied der Familie eine *leucin-zipper domain* (LZ) (modifiziert nach *Ghosh et al.* 1998).<sup>75</sup>

Insgesamt sind fünfzehn verschiedene Dimer-Zusammensetzungen aus den fünf NFκB-Untereinheiten möglich, die Stimulus- und Zelltypabhängig exprimiert werden.<sup>75,76</sup> Das erste beschriebene NF-κB-Heterodimer besteht aus den Untereinheiten RelA

41

(p65) und p50. Unter dem Begriff NF-κB versteht man selbst heute noch dieses erstmals beschriebene Dimer, trotz der mittlerweile großen Anzahl weiterer charakterisierter Dimere.<sup>77</sup> Im Gegensatz zu den Mitgliedern der NF-κB/Rel-Proteinfamilie, die als Hetero- und Homodimer vorliegen können, bildet RelB *in vivo* nur Heterodimere aus. Die NF-κB-Transkriptionsfaktoren können nach erfolgreicher Dimerisierung nur an spezifische neun bis zehn Basenpaare lange Sequenzmotive der DNA, die sogenannten κB-Elemente, binden. Diese Sequenzen weisen eine hohe Variabilität auf (5'-GGGRNWYYCC-3'; R: Adenin/Guanin; N: beliebige Base; W: Adenin/Thymin; Y: Cytosin/Thymin) und die verschiedenen NF-κB-Dimere binden spezifisch an eine jeweils andere Variante dieser Sequenz. Aufgrund der Vielzahl möglicher NF-κB-Dimere, die je nach Bedingung gebildet werden, und der Variabilität innerhalb der Bindungssequenzen der DNA, können auf diesem Weg viele verschiedene Sätze an Genen, je nach Gegebenheit, reguliert werden.<sup>78</sup>

#### 1.4.1 Die Familie der IkB-Proteine

Die Aktivität des NF- $\kappa$ B-Signalweges wird durch die Bindung an inhibitorisch wirkende I $\kappa$ B (*inhibitor of \kappaB*)-Proteine reguliert. Charakteristisch für die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind die am C-Terminus liegenden fünf bis sieben Ankyrin-Wiederholungen (*ankyrin repeats; AR*), die für die Wechselwirkung dieser Inhibitoren mit der *Rel-homology* Domäne (RHD) der NF- $\kappa$ B-Proteine nötig sind. Die I $\kappa$ B-Proteinfamilie umfasst insgesamt acht Mitglieder, die in zwei Klassen unterteilt werden können (Abb. 1.8). Zu der ersten Klasse gehören die sogenannten typischen I $\kappa$ B-Proteine wie I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  und die aus den Vorläuferproteinen p100 und p105 synthetisierten Inhibitoren I $\kappa$ B $\gamma$  (p105) und I $\kappa$ B $\delta$  (p100). Die Hauptaufgabe dieser I $\kappa$ B-Proteine liegt in der negativen Regulierung der NF- $\kappa$ B-Dimere, die auf diese Weise von der Translokation in den Kern abgehalten und inaktiviert werden. Die typischen I $\kappa$ B-Proteine werden Stimulus-vermittelt degradiert und setzen die somit aktivierten NF- $\kappa$ B-Dimere frei. Die restlichen drei untypischen I $\kappa$ B-Proteine, I $\kappa$ B $\zeta$ , BCL-3 und I $\kappa$ B $_N$ s bilden die zweite Klasse dieser Proteinfamilie. Diese Proteine

werden in der Zelle nicht konstitutiv, sondern Stimulus-vermittelt exprimiert und sind hauptsächlich im Nukleus lokalisiert. Neben der inhibitorischen Funktion gegenüber NF-κB üben sie auch regulatorische Funktionen im Bezug auf die Transkription von NF-κB-Zielgenen aus.



#### Abb. 1.8: Die IkB-Proteinfamilie.

Die Familie der I $\kappa$ B-Proteine umfasst acht Mitglieder, die in zwei Klassen unterteilt werden. Charakteristisch für alle I $\kappa$ B-Proteine ist das Vorhandensein von fünf bis sieben Ankyrin (ANK)-Wiederholungen, die für die Interaktion mit der *Rel-homology domain* (RHD) der NF- $\kappa$ B-Proteine verantwortlich sind. Bevor die NF- $\kappa$ B-Vorläuferproteine p100 und p105 prozessiert werden, können sie aufgrund ihrer Ankyrin-Wiederholungen selbst als I $\kappa$ B-Proteine fungieren und werden als I $\kappa$ B $\delta$  und I $\kappa$ B $\gamma$  bezeichnet. Diese Proteine gehören zu der ersten Klasse, den typischen I $\kappa$ -B-Proteinen, ebenso wie I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$ . Die zweite Klasse umfasst die nukleären I $\kappa$ B-Proteine I $\kappa$ B $\zeta$ , BCL-3 und IkB<sub>NS</sub>. Abkürzungen: ANK: Ankyrin-Wiederholungen, PEST: Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threoninreiche Region, TAD: Transaktivierungs-Domäne, TD: Todesdomäne (modifiziert nach Ghosh et al. 2008).<sup>79</sup>

Die klassischen  $I\kappa B$ -Proteine  $I\kappa B\alpha$ ,  $I\kappa B\beta$  und  $I\kappa B\epsilon$  weisen strukturell große Ähnlichkeiten auf. Am C-Terminus der Proteine  $I\kappa B\alpha$  und  $I\kappa B\beta$  befindet sich eine PEST-Domäne (Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiche Region), die für die Stabilität der Proteine wichtig ist und N-terminal besitzen alle drei spezifische Phosphorylierungsstellen, die für ihre proteasomale Degradierung eine wichtige Rolle spielen.

IκBα wurde als erster spezifischer NF-κB-Inhibitor entdeckt und wurde seither intensiv studiert. Dieses 37 kDa große Protein inhibiert bevorzugt die Aktivierung des klassischen NF-κB-Dimers p65/p50. Dabei maskiert IκBα allerdings nur das Kernlokalisierungssignal von p65, aber nicht von p50 und kann so im Komplex mit dem NF-κB-Dimer in den Kern translozieren. Da IκBα selbst auch ein Kernexportsignal enthält, kann der Komplex zwischen Zytoplasma und Kern hin und her wandern. Durch Stimulation der Zelle wird  $I\kappa B\alpha$  phosphoryliert und proteasomal abgebaut, die NF-kB-Dimere werden freigesetzt und können in den Kern translozieren und die Transkription verschiedenster Gene aktivieren. Da sich in dem I $\kappa$ B $\alpha$ -kodierenden Gen auch ein  $\kappa$ B-Motiv findet, wird die Neusynthese dieses Gens schon kurz nach der Aktivierung von NF-κB gestartet. IκBα bindet wiederum die NFκB-Dimere im Kern und exportiert diese ins Zytoplasma. Durch diesen Rückkopplungsmechanismus reguliert NF- $\kappa$ B seine eigene Aktivität. I $\kappa$ B $\beta$  weist strukturell die gleichen Merkmale auf wie  $I\kappa B\alpha$  und bindet ebenfalls bevorzugt NF- $\kappa$ B-Dimere, bestehend aus p65 und p50. Anders als bei  $I\kappa$ B $\alpha$  werden hierbei jedoch beide Kernlokalisierungssignale maskiert und die IkBB/NF-kB-Komplexe verbleiben ausschließlich im Zytoplasma. Die Kinetik der ΙκΒβ-Degradierung und -Neusynthese ist im Vergleich zu I $\kappa$ B $\alpha$  deutlich langsamer und somit wichtig für eine länger anhaltende NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Auch I $\kappa$ B $\epsilon$  ist ähnlich aufgebaut wie I $\kappa$ B $\alpha$ , enthält jedoch keine PEST-Domäne. I $\kappa$ B $\epsilon$  wird ebenfalls nach Stimulation der Zelle phosphoryliert und degradiert und weist analog zu  $I\kappa B\beta$  im Bezug auf  $I\kappa B\alpha$  eine langsamere Kinetik auf. Eine Besonderheit bei IkBE ist die vorwiegende Expression in hämatopoetischen Zellen. Aufgrund der unterschiedlichen Kinetiken für die durch  $I\kappa B\alpha$ ,  $I\kappa B\beta$  und  $I\kappa B\varepsilon$  bedingte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges und deren Zelltyp-spezifischer Expression, kann teilweise von der Beteiligung an unterschiedlichen Prozessen ausgegangen werden. Die NF-KB-Vorläuferproteine p100 und p105 können wegen ihrer Ankyrin-Wiederholungen ebenfalls zu den IkB-Proteinen gezählt werden. Die Prozessierung von p100 (IkB\delta) geschieht Stimulusvermittelt über die Phosphorylierung und anschließende Degradierung des Proteins. Dieser Inhibitor wechselwirkt hauptsächlich mit NF-κB-Dimeren, bestehend aus p50 und RelB. Durch die Degradierung von p100 wird, analog zu den restlichen typischen IκB-Proteinen, das NF-κB-Dimer freigesetzt und dadurch aktiviert. p100 spielt vor allem im alternativen NF-kB-Aktivierungsweg eine wichtige Rolle. Das NF-kB-Vorläuferprotein p105 ( $I\kappa B\gamma$ ) wird sowohl konstitutiv, als auch Stimulus-abhängig prozessiert. Die konstitutive Prozessierung resultiert in der Bildung von p50 und schafft ein Gleichgewicht zwischen p105 und p50 in der Zelle. Die Stimulus-

vermittelte Prozessierung dagegen verläuft auch hier über die Phosphorylierung und

anschließende Degradierung des Inhibitors, wodurch die gebundenen NF- $\kappa$ B-Dimere freigesetzt werden.<sup>80</sup>

Die untypischen IkB-Proteine sind hauptsächlich im Nukleus der Zelle lokalisiert und werden, im Gegensatz zu den typischen IkB-Proteinen, Stimulus-vermittelt induziert und nicht degradiert. BCL-3 wurde erstmals als Protoonkogen in chronischer lymphatischer Leukämie entdeckt. Dieses Protein kann sowohl inhibitorisch, als auch aktivierend auf die p50- oder p52-vermittelte Genexpression wirken. Auf der einen Seite ist BCL-3 in der Lage repressiv wirkende NF-kB-Dimere aus p50 und p52 von der DNA zu lösen und dadurch die Bindung von transkriptionell aktiven Dimeren zu ermöglichen, aber auf der anderen Seite kann es auch repressiv wirkende NF-κB-Dimere an der DNA stabilisieren und damit die Bindung von aktivierenden Dimeren verhindern. IkB<sub>NS</sub> ist ein durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine induzierbares Protein, das primär mit dem NF-kB-Protein p50 wechselwirkt. Auf diesem Weg inhibiert es die durch den Toll-Like Rezeptor (TLR) und NF-kB vermittelte Genexpression. So hat IkB<sub>NS</sub> einen wichtigen, inhibierenden Einfluss auf die Zytokinproduktion bei Entzündungsprozessen und auf die NF-kB-vermittelte Immunantwort. Ein Beispiel hierfür findet sich im inhibitorischen Effekt auf die LPSvermittelte Expression von Interleukin-6. Da das nukleäre IkB-Protein IkBC (Kapitel 1.4.2) zu der Induktion der LPS-vermittelten IL-6-Expression führt, ist es anzunehmen, dass es sich bei  $I\kappa B_{NS}$  und  $I\kappa B\zeta$  um Gegenspieler handelt.<sup>80,81</sup>

#### 1.4.2 Das nukleäre IκB-Protein IκBζ

Der induzierbare NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B $\zeta$  wurde erstmals in der Maus beschrieben und wird im Gegensatz zu den typischen I $\kappa$ B-Proteinen nach Stimulation induziert und nicht abgebaut. Auf Basis der verwendeten Stimuli wird das Protein im Falle der LPS-Stimulation auch als *molecule possessing ankyrin-repeats induced by lipopolysaccharide* (MAIL) und im Falle der Interleukin-1 $\beta$ -Stimulation als *IL-1-inducible nuclear ankyrin-repeat protein* (INAP) bezeichnet.<sup>82,83</sup> I $\kappa$ B $\zeta$  wird aufgrund der sechs C-terminalen Ankyrin-Wiederholungen und seiner Homologie, besonders zu den nukleären I $\kappa$ B-Proteinen BcI-3 und I $\kappa$ B<sub>NS</sub>, zu der Familie der I $\kappa$ B-Proteine

gezählt.<sup>84,</sup> Im Gegensatz zu den vergleichbaren C-Termini unterscheidet sich der N-Terminus des I $\kappa$ B $\zeta$ -Proteins stark von dem der anderen Familienmitglieder. So findet man die PEST-Domäne (Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiche Region) im Vergleich zu den typischen IkB-Proteinen am N- und nicht am C-Terminus von IkBζ. Zudem besitzt IκBζ N-terminal eine nuclear-localization-sequence (NLS) und eine Transaktivierungsdomäne. Die PEST-Domäne ist für die Stabilität des Proteins verantwortlich, während die NLS für die Lokalisation von IkBC im Kern sorgt. IkBC wird nach Stimulation in den verschiedensten Organen exprimiert. Hierzu zählen unter anderem die Lunge, die Leber, die Milz, die Niere und das Herz, aber nicht das Gehirn.<sup>83,84,85,86</sup> Zudem wurde die Expression von IκBζ in Zellen der Immunantwort, wie B-Lymphozyten und Makrophagen, beschrieben.<sup>87</sup> Die Induktion von IkBζ in Zellen der Maus, aber auch im humanen System, wird durch Stimuli wie LPS, IL-1 und poly I:C (polyinosinic:polycytidylic acid) beobachtet.<sup>82,83,88</sup> Untersuchungen zu der Induzierbarkeit durch TNF- $\alpha$  ergaben teils unterschiedliche Ergebnisse für humane und murine Systeme. So wird in murinen Zellen die Induktion der Transkription von I $\kappa$ B $\zeta$  durch eine TNF- $\alpha$ -Stimulation erreicht, aber es wird keine Proteinsynthese induziert. Erst durch eine Co-Stimulation mit Interleukin-17 wird das Transkript stabilisiert und das Protein exprimiert.<sup>89</sup> In humanen Zellen dagegen, konnte auch die I $\kappa$ B $\zeta$ -Proteinsynthese nach TNF- $\alpha$  beobachtet werden. Es existieren drei Spleißvarianten des IκBζ-Proteins. Nach Stimulation der Zellen entsteht hauptsächlich die längste der Spleißvarianten, IκBζ-L. Die Spleißvariante IκBζ-S wird durch die Entfernung von drei Exons aus dem IkBζ-L-Protein produziert und die Variante IkBζ-D entsteht durch ein zusätzliches Spleißen in Exon 7 und zeigt keine Transaktivierungs-Aktivität.<sup>82,85</sup>

Für die Expression von IκBζ ist die Aktivierung des NF-κB-Signalweges essentiell, aber nicht ausreichend. NF-κB-Inhibitoren hemmen zum Teil auch die Expression von IκBζ und eine Überexpression verschiedener NF-κB-Untereinheiten führt nur zu einer schwachen Induktion von IκBζ.<sup>90,86</sup> Diese Befunde legen nahe, dass IκBζ zusätzlich durch einen hiervon abweichenden Mechanismus reguliert wird. So belegten Untersuchungen, dass MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) und TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), die beide durch die Aktivierung von Rezeptoren mit einer TIR-Domäne (Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne) induziert werden, für die Regulierung von IκBζ verantwortlich sind. In diesem Signalweg soll desweiteren IRAK1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1) eine wichtige Rolle spielen.<sup>91,92</sup> Außerdem beinhaltet ΙκΒζ zwei CRE-Bindestellen (*cAMP response element*) und die LPS-vermittelte Induktion von  $I\kappa B\zeta$ wird teilweise durch die Aktivierung von CREB (cAMP response element-binding protein) reguliert. So führt eine Inhibierung von CREB in Makrophagen zu einer Abnahme der IκBζ-Expression um etwa 50 %.<sup>93</sup> In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte in Fibroblasten eine ATF3 (activating transcription factor 3)abhängige Regulierung der IκBζ-Expression beobachtet werden. Hierbei führte eine ATF3-Defizienz zu einem Anstieg der IκBζ-Expression.<sup>94</sup> Nach der Induktion von IκBζ akkumuliert das Protein im Nukleus der Zelle. Hierbei wurde eine Kolokalisierung von IkBζ mit SMRT (silencing mediator for retinoid or thyroidhormone receptor) und HDAC5 (histone deacetylase 5) in sogenannten Matrixbeobachtet.<sup>86</sup> Deacetylase-Strukturen Zusätzlich zu assoziierten diesen beschriebenen Regulationsmechanismen wird ΙκΒζ auch post-transkriptionell gesteuert. Dies geschieht unter anderem durch die Wirkung von kleinen nicht kodierenden RNA-Molekülen, den micro-RNAs (miRNA). Diese aus etwa 22 Basenpaaren bestehenden RNAs binden an die mRNA ihrer Zielgene und führen entweder zu einem Abbau der mRNA, oder verhindern die Translation derselben. In der 3'UTR (*untranslated region*) von  $I\kappa B\zeta$  konnte eine Bindestelle für die miR-124a identifiziert werden, wobei die Bindesequenz nur in sieben Nukleotiden mit der Sequenz der IkBζ-mRNA übereinstimmt. Durch diese nur teilweise Übereinstimmung kann von einer Regulierung auf Ebene der Translation ausgegangen werden. Demzufolge konnte beobachtet werden, dass bei Anwesenheit von miR-124a die IκBζ-Proteinexpression supprimiert ist.<sup>95</sup> Eine weitere miRNA, die an der Regulierung von IκBζ beteiligt ist, ist die miR-187. Diese miRNA wird durch Stimulation mit Interleukin-10 induziert und bewirkt eine Suppression der IκBζ-Expression. Auch diese miRNA wirkt auf Ebene der Translation. Durch diesen Befund kann der inhibitorische Effekt von Interleukin-10 auf die LPS-vermittelte Expression von  $I\kappa B\zeta$ erklärt werden.<sup>96</sup>

IκBζ bindet präferentiell an die NF-κB-Untereinheit p50 und kann sowohl eine negative als auch eine positive Regulierung seiner Zielgene bewirken.<sup>85, 97</sup> So interagiert IκBζ mit dem Heterodimer p65/50 und dem Homodimer p50/p50.<sup>84, 98</sup> Durch die Aktivierung von IκBζ, werden NF-κB, aber auch andere

Transkriptionsfaktoren wie C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein) und Brg1 (ATP-dependent helicase SMARCA4), an die entsprechenden Zielgene rekrutiert und vermitteln dort die Transkription der Gene.<sup>99</sup> ΙκΒζ ist an der Regulierung von inflammatorischen Prozessen beteiligt. So führt die Induktion von IκBζ durch verschiedene Stimuli zu der Expression von Interleukin-6 oder auch Lipocalin-2 (Kapitel 1.4).<sup>82,144</sup> Die Expression von IκBζ in Monozyten und Makrophagen führt zu der Induktion der Interleukin-6-Produktion, wobei bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen sowohl die IκΒζ-, als auch die IL-6-Expression verringert wird.<sup>100</sup> Außerdem dient I $\kappa$ B $\zeta$  als transkriptioneller Regulator der CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2)-Expression. CCL2 wird bei Krankheiten, wie Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis und Atherosklerose vermehrt exprimiert und korreliert mit dem Fortschritt der Entzündung. IκBζ-defiziente Makrophagen zeigen eine verminderte CCL2-Expression und IkBC-defiziente Mäuse weisen neben diesem Effekt eine Infiltration von Monozyten in einem Peritonitis-Modell auf.<sup>101</sup> In NK-Zellen (natural killer cells) wird ΙκΒζ nach Stimulation mit Interleukin-12 und Interleukin-18 induziert und verstärkt die immunstimulierende, antiviral und antitumoral wirkende Interferon- $\gamma$ -Produktion.<sup>102,103</sup> Zudem ist beschrieben, dass I $\kappa$ B $\zeta$ durch Stimulation des B-Zell-Rezeptors aktiviert wird, was auf eine Beteiligung von IκBζ an der adaptiven Immunantwort hindeutet.<sup>104</sup> Desweiteren ist IκBζ für die Expression verschiedenster LPS- und Interleukin-abhängig induzierter Gene, wie β-Defensin, E-selectin, Csf2 (colony stimulating factor 2) und Interleukin-12b verantwortlich. <sup>105, 106</sup> I $\kappa$ B $\zeta$  ist an der Entwicklung einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt. So ist eine Verbindung der IκBζ-Expression mit Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis beschrieben.<sup>107,108</sup> ΙκΒζ-*knockdown*-Mäuse zeigen vier bis acht Wochen nach der Geburt chronische Entzündungen im Bereich der Augen. Hierbei zeigen sich eine starke Infiltration der Bindehaut (tunica conjunctiva) mit inflammatorischen Zellen und ein nahezu vollständiger Verlust der Becherzellen.<sup>109</sup> Außerdem bilden sich rund um das Auge und am Hals atopische Ekzeme. Dies geht einher mit erhöhten IgE-Werten im Serum und einer verstärkten Expression Thymusund Aktivierungs-regulierter Chemokine im betroffenen Gewebe.<sup>110</sup> In B-Zell-Lymphomen steuert I $\kappa$ B $\zeta$  die NF- $\kappa$ B-vermittelte Tumorbildung. Dies geschieht durch die verstärkte Expression der Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-10, die durch IκBζ induziert werden und die Aktivierung von STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) fördern. <sup>111</sup> Für STAT3 ist jedoch auch ein entgegengesetzter Effekt beschrieben. In humanen embryonalen Nierenzellen wurde ein inhibitorischer Effekt der IκBζ-Induktion auf die STAT3-Aktivierung beobachtet.<sup>112</sup> Ein Mechanismus zum Schutz der Zelle vor der Entwicklung von Tumoren ist die Seneszenz, die durch Zytokine wie Interleukin-6 und Interleukin-8 vermittelt wird. IκBζ spielt durch die Regulierung dieser Zytokine eine wichtige Rolle in der durch DNA-Schädigung oder Onkogene induzierten Seneszenz, durch die die Zellzyklus-Progression aufgehalten wird und der apoptotische Zelltod herbeigeführt wird. IκBζ wird durch DNA-Schädigung und Onkogene induziert und eine Überexpression führt zu einer verstärkten Seneszenz und der *knockdown* entsprechend zu einer Abnahme.<sup>113</sup> IκBζ führt außerdem zu einer Verstärkung der durch TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose, während die Suppression von IκBζ eine durch siRNA verursachte Resistenz der Zelle gegen Apoptose bewirkt.<sup>84,86</sup>

#### 1.4.3 Aktivierung des NF-κB-Signalweges

NF-kB ist ein regulierter Transkriptionsfaktor, der durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli induziert wird. Hierzu zählen unter anderem inflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , aber auch Pathogene (Bakterien und Viren) und ihre Produkte, wie LPS und doppelsträngige RNA. Desweiteren führen Stress-Reaktionen der Zelle (reaktive Sauerstoffspezies und UV-Strahlung) ebenfalls zu einer Aktivierung des NF-150 verschiedene extrazelluläre κB-Signalweges. Insgesamt sind Signale beschrieben, die in einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B resultieren.<sup>114</sup> In einer ruhenden Zelle sind die NF-kB-Dimere im Zytoplasma an ihre Inhibitoren, die klassischen IkB-Proteine  $I\kappa B\alpha$ ,  $I\kappa B\beta$  und  $I\kappa B\epsilon$ , gebunden. Durch diese Komplexbildung wird das Kernlokalisierungssignal der NF-κB-Dimere maskiert und die Translokation derselben in den Nukleus verhindert. Die Stimulus-abhängige Aktivierung der IkB-Kinasen (IKK) resultiert in der Phosphorylierung der klassischen IkB-Proteine und führt dadurch zu einer Polyubiquitinylierung und dem anschließenden proteasomalen Abbau derselben. Auf diese Weise wird NF-κB freigesetzt, transloziert in den Nukleus und startet die Transkription der entsprechenden Zielgene. Da die Transkription der IkB-

Proteine wiederum durch NF- $\kappa$ B reguliert wird, ergibt sich hierbei ein negativer *feedback loop*. Es sind verschiedene Mechanismen für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges beschrieben, wobei die beiden Hauptwege als klassischer und alternativer NF- $\kappa$ B-Signalweg bezeichnet werden (Abb. 1.9).<sup>76,</sup>

Der klassische NF-κB-Signalweg wird durch proinflammatorische Zytokine, aber auch durch Pathogene induziert. Durch die Bindung der Stimuli an die entsprechenden Rezeptoren, wird der IκB-Kinase-Komplex (IKK) aktiviert. Dieser Komplex setzt sich aus den Untereinheiten IKKα, IKKβ und dem *NF-κB* essential modifier (NEMO) zusammen und wird durch die Phosphorylierung von IKKβ an Serin 177 und Serin 181 aktiviert. Die IKK-Aktivierung führt anschließend zur Phosphorylierung der klassischen IκB-Proteine IκBα, ΙκBβ und ΙκBε.<sup>115</sup> Hierbei wird IκBα an den Serinen 32 und 36 phosphoryliert und durch die E3-Ubiquitin-Ligase SCF/βTRCP ubiquitiniert.<sup>116</sup> Anschließend wird ΙκBα durch das 26S-Proteasom abgebaut. Auf diese Weise werden die NF-κB-Dimere freigesetzt und starten die Transkription der entsprechenden Zielgene.<sup>76,78</sup>

Die alternative Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges erfolgt durch Stimulanzien, wie Lymphotoxin- $\beta$  oder den *B cells activating factor* (BAFF). Die Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren führt zu einer Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) an Serin 809, Serin 812 und Serin 815. Diese Aktivierung führt wiederum zu einer Phosphorylierung des IKK $\alpha$ -Komplexes, der durch Phosphorylierung von p100 dessen Proteolyse zu p52 induziert. Das dabei freigesetzte NF- $\kappa$ B-Dimer aus p52 und RelB kann anschließend in den Nukleus translozieren und dort die Transkription der Zielgene induzieren.<sup>76,78</sup>

50



#### Abb. 1.9: Aktivierung des NF-κB-Signalweges.

Der klassische NF-κB-Signalweg wird durch verschiedene proinflammatorische Zytokine induziert. Die Bindung der entsprechenden Liganden an ihre Rezeptoren führt zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes, bestehend aus IKKα, IKKβ und NEMO. Der IKK-Komplex wiederum führt zu einer Phosphorylierung und damit Ubiquitinylierung der klassischen IκB-Proteine, die anschließend proteasomal degradiert werden. Die NF-κB-Dimere werden dadurch freigesetzt und translozieren in den Nukleus, wo sie die Transkription ihrer Zielgene induzieren. Der alternative NF-kB-Signalweg wird dagegen durch Stimuli, wie Lymphotoxin- $\beta$  und BAFF induziert. Durch dieses Signal wird NIK aktiviert, welches wiederum den IKKα-Komplex phosphoryliert. IKKα phosporyliert anschließend p100 und induziert auf diesem Wege dessen Proteolyse zu p52. Das freigesetzte p52-ReIB-Dimer kann anschließend in den Nukleus translozieren und die Transkription seiner Zielgene induzieren (modifiziert nach *Gilmore et al.* 2006).78

# 1.4.4 Wechselwirkungen des NF-κB-Signalweges mit Krankheiten und im Besonderen mit dem Hepatitis C Virus

Der NF-κB-Transkriptionsfaktor ist an der Regulierung einer Vielzahl von Genen beteiligt. Hierzu gehören Zytokine, Chemokine, antimikrobielle Peptide und Enzyme, die eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort einer Zelle und bei Entzündungsprozessen spielen. So reguliert NF-κB zum Beispiel die Transkription von IL-1<sub>β</sub>, IL-6 und IL-8, aber auch die Expression des *major histocompatibility complex* (MHC).<sup>117,118,119,120</sup> Desweiteren ist beschrieben, dass NF-κB sowohl an der Regulierung der Zellproliferation, als auch an der Apoptose beteiligt ist. Als Beispiele sind hier die Regulierung des Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) und der anti-apoptotisch wirkenden Gene Bcl-2 und XIAP zu nennen.<sup>121, 122, 123</sup> Da NF-kB an einer Vielzahl von sehr wichtigen, zentralen Prozessen in der Zelle beteiligt ist, ist es nicht verwunderlich, dass eine Fehlregulierung dieses Transkriptionsfaktors eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Krebs und verschiedensten anderen Krankheiten spielt.<sup>124</sup> Die Transkription der NF-kB-Faktoren ist zum Beispiel in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease, IBD), wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, beeinflusst, aber auch in *Diabetes mellitus* und rheumatoider Arthritis.<sup>125,126,127</sup>

Der NF-κB-Signalweg wird außerdem von vielen verschiedenen Viren genutzt. Im Falle des Hepatitis B Virus (HBV) zum Beispiel stellt sich eine durch das Core-Protein verstärkte NF-κB-Aktivität dar, die wiederum zu einer Zunahme der viralen Replikation führt.<sup>128</sup> Ebenso erhöht eine Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) die NF-κB-Aktivität, die ihrerseits die HIV-Gen-Expression in Monozyten aktiviert.<sup>129</sup>

Auch in einer Hepatitis C Virus Infektion zeigen sich vielseitige Wechselwirkungen mit dem NF- $\kappa$ B-Signalweg. Hierbei nutzen die verschiedenen HCV-Proteine unterschiedliche Mechanismen. Für die viruseigene Polymerase NS5B ist beispielsweise ein stimulierender Effekt auf die Lymphotoxin- $\beta$  Expression beschrieben worden, der durch eine erhöhte Aktivität von NF- $\kappa$ B erreicht wird. Eine Inaktivierung von IKK $\beta$  in HCV-transgenen Mäusen führte sogar zu einer verminderten Tumorbildung.<sup>130</sup> Desweiteren führt die Expression von NS5B in Hepatozyten zu der Bildung von kleinen RNA-Spezies, die NF-kB-abhängig die Zytokin-Produktion der Zelle anregen und zu der Ausschüttung von Typ I Interferonen und Interleukin-6 führen. <sup>131</sup> Die HCV Protease NS3/4A ruft in transgenen Mäusen eine verstärkte Expression von TNF- $\alpha$  und CCL2 hervor, die durch eine erhöhte Aktivität von NF- $\kappa$ B bedingt wird und Apoptose verringert.<sup>132</sup> Zudem reguliert HCV NF-κB-abhängig die Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression in Hepatozyten.<sup>133</sup> Hepatitis C bewirkt eine Inflammation in Hepatozyten unter anderem durch die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1ß und Interleukin-18, die von Makrophagen ebenfalls NF- $\kappa$ B-vermittelt sekretiert werden.<sup>134</sup> Doch das Hepatitis C Virus ist nicht nur in der Lage NF-kB direkt zu regulieren, sondern kann dies auch durch die Regulierung seiner Inhibitoren, den IkB-Proteinen erreichen. NS5A aktiviert NF- $\kappa$ B durch oxidativen Stress. Hierbei wird I $\kappa$ B $\alpha$  zusätzlich zu den üblichen Phosphorylierungen an Serin 32 und Serin 36 von HCV an den Tyrosin-Resten 42 und 305 phosphoryliert. Dies führt zu einem Calpain-vermittelten Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , wodurch wiederum die NF- $\kappa$ B-Dimere freigesetzt und aktiviert werden.<sup>135</sup> Der Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Mitglieder der I $\kappa$ B-Proteine I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$ wurde bereits näher untersucht, doch die Wechselwirkung des Virus mit untypischen IkB-Proteinen bedarf weiterer Aufklärung.

#### 1.5 Lipocalin-2

Lipocalin-2 (*neurophil gelatinase-associated lipocalin*, NGAL; LCN2) ist ein Mitglied der Lipocalin-Proteinfamilie, die mehr als dreißig Proteine umfasst.<sup>136</sup> Erstmals wurde LCN2, vorliegend in einem Komplex mit Gelatinase/MMP9, aus humanen neutrophilen Granulozyten isoliert. Das 25 kDa Protein LCN2 konnte als homolog zu dem in der Ratte gefundenen  $\alpha_2$ -*microglobulin-related protein* und dem aus der Maus stammenden Protein 24p3 identifiziert und somit der Familie der Lipocaline zugeordnet werden.<sup>137, 138</sup> Die Proteine dieser Familie sind zumeist sehr kleine, sezernierte Proteine, die in der Lage sind kleine, hydrophobe Moleküle zu binden und diese über ihre Rezeptoren in die Zelle zu transportieren.<sup>139</sup> Bei diesen Rezeptoren handelt es sich im Falle von LCN2 um den 24p3 *cell-surface receptor* 

(24p3R) density lipoprotein und low receptor-related 2 dem protein (LRP2/Megalin).<sup>140,141</sup> Lipocalin-2 wird Zelltyp-abhängig durch verschiedene Stimuli induziert. So ist die Aktivierung der Lipocalin-2-Expression nach LPS-Stimulation in Makrophagen beschrieben.<sup>142</sup> In humanen und murinen Fettzellen wird LCN2 INF-γund TNF- $\alpha$ -vermittelt exprimiert. Hierbei werden durch die Aktivierung von ERK sowohl STAT1, als auch NF-κB aktiviert, die wiederum zu der Induktion von Lipocalin-2 führen.<sup>143</sup> In Epithelzellen, Fettzellen und humanen Hepatozyten wird Lipocalin-2 aber auch durch das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1ß induziert. In entzündeten Epithelzellen der Lunge konnte eine erhöhte LCN2-Expression festgestellt werden. Untersuchungen in der Zelllinie A549 ergaben, dass diese verstärkte Expression IL-1 $\beta$ - aber nicht TNF- $\alpha$ -vermittelt reguliert wird. Der Grund hierfür liegt darin, dass für die Induktion von LCN2 nicht nur die Aktivierung des NFκB-Signalweges notwendig ist, sondern auch die seines Co-Faktors ΙκΒζ. Dieser Faktor wird allerdings nur durch IL-1 $\beta$  induziert, während TNF- $\alpha$  zwar die mRNA-Expression induziert, aber nicht in der Lage ist das Transkript zu stabilisieren und die Protein-Expression zu starten. Stimuliert man jedoch mit TNF- $\alpha$  in Anwesenheit von Interleukin-17, kann man die Induktion von Lipocalin-2 beobachten. Während TNF-a die Transkription von I $\kappa$ B $\zeta$  induziert, ist IL-17 in der Lage das Transkript zu stabilisieren und somit die Expression von LCN2 zu induzieren.<sup>144,145,</sup> Auch die IL-1βvermittelte Expression von LCN2 in Fettzellen wird über den NF-kB-Signalweg 146 reguliert. Akut-Phase-Reaktion von Hepatozyten Die wird durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1β oder IL-6 induziert. Dabei verstärken beide Zytokine die Expression einer Gruppe von sekretierten Proteinen, die sich kaum voneinander unterscheiden. Lipocalin-2 bildet hierbei eine Ausnahme, da es nur nach Stimulation mit IL-1ß, aber nicht durch IL-6 verstärkt wird und daher zur Unterscheidung der beiden Signalwege dienen kann.<sup>147</sup>

Lipocalin-2 spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, bei oxidativem Stress, bei Adipositas und Organschädigung.<sup>136</sup> Desweiteren ist die Fehlregulierung von LCN2 mit Krebserkrankungen assoziiert.<sup>148,149</sup> LCN2 ist am Transport von Siderophoren in die Zelle beteiligt. Bei einer bakteriellen Infektion nutzt das Bakterium Eisenvorräte der Wirtszelle. Hierzu bildet es Siderophore, die Eisen binden und in das Bakterium transportieren. Die Immunabwehr des Wirtes wiederum ist im Stande die Lipocalin-2-Expression zu induzieren und somit die gebildeten Siderophore zu binden und dem Bakterium das Eisen zu entziehen. Auf diese Weise hemmt Lipocalin die Vermehrung des Bakteriums und dient somit als Akut-Phase-Protein bei der angeborenen Immunantwort des Wirtes auf eine bakterielle Infektion.<sup>150, 151, 152</sup> In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Lipocalin-2 an der Rekrutierung von Immunzellen, im Speziellen Neutrophilen, an den Ort der Entzündung beteiligt ist.<sup>153</sup> Lipocalin-2 ist desweiteren im Zusammenhang mit Adipositas und Hyperglykämie beschrieben. Mit LCN2 behandelte Hepatozyten entwickeln eine Insulin-Resistenz.<sup>154,155</sup> Untersuchungen ergaben zudem eine wichtige Rolle für Lipocalin-2 in der Regulierung von Zellproliferation und Apoptose, wobei die Literatur an dieser Stelle teils gegenläufige Effekte beschreibt. So hat eine Reihe von Arbeiten in Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp eine anti-apoptotische Wirkung von LCN2 gezeigt, während andere LCN2 als Apoptose förderndes Protein beschreiben, wobei letztere Publikationen überwiegen.<sup>156</sup> Ein Beispiel für den proliferationsfördernden Einfluss von Lipocalin-2 ist in Untersuchungen zum akuten Nierenversagen zu finden. In diesem Tiermodell wiesen mit LCN2 behandelte Tiere eine Abnahme der apoptotischen Zellen und eine Zunahme der Zellproliferation bei einer Ischämie auf.<sup>157</sup> Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse aus Untersuchungen in hepatozellulären Karzinomen. Die Überexpression von Lipocalin-2 und seinem Rezeptor in Hepatoma-Zelllinien führen zu verstärkter Apoptose, reduzierter Zellviabilität und Seneszenz.<sup>158</sup> Eine erhöhte Lipocalin-2-Expression konnte in humanen hepatozellulären Karzinomen (HCC) beobachtet werden, weshalb von einer proliferationsfördernden Wirkung des Lipocalins ausgegangen wurde. Es ist jedoch beschrieben, dass eine Überexpression von Lipocalin-2 in HCC-Zellen zu einer Verringerung des Zellwachstums, des invasiven Wachstums der Krebszellen und einer Inhibierung der Expression der Metalloproteinase MMP-2 führt. Dieser Effekt konnte als das Ergebnis der Inhibierung des c-Jun-N-terminal Kinase (JNK)und Phosphoinositid-3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/Akt)-Signalweges durch LCN2 identifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte Lipocalin-2 einen protektiven Effekt gegen das Voranschreiten der Krebserkrankung ausüben.<sup>159</sup> Desweiteren wurde eine negative Wirkung von LCN2 auf die Epithelialmesenchymale-Transition von HCC-Zellen beobachtet. Sowohl die Behandlung der Zellen mit dem epidermal growth factor (EGF), als auch mit dem transforming growth factor beta 1 (TGF-B1), führte zu einer Herabregulierung der Lipocalin-2-Expression und damit zu einer Verstärkung der Zellproliferation. Die Überexpression von

Lipocalin-2 führte zudem zu einer Suppression des Tumorwachstums in einem Maus-Modell.<sup>160</sup> Zu der Wechselwirkung zwischen Lipocalin-2 und einer Hepatitis C Virus-Infektion gibt es bislang noch sehr wenige Untersuchungen. Es ist jedoch beschrieben, dass die Expression von LCN2 mit steigender Leberschädigung im Verlauf der Krankheit stark zunimmt.<sup>161</sup> Die Wirkung einer differentiell regulierten Lipocalin-2-Expression bedarf daher weiterer Untersuchungen und scheint abhängig vom Zelltyp zu sein.

#### 1.6 Calpain-vermittelte Regulation der Protein-Expression

Calpaine wurden erstmals in den sechziger Jahren im Gehirn von Ratten entdeckt und als zytosolische, durch Calciumionen aktivierbare Proteasen beschrieben.<sup>162</sup> Ursprünglich wurde diese Protease als *calcium-activated neutral protease* (CANP) bezeichnet, da der optimale pH-Wert für ihre Wirkung im neutralen Bereich liegt.<sup>163</sup> Aufgrund ihrer Calcium-Abhängigkeit und ihrer Homologie zu der Cysteinprotease Papain wurde sie nach Aufklärung ihrer Sequenz in Calpain (*calcium-dependentpapain-like enzyme*) umbenannt.<sup>164</sup>

Die humane Calpain-Proteinfamilie umfasst nach heutigem Kenntnisstand fünfzehn Mitglieder, wobei die Expression der verschiedenen Varianten sich je nach Organismus und Gewebe unterscheidet. Während Calpain-1 und Calpain-2 im Menschen ubiquitär exprimiert werden, liegen andere Mitglieder der Familie Organund Zelltyp-spezifisch vor.<sup>165,166</sup> Die am besten untersuchten Calpain-Varianten sind Calpain-1 und Calpain-2, die früher auch als µ-Calpain und m-Calpain bezeichnet wurden. Die früheren Bezeichnungen leiten sich von der für die Aktivierung benötigten Konzentration an Ca<sup>2+</sup>-Ionen ab, wobei µ- für mikromolar und m- für millimolar steht. Beide Calpain-Formen sind Heterodimere, die sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzen, einem großen, Calcium-bindenden Protein und einer kleinen Cysteinprotease-Untereinheit. Während die kleine Untereinheit in beiden Calpain-Varianten dieselbe ist, unterscheiden sich die großen Untereinheiten voneinander.<sup>167</sup> Das Kriterium für die Einordnung der übrigen Calpaine in diese Proteinfamilie ist der Besitz einer Cysteinprotease-Kernsequenz. So konnten insgesamt fünfzehn Proteine identifiziert werden, die dieser Familie angehören und als Calpain-1 bis Calpain-15 bezeichnet werden. Bei Calpain-4, das auch *calpain small subunit 1* (CAPNS1) genannt wird, handelt es sich um die kleine Untereinheit, die mit den Calpainen 1 und 2 assoziiert vorliegt.<sup>168</sup>

Der Mechanismus der Calpain-Aktivierung erfolgt in mehreren Schritten. Die Stimulation diverser Rezeptoren oder der Einstrom von Calcium-Ionen führen zu einer Zunahme der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der Zelle. Dieses bindet an die Calpaine und führt über Konformationsänderungen zu ihrer Aktivierung. Die aktivierten Calpaine translozieren anschließend zu Phospholipiden in der Zellmembran und unterliegen dort einer Autolyse, die ihre Aktivität weiter steigert. Nach Bindung ihrer Substrate und deren Spaltung werden die Calpaine wiederum inaktiviert. Dies geschieht über ihren natürlichen Inhibitor, dem Calpastatin.<sup>169</sup> Die Bindung dieses Inhibitors erfolgt nur an die aktivierte Form des Calpains und ist daher ebenfalls ein Calcium-abhängiger Prozess. Desweiteren ist beschrieben, dass es sich hierbei um einen reversiblen Prozess handelt, so wird durch die Zugabe von Calcium-komplexierendem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zu Calpain/Calpastatin-Komplexen die Bindung dieser Proteine rückgängig gemacht.<sup>170</sup>

Calpaine sind an der Regulierung einer großen Zahl von Proteinen beteiligt und schneiden diese an keiner klar definierten, spezifischen Stelle. Eine etwa zehn Aminosäuren umfassende, sehr variable Seguenz beinhaltet die Schnittstelle für die Calpaine und ermöglicht so eine hohe Vielfalt an Substraten.<sup>171</sup> Hierzu zählen zum Beispiel Proteine des Zytoskeletts, wie  $\alpha$ -Fodrin, Talin und Vinculin. Die Proteolyse dieser Proteine kann zu Strukturänderungen, erhöhter Membranpermeabilität und zu Rissen in der Membran führen. Daneben ist eine Wechselwirkung von Calpainen mit Membranrezeptoren, wie dem EGF-Rezeptor, Enzymen der Signaltransduktion, wie die Protein-Kinase C (PKC) und verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie c-FOS und c-JUN beschrieben.<sup>172</sup> Neben der Calcium-vermittelten Aktivierung von Calpain-2 ist auch eine Wachstumsfaktor-abhängige Aktivität beschrieben. EGF (epidermal growth factor) aktiviert die MAP-Kinase ERK, welche wiederum über direkte Phosphorylierung von Calpain-2 dessen Aktivierung vermittelt. Dieser Vorgang ist zudem unabhängig von der Anwesenheit von Calciumionen und konnte sowohl in vitro, als auch in vivo beobachtet werden. Calpain-2 spielt daher eine wichtige Rolle in der Wachstumsfaktor-induzierten Zellmotilität.<sup>173</sup> Neben der Beteiligung der Calpain-Familie an verschiedenen Krankheiten, wie Diabetes Mellitus und

Atherosclerose, ist auch ein aktivierender Effekt des Hepatitis C Virus auf Calpaine beschrieben.<sup>174,175</sup> Die Bindung des viralen NS5A-Proteins an das endoplasmatische Retikulum führt zu einer Stressantwort und damit einhergehender Ausschüttung von Calcium-Ionen innerhalb der Zelle. Diese wiederum führen zu der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Mitochondrien, die den NF-kB-Signalweg aktivieren.<sup>176</sup> Die Zunahme der Calciumionen-Konzentration führt außerdem zu der Aktivierung von Calpainen, die durch den Abbau des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$ wiederum zur Aktivierung von NF-κB beitragen (Kapitel 1.4.4). Desweiteren konnte in diesen Untersuchungen beobachtet werden, dass, im Gegensatz zu der stabilen Expression von Calpain, in Anwesenheit von NS5A Calpastatin degradiert wird.<sup>135</sup> Die verstärkte Calpain-Aktivität führt zudem zu einer Prozessierung des viralen N-terminale Spaltprodukte verschiedener NS5A-Proteins in Größen. Die Anwesenheit eines 40 kDa und eines 24 kDa langen Produkts konnte durch den Einsatz von Calpain-Inhibitoren vollständig verhindert werden. Dies impliziert, dass NS5A gleichzeitig Aktivator und Substrat dieser Protease ist und Calpain vielleicht eine Rolle in der Regulierung der NS5A-Funktion spielt.<sup>177</sup> Außerdem resultiert die durch HCV und Calpain verstärkte NF-kB-Aktivität in einer Zunahme der Cyclooxygenase-2 (Cox-2)-Expression. Dieses durch verschiedene Stimuli induzierbare Enzym spielt eine wichtige Rolle in Krebserkrankungen, so auch in HCV-bedingten Hepatozellulären Karzinomen. Cox-2 inhibiert dabei über die Induktion von Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) die Apoptose der Tumorzellen und fördert ihre Zellproliferation. Auch die HCV-vermittelte Expression von Cox-2 ist durch Calpain-Inhibitoren reduzierbar und daher ein Calpain-abhängiger Prozess. Zudem konnte ein Effekt der erhöhten Cox-2 Expression auf die virale Replikation beobachtet werden. So wird die Replikation der viralen RNA herabreguliert, während die Translation der Virusproteine zunimmt.<sup>178</sup> Ein weiterer Faktor, der in Hepatozellulären Karzinomen verstärkt exprimiert wird und an der Tumorinvasion und Metastasenbildung beteiligt ist, ist das Osteopontin (OPN). Auch in diesem Fall führt der HCV-vermittelte Anstieg der Calciumionen-Konzentration über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und der Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und MEK1/2 zu einer Zunahme der Osteopontin-Expression. Das Vorläufermolekül des Osteopontins wird post-translationell durch Calpaine prozessiert und die aktive Form von der Zelle sezerniert.<sup>179</sup> Auch in der Unterdrückung der Apoptose durch HCV ist Calpain involviert. Das durch NS5A aktivierte Calpain degradiert Bid (BH3 interacting *domain death agonist*) und macht die Zellen unempfänglicher für apoptotische Signale. Hepatozyten aus HCV- transgenen Mäusen weisen daher eine geringe Bid-Expression und verstärkte Calpain-Aktivität auf.<sup>180</sup>

#### 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Hepatitis C Virus führt in mehr als 70 % der Fälle zu einer chronischen Infektion, die aufgrund von Symptomfreiheit meist bis zu der Entstehung von Leberfibrose oder Leberkarzinomen unerkannt bleibt. Wie alle persistierenden Viren hat auch HCV Mechanismen entwickelt, um die Immunantwort der Wirtszelle zu unterlaufen und wirtsspezifische Faktoren für seine eigene Replikation zu nutzen, ohne jedoch das Überleben der Zelle zu gefährden. Hierzu beeinflusst das Virus wichtige zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Ein durch das Virus auf vielfältige Art und Weise regulierter Signalweg ist der des Transkriptionsfaktors NF-κB, der für die Zytokinproduktion, Zellproliferation und Apoptose eine bedeutende Rolle spielt. HCV hemmt hierbei unter anderem den Abbau des NF-kB-Inhibitors IκBα und aktiviert auf diese Weise den Transkriptionsfaktor. Die Familie der IκB-Proteine umfasst jedoch acht Mitglieder, von denen bislang nicht bekannt ist, ob sie in Wechselwirkung mit dem Hepatitis C Virus stehen. Vorarbeiten aus unserer Gruppe legen nahe, dass HCV die Expression des untypischen  $I\kappa B$ -Proteins  $I\kappa B\zeta$ supprimiert.<sup>185</sup> Ziel dieser Arbeit war es daher den Einfluss des Virus auf die Expression von  $I\kappa B\alpha$ ,  $I\kappa B\beta$  und im besonderen  $I\kappa B\zeta$  näher zu untersuchen. Der Mechanismus der IkBZ-Suppression sollte aufgeklärt werden und die Bedeutung für die Signaltransduktion der Wirtszelle sowie die daraus entstehenden Vorteile für das Virus untersucht werden.

# 2 MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 Material, Substanzen und Lösungen

# 2.1.1 Materialien für die Zellkultur

75 cm <sup>2</sup> Gewebekulturflaschen	Greiner; Solingen, Deutschland
6 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
10 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
15 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
6-Well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
12-Well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
96-Well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
Minisart Plus Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Minisart Plus Sterilfilter 0,45 µm	Sartorius; Göttingen, Deutschland

# 2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

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
Zeocin	Invitrogen; Karlsruhe, 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
Bromphenolblau	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
HiPerFect™ Transfection Reagent	Qiagen; Hilden, Deutschland

IL-1β, human	Roche; Mannheim, Deutschland
Leupeptin	Sigma; München, Deutschland
Lipocalin-2, human	Abcam; Cambridge, UK
Na-Pyrophosphat	Sigma; München, Deutschland
siGenome Non-Targeting siRNA 1	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome Non-Targeting siRNA 3	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome Non-Targeting siRNA 5	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool siRNA NFKBIZ	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool siRNA CAPN1	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool siRNA CAPN2	Dharmacon; Colorado, USA
Spermidine	Sigma; München, Deutschland
TNFα, human	Roche; Mannheim, Deutschland
Triton X-100	Merck; Darmstadt, Deutschland
WL Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer; Rodgau-Jügesheim,
	Deutschland

# 2.1.4 Kits

miRNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
miScript II RT Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Maxiprep 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
Ubiquitinated Protein Enrichment Kit	Merck; Darmstadt, Deutschland
VenorGeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs; Berlin, Deutschland
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche; Mannheim, Deutschland

# 2.1.5 PCR und Klonierung

rNTP Mix	Roche; Mannheim, Deutschland
High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs; Ipswich, 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
T7-RNA-Polymerase	Promega; Madison, USA

# 2.1.6 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: Verwendete	Escherichia	coli-Stämme
-------------------------	-------------	-------------

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
One Shot <sup>®</sup>	$F^{-}$ mcr A $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\varphi$ 80/acZ $\Delta$ M15	Invitrogen;
TOP10	∆ <i>lac</i> X74 <i>r</i> ∆ (ara-leu) 7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K <i>rps</i> L	Karlsruhe,
Chemically	(Str <sup>R</sup> ) <i>end</i> A1 <i>nup</i> G4	Deutschland
Competent		
<i>E. coli</i> JM109	endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (rk. , mk+)	Promega;
	relA1 supE44 ∆(lac-proAB) [F' traD36 proAB	Madison,
	<i>laq</i> lqZ∆M15]	USA

# 2.1.7 Plasmide

#### Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
JC1	pFK_JH1/J6/C-846_dg	R. Bartenschlager; Heidelberg,
		Deutschland

## 2.1.8 Antikörper

Primärantikörper

Akt	Cell Signaling; Danvers, USA
ß-actin	Abcam; Cambridge, UK
Birc3 (c-IAP2 (58C7))	Cell Signaling; Danvers, USA

Calpain 1	Cell Signaling; Danvers, USA	
Calpain 2	Cell Signaling; Danvers, USA	
GAPDH	Biodesign; Saco, USA	
Gbp2	Santa Cruz; Santa Cruz, USA	
HCV NS3	Abcam; Cambridge, UK	
HCV NS5A [H26]	Abcam; Cambridge, UK	
ΙκΒα	Santa Cruz; Santa Cruz, USA	
ΙκΒβ	Santa Cruz; Santa Cruz, USA	
ΙκΒζ	Cell Signaling; Danvers, USA	
Lipocalin-2	R&D-Systems Minneapolis, USA	
МАРКАРК-2	Cell Signaling; Danvers, USA	
pAkt (Ser473)	Cell Signaling; Danvers, USA	
pMAPKAPK-2 (Thr222)	Santa Cruz; Santa Cruz, USA	
PARP	CellSignaling; Danvers, USA	
p38 (C-20)	Santa Cruz; Santa Cruz, USA	
p-p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling; Danvers, USA	
TNFAIP3 (A20 (D13H3)	Cell Signaling; Danvers, USA	
Ubiquitin	Abcam; Cambridge, UK	

Sekundärantikörper

HRP-anti-KaninchenDAKO; Hercules, USAHRP-anti-MausDAKO; Hercules, USA

HRP-anti-Ziege

DAKO; Hercules, USA

# 2.1.9 Inhibitoren

Actinomycin-D	Sigma; München, Deutschland	
Akt Inhibitor V, Triciribine	Merck; Darmstadt, Deutschland	
ALLN	Merck; Darmstadt, Deutschland	
JNK Inhibitor II	Merck; Darmstadt, Deutschland	
MG132	Merck; Darmstadt, Deutschland	
miScript miRNA Inhibitoren	Qiagen; Hilden, Deutschland	
PF3644022	Sigma; München, Deutschland	
Proteasom Inhibitor II	Merck; Darmstadt, Deutschland	
SB203580	Merck; Darmstadt, Deutschland	
U0126	Merck; Darmstadt, Deutschland	

# 2.1.10 Computerprogramme und Datenbanken zur Datenauswertung

microRNA	microrna.org	
miR-Base	www.mirbase.org	
Targetscan	www.targetscan.org	
Primer Blast	www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-	
	blast/	

Nicht aufgeführte Chemikalien zur Herstellung der Pufferlösungen wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Taufkirchen, Deutschland) oder Fluka (St. Gallen, Schweiz) in *p. A.* Qualität bezogen.

## 2.2 Methoden

# 2.2.1 Zellbiologische Methoden

## Kultivierung von Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Hepatomazelllinien wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5 %  $CO_2$  und 37 °C in DMEM Medium mit 10 % (v/v) Hitze-inaktiviertem FCS kultiviert.

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Zusätze
Huh7	humane	DMEM/Nutrient Mix F-12	10 % ECS
	Hepatomazelllinie		
Huh9-13*	humane	DMEM/Nutrient Mix F-12	
	Hepatomazelllinie;		10 % ECS
	subgenomisches		1 mg/ml G/18
	HCV Replikon		1 mg/mi 0410
	(NS3-NS5B)		
Huh21-5*		DMEM (4,5 g/l Glukose)	10 % FCS
	humane		2 mM Glutamin
	Hepatomazelllinie;		100 U/ml Pen/Strep
	HCV Volllängen-		1 x Nicht-essentielle-
	Replikon		Aminosäuren
			0,1 mg/ml G418
Huh7.5**	humane Hepatomazelllinie	DMEM (4,5 g/l Glukose)	9 % FCS
			2 mM Glutamin
			100 U/ml Pen/Strep
			1 x Nicht-essentielle-
			Aminosäuren

Tabelle 2.3: Kultivierung der Hepatomazelllinien

\* zur Verfügung gestellt von R. Bartenschlager; Heidelberg, Deutschland

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

Zur Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff, wurden diese bei einer Konfluenz von 60 % trypsiniert, pelletiert (1000 rpm, 4 °C, 4 min; Beckmann CS-15R Centrifuge; Rotor S4180) und in Einfriermedium (DMEM, 20 % FCS und 10 % DMSO) aufgenommen. Nach einer Verweildauer von ca. 24 Stunden bei -80 °C wurden die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt. Alle Zelllinien wurden regelmäßig mittels PCR (VenorGeM Mycoplasma Detection Kit) auf die Anwesenheit von Mycoplasmen getestet.

### Transfektion von siRNA

Der Einsatz von small interference RNA (siRNA) dient zum gezielten Ausschalten (*knockdown*) von Genen in einer Zelle und ermöglicht so die genauere Untersuchung der Genfunktionen. Hierbei binden die kurzen RNA Fragmente an die komplementäre RNA des entsprechenden Gens und verhindern durch Degradierung die Expression desselben.

Die Transfektion der siRNA erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Dharmafect 4 von Dharmacon. Hierzu wurden am Vortag der Transfektion Zellen in 6-Well-Gewebekulturplatten ausgesät. Zur Zeit der Transfektion betrug die Konfluenz der Zellen ca. 30 %. Die spezifische siRNA und ein Kontoll-siRNA-Mix aus den Non-Targeting siRNA's 1, 3 und 5 wurden in einer Endkonzentration von 50 nM pro Well eingesetzt. Die Transfektion erfolgte nach einem Protokoll von Thermo Scientific mit 5 µl Dharmafect 4 pro Well. Im ersten Schritt wurden die siRNA's mit 1 x siRNA-Puffer auf 5 µM verdünnt. 20 µl der siRNA's und 5 µl Dharmafect 4 wurden mit 180 bzw. 195 µl Antibiotika-freiem OptiMEM versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden der siRNA-Ansatz und der Dharmafect 4-Ansatz in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert um eine Komplexbildung zwischen der siRNA und dem ermöglichen. Den Transfektionsansätzen Transfektionsreagenz zu wurde abschließend 1600 µl Antibiotika-freies Kulturmedium zugesetzt und der vollständige Ansatz zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 6 Stunden Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz durch frisches Medium ersetzt um toxische Effekte der siRNA zu verringern. Die entsprechenden Versuche mit den transfizierten Zellen und die Ernte wurden nach weiteren 72 Stunden Inkubationszeit bei einer Konfluenz von 80-90 % durchgeführt.

#### Transfektion von miScript miRNA Inhibitoren

Für die Transfektion von miRNA Inhibitoren wurden Zellen am Vortag in 6-*Well*-Gewebekulturplatten ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 30 %. Der spezifische miRNA-Inhibitor und ein *negative control* Inhibitor wurden mit einer Endkonzentration von 50 nM pro *Well* eingesetzt. Hierzu wurden die in RNAse-freiem Wasser gelösten Inhibitoren in der entsprechenden Menge mit 100 µl

OptiMEM und 12 µl HiPerfect Transfektionsreagenz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 2,3 ml frischem, Antibiotika-freiem Kulturmedium versetzt und 118 µl Transfektionsansatz tropfenweise hinzugegeben. Nach 48 h wurde der Transfektionsansatz durch frisches Kulturmedium ersetzt und nach weiteren 24 h wurde das entsprechende Experiment durchgeführt.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### Kultivierung von Bakterienstämmen

Für die Kultivierung der verwendeten Bakterienstämme TOP10 und JM109 wurde LB-Medium verwendet (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton und 5 g/l Natriumchlorid, pH Agar-Platten wurde dem Medium 15 g/l Agar hinzugesetzt. 7,5). Für Selektionsmedien enthielten weiterhin 50 mg/l Ampicillin. Für eine langfristige bei -80 °C Lagerung der Bakterien wurden Glycerolstammkulturen aus Bakterienkulturen mit 20 % Glycerol hergestellt.

#### Herstellung chemisch kompetenter E. coli Bakterien

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wurde zunächst ein Verdünnungsausstrich aus einem entsprechenden *E. coli* Glycerolstock auf LB-Agar-Platten angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer einzelnen Bakterienkolonie wurde dann eine Übernacht-Kultur angeimpft, die am nächsten Tag in 250 ml LB-Medium mit 20 nM MGSO<sub>4</sub> überführt wurde. Das Zellwachstum wurde bei 37 °C fortgesetzt, bis eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,4 bis 0,6 erreicht wurde. Die Kultur wurde anschließend bei 4000 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 100 ml TFB1-Puffer (30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 10 ml TFB2-Puffer (100 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 6,5) resuspendiert und 15-60 Minuten lang auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden dann aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

## Transformation kompetenter E. coli Bakterien

Für die Transformation wurden 100 µl der bei -80 °C gelagerten kompetenten E.coli-Zellen JM109 und 1 µl der entsprechenden Plasmid-DNA auf Eis aufgetaut und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 20 Minuten auf Eis folgte ein 42 °C. 45 Sekunden langer Hitzeschock bei Hiernach wurde der Transformationsansatz sofort für 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 900 µl auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium (0,5 g/l Hefeextrakt, 2 g/l Trypton, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Glukose, pH 7,0) versetzt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 50 bis 100 µl der Reaktionslösung wurden auf LB-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthalten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert.

Die Transformation der chemisch kompetenten TOP10-Zellen erfolgte nach Hersteller-Angaben.

#### Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mittels QIAprep Spin Maxiprep Kit von Qiagen. Die Konzentration der gewonnen DNA wurde mittels NanoDrop spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt.

#### Isolierung von RNA

Die auf Gewebekulturschalen oder Gewebekulturplatten ausgesäten Zellen wurden nach Durchführung der Experimente bei eine Konfluenz von 60 bis 80 % für die Isolierung von mRNA in 350 µl RLT-Puffer pro Schale oder *Well* (1:100 mit b-Mercaptoethanol versetzt) lysiert. Die Homogenisierung der Lysate erfolgte über das QIAshredder Kit von Qiagen. Die Isolierung und Aufreinigung der mRNA wurde nach Herstellerangaben mittels des RNeasy Mini Kits von Qiagen durchgeführt. Die RNA wurde in 70 µl Wasser eluiert. Abschließend wurde die Konzentration der RNA am

NanoDrop (NanoDrop 1000; PeQLab) spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt.

Für die Isolierung von miRNA aus den Zellen wurden diese in 700 µl QIAzol Lyse-Puffer lysiert und nach Herstellerangaben mit dem miRNeasy Mini Kit isoliert und aufgereinigt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte auch hierbei spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm.

## cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA aus der zuvor gewonnen mRNA wurde das Quantitect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Es wurde 1 µg der mRNA für einen Ansatz eingesetzt und die erhaltene cDNA wurde in 100 µl (Verhältnis 1:5) Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Die Reinheit der Synthese wurde mittels einer Reverse-Transkriptase-freien Probe überprüft.

Die Synthese der cDNA aus miRNA dagegen erfolgte mittels des miScript II RT Kits von Qiagen. Auch hierzu wurde 1 µg der miRNA für einen Ansatz eingesetzt. Durch die Verwendung des HiFlex-Puffers war es möglich sowohl mRNA als auch miRNA in cDNA umzusetzen. Die erhaltene cDNA wurde in 80 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und ein weiteres Mal im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt. Die Reinheit der Synthese wurde mittels einer Reverse-Transkriptase-freien Probe überprüft.

#### Real-Time-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR ist es möglich über eine herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion die cDNA-Menge eines gewünschten Gens relativ zu einer Referenz in Echtzeit zu bestimmen. Hierzu wird der DNA-Farbstoff SYBR-Green verwendet, der in der Lage ist an doppelsträngige DNA zu binden und auf diese Weise einen fluoreszierenden Komplex zu bilden. Die Fluoreszenz nimmt hierbei proportional zu der Menge der amplifizierten DNA zu. Die Quantifizierung der Menge eines bestimmten amplifizierten Gens bedarf spezifischer Primer. Mittels der Pubmed-Datenbank wurden Primer designed, die sowohl spezifisch ein bestimmtes Gen generieren, als auch eine geringe Neigung zur Ausbildung von
Sekundärprodukten, wie Primer-Dimeren, zeigen. Ausgewählt wurden hierbei Primer mit einem GC-Gehalt von ca. 50 %, einer Schmelztemperatur von ca. 59 °C und einer Amplikon-Länge von 90 bis 120 Basenpaaren. Die verwendeten Primer wurden mit einer Schmelzkurven-Analyse auf ihre Eignung getestet. Für die Real-Time-PCR wurden pro *Well* 1,2 µl der zu untersuchenden cDNA mit 2 µl des entsprechenden Primerpaars, 9,3 µl RNase-freiem Wasser und 12,5 µl SYBR-Green PCR Mastermix versetzt. Die PCR erfolgte mit standardisierten Parametern in 40 Zyklen und bei einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C (10 min 95 °C, 40 Zyklen mit 15 s 95 °C und 1 min 60 °C) am ViiA<sup>TM</sup>7 Real-Time PCR System der Firma *Applied Biosystems*. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Für die Quantifizierung der cDNA-Menge wurde die  $\Delta$ CT-Methode verwendet. Der hierzu benötigte CT-Wert ergibt sich aus der Anzahl der Zyklen, bei der das erfasste Fluoreszenz-Signal einen definierten, signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegenden, Schwellenwert übersteigt. Als Referenz wurde hierbei das humane SDHA (Succinatdehydrogenase Komplex, Untereinheit A) verwendet.

Für die Quantifizierung der aus miRNA gewonnen cDNA wurde ein wie folgt abweichendes Protokoll verwendet. Die für das Primer-Design benötigten Sequenzen wurden der Datenbank miR-Base entnommen. Als Primerpaar wurde für die Real-Time-PCR der spezifische miRNA Primer und ein miScript Universal Primer aus dem miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) eingesetzt. Für die PCR wurden pro *Well* 2 µl der zu untersuchenden cDNA mit 12,5 µl des SYBR Greens, 5 µl des Primerpaars und 5,5 µl RNase-freiem Wasser gemischt. Desweiteren unterschieden sich die PCR-Parameter von den verwendeten Standard-Parametern durch einen 15 minütigen Aktivierungsschritt, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus 15 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Anlagerung bei 55 °C und 34 s Extension bei 70 °C. Für die Auswertung wurde ebenfalls die  $\Delta$ CT-Methode verwendet, wobei der Schwellenwert nach Angabe des miRNA-Kit Herstellers Qiagen für den Einsatz von 1-3 ng miRNA manuell auf einen C<sub>T</sub>-Wert von 0,02 gesetzt wurde. Als Referenz wurde auch bei der Quantifizierung von miRNA das humane SDHA verwendet.

## Tabelle 2.4: Für die Real-Time-PCR verwendete Primer

Primer-Bezeichnung		Nukleotidsequenz 5' → 3'
humanes SDHA	sense	AGA TGT GGT GTC TCG GTC GAT
	antisense	CGT GAT CTT TCT CAG GGC CA
humanes ΙκΒζ	sense	GCT AAT CCC ATG CAG ACT
	antisense	GAA CGT GTC ACC ATC TGC AT
humanes LCN2	sense	CGC AAA AGA TGT ATG CCA CC
	antisense	GCA ACC TGG AAC AAA AGT CC
humanes II -18	sense	GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA
numanes IL-10	antisense	ACC TCT AGG CTG GCT ATC TT
humanes CXCI 1	sense	CTG GCG GAT CCA AGC AAA T
numanes excer	antisense	CAT TCC CCT GCC TTC ACA AT
humanes CXCL3	sense	TGC TTG TAG GGC ATA ATG CCT
	antisense	AGA GAA ACG CTG CAG AAT GGA
humanes CXCL8	sense	AGA AGT TTT TGA AGA GGG CTG AGA
numanes CACLO	antisense	CAG ACC CAC ACA ATA CAT GAA GTG
humanes CXCI 5	sense	ACG CAA GGA GTT CAT CCC AA
numanes 6X0E5	antisense	TTT CCT TCC CGT TCT TCA GGG
humanes CCI 20	sense	ACG GCA GCT GGC CAA TGA AGG
numanes CCL20	antisense	GTC TGT TTT GGA TTT GCG CAC ACAG
humanes CEBP8	sense	CGC GAG GGC AAC AAC AT
numanes CEDF0	antisense	TTC TCG TTC TCA GCC GAC AG
humanes TNFAIP3	sense	TTG TTG AAA CGG GGC TTT GC
numanes nu Air S	antisense	CCA TGG GTG TCT GTG TGG AA
humanes GBP1	sense	AAC CAT CAA CCA GCA GGC TA
Initialies ODF I	antisense	AGT CAG CTG AAT CCT CAA CCT
humanes GBP2	sense	AGC ATG GGA ACC ATC AAC CA
HUMANES ODFZ	antisense	TAC CAG GTG AGG AGT TTG CC
humanes BIRC2	sense	TGA TGG TGG CTT GAG GTG TT
	antisense	ACA AAC TCT TGG CCT TTC ATT CG
humanes BIRC3	sense	TCC ATG GGT TCA ACA TGC CA
	antisense	ACT GGC TTG AAC TTG ACG GA
humanes TNF $\alpha$	sense	AAG CCT GTA GCC CAT GTT GTA

	antisense	GCT GGT TAT CTC TCA GCT CCA
humanes p105	sense	TGG ACT ACC TGG TGC CTC TA
	antisense	ACA ATA ACC TTT GCT GGT CCC
humanes SOD2	sense	CTA ACG GTG GTG GAG AAC CC
	antisense	GAG CCT TGG ACA CCA ACA GA
HCV NS5A	sense	AAT TAT TCT AGG GCG CTG TGG
HOV NOSA	antisense	GAG CTG TGA CCC AAC CAG GT
HCV NS5A JFH1	sense	CCG TTG CTG GTT GTG CTC T
	antisense	GTT GCT GGA GGG CTT CTG AT
	sense	CTA CGG TGT GCG CCA GAG
	antisense	CCC AAA CGG TAC AGG AGA GG
hsa-miR-124a		TTA AGG CAC GCG GTG AAT GC
hsa-miR-187-3p		GAC ACA GCC TAC TTT GGG TC
hsa-miR-187-5p		GAA ACT GCC TTC CTT GCT ACC
hsa-miR-483-3p		TCA CTC CTC TCC TCC CGT CT
hsa-miR-376b		ATC ATA GAG GAA AAT CCA TG
hsa-miR-186-3p		GCC CAA AGG TGA ATT TTT TG
hsa-miR-1915-5p		ACC TTG CCT TGC TGC CCG GG
hsa-miR-421		ATC AAC AGA CAT TAA TTG GG
hsa-miR-2113		ATT TGT GCT TGG CTC TGT CA
hsa-miR-1227		CGT GCC ACC CTT TTC CCC A
hsa-miR-554		GCT AGT CCT GAC TCA GCC AG
hsa-miR-591		AGA CCA TGG GTT CTC ATT G
hsa-miR-24-2-5p		TGC CTA CTG AGC TGA AAC AC
hsa-miR-512-1-5p		CAC TCA GCC TTG AGG GCA CT
hsa-miR-1228-5p		GTG GGC GGG GGC AGG TGT GT
hsa-miR-200b-5p		ATC TTA CTG GGC AGC ATT GG
hsa-miR-548a-3p		AAA CTG GCA ATT ACT TTT GC
hsa-miR-527		CTG CAA AGG GAA GCC CTT TC
hsa-miR-381		TAC AAG GGC AAG CTC TCT GT
hsa-miR-921		CTA GTG AGG GAC AGA ACC AG
hsa-miR-624-5p		AGT ACC AGT ACC TTG TGT TC
hsa-miR-1303		TTT AGA GAC GGG GTC TTG CT

hsa-miR-374a-3p	CTT ATC AGA TTG TAT TGT AA
hsa-miR-374b-3p	CTT AGC AGG TTG TAT TAT CA

# 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

## Lyse von Zellen

Die auf Gewebekulturschalen oder Gewebekulturplatten kultivierten Zellen wurden nach Durchführung der Versuche zunächst mit kaltem PBS, das mit 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> versetzt war, gewaschen und anschließend durch die Zugabe des Lyse-Puffers mTLP (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 % Triton X-100, 136 mM NaCl, 20 mM Natrium-Pyrophosphat, 10 % Glycerol, 50 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 μg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 4 mM Benzamidin, 2 mM EDTA, 0,2 mM Pefabloc, 0,2 % SDS) mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Die verwendete Lyse-Puffer-Menge richtete sich hierbei nach der Größe der Gewebekulturschale und der Konfluenz der Zellen. Für 6 cm Schalen wurden hierbei 120 bis 180 µl verwendet, für 6-Well-Platten 80 bis 120 µl und für 10 cm Schalen 200 bis 300 µl. Die lysierten Zellen wurden gut gevortext und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach möglichst vollständiger Lyse wurden die Zellen für 15 min bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R; Rotor 5417C/R) und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und der Proteingehalt mittels des Protein-Assays von BioRad bestimmt. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

# Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Protein-Assay ist eine spektralphotometrische Methode zur Bestimmung der Protein-Konzentration einer Lösung.<sup>181</sup> Hierzu wurde ein Bradford-Assay von Biorad verwendet, der nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. In diesem Verfahren wird der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau eingesetzt, dessen Absorptionsmaximum sich bei Anwesenheit von Proteinen von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Anhand der Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm

(Ultrospec 2100 pro; Amersham Biosciences) ist es somit möglich die Proteinkonzentration einer Lösung zu bestimmen.

## SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Für die Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Bei dem von U. Laemmli entwickelten Verfahren wird die Probe zunächst im Sammelgel aufkonzentriert und anschließend im Trenngel getrennt. Durch das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat werden die Proteine denaturiert und erhalten eine negative Ladung. Durch Anlegen von Spannung wandern die negativ geladenen Proteine durch das Gel und werden nach ihrer Größe getrennt. <sup>182</sup> Je nach Experiment wurden 30 bis 70 µg Protein aufgetragen, die zuvor mit dem entsprechenden Volumen 4-fach Lämmli-Puffer (250 mM Tris/HCI (pH 6,8), 40 % Glycerol, 5 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau, 8 % β-Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert wurden. Abhängig von der Größe des zu detektierenden Proteins erfolgte die Auftrennung der Proben in SDS-Polyacrylamidgelen mit einer PAA-Konzentration von 8 bis 12 %. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde der Precision Plus Protein<sup>™</sup> Dual Color Standard von Biorad mit aufgetragen. Mit Hilfe des Gelelektrophoresesystems von Biometra wurden die Proteine je nach Gelgröße bei einer Spannung von 160 bzw. 240 V für 4 bzw. 6 h aufgetrennt.

Nach Beendigung des Laufs erfolgte der Transfer der Proteine von dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Amersham). Dieses als Western-Blot bezeichnete Verfahren ist eine Methode, mit der Proteine spezifisch nachgewiesen werden können. Hierzu werden die Proteine von einem SDS-Gel auf eine Trägermembran übertragen. Die Membran wird zunächst mit einem primären Antikörper behandelt, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet. Anschließend wird ein entsprechender sekundärer Antikörper verwendet, der den primären Antikörper erkennt. Der sekundäre Antikörper ist mit einer horseradish peroxidase (HRP) konjugiert, die durch eine enzymatische Reaktion mit der Detektionslösung Chemilumineszenz erzeugt. Durch die Detektion des freiwerdenden Lichtes kann sowohl die Position des Proteins auf der Membran und damit durch den Größenmarker die Größe der Proteine bestimmt werden, als auch die Menge an Protein.<sup>183</sup> Hierbei wurde die *Semidry-Blotting-*Variante des Western Blots in einer Elektroblotting-Apparatur von Biorad verwendet. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> für 90 bis 150 min abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine. Der Stromfluss zwischen den Elektroden wurde durch die Verwendung von in Flüssigkeit getränktem Whatman-Papier (Schleicher & Schuell) sichergestellt. Hierzu wurden drei verschiedene Puffersysteme mit unterschiedlichen Ionenstärken eingesetzt (Anodenpuffer 1: 0,3 M Tris, 20 % Methanol; Anodenpuffer 2: 0,025 M Tris, 20 % Methanol; Kathodenpuffer: 0,04 M 6-Aminocapronsäure, 20 % Methanol). Im Anschluss wurde für die Detektion der Proteine zunächst die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % BSA in TBS-T (20 mM Tris/HCI (pH 7,4), 137 mM NaCI, 0,1 % Tween) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu sättigen. Darauf folgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T über Nacht bei 4 °C. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde in drei 20-minütigen Waschschritten mit TBS-T bei Raumtemperatur entfernt. Danach folgten die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:3000 in TBS-T bei Raumtemperatur und drei weitere Waschschritte. Die Detektion der Proteine wurde mit Hilfe des WL Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer) und ECL-Filmen von GE Healthcare in einer Entwicklermaschine der Firma Kodak durchgeführt. Für die mehrfache Detektion verschiedener Proteine auf einer Membran, wurden die gebildeten Protein-Antikörper-Komplexe mittels ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Millipore) von der Membran entfernt.

## **Ubiquitinylierung**

Für die Detektion ubiquitinylierter Proteine wurde das *Ubiquitinated Protein Enrichment Kit* der Firma Merck verwendet. Hierbei wurden die Zellen auf 10 cm Gewebekulturschalen kultiviert und bei einer Konfluenz von etwa 90 % stimuliert und Proteinlysate geerntet. 500 bis 1000 µg Protein wurden mit mTLP auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und mit 30 µl der *Polyubiquitin affinity beads* versetzt. Für die negativ-Kontrolle wurden einer Probe *control beads* zugesetzt, die keine ubiquitinylierten Proteine binden. Die Proteinlysate wurden zusammen mit den *beads* für vier Stunden bei 4 °C unter ständigem Invertieren inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 s bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände

verworfen. Es folgten zwei Waschschritte mit dem Triton-Lysepuffer und zwei Waschschritte mit dem Triton-Waschpuffer (entspricht dem Triton-Lysepuffer, enthält aber nur 0,1 % TritonX-100). Abschließend wurden die *beads* in 40  $\mu$ l 2xLämmli mit  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Überstände wurden in Immunoblot-Analysen eingesetzt.

## <u>XTT-assay</u>

Das Prinzip dieses Zellproliferationsassays beruht auf der Fähigkeit von lebenden die Substanz 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-Zellen carboxanilidsalz (XTT) durch mitochondriale Enzyme in eine wasserlösliche, farbige Formazan-Form umzusetzen. Daher ist es mit diesem Test möglich die Zahl der metabolisch-aktiven, also proliferierenden, Zellen zu bestimmen. Anhand der Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm kann die Konzentration des Farbstoffes bestimmt werden, die direkt proportional zu der Anzahl an metabolisch-aktiven Zellen ist. Für den XTT-assay wurden Huh7 Zellen (2500 Zellen/Well) und Huh9-13 Zellen (4250 Zellen/Well) in einer 96-Well-Gewebekulturplatte ausgesät und nach 24 h mit 100 ng/ml Actinomycin-D pro Well und einer zunehmenden Konzentration von 0 bis 80 ng/ml an LCN2 behandelt. Nach der entsprechenden Stimulationszeit wurde das Medium durch frisches, Stimulusfreies Kulturmedium ersetzt und 50 µl der Zellproliferations-Lösung (XTT Labeling Reagent 1:50 mit Electron-coupling Reagent versetzt) pro Well hinzugegeben. Die Absorption dieser Zellen wurde nach 4 h Inkubationszeit bei 450 nm bestimmt (Multiskan Spectrum; Thermo Scientific) und damit Rückschlüsse auf den Einfluss der steigenden LCN2-Konzentration auf die Zellproliferation und Apoptose der Zellen gezogen.

## Primäre humane Hepatozyten

Die Präparation primärer humaner Hepatozyten erfolgte über eine 3-Schritt Perfusion von Lebergewebestücken. Hierbei wurde das Lebergewebestück direkt nach der Entnahme in kaltes PBS w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> auf Eis gelegt und in die größten Gefäße Heparin gespritzt. Die Perfusion der Leber erfolgte unter Verwendung einer

Schlauchpumpe bei einem Volumenstrom von 20 ml/min durch Kanülierung der Venen-Eingänge zunächst für 10 min mit Puffer 1 (5-fach Puffer 1, pH 7,3: 0,2 mM EGTA, 10 mM Hepes, 7 mM KCl, 143 mM NaCl). Darauf folgten weitere 5 min Spülung des Leberstückes mit Puffer 2 (5-fach Puffer 2, pH 7,48: 50 mM Hepes, 7 mM KCl, 100 mM NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>) und 10 min mit Puffer 3 (150 ml 1-fach Puffer 2, 3 g BSA, 50 mg Collagenase IV der Firma Sigma Aldrich). Aus der blutleeren Leber wurden durch den Collagenase-haltigen Puffer die Hepatozyten aus ihrem Zellverbund gelöst. Unter sterilen Bedingungen wurde mit einer Pinzette die Leberkapsel geöffnet und die Zellen in Puffer 3 ausgeschüttelt. Die Zellen wurden über ein 70 µm Zellsieb gefiltert und durch dreimaliges Zentrifugieren (3 min, 50 rcf, 18 °C, Acc 2, Dec 2) wurden die Hepatozyten von den Nicht-Parenchymzellen (Überstand) getrennt. Die Hepatozyten wurden in 10 ml Wasch/Attachment-Medium (William's Medium E supplementiert mit 10 % FCS, 100 nM Dexamethason, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung) aufgenommen und die Zellzahl und Vitalität der Zellen durch Trypanblau-Färbung bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf 2 Millionen Zellen/ml verdünnt und auf zuvor mit Collagen-I-beschichteten Platten ausgesät (2 x 10<sup>6</sup> Zellen/6-Well-Platte). Nach drei Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen um die toten Zellen zu entfernen, und dann in Pre-Starvation Medium (William's Medium E supplementiert mit 100 nM Dexamethason, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung) über Nacht kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Drei Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und bis zum Versuchsende in Starvation Medium (William's Medium E supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 1 %

## 2.2.4 Hepatitis C Virus Infektionssystem

Penicillin/Streptomycin-Lösung) kultiviert.

## In vitro Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde die virale DNA aus dem JC1-Plasmid isoliert und 10 µg pro Ansatz mit Hilfe des Restriktionsenzyms Mlu I für 1 h bei 37 °C linearisiert. Mittels QIAquick PCR Purification Kit wurde die linearisierte DNA aufgereinigt und in 60 µl Wasser eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 20 µl 5-fach RRL-Puffer

(400 mM Hepes (pH 7,5), 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Spermidin, 200 mM DTT), 12,5 µl rNTPs (25 mM), 2,5 µl RNasin (40 U/µl) und 4 µl T7-RNA-Polymerase versetzt. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden weitere 2 µl T7-RNA-Polymerase hinzugefügt und die Inkubation des Ansatzes über Nacht fortgesetzt. Die im Anschluss noch übrig gebliebene DNA wurde durch 30 min Inkubation mit 2,5 µl DNase [3 U/µl] entfernt und die gewonnene RNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Abschließend wurde die Konzentration der RNA am NanoDrop (NanoDrop 1000; PeQLab) spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt.

# **Elektroporation**

Huh7.5 Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % mit 10 ml PBS w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> je Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) gewaschen und für 3 min bei 37 °C trypsiniert. Die Zellen wurden in 8 ml Kulturmedium aufgenommen und je 1,5 \* 10<sup>7</sup> Zellen pro 15 ml Reaktionsgefäß aufgeteilt. Nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei 700 rpm (Beckmann CS-15R Centrifuge; Rotor S4180) und 4 °C wurde das Pellet mit PBS gewaschen und in 1 ml Cytomix (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,6, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) mit ATP (1:50) und GSH (1:50) resuspendiert. Für die Elektroporation wurden 400 µl der Zellsuspension mit 10 µg der JC1 RNA versetzt und in einer Pulskammer bei 975 µF und 270 V elektroporiert. Die Zeitkonstante lag hier bei etwa 20 ms. Je 1,5 Ansätze wurde in 18 ml Huh7.5 Medium aufgenommen und in einer 15 cm-Schale kultiviert. Die Virusproduktion beginnt nach etwa vier Stunden.

# Virusernte und PEG-Fällung

Die Virusernte erfolgte 48 h, 72 h und 96 h nach der Elektroporation der HCV RNA in Huh7.5 Zellen. Das virushaltige Medium wurde abgenommen und für 5 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Den Zellen wurde 20 ml frisches Huh7.5 Medium je 15 cm Schale zugesetzt. Der Überstand wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Abnahme des Mediums nach 96 h bei 4 °C gelagert. Zur Virusfällung wurden zu je 20 ml virushaltigem Medium je 4,8 ml 40 % PEG-8000 in PBS zugegeben und für 3 Tage bei 4 °C gelagert. Das gefällte Virus wurde durch 90 min Zentrifugation bei 8000 x g und 4 °C pelletiert. Das Virus-Pellet wurde abschließend in DMEM aufgenommen und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

# <u>TCID50</u>

Die Tissue Culture Infection Dose 50 (TCID50) beschreibt die Menge an Virussuspension die nötig ist um 50 % der behandelten Zellen zu infizieren. Zur Bestimmung der TCID50 wurden Huh7.5 Zellen auf einer 96-Well-Platte ausgesät (0,01\*10<sup>6</sup> Zellen in 200 µl/ Well) und nach 24 h Stunden mit Verdünndungen des Virus von 1:10 bis 1:50 infiziert. Hierbei wurden je sechs Wells nebeneinander mit der gleichen Verdünnung infiziert. Ausgehend von jeder Verdünnung wurden 40 µl von einem Well in das darunter liegende Well überführt und auf diese Weise sieben 1:6 Verdünnungen durchgeführt. Nach 72 h Inkubationszeit wurden die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen und für 15 min bei -20 °C mit Methanol fixiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschritt und die Zellen wurden mit 0,5 % TritonX-100/PBS permeabilisiert. Nach weiteren drei Waschschritten wurde das HCV-Protein NS3 durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers in einer 1:1000 Verdünnung gefärbt. Als Sekundärantikörper diente hierbei Anti-mouse-HRP in einer 1:200 Verdünnung. Die horseradish peroxidase setzt wiederum eine Carbazol-Substrat-Lösung (5 ml NaOAc, 1,5 ml 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, 20 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; gefiltert 0,45 µM Filter) um und ermöglicht auf diese Weise die Detektion des HCV-Proteins NS3. Nach Auszählung der gefärbten Viruskolonien wurde die TCID50 nach Spearman & Kärber bestimmt.<sup>184</sup>

## 3 ERGEBNISSE

Persistierende Viren, so auch das Hepatitis C Virus, haben eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um infizierte Wirtszellen am Leben zu erhalten und die Immunantwort des Wirtes zu unterlaufen. HCV greift hierbei in verschiedene Signalwege der Zelle ein. Die Fehlregulierung dieser Mechanismen geht mit einer starken Entzündung der Leber einher, welche für die Entwicklung von Leberfibrose und Zirrhose verantwortlich ist. Eine wichtige Rolle in diesem Entzündungsprozess spielt die Hochregulierung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch das Virus. So kommt es zum Beispiel zu einem starken Anstieg der Interleukin-1ß-Expression im Serum infizierter Patienten auf etwa 3 pg/ml. Die Behandlung von aus dem Blut gesunder Patienten gewonnenen Makrophagen mit dem Hepatitis C Virus-Klon JFH-1 resultiert sogar in einem Anstieg der IL-1 $\beta$ -Sekretion auf etwa 3000 pg/ml.<sup>49</sup> IL-1 $\beta$ ist als Mediator der Entzündungsantwort an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt und reguliert zum Beispiel die Produktion von proinflammatorischen Genen, wie Cyclooxygenase-2 (Cox-2), induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) und Chemokinen (Kapitel 1.2). IL-1<sup>β</sup> aktiviert hierbei unter anderem Signalkaskaden, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führen, der an der Regulation einer Reihe von Genen beteiligt ist und mit verschiedenen Erkrankungen korreliert ist, so auch mit Hepatitis C. Arbeiten legen ferner nahe, dass der HCV-bedingten Verstärkung der NF-kB Aktivierung eine Bedeutung für die Entstehung von Leberkarzinomen durch die Steigerung von Zellproliferation und Hemmung der Apoptose zukommt (Kapitel 1.4.4). HCV reguliert hierbei die Aktivierung des NF-κB-Signalweges unter anderem durch die verstärkte Degradierung seines Inhibitors  $I\kappa B\alpha$ .<sup>135</sup> Da die Familie der I $\kappa$ B-Proteine (Kapitel 1.4.1) eine Reihe von Mitgliedern umfasst, die in Wechselwirkung mit dem Virus stehen könnten, wurde die Expression der I $\kappa$ B-Proteine I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , und I $\kappa$ B $\zeta$  nach Interleukin-1 $\beta$ -Stimulation in An- und Abwesenheit des Hepatitis C Virus untersucht. Hierbei wurde zunächst das subgenomische HCV-Replikon Huh9-13 verwendet und die wichtigsten aus diesem System gewonnenen Befunde in der Volllängen-Replikonlinie Huh21-5 und nach Infektion von Huh7.5 Zellen mit dem HCV-Klon JC1 verifiziert. Die zur Stimulation verwendete IL-1<sup>β</sup>-Konzentration betrug 1 ng/ml (50 U/ml) und lag somit im Bereich der von infizierten Makrophagen sekretierten Menge Interleukin-1ß.

# 3.1 Die Expression von $I\kappa B\alpha$ und $I\kappa B\zeta$ , aber nicht von $I\kappa B\beta$ , wird durch HCV supprimiert

Vorbefunde aus der Arbeitsgruppe legen nahe, dass HCV die Expression des NF-kB-Inhibitors IκBζ hemmt.<sup>185</sup> Basierend auf diesem Ergebnis wurde zunächst mittels Western Blot-Analyse die Expression der I $\kappa$ B-Proteine I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\zeta$  nach Interleukin-1β-Stimulation in der Hepatomazelllinie Huh7 untersucht. Wie bereits aus der Literatur hervorgeht (Kapitel 1.4.1), werden die typischen I $\kappa$ B-Proteine I $\kappa$ B $\alpha$  und IκBβ nach Stimulation degradiert, während die Expression des nukleären Proteins I $\kappa$ B $\zeta$  induziert wird. Dieser Befund konnte auch in Huh7 Zellen bestätigt werden. I $\kappa$ B $\alpha$ und  $I\kappa B\beta$  werden sehr rasch nach der IL-1 $\beta$ -Stimulation degradiert und nach einiger Zeit regeneriert (Abb. 3.1 A und B). Die IkBC-Proteinexpression erreicht dagegen ihr Maximum bei 90 bis 120 min und wird anschließend wieder reduziert (Abb. 3.1 C). Diese Beobachtung konnte auch in primären humanen Hepatozyten bestätigt werden (Abb. 3.1 D). Untersuchungen zum Einfluss von TNF $\alpha$  auf die Expression der I $\kappa$ B-Proteine  $I\kappa B\alpha$  und  $I\kappa B\zeta$  legen jedoch nahe, das  $I\kappa B\zeta$  entgegengesetzt zu Untersuchungen, die an HeLa-Zellen erfolgten (Lindenblatt et al. 2009), in Huh7 nur durch IL-1 $\beta$  und nicht durch TNF $\alpha$  induziert wird und I $\kappa$ B $\alpha$  vermindert degradiert wird (Abb. 3.1 E).



# Abb. 3.1: $I_{\kappa}B\alpha$ und $I_{\kappa}B\beta$ werden nach IL-1 $\beta$ -, aber nicht TNF $\alpha$ -Stimulation in Hepatozyten degradiert, während $I_{\kappa}B\zeta$ induziert wird.

Für **A**, **B** und **C** wurden Huh7 Zellen für die entsprechende Zeit mit 50 U/ml IL-1β stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden aus den Zellen isoliert und 50 bis 70 µg Protein in 12 %-igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Expression von IκBα (**A**), IκBβ (**B**) und IκBζ (**C**) hin analysiert. **D** Primäre humane Hepatozyten wurden mit 50 U/ml IL-1β stimuliert und Gesamtproteinextrakte isoliert. 70 µg Protein wurden in 12 %-igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Expression von IκBζ hin analysiert. **E** Huh7 Zellen wurden für die entsprechende Zeit mit 50 U/ml IL-1β oder 10 ng/ml TNFα stimuliert und Gesamtproteinextrakte isoliert. 70 µg Protein wurden in einem 12 %-igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Expression von IκBζ hin analysiert. **E** Huh7 Zellen wurden für die entsprechende Zeit mit 50 U/ml IL-1β oder 10 ng/ml TNFα stimuliert und Gesamtproteinextrakte isoliert. 70 µg Protein wurden in einem 12 %-igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Expression von IκBα und IκBζ hin analysiert. Als Beladungskontrolle wurden für alle Experimente β-actin oder GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurden die Membranen mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt. Die Befunde wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

Im Anschluss sollte nun untersucht werden, ob das Hepatitis C Virus die Regulierung der I $\kappa$ B-Proteine I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\zeta$  beeinflusst. Dies wurde zunächst in Huh7-Kontrollzellen im Vergleich zu der HCV-Replikon-Zelllinie Huh9-13 überprüft. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte eine verzögerte Neusynthese des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins nach IL-1 $\beta$ -Stimulation in Anwesenheit des subgenomischen HCV Replikons beobachtet werden (Abb. 3.2 A).<sup>135</sup> Dagegen konnte kein Einfluss des Hepatitis C Virus auf die IL-1 $\beta$ -induzierte I $\kappa$ B $\beta$ -Degradierung und Neusynthese festgestellt werden (Abb. 3.2 B). Das virale Replikon beeinflusste nicht nur die Expression des typischen I $\kappa$ B-Proteins I $\kappa$ B $\alpha$ , sondern auch die des nukleären Inhibitors I $\kappa$ B $\zeta$ . Die durch IL-1β-induzierte IκBζ-Proteinexpression wird in Zellen, die das HCV Replikon exprimieren fast vollständig supprimiert (Abb. 3.2 C). Diese Befunde konnten auch in mit dem HCV-Stamm JC1 infizierten Huh7.5-Zellen bestätigt werden (Abb. 3.2 D). Hierfür wurden Huh7.5 Zellen mit einer MOI (muliplicity of infection) des Virus infiziert und nach 72 h Inkubationszeit mit IL-1ß stimuliert und mittels Western Blot-Analyse auf die Expression der IκB-Proteine hin untersucht. Dass HCV die IκBζ-Expression unterdrückt, konnte in mehr als vierzig unabhängigen Experimenten im subgenomischen Replikonsystem und drei unabhängigen Experimenten im Infektionssystem beobachtet werden.





Für **A**, **B** und **C** wurden Huh7 Kontrollzellen und Huh9-13-Zellen für die entsprechende Zeit mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden aus den Zellen isoliert und 70 µg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  (**A**), I $\kappa$ B $\beta$  (**B**) und I $\kappa$ B $\zeta$  (**C**) hin analysiert. **D** Huh7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Klons JC1 infiziert und nach 72 h Inkubationszeit mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert und Gesamtproteinextrakte isoliert. 30 µg Protein wurden in einem 12 %-igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  hin analysiert. Als Beladungskontrolle wurden für alle Experimente  $\beta$ -actin oder GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurden die Membranen mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt. Die Befunde wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

# 3.2 Die HCV-vermittelte Suppression von $I_{\kappa}B\zeta$ erfolgt auf der Proteinebene unter Beteiligung von Calpain

Nun stellte sich die Frage, ob die HCV-vermittelte Suppression der I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression bereits auf der Ebene der Transkription stattfindet, oder erst auf der Proteinebene.

Wie in Abbildung 3.3 dargestellt führt IL-1ß sowohl in Replikonzellen als auch in primären humanen Hepatozyten zu einer verstärkten Expression der IκBζ mRNA, die ihr Maximum nach 90 bis 120 min erreicht (Abb. 3.3 A, C). Um nun zu klären auf welcher Ebene HCV die IkBζ-Expression reguliert, wurde die IkBζ-Transkriptmenge zunächst in Huh7 und Huh9-13 Zellen nach IL-1ß-Stimulation mittels RT-PCR untersucht. Diese wird durch die Präsenz des subgenomischen Replikons in Huh9-13 Zellen nicht zur Regulierung auf Proteinebene vergleichbar beeinflusst (Abb. 3.3 A). Übereinstimmend konnte auch in mit dem HCV-Stamm JC1 infizierten Zellen keine deutlich reduzierte Expression beobachtet werden (Abb. 3.3 B). Eine weitere Möglichkeit der Regulierung der IκBζ-Expression auf der Ebene des Transkripts, stellt die mRNA-Stabilität dar. Um nun zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Stabilität der IkBζ-mRNA in An- und Abwesenheit des Hepatitis C Virus gibt, wurden Experimente mit dem Zytostatikum Actinomycin D durchgeführt, welches mit der DNA interkaliert und die de novo mRNA-Synthese unterbricht. Diese Methode ermöglicht daher die Untersuchung von Unterschieden in der Halbwertszeit von RNA. Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden zunächst für 40 min mit IL-1ß vorstimuliert und anschließend mit 5 µg/ml Actinomycin D behandelt. Nach der Einleitung des Transkriptionsstopps wurde der Abbau der IκBζ-mRNA im zeitlichen Verlauf mittels RT-PCR verfolgt. Die Halbwertszeit der mRNA in den Huh7 Kontrollzellen betrug hierbei in etwa 150 min und es konnte kein Unterschied in der Geschwindigkeit des Abbaus zu den Replikonzellen Huh9-13 beobachtet werden (Abb. 3.3 D). Daher kann von einer in etwa gleichen IκBζ-mRNA-Stabilität in beiden Zelllinien ausgegangen werden. Zusammenfassend legen diese Befunde nahe, dass die Suppression der IκBζ-Expression durch das Hepatitis C Virus nicht auf der Ebene der Transkription mRNA-Stabilität stattfindet, sondern auf der translationellen oder oder posttranslationellen Ebene.



Abb. 3.3:  $I_{\kappa}B\zeta$ -Suppression durch das Hepatitis C Virus erfolgt weder auf der Ebene der Transkription, noch auf der Ebene der mRNA-Stabilität.

**A** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden für die entsprechende Zeit mit 50 U/ml IL-1β stimuliert und die mRNA aus Gesamtzelllysaten isoliert. Mittels spezifischer Primer wurde die I<sub>K</sub>Bζ-Expression in der RT-PCR analysiert. Der 90 min Wert wurde in drei und der 120 min Wert in fünf unabhängigen Experimenten voneinander gemessen. **B** Huh7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Klons JC1 infiziert und nach 72 h Inkubation mit 50 U/ml IL-1β für die entsprechende Zeit stimuliert. Aus Gesamtzelllysaten wurde die mRNA isoliert und die I<sub>K</sub>Bζ-Expression mittels spezifischer Primer in der RT-PCR analysiert. **C** Primäre humane Hepatozyten wurden für die entsprechende Zeit mit 50 U/ml IL-1β stimuliert und die mRNA aus Gesamtzelllysaten isoliert. Mittels spezifischer Primer wurde die I<sub>K</sub>Bζ-Expression in der RT-PCR analysiert. **D** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden für 40 min mit 50 U/ml IL-1β vorstimuliert und anschließend mit 5 μg/ml Actinomycin D (ActD) behandelt. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten isoliert und die I<sub>K</sub>Bζ-Expression mittels spezifischer Primer in der RT-PCR analysiert. Die Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die ΔΔCT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden

mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test (\*=p<0,05; n.s.= nicht signifikant) erstellt.

Im Anschluss galt es nun den Mechanismus aufzuklären, über den HCV die IkBζ-Expression auf der Proteinebene reguliert. Eine Möglichkeit in diesem Kontext stellt eine verstärkte Degradierung des Proteins durch das Proteasom dar. Hierzu sollte zunächst untersucht werden, ob das durch IL-1 $\beta$ -induzierte Protein I $\kappa$ B $\zeta$  einem proteasomalen Abbau unterliegt. Hierfür wurden Huh7 Zellen mit 10 µM des Proteasom-Inhibitors MG132 für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 50 U/ml IL-1β stimuliert. Die Western Blot-Analyse ergab eine fast vollständige Hemmung der IκBζ-Expression durch den Inhibitor (Abb.3.4 A). Der Grund hierfür liegt am ehesten in der Tatsache, dass IκBζ NF-κB-abhängig exprimiert wird (Muta et al. 2003; Totzke et al. 2006)<sup>,</sup> und die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors durch die Inhibierung des Proteasoms verhindert wird, da die typischen NF-κB-Inhibitoren, wie  $I \kappa B \alpha$ , unter diesen Bedingungen vermindert degradiert werden. Hierdurch bleibt NF-kB im Zytoplasma gebunden und die Induktion der Expression NF-kB-abhängiger Gene, wie IkB<sup>2</sup>, wird gehemmt. Interessanterweise konnte in diesen Experimenten, entgegen der Erwartungen, in mit Inhibitor behandelten Proben weiterhin ein Abbau von  $I\kappa B\alpha$  beobachtet werden. Ebenso war die Regenerierung des Proteins bei längeren Stimulations-Zeitpunkten durch den Proteasom-Inhibitor gehemmt (Abb. 3.4. A), so dass hier noch andere Mechanismen für die Hemmung der I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression durch Inhibitoren des Proteasoms verantwortlich sind. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde das Versuchsprotokoll abgeändert und die Zellen zunächst für 20 min mit IL-1ß vorstimuliert, um den Abbau der typischen IkB-Proteine und die Aktivierung von NF-κB zu ermöglichen und dann das Proteasom durch die Zugabe des Inhibitors gehemmt. Hierbei kamen sowohl der Proteasom-Inhibitor MG132 (Daten hier nicht gezeigt), als auch der Proteasom-Inhibitor II zum Einsatz. Während in den Kontrollzellen die IκBζ-Proteinmenge bei 180 und 240 min IL-1β-Stimulation bereits deutlich vermindert ist, wird durch die Hemmung des Proteasoms der Abbau von  $I\kappa B\zeta$  verhindert und das Signal bei diesen Zeitpunkten deutlich verstärkt. Auch im Falle der I $\kappa$ B $\alpha$ -Expression konnte in diesem Versuchsaufbau ein verringerter Abbau beobachtet werden (Abb. 3.4 B). Untersuchungen nach demselben Versuchsprotokoll in primären humanen Hepatozyten ergaben für den Abbau von IκBζ vergleichbare Ergebnisse (Abb. 3.4 C). Auf Basis dieser Hinweise kann darauf

geschlossen werden, dass I $\kappa$ B $\zeta$  nach Induktion durch einen Stimulus wie IL-1 $\beta$  in Hepatozyten proteasomal degradiert wird.



Abb. 3.4: ΙκΒζ wird in Hepatozyten proteasomal degradiert.

**A** Huh7 Zellen wurden mit 10 μM MG132 für eine Stunde vorinkubiert und dann mit 50 U/ml IL-1β für die entsprechende Zeit stimuliert. Aus den Zellen wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und 70 μg Protein in einem 12 %-igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot-Analyse wurde die Expression von IκBζ und IκBα untersucht. **B** Huh7 Zellen wurden für 20 min mit 50 U/ml IL-1β vorstimuliert und dann mit 5 und 10 μM Proteasom-Inhibitor II für die dargestellte Dauer behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70 μg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von IκBζ und IκBα analysiert. **C** Primäre humane Hepatozyten wurden für 20 min mit 50 U/ml IL-1β vorstimuliert und dargestellte Dauer behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70 μg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von IκBζ und IκBα analysiert. **C** Primäre humane Hepatozyten wurden für 20 min mit 50 U/ml IL-1β vorstimuliert und dann mit 10 μM MG132 für die dargestellte Dauer behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 30 μg Protein in einem 12 %-igen Polyacylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von IκBζ untersucht. Als Beladungskontrolle wurden für alle Experimente β-actin oder GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurden die Membranen mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt. Die Befunde wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Der Einfluss des Hepatitis C Virus auf die proteasomale Degradierung von  $I\kappa B\zeta$ wurde in Huh7 und Huh9-13 Zellen analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit IL-1ß für 20 min vorstimuliert und anschließend mit 10 µM des Proteasom-Inhibitors II versetzt. Die Analsyse der Proteinextrakte mittels Western Blot ergab hier keine zuverlässige Wiederherstellung der Expression von IκBζ in Zellen, die das HCV Replikon exprimieren (Abb. 3.5 A). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass dem Proteasom für die HCV- bedingte Reduktion der IkBC-Expression keine relevante Bedeutung zukommt. Interessanterweise konnte in diesen Experimenten beobachtet werden, dass die HCV-vermittelte Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  im Gegensatz zu veröffentlichten Daten auf das Proteasom zurück zu führen ist (Abb. 3.5 A). Der Ubiquitinylierungsgrad von I $\kappa$ B $\zeta$  in Huh7 und Huh9-13 Zellen wurde mit Hilfe eines Ubiquitin Enrichment Kits analysiert. Nach dem zuvor genutzten Versuchsprotokoll wurden die Zellen mit dem Proteasom- Inhibitor II behandelt und ubiguitinvlierte Proteine aus den Proteinlysaten durch *affinity beads* aufgereinigt. Diese an die *beads* gebundenen Proteine können im Western Blot detektiert werden. Der Vergleich der gebundenen IκBζ-Mengen aus Huh7 und Huh9-13 Zellen ergab keinen Hinweis auf eine signifikant verstärkte Ubiquitinylierung von ΙκΒζ in Anwesenheit des Hepatitis C Virus (Abb. 3.5 B). Dementsprechend legen auch diese Ergebnisse nahe, dass die proteasomale Degradierung von  $I_{\kappa}B\zeta$  höchstens eine untergeordnete Rolle für die Herabregulierung durch HCV spielen kann.



Abb. 3.5: Der proteasomale Abbau spielt bei der Suppression der I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression durch HCV höchstens eine untergeordnete Rolle.

**A** Huh7 Zellen und Huh9-13 Zellen wurden für 20 min mit 50 U/ml IL-1β vorstimuliert und dann mit 10 μM Proteasom-Inhibitor II für die dargestellte Dauer behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70 μg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von IκBζ und IκBα analysiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt. **B** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden für 20 min mit 50 U/ml IL-1β vorstimuliert und dann mit 10 μM MG132 behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 700 μg Protein mit Hilfe des *Ubiquitin Enrichment* Kits aufgereinigt. Die Proben wurden in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Menge an ubiquitinyliertem IκBζ untersucht. Als Beladungskontrolle wurde freies Ubiquitin detektiert.

Da für das typische IkB-Protein IkB $\alpha$  eine verstärkte HCV-vermittelte Degradierung durch Calpain beschrieben ist (*Warris et al.* 2003), wurde mit Hilfe des Calpain-Inhibitors ALLN der Einfluss auf die IkB $\zeta$ -Expression in Huh7 und Huh9-13 Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit 10 µM des Inhibitors für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Wie in Abb. 3.6 dargestellt, kommt es unter Einsatz des Calpain-Inhibitors zu einer Wiederherstellung der IL-1 $\beta$ -induzierten IkB $\zeta$ -Expression in Huh9-13 Zellen die annähernd derjenigen in Huh7 Zellen entspricht (Abb. 3.6 A). Interessanterweise konnte die in der Literatur beschriebene HCV-bedingte Degradierung von IkB $\alpha$  durch Calpain in diesen Experimenten nicht nachvollzogen werden, da der Einsatz des Inhibitors in Huh9-13 Zellen nicht zu einem verminderten Abbau von  $I\kappa B\alpha$  führte (Abb. 3.6 A). Da fünfzehn verschiedene Calpain-Familienmitglieder beschrieben sind, von denen Calpain-1 und Calpain-2 am besten beschrieben sind und ubiguitär exprimiert werden (Kapitel 1.6), sollte nun untersucht werden, ob eine dieser beiden Varianten an dem HCVvermittelten Abbau von I $\kappa$ B $\zeta$  beteiligt ist. Hierzu wurden gegen Calpain-1 und Calpain-2 gerichtete siRNAs in Huh7 und Huh9-13 Zellen transfiziert und nach 72 h mit 50 U/ml IL-1ß stimuliert. Die Untersuchung der Proben erfolgte mittels Western Blot. Der knockdown beider Calpain-Formen war erfolgreich, übte jedoch keinen Einfluss auf die IκBζ-Proteinmenge aus (Abb. 3.6 B). Es ist daher anzunehmen, dass ein anderes Mitglied der Calpain-Familie für den Abbau von ΙκΒζ verantwortlich ist. oder nach knockdown von Calpain-1 und 2 diesen übernimmt. Ein interessanter Nebenbefund hierbei war die verstärkte Expression der Calpaine 1 und 2 in den Replikonzellen (Abb. 3.6 B). Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass die Herabregulierung der IκBζ-Expression durch HCV am ehesten durch einen verstärkten Calpain-vermittelten Abbau bedingt ist.



# Abb. 3.6: HCV-bedingte Suppression von $I\kappa B\zeta$ wird am ehesten durch Calpain-vermittelten Abbau verursacht.

**A** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden mit 10  $\mu$ M ALLN für 1 h vorinkubiert und dann mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70  $\mu$ g Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  und I $\kappa$ B $\alpha$  analysiert. **B** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden mit je 25 nM der siRNAs CAPN I und CAPN II transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert und Gesamtproteinextrakte isoliert. 40  $\mu$ g Protein wurden in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ , Calpain-1 und Calpain-2 hin untersucht. Als Beladungskontrolle wurde für beide Experimente GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurden die Membranen mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt.

Wie im Abschnitt zuvor beschrieben, konnte der Calpain-bedingte Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  durch das Hepatitis C Virus nicht bestätigt werden. Daher sollte nun der Einfluss von Inhibitoren des Proteasoms und von Calpainen auf die Expression der typischen I $\kappa$ B-Proteine I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  näher untersucht werden. Hierzu wurden Huh7 und Huh9-13 Zellen für 20 min mit IL-1 $\beta$  vorstimuliert und anschließend mit 10  $\mu$ M des Proteasom-Inhibitors behandelt, oder für eine Stunde mit ALLN vorbehandelt und dann mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Im Falle von I $\kappa$ B $\alpha$  konnte durch den Einsatz des Proteasom-Inhibitors der

verstärkte Abbau durch HCV fast vollständig aufgehoben werden, während die Inhibierung von Calpain sogar zu einer beschleunigten Degradierung führte (Abb. 3.7 A). I $\kappa$ B $\beta$  wird hingegen, wie bereits beschrieben, nicht durch das Hepatitis C Virus reguliert. Der Abbau von I $\kappa$ B $\beta$  nach IL-1 $\beta$ -Stimulation konnte in einem geringen Maße durch den Proteasom-Inhibitor (Abb. 3.7 A) und sogar vollständig durch den Calpain-Inhibitor verhindert werden (Abb. 3.7 B). Diese Hinweise lassen darauf schließen, dass in Huh7 Zellen I $\kappa$ B $\alpha$  nach IL-1 $\beta$ -Stimulation hauptsächlich durch das Proteasom abgebaut wird, während I $\kappa$ B $\beta$  zwar auch durch das Proteasom, aber überwiegend durch Calpaine degradiert wird. Außerdem legen diese Ergebnisse nahe, dass in Huh9-13 Zellen der HCV-abhängige Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  durch das Proteasom reguliert wird.

Α



# Abb. 3.7: HCV-vermittelter Abbau von $I_{\kappa}B\alpha$ durch das Proteasom und Regulierung des HCVunabhängigen $I_{\kappa}B\beta$ durch Calpain.

**A** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden für 20 min mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  vorstimuliert und dann mit 10  $\mu$ M Proteasom-Inhibitor II behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70  $\mu$ g Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  analysiert. **B** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden für 1 h mit 10  $\mu$ M ALLN vorbehandelt und dann mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70  $\mu$ g Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  analysiert. **B** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden für 1 h mit 10  $\mu$ M ALLN vorbehandelt und dann mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70  $\mu$ g Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  analysiert. Als Beladungskontrolle wurde für beide Experimente GAPDH detektiert.

Zwischen den einzelnen Detektionen wurden die Membranen mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, der post-transkriptionell greift und auch die Translation reguliert, verläuft über sogenannte *micro*-RNAs. Diese aus 22 Basenpaaren bestehenden, nicht-kodierenden RNA-Moleküle binden in der 3'-UTR ihrer Zielgene und verhindern die Translation derselben. Da für IkBC bereits zwei miRNA-basierende Regulationsmechanismen beschrieben sind (Kapitel 1.4.2), sollte nun auch diese Möglichkeit untersucht werden. Sowohl miRNA-124a, als auch miRNA-187 binden nur unvollständig an IkBζ und induzieren auf diese Weise keinen Abbau der mRNA, sondern hemmen die Synthese des Proteins.<sup>95,96</sup> Aufgrund dieser Vorbefunde sollte nun nach miRNAs gesucht werden, die eine Bindestelle in I $\kappa$ B $\zeta$ aufweisen, durch HCV fehlreguliert werden und möglicherweise die Translation von IκBζ behindern. Hierzu wurden Ergebnisse aus zwei verschiedenen Datenbanken, targetscan.org und microrna.org, verglichen und ein Satz miRNAs ausgewählt, die partiell komplementär zu der mRNA von IkBC sind und teilweise der aktuellen Literatur zur Folge durch HCV beeinflusst werden. Die Ergebnisse dieser Suche sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Untersuchte miRNAs	Regulierung durch HCV laut Literatur
hsa-miR-124a	-
hsa-miR-376b	-
hsa-miR-186-3p	herabreguliert <sup>186</sup>
hsa-miR-1915-5p	verstärkt exprimiert <sup>187</sup>
hsa-miR-421	-
hsa-miR-2113	-
hsa-miR-1227	-
hsa-miR-554	-
hsa-miR-591	-
hsa-miR-24-2-5p	herabreguliert <sup>187</sup>
hsa-miR-512-1-5p	-
hsa-miR-1228-5p	verstärkt exprimiert <sup>187</sup>
hsa-miR-200b-5p	herabreguliert <sup>186</sup>

hsa-miR-548a-3p	verstärkt exprimiert <sup>188</sup>
hsa-miR-527	-
hsa-miR-381	herabreguliert <sup>186</sup>
hsa-miR-921	herabreguliert <sup>186</sup>
hsa-miR-624-5p	-
hsa-miR-1303	-
hsa-miR-483-3p	verstärkt exprimiert
hsa-miR-374a-3p	-
hsa-miR-374b-3p	-
hsa-miR-187-3p	-

Zunächst wurde also die Expression dieser miRNAs mittels RT-PCR in Huh7 und Huh9-13 Zellen verglichen. Hierbei konnten zwei miRNAs indentifiziert werden, die bereits unstimuliert in den Replikonzellen fehlreguliert waren (in Tabelle 3.1 rot markiert). Während miR-483, anders als in der Literatur beschrieben, in Replikonzellen herabreguliert ist (Abb. 3.8 B), wird miR-187 verstärkt exprimiert (Abb. 3.9 A). Die übrigen miRNAs, einschließlich der für die Regulierung von IkB $\zeta$  beschriebenen microRNA-124a, wurden durch das Virus nicht beeinflusst und daher nicht weiter untersucht.



Abb. 3.8: HCV hemmt die Expression von miR-483-3p, hat aber keinen Einfluss auf miR-124a.

Aus Huh7 und Huh9-13 Zellen wurde die miRNA aus Gesamtzelllysaten isoliert und mittels spezifischer Primer auf die Expression von hsa-miR-124a (**A**) und hsa-miR-483-3p (**B**) in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanz wurde mit Hilfe eines beidseitigen t-tests erstellt (\*\*\*=p<0,001), wobei die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten berücksichtigt wurden.

Für die Suppression der IkBζ-Synthese müsste die entsprechende miRNA verstärkt exprimiert werden. Da miR-483-3p herabreguliert war und damit ausschied und miR187 verstärkt exprimiert wurde, sollten weitere Untersuchungen die Bedeutung dieses Befundes für die IkBζ-Expression klären. Ein weiterer Grund für die Fokussierung auf miR-187 ist die in der Literatur beschriebene Beteiligung an der IκBζ-Regulierung. Zunächst wurden daher Huh7 und Huh9-13 Zellen mit 50 U/ml IL-1β stimuliert und in der RT-PCR auf die Expression von miR-187 hin untersucht. Hierbei wurden spezifische Primer gegen miR-187-3p und miR-187-5p verwendet. Beide Formen dieser miRNA stammen aus derselben pre-miRNA, die als Haarnadelstruktur (hairpin structure) vorliegt, nur dass sie aus den beiden einander gegenüber liegenden Armen gebildet werden. Diese Experimente ergaben, dass miR-187-3p und miR-187-5p sowohl stimuliert, als auch unstimuliert, verstärkt exprimiert werden, wobei die Hochregulierung der miR-187-5p nicht signifikant war (Abb. 3.8 A). Um nun die Relevanz der verstärkten miR-187-Expression für die ΙκΒζ-Proteinexpression zu untersuchen, wurden die entsprechenden miRNA-Inhibitoren (antagomirs) gegen miR-187-3p und miR-187-5p in Huh9-13 Zellen transfiziert. Nach

erfolgter IL-1 $\beta$ -Stimulation wurde die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  mittels Western Blot untersucht. Hierbei konnte durch die Unterdrückung der Expression der beiden miRNAs kein Effekt auf die Herabregulierung von I $\kappa$ B $\zeta$  durch das virale Replikon beobachtet werden (Abb. 3.9 B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass HCV die I $\kappa$ B $\zeta$ -Proteinsynthese nicht unter Beteiligung der miR-187 hemmt.



# Abb. 3.9: Die HCV-vermittelte Herabregulierung von IκBζ wird nicht durch die verstärkte Expression von miR-187 bedingt.

**A** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert und die miRNA aus Gesamtzelllysaten isoliert. Mittels spezifischer Primer wurde die Expression von hsa-miR-178-3p und hsa-miR-187-5p in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test (\*=p<0,05; n.s.= nicht signifikant) erstellt, wobei vier unabhängige Experimente berücksichtigt worden sind. **B** Huh9-13 Zellen wurden mit 50 nM der miRNA-Inhibitoren gegen miR-187-3p und miR-187-5p transfiziert. Huh7 Zellen dienten dem Vergleich. Nach 72 h Inkubationszeit

erfolgte die Stimulation der Zellen mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  für die dargestellte Zeit. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 45 µg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ , I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  analysiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt.

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass  $I\kappa B\zeta$  durch das Hepatitis C Virus verstärkt abgebaut wird und Calpain hierbei eine wichtige Rolle spielt. Da das Virus eine Reihe von Signalwegen zu seinen Gunsten reguliert, stellte sich nun die Frage, ob einer dieser Wege an dem verstärkten Abbau von  $I\kappa B\zeta$  durch Calpain beteiligt ist. Daher wurde der Einfluss von Inhibitoren gegen die Signalmoleküle Akt, p38-MAPK, MEK und JNK auf die Expression von  $I\kappa B\zeta$  näher untersucht. Alle diese Signalmoleküle werden, wie einleitend beschrieben, durch das Hepatitis C Virus verstärkt aktiviert. Die Inhibitoren wurden eine Stunde vor der IL-1 $\beta$ -Stimulation den Huh7 und Huh9-13 Zellen in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zugesetzt. Die verstärkte Aktivierung von Akt und p38 nach IL-1 $\beta$ -Stimulation konnte bestätigt werden, doch weder der Akt-Inhibitor Triciribine (Abb.3.10 A), noch der p38-Inhibitor SB203580 (Abb. 3.10 B) übten einen Effekt auf die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  aus.



Abb. 3.10: Inhibitoren des Akt- und p38-Signalweges zeigen keinen Effekt auf die Expression von ΙκΒζ.

Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden mit 10  $\mu$ M der Inhibitoren Triciribine (**A**) und SB203580 (**B**) für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70  $\mu$ g Protein in 12 %-igen PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ , P-Akt (Ser 473), Akt und P-p38 (Thr 180/Tyr 182) analysiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt. Diese Ergebnisse konnten jeweils in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Dagegen hemmten der Einsatz des MEK- Inhibitors U0126 (Abb. 3.11 A) und des JNK-Inhibitors II (Abb. 3.11 B) in Huh7 Zellen die IkB $\zeta$ -Proteinsynthese. Zudem legen noch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe nahe, dass in Huh9-13 Zellen nach IL-1 $\beta$ -Stimulation die Aktivierung der MAPKAP-Kinase 2 gehemmt ist (unpublizierte Ergebnisse *Karthe, Bode et al.*). Die MK2 ist ein vor allem durch die MAP-Kinase p38 aktiviertes Protein, doch interessanterweise konnte an dieser Stelle auch eine Inhibierung der MK2-Aktivität nach Inhibierung der MAP-Kinasen MEK (Abb. 3.11 A) und JNK (Abb. 3.11 C) beobachtet werden. Da sowohl MEK, als auch JNK in Gegenwart viraler Proteine laut Literatur jedoch verstärkt aktiviert sein sollen (Kapitel 1.3) und deren Inhibierung zu der Suppression von IkB $\zeta$  führt, findet sich hier ein Hinweis darauf, dass ein durch das Virus gehemmtes Protein in der Signalkaskade

unterhalb von MEK und JNK für diesen Befund verantwortlich sein muss. Die Hemmung der oberhalb liegenden Proteine MEK und JNK würde daher den Zustand des bislang nicht identifizierten Proteins in den viralen Replikonzellen simulieren.



Abb. 3.11: Inhibitoren des MEK1/2- und JNK-Signalweges hemmen die Expression von IκΒζ.

Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden mit 10  $\mu$ M der Inhibitoren U0126 (**A**) und JNK-Inhibitor II (**B**) für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70  $\mu$ g Protein in 12 %-igen PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ , P-MK2 (Thr 222) und MK2 analysiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt. Diese Ergebnisse konnten jeweils in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Um sicher zu gehen, dass der MEK-Inhibitor die Suppression von I $\kappa$ B $\zeta$  nicht einfach nur durch eine Hemmung der Transkription, sondern tatsächlich auf der Proteinebene erreicht, wurde die mRNA-Expression mittels RT-PCR untersucht. Da die Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor keinen signifikanten Unterschied in der I $\kappa$ B $\zeta$ -Transkriptmenge ergab, ist davon auszugehen, dass die Suppression von I $\kappa$ B $\zeta$  auf der Ebene des Proteins erfolgt (Abb. 3.12).





**A** Huh7 Zellen wurden für eine Stunde mit 10  $\mu$ M U0126 vorinkubiert und dann mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Huh9-13 Zellen dienten der Kontrolle. Aus Gesamtzelllysaten wurde die mRNA isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben.

# 3.3 Die Herabregulierung der I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression resultiert in der Hemmung der Lipocalin-2 Expression

Das Hepatitis C Virus nutzt und reguliert eine Reihe von Signalwegen der Wirtszelle, um in ihr replizieren zu können, ohne die Vitalität derselben hochgradig einzuschränken. Da I $\kappa$ B $\zeta$  nicht nur als Inhibitor von NF- $\kappa$ B fungiert, sondern laut Literatur (Kapitel 1.4.2) auch als positiver oder negativer Regulator der Transkription verschiedenster, NF- $\kappa$ B-abhängiger, Gene dient, sollte nun nach Zielgenen gesucht werden, die das Virus durch die Suppression von IκBζ reguliert. Außerdem sollte untersucht werden, welche Bedeutung die Herabregulierung von IκBζ durch das Virus für die Wirtszelle hat. Zunächst einmal wurde eine ausgiebige Literaturrecherche durchgeführt und eine Reihe, als IκBζ-abhängig beschriebener, Gene ausgewählt, die nun im Kontext des Hepatitis C Virus untersucht werden sollten (Tabelle 3.2). Darüber hinaus wurden die Daten aus einem in der Arbeitsgruppe durchgeführten, 300 Gene umfassenden Gen-*array* (unveröffentlichte Daten Albrecht, Bode *et al.*) mit Hepatomazellen, die eine nicht degradierbare Mutante von IκBα stabil exprimieren ausgewertet, um Gene zu identifizieren die durch IL-1 $\beta$  NF-κB-abhängig induziert werden. Die ausgewählten Gene (Tabelle 3.2) wurden auf eine Beteiligung von IκBζ an ihrer Regulierung näher untersucht.

Regulierung durch ΙκΒζ laut	NF-κB-abhängig reguliert
Literatur	laut Gen- <i>Array</i>
CXCL1 (chemokine (C-X-C motif)	CXCL1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1)
ligand 1)	
-	CXCL3 (chemokine (C-X-C motif) ligand 3)
-	CXCL5 (chemokine (C-X-C motif) ligand 5)
CXCL8 (chemokine (C-X-C motif)	CXCL8 (chemokine (C-X-C motif) ligand 8)
ligand 8)	
-	CCL20 (chemokine (C-C motif) ligand 20)
IL-18 (Interleukin-18) <sup>106</sup>	-
CEBPδ (CCAT/Enhancer-Binding	CEBP $\delta$ (CCAT/Enhancer-Binding Protein $\delta$ )
Protein $\delta$ ) <sup>106</sup>	
TNF $\alpha$ (Tumornekrosefaktor $\alpha$ ) <sup>106</sup>	TNF $\alpha$ (Tumornekrosefaktor $\alpha$ )
-	TNFAIP3 (Tumornekrosefaktor $\alpha$ induziertes
	Protein 3)
Gbp1 (Guanylat-Bindeprotein-1) <sup>106</sup>	Gbp1 (Guanylat-Bindeprotein-1)
-	Gbp2 (Guanylat-Bindeprotein-2)
-	Birc2 (Baculoviral IAP repeat-containing
	protein 2)
-	Birc3 (Baculoviral IAP repeat-containing

Die Expression dieser Gene nach IL-1 $\beta$ -Stimulation wurde zunächst mittels RT-PCR in Huh7 und Huh9-13 Zellen untersucht, um den Einfluss des viralen Replikons zu bestimmen. Im nächsten Schritt wurden dann Huh7 Kontrollzellen mit einer KontrollsiRNA oder einer I $\kappa$ B $\zeta$ -siRNA behandelt und nach 72 h Inkubationszeit mit IL-1 $\beta$ stimuliert. In diesem Experiment wurde also die HCV-vermittelte Suppression von I $\kappa$ B $\zeta$  in Huh7 Zellen simuliert und der Einfluss des *knockdowns* auf die Expression der Zielgene untersucht. Der Erfolg des I $\kappa$ B $\zeta$ -*knockdowns* wurde sowohl auf der Transkriptebene mittels RT-PCR (Abb. 3.13 A), als auch auf Proteinebene im Western Blot (Abb. 3.13 B) überprüft.





**A** Huh7 Zellen wurden mit 50 nM sicontrol oder silkB $\zeta$  transfiziert und nach 72 h Inkubation mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von IkB $\zeta$  in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **B** Huh7 Zellen wurden mit 50 nM sicontrol oder silkB $\zeta$  transfiziert und nach 72 h Inkubation mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Huh9-13 Zellen dienten dem Vergleich. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 50 µg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von IkB $\zeta$  analysiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt.

Alle in Tabelle 3.2 aufgeführten NF-κB-abhängigen Gene wurden in HCV Replikonzellen auf Transkriptebene verstärkt exprimiert. Die Ergebnisse zu den Genen mit den größten HCV-bedingten Expressionsunterschieden sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt. Aus der Gruppe der Chemokine sind CXCL5 und CXCL8 besonders hervorzuheben. Beide sind in Anwesenheit des viralen Replikons nach IL-1 $\beta$ -Stimulation verstärkt, der *knockdown* von I $\kappa$ B $\zeta$  übte jedoch keinen Einfluss auf die Regulierung dieser Gene in Hepatozyten aus (Abb. 3.14 A, B).





Huh7, Huh9-13 und mit 50 nM sicontrol oder silkB $\zeta$  transfizierte Huh7 Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von CXCL8 (**A**) und CXCL5 (**B**) in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben.

Aus der Gruppe der Apoptose-Inhibitoren, die die Aktivierung von Caspasen hemmen und so die Apoptose verhindern, wurden Birc2 und Birc3 näher untersucht. Auch hier konnte eine verstärkte IL-1β-vermittelte Expression dieser Gene in HCV-
Replikonzellen beobachtet werden. Ein *knockdown* von  $I\kappa B\zeta$  führte jedoch nicht zu einer veränderten Regulierung dieser Gene in Huh7 Zellen (Abb. 3.15 A, B).





Huh7, Huh9-13 und mit 50 nM sicontrol oder silkB $\zeta$  transfizierte Huh7 Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von Birc2 (**A**) und Birc3 (**B**) in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test (\*\*=p<0,01; n.s.= nicht signifikant) erstellt, wobei drei unabhängige Experimente berücksichtigt worden sind.

Auch die durch IL-1 $\beta$ -induzierte Expression des Transkriptionsfaktors CEBP $\delta$  und des Guanylat-Bindeprotein-1 (Gbp1) wird durch das Hepatitis C Virus verstärkt. Ein

*knockdown* von I $\kappa$ B $\zeta$  führte jedoch auch bei diesen Genen nicht zu einer veränderten Regulierung in Huh7 Zellen (Abb. 3.16 A, B), so dass auch hier anzunehmen ist, dass HCV die IL-1 $\beta$ -induzierte Expression dieser Gene zwar verstärkt, aber dass I $\kappa$ B $\zeta$  hierbei keine regulatorische Bedeutung zukommt.





Huh7, Huh9-13 und mit 50 nM sicontrol oder silkB $\zeta$  transfizierte Huh7 Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von CEBP $\delta$  (**A**) und Gbp1 (**B**) in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test (\*=p<0,05; \*\*\*=p<0,001; n.s.= nicht signifikant) erstellt, wobei drei unabhängige Experimente berücksichtigt worden sind.

Wie auch schon bei den untersuchten Zielgenen zuvor, konnte entgegen der Literatur in der Hepatomazelllinie Huh7 keine Beteiligung von I $\kappa$ B $\zeta$  an der IL-1 $\beta$ -vermittelten Expression von TNF $\alpha$  beobachtet werden. Dies gilt auch für das durch TNF $\alpha$ -induzierte Protein TNFAIP3. Aber auch hier konnte eine verstärkte IL-1 $\beta$ -induzierte Expression der beiden Gene in den HCV Replikonzellen festgestellt werden (Abb. 3.17).



Abb. 3.17: Sowohl TNF $\alpha$  als auch das durch TNF $\alpha$ -induzierte Protein TNFAIP3 werden HCV-vermittelt verstärkt exprimiert, sind jedoch lkB $\zeta$ -unabhängig.

Huh7, Huh9-13 und mit 50 nM sicontrol oder silkB $\zeta$  transfizierte Huh7 Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von TNF $\alpha$  (**A**) und TNFAIP3 (**B**) in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test (\*\*=p<0,01; \*\*\*=p<0,001; n.s.= nicht signifikant) erstellt, wobei drei unabhängige Experimente berücksichtigt worden sind.

Das Hepatitis C Virus verstärkt nicht nur die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1<sup>β</sup> sondern auch die Synthese eines weiteren Zytokins aus der IL-1-Proteinfamilie, dem Interleukin-18. Anders als Daten aus der Literatur annehmen lassen (Yamamoto *et al.* 2004)<sup>106</sup> konnte kein Einfluss des IκBζ-*knockdowns* auf die Expression dieses Zytokins in Huh7 Zellen beobachtet werden (Abb. 3.18 A). Für einen kleinen Satz der untersuchten Gene wurde mittels Western Blot die Expression auf Proteinebene näher untersucht. In IL-1ß-stimulierten Huh7 und Huh9-13 Zellen konnte die zuvor auf der Transkriptebene beobachtete verstärkte Expression von Gbp2, Birc3 und TNFAIP3 auf der Ebene des Proteins verifiziert werden (Abb. 3.18 B). Zusammengefasst konnte in diesen Untersuchungen eine Reihe von Genen identifiziert werden, deren Expression durch das Virus verstärkt wird. So sind die Transkriptmengen von CXCL5, CXCL8, Birc2, Birc3, CEBPδ, Gbp1, TNFα, TNFAIP3 und IL-18 in den Replikonzellen stark erhöht. Allerdings konnten keine Hinweise dafür gewonnen werden, dass IκBζ an der Regulierung dieser Gene in Hepatozyten beteiligt ist. Dies gilt auch für die Gene CXCL8, CEBP $\delta$ , Gbp1,TNF $\alpha$  und IL-18, die in der Literatur (Tabelle 3.2) als IκBζ-abhängige Gene beschrieben sind.



### Abb. 3.18: Auch IL-18 wird HCV-abhängig, aber ΙκΒζ-unabhängig exprimiert. Die Expression von Gbp2, Birc3 und TNFAIP3 ist zudem auf Proteinebene verstärkt.

**A** Huh7, Huh9-13 und mit 50 nM sicontrol oder silkBζ transfizierte Huh7 Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1β stimuliert. mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von IL-18 in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die ΔΔCT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test (\*=p<0,05; \*\*\*=p<0,001; n.s.= nicht signifikant) erstellt, wobei drei unabhängige Experimente berücksichtigt worden sind. **B** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1β stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70 μg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von Gbp2, Birc3 und TNFAIP3 analysiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt.

Das letzte aus Tabelle 3.2 noch nicht beschriebene Gen ist das Lipocalin-2. Dieses Protein spielt, wie bereits einleitend erläutert (Kapitel 1.5), eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunantwort des Wirts und wird NF- $\kappa$ B-abhängig reguliert. Außerdem gibt es eine Vielzahl an Literaturbefunden, die aufzeigen, dass Lipocalin-2

nicht nur NF-kB für seine Transkription benötigt, sondern auch das hierbei als Co-Faktor agierende I $\kappa$ B $\zeta$ . Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von I $\kappa$ B $\zeta$  an der Regulierung von LCN2 ist die Tatsache, dass dieses Gen, ebenso wie IκBζ, in der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 nur IL-1 $\beta$ , aber nicht TNF $\alpha$ -vermittelt exprimiert wird. Daher sollte nun in der RT-PCR der Einfluss des Hepatitis C Virus auf die IL-1βvermittelte Expression von LCN2 untersucht werden. Dies erfolgte zunächst in Huh7 und Huh9-13 Replikonzellen und anschließend sowohl im Volllängen-Replikonsystem, als auch im JC1-Infektionssystem. In allen drei Systemen konnte eine deutliche Herabregulierung der Lipocalin-2 Expression durch das Hepatitis C Virus beobachtet werden (Abb. 3.19 A, B, C). Desweiteren führte ein knockdown von IκBζ in Huh7 Zellen zu einer Hemmung der Lipocalin-2 Expression (Abb. 3.18 A). Die Induktion von Lipocalin-2 durch das proinflammatorische Zytokin IL-1ß wurde zudem in primären humanen Hepatozyten verifiziert (Abb. 3.19 D). Zusammengefasst belegen diese Befunde, dass das Hepatitis C Virus die IL-1<sup>β</sup>-vermittelte Expression von Lipocalin-2 durch die Suppression von IkBC bereits auf der Transkriptebene hemmt.

IL-1β [min]





IL-1β [h]

-

Abb. 3.19: HCV hemmt die IL-1β-vermittelte Expression von LCN2 durch die Suppresion von ΙκΒζ.

A, B Huh7, Huh9-13, Huh21-5 und mit 50 nM sicontrol oder silκBζ transfizierte Huh7 Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1ß stimuliert. mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von LCN2 in der RT-PCR untersucht. **C** Huh7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Klons JC1 infiziert und nach 72 h Inkubationszeit mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von LCN2 in der RT-PCR untersucht. **D** Primäre humane Hepatozyten wurden mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert und die mRNA aus Gesamtzelllysaten isoliert. Mittels spezifischer Primer wurde die Expression von LCN2 in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test (\*=p<0,05; n.s.= nicht signifikant) erstellt, wobei drei unabhängige Experimente berücksichtigt worden sind.

Um nun zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte auch auf der Proteinebene vorzufinden sind, wurde erneut ein  $I\kappa B\zeta$ -*knockdown* mit Hilfe der spezifischen siRNA durchgeführt und nach 72 h mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Die gewonnen Proteinlysate wurden anschließend mittels Western Blot auf die Expression von  $I\kappa B\zeta$  analysiert. Hierbei konnten die auf der Transkriptebene gewonnenen Befunde bestätigt werden. HCV hemmt die IL-1 $\beta$ -vermittelte Expression von Lipocalin-2 in Huh9-13 Zellen. Die Befunde legen nahe, dass hier die Suppression der  $I\kappa B\zeta$ - Proteinsynthese von Bedeutung ist. Daher führt ein *knockdown* von  $I\kappa B\zeta$  in Huh7 Zellen zu demselben Befund, der in Huh9-13 Zellen zu beobachten ist, also zu der Hemmung der LCN2-Expression (Abb. 3.20 A). Die Suppression der LCN2-Proteinsynthese konnte ebenfalls im JC1-Infektionssystem bestätigt werden (Abb. 3.20 B). Diese Befunde lassen annehmen, dass das Hepatitis C Virus die Expression von Lipocalin-2  $I\kappa B\zeta$ -abhängig hemmt. Dass LCN2 hierbei bereits auf der Transkriptebene reguliert wird, unterstützt die Literatubefunde, nach denen  $I\kappa B\zeta$  als transkriptioneller Regulator fungiert (Kapitel 1.4.2).

Α sicontrol silκBζ 12 IL-1β [h] 2 6 9 12 2 6 9 12 2 6 9 12 9 6 2 - LCN2 - NS5A - GAPDH Huh7 Huh9-13 В 90 120 360 540 540 360 120 90 IL-1β [min] LCN2 ←NS5A ←GAPDH Huh7.5 Huh7.5 JC1

Abb. 3.20: HCV-bedingte Hemmung der LCN2-Expression durch die Suppression von  $I\kappa B\zeta$  kann auf der Proteinebene bestätigt werden.

**A** Huh7 Zellen wurden mit 50 nM sicontrol oder silκBζ transfiziert und nach 72 h mit 50 U/ml IL-1β stimuliert. Huh9-13 Zellen dienten dem Vergleich. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 50 µg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von LCN2 analysiert. **B** Huh7.5 Zellen wurden mit einer MOI des HCV-Klons JC1 infiziert und nach 72 h Inkubationszeit mit 50 U/ml IL-1β stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 30 µg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von LCN2 analysiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt.

Dass  $I\kappa B\zeta$  an der Regulierung von Lipocalin-2 beteiligt ist, wird außerdem durch die Beobachtung gestützt, dass die Inhibierung des MEK-Signalweges in Huh7 Zellen nicht nur die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  hemmt (Abb. 3.11), sondern auch die Transkription von LCN2 (Abb. 3.21). Diese Hinweise deuten daraufhin, dass das Hepatitis C Virus ein Protein in der MEK-Signalkaskade hemmt und so die Suppression von I $\kappa$ B $\zeta$  und seines Zielgens LCN2 bedingt.



#### Abb. 3.21: Die LCN2-Expression wird ebenso wie $I\kappa B\zeta$ durch die Inhibierung des MEK-Signalweges gehemmt.

**A** Huh7 Zellen wurden mit 10  $\mu$ M U0126 für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von LCN2 in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben, wobei der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten verwendet wurde.

## 3.4 HCV hemmt die Aktivität der MAPKAP-Kinase-2 und supprimiert somit die lκBζ-Proteinsynthese und die darausfolgende LCN2-Expression

Zeitgleich zu diesen Studien wurde in der Arbeitsgruppe ein Gen-*array* mit murinen Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen, MK2-defizienten Mäusen und MK2/MK3defizienten Mäusen, die mit LPS stimuliert waren, durchgeführt. Unter den hierbei untersuchten Genen befand sich auch Lipocalin-2. Die Ergebnisse dieses *arrays* lieferten Hinweise darauf, dass die LPS-induzierte Transkription von LCN2 in MK2defizienten Zellen gehemmt ist (unveröffentlichte Daten, *Ehlting, Bode et al.*). Um diesen Befund zu bestätigen, wurden erneut murine Makrophagen aus Wildtyp, MK2defizienten und MK2/MK3-defizienten Mäusen mit LPS stimuliert und die LCN2-Transkriptmengen in der RT-PCR untersucht. Hierbei bestätigte sich der Befund aus dem Gen-*array*. In MK2-defizienten Makrophagen konnten deutlich reduzierte LCN2 mRNA-Mengen gemessen werden. Ein zusätzlicher *knockout* der MAPKAP-Kinase-3 (MK3) führte sogar zu einer weiteren Reduzierung der LCN2-Expression (Abb. 3.22 A). In Immunoblot-Analysen konnte die Suppression der LPS-vermittelten LCN2-Expression durch den MK2-*knockout* in murinen Makrophagen ebenfalls bestätigt werden (Abb. 3.22 B). Doch die Expression des Lipocalin-2 war nicht nur in murinen Makrophagen MK2-abhängig, sondern auch in primären murinen Hepatozyten. Im Western Blot konnte in den MK2-defizienten Hepatozyten eine deutlich verringerte LCN2-Expression nach LPS-Stimulation, im Vergleich zu dem Wildtyp, beobachtet werden (Abb. 3.22 C). Zusammengfasst belegen diese Daten, dass die LPSinduzierte Expression von Lipocalin-2 sowohl in murinen Makrophagen, als auch in Hepatozyten MK2-abhängig reguliert wird.





**A** Primäre murine Makrophagen aus dem Knochnemark (BMDM) von Wildtyp-, MK2-defizienten und MK2/MK3-defizienten Mäusen wurden mit 100 ng/ml LPS stimuliert und die mRNA aus Gesamtzelllysaten isoliert. Mittels spezifischer Primer wurde die Expression von LCN2 in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung aller Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit mSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Wildtyp Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test (\*=p<0,05; \*\*=p<0,01; \*\*\*=p<=0,001) erstellt, wobei fünf unabhängige Experimente berücksichtigt worden sind. **B** Primäre murine Makrophagen aus dem Knochenmark (BMDM) von Wildtyp und MK2-defizienten Mäusen wurden mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 60 µg Protein in einem 9-13 % PAA-Gradienten-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von LCN2 und MK2 analysiert. **C** Primäre humane Hepatozyten (PMH) aus

Wildtyp- und MK2-defizienten Mäusen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 60 µg Protein in einem 10 % PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von LCN2 analysiert. Als Beladungskontrolle wurde bei allen Versuchen  $\beta$ -actin detektiert.

Da die Befunde aus dem murinen System eine Verbindung von MK2-Defizienz und Hemmung der LCN2-Expression annehmen lassen, sollte nun untersucht werden, ob diese Verbindung auch in humanen Hepatozyten besteht. Daher wurde in Huh7 Zellen auf Transkriptebene mittels RT-PCR und auf der Proteinebene mittels Immunoblotanalyse die Expression von LCN2 nach Hemmung der MK2-Aktivität durch den MK2-Inhibitor PF3644022 untersucht. Trotz des relativ starken DMSO-Effekts auf die LCN2-Expression in diesen Versuchen, ist eine deutliche Herabregulierung des Proteins durch die Inhibierung der MK2-Aktivität sowohl auf der Transkriptebene, als auch auf der Proteinebene zu beobachten (Abb. 3.23 A, B). Diese Ergebnisse belegen zusammen mit den Befunden aus dem murinen System, dass LCN2 MK2-abhängig reguliert wird und eine MK2-Defizienz in humanen Hepatozyten eine Hemmung der LCN2-Transkription bedingt. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl die Aktivität der MK2 (Abb. 3.11), als auch die Expression von LCN2 durch das Hepatitis C Virus gehemmt werden, sollte nun analysiert werden, ob das Virus einen MK2-abhängigen Signalweg nutzt, um LCN2 zu supprimieren. Aus den zuvor beschriebenen Befunden geht hervor, dass HCV Lipocalin-2 IκBζ-vermittelt reguliert, daher sollte nun der Einfluss der MK2-Inhibierung auf die Expression von  $I\kappa B\zeta$  untersucht werden. Ebenso wie für LCN2, konnte eine Suppression der IκBζ-Expression durch die Hemmung der MK2-Aktivität auf der Prtoeinebene beobachtet werden (Abb. 3.23 C), wobei ähnliche IkBζ-Proteinmengen wie in Huh9-13, erreicht wurden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass HCV durch die Inhibierung der MK2-Aktivität die IkBC-Proteinsynthese supprimiert und demzufolge die LCN2-Transkription hemmt.





Huh7 Zellen wurden für eine Stunde mit 10 μM PF3644022 vorinkubiert und anschließend mit 50 U/ml IL-1β stimuliert. Huh9-13 Zellen dienten dem Vergleich. **A** mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde isoliert und mittels spezifischer Primer wurde die Expression von LCN2 in der RT-PCR untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die  $\Delta\Delta$ CT Methode mit hSDHA als Referenz. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Huh7 Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an und die Signifikanzen wurden mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test (\*=p<0,05; n.s.= nicht signifikant) erstellt, wobei drei unabhängige Experimente berücksichtigt worden sind. **B**, **C** Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70 μg Protein in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von LCN2 (B) und IkB $\zeta$  (C) analysiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt.

### 3.5 HCV hemmt die Expression von Lipocalin-2, um dessen negativen Effekt auf die Zellproliferation des Hepatozyten zu verringern

Das Hepatitis C Virus muss, um sein Überleben zu sichern, seine Wirtszelle am Leben erhalten, also die Zellproliferation fördern und Apoptose verhindern. Sowohl für IkBC, als auch für LCN2 gibt es eine Reihe von Literaturbefunden, die diese Proteine mit der Induktion von Seneszenz und Apoptose in Verbindung bringen. So bewirkt der knockdown von I $\kappa$ B $\zeta$  eine Resistenz der Zelle gegen die TNF $\alpha$ vermittelte Apoptose.<sup>84</sup> Außerdem verursacht IκBζ die Expression von Cytokinen und induziert dadurch die Seneszenz einer Zelle.<sup>113</sup> Die Überexpression von Lipocalin-2 in Hepatoma-Zelllinien führt zu einer verstärkten Apoptose der Zellen, induziert Seneszenz und hemmt die Zellviabilität.<sup>158</sup> Auch in HCC-Zellen und in einem Maus-Modell führt die Überexpression von LCN2 zu einer Suppression des Tumorwachstums.<sup>159,160</sup> Aufgrund dieser Literaturbefunde sollte nun untersucht werden, ob HCV die Expression von IκBζ und Lipocalin-2 hemmt, um einen Einfluss auf die Zellproliferation seiner Wirtszelle zu nehmen und den Tod der Zelle zu verhindern. Hierzu wurde ein Zellproliferationsassay durchgeführt, mit dem es möglich ist die Zahl der metabolisch-aktiven, also proliferierenden, Zellen zu bestimmen. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Fähigkeit von lebenden Zellen die Substanz 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilidsalz (XTT) durch mitochondriale Enzyme in eine wasserlösliche, farbige Formazan-Form umzusetzen. Anhand der Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm kann die Konzentration des Farbstoffes bestimmt werden, die direkt proportional zu der Anzahl an metabolisch-aktiven Zellen ist. Um den Einfluss von LCN2 auf die Zellproliferation und Apoptose von Huh7 und Huh9-13 Zellen zu bestimmen, wurden diese Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und mit 100 ng/ml Actinomycin-D und einer zunehmenden Konzentration von 0 bis 80 ng/ml an LCN2 behandelt. Die Absorption dieser Zellen wurde bestimmt und damit Rückschlüsse auf den Einfluss der steigenden LCN2-Konzentration auf die Zellproliferation und Apoptose der Zellen gezogen. Da die Zellen zuvor mit Actinomycin-D behandelt wurden, das einen Transkriptionsstopp und damit die Apoptose der Zelle einleitet, konnte auf diesem Weg die Apoptose der Zellen nach LCN2-Zugabe untersucht werden. Sowohl in Huh7, als auch in Huh9-13 Zellen

konnte eine Verringerung der Zellproliferation durch Zugabe von LCN2 beobachtet werden, die mit steigender Konzentration verstärkt wird. Bei Zugabe von 80 ng/ml LCN2 wurde die Zahl an proliferierenden Zellen in Huh7 auf etwa 50 % (Abb. 3.24 A) und in Huh9-13 auf etwa 60 % (Abb. 3.24 B) reduziert. Diese Befunde legen in Übereinstimmung mit der Literatur nahe, dass LCN2 die Zellproliferation von Hepatozyten hemmt und dass HCV durch die Suppression von MK2 und damit IkBC und Lipocalin-2, diesen negativen Effekt verringert. Ob nun LCN2 in Replikonzellen nur die Zellproliferation inhibiert und eine Seneszenz verursacht, oder Apoptose fördert, sollte durch die Betrachtung des Apoptosemarkers PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerase) und dessen Spaltung näher untersucht werden. Hierzu wurden Huh9-13 Zellen mit Actinomycin-D behandelt und die Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Kombination mit LCN2 hinzugesetzt. Die Initiierung des Transkriptionsstopps durch Actinomycin-D führte bereits zu einer verstärkten Spaltung und damit Deaktivierung von PARP. Der Zusatz an TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  erhöhte die Menge der Spaltprodukte und reduzierte die Konzentration des vollständigen Proteins. Doch die zusätzliche Gabe von Lipocalin-2 ergab keine weiteren verstärkenden Effekte auf die Spaltung von PARP und damit auf den Apoptosegrad der Zellen (Abb. 3.24 C). Zusammengefasst legen diese Befunde nahe, dass LCN2 eher die Zellproliferation von Hepatozyten hemmt und keinen Einfluss auf die Apoptose der Zelle nimmt. Das Virus wird also am wahrscheinlichsten die Expression von LCN2 hemmen, um dessen Zellproliferationsinhibierenden Effekt zu unterbinden und nicht um die Apoptose der Zelle zu verhindern.



Abb. 3.24: Lipocalin-2 hemmt konzentrationsabhängig die Zellproliferation von Hepatozyten.

**A**, **B** Huh7 und Huh9-13 Zellen wurden für 4 h mit 100 ng/ml Actinomycin-D (ActD) und einer steigenden Konzentration an LCN2 von 0 bis 80 ng/ml behandelt. Die Absorption bei 450 nm wurde gemessen. Die Hintergrundabsorption des Mediums wurde von der Absorption der Zellen abgezogen. Die Ergebnisse sind relativ zur Absorption der nur mit ActD behandelten Zellen, die auf 100 % gesetzt wurde, wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. **C** Huh9-13 Zellen wurden mit 100 ng/ml ActD in Kombination mit 10 ng/ml TNF $\alpha$ , 50 U/ml IL-1 $\beta$  und 20 ng/ml LCN2 für die dargestellte Zeit stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und 70 µg Protein in einem 8 % PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von PARP analysiert. Als Beladungskontrolle wurde  $\beta$ -actin detektiert. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 min gestrippt.

#### 4 DISKUSSION

## 4.1 Die Expression von $I\kappa B\alpha$ und $I\kappa B\zeta$ , aber nicht von $I\kappa B\beta$ , wird durch HCV supprimiert

Hepatitis C ist eine zumeist chronisch verlaufende Lebererkrankung, die durch das Hepatitis C Virus ausgelöst wird und weltweit einer der führenden Gründe für schwerwiegende Erkrankungen wie Leberzirrhose, Leberfibrose und in der Folge hepatozelluläre Karzinome ist. Voraussetzung für die Ausbildung einer persistenten Infektion ist die Wechselwirkung des Virus mit der Wirtszelle und die Beeinflussung von essentiellen Funktionen wie Immunantwort, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Das Virus nutzt also nicht nur Wirtsfaktoren für seine Replikation und Verbreitung, sondern reguliert eine Vielzahl von Genen um das Überleben der Zelle zu sichern. Andererseits führt die Reaktion von Wirt und Wirtszelle zur Entstehung einer Entzündungsantwort mit Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren, wie unter anderem IL-1β, die vom Virus nur partiell unterdrückt bzw. beeinflusst werden kann.<sup>49</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interferenz des Hepatitis C Virus mit Komponenten des NF-κB-Signalweges untersucht werden. Dieser Transkriptionsfaktor wird als Antwort auf proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1ß aktiviert und reguliert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielen.<sup>118,120</sup> NF-kB ist zudem an der Regulierung der Zellproliferation und Apoptose beteiligt.<sup>122,123</sup> Eine anhaltende Aktivierung dieses Signalweges führt zu chronischen Entzündungen und trägt zu der Entwicklung von Krebserkrankungen bei.<sup>124</sup> Wie in Kapitel 1.4.4 beschrieben nutzt das Hepatitis C Virus die zellproliferationsfördernden und anti-apoptotischen Funktionen dieses Transkriptionsfaktors. Die Bedeutung von NF-kB wird durch die Wechselwirkung und Nutzung dieses Signalweges mit einer Reihe persistierender Viren noch deutlicher. Als Beispiele sind hier neben HCV das humane Immundefizienz-Virus (HIV) zu nennen, wobei NF-κB die Transkription des viralen Promotors verstärkt, oder aus der Familie der Herpesviren das Cytomegalievirus (CMV) und das Herpes-simplex-Virus (HSV), die für eine effiziente Replikation auf die Aktivierung des NF-κB-Signalweges angewiesen sind.<sup>129,189,190,191</sup> Wie in Kapitel 1.4.3 beschrieben, ist für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges die Degradierung

seiner Inhibitoren, der I $\kappa$ B-Proteine, von großer Bedeutung. Da bereits in der Literatur der verstärkte Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  durch das Hepatitis C Virus beschrieben ist, war das Ziel dieser Arbeit die Wechselwirkung, nach Interleukin-1 $\beta$  Stimulation, mit anderen Mitgliedern der I $\kappa$ B-Proteinfamilie zu untersuchen.<sup>135</sup>

Der NF-κB-Signalweg wird durch 150 verschiedene Stimuli aktiviert, hierunter Interleukin-1β und TNFα.<sup>78,114</sup> Wie bereits in Kapitel 1.4.3 beschrieben, werden hierbei die NF-κB-Inhibitoren IκBα und IκBβ degradiert.<sup>76</sup> Auch in den hier untersuchten Hepatomazelllinien konnte ein rascher Abbau dieser Proteine durch IL-1β nachgewiesen werden (Abb. 3.1 A, B). Die Stimulation mit TNFα dagegen führte unerwarteter Weise im untersuchten Zeitraum nicht zu der Degradierung von IκBα (Abb. 3.1 E). Die Gründe hierfür gilt es weiter zu untersuchen. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte dagegen die durch IL-1β induzierte Expression von IκBζ in den Hepatomazelllinien, aber auch in primären humanen Hepatozyten belegt werden (Abb. 3.1 C, D). Eine Stimulation der Hepatomazellen mit TNFα ergab jedoch auch hier keine Induktion der IκBζ-Expression auf Proteinebene. Auch dieses Ergebnis unterscheidet sich von Literaturbefunden aus der humanen Hepatomazelllinie HepG2, passt jedoch zu Berichten aus murinen Systemen, in denen durch TNFα lediglich die Expression der IκBζ-mRNA induziert wird, aber aufgrund des Fehlens eines Stabilisierungssignales keine Proteinsynthese stattfindet.<sup>86,89</sup>

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte nicht nur die bereits beschriebene, verstärkte IL-1 $\beta$ -vermittelte Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  durch das Hepatitis C Virus bestätigt werden (Abb. 3.2. A), sondern erstmals auch Belege für eine stark verminderte Expression des I $\kappa$ B-Proteins I $\kappa$ B $\zeta$  in der subgenomischen HCV Replikonlinie Huh9-13 (Abb. 3.2 C) und in mit dem HCV-Klon JC1 infizierten Huh7.5 Zellen gesammelt werden (Abb. 3.2. D). Für den NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B $\beta$  dagegen konnte keine Wechselwirkung mit dem Virus nachgewiesen werden (Abb. 3.2 B).

# 4.2 Die HCV-vermittelte Suppression von IκBζ erfolgt auf der Proteinebene unter Beteiligung von Calpain

Bei der weiterführenden Untersuchung des Mechanismus, welcher der Suppression galt ΙκΒζ durch HCV zu Grunde liegt, verschiedene von es Regulierungsmechanismen zu betrachten, die für die IκBζ-Expression auf Transkriptund Proteinebene bereits beschrieben sind. Zu allererst sollte die Ebene bestimmt werden, auf der IkBζ HCV-vermittelt gehemmt wird. Bei diesen Untersuchungen konnte anhand der hohen Diskrepanz zwischen der fast vollständigen Hemmung der IκBζ-Expression auf Proteinebene (Abb. 3.2 C, D) und der nur geringen Suppression auf der Transkriptebene (Abb. 3.3 A, B) darauf geschlossen werden, dass IkBC eher auf der Ebene des Proteins reguliert wird.

Für die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  ist die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zwar essentiell, aber nicht ausreichend. So hemmen NF-κB-Inhibitoren die Expression der IκBζ-mRNA, aber eine Überexpression von verschiedenen NF-kB-Untereinheiten führt nur zu einer schwachen IκBζ-Induktion.<sup>90</sup> Wie bereits *Totzke et al.* 2006 beobachteten, wird durch die Hemmung der IkBa-Degradierung mit Hilfe eines Proteasom-Inhibitors die Expression von IκBζ bereits auf der Transkriptebene verhindert.<sup>86</sup> Dieser Befund konnte im Laufe dieser Arbeit auf der Proteinebene bestätigt werden (Abb. 3.4 A). Yamazaki et al. beobachteten bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener NF- $\kappa$ B-aktivierender Stimuli auf die Proteinexpression von I $\kappa$ B $\zeta$  im murinen System, dass LPS und IL-1 $\beta$  in der Lage sind die I $\kappa$ B $\zeta$ -Proteinsynthese zu induzieren, aber nicht TNFa. Dies konnte auf die verstärkte mRNA-Stabilität durch IL-1ß und LPS werden.<sup>89</sup> zurückgeführt Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Transkriptstabilität von I $\kappa$ B $\zeta$  in Anwesenheit und Abwesenheit des HCV Replikons untersucht. Dass kein Unterschied bezüglich der mRNA-Stabilität beobachtet werden konnte (Abb. 3.3 D), unterstützt die Annahme, dass HCV die IκBζ-Expression auf der Proteinebene reguliert.

Für die post-transkriptionelle Regulierung der IκBζ-Expression ist in der Literatur eine Beteiligung von miRNAs beschrieben. In der IκBζ-mRNA konnten Bindestellen für die miRNAs miR-124a und miR-187 identifiziert werden, die beide nur unvollständig an

 $I\kappa B\zeta$  binden und die Translation des Proteins hemmen.<sup>95,96</sup> Aufgrund dieser Befunde sollte daher die Beteiligung von miRNAs an der HCV-vermittelten Suppression von IκBζ untersucht werden. Neben den beiden bereits genannten miRNAs wurden mittels zweier Datenbanken weitere ausgewählt, die Bindestellen in der IκBζ-mRNA aufweisen und unter Umständen bereits als HCV-abhängig beschrieben wurden. Bei diesen Experimenten konnten zwei miRNAs identifiziert werden, die durch das HCV Replikon reguliert werden. So wurde miR-483 anders als in der Literatur beschrieben im Replikonmodell herabreguliert (Abb. 3.8 B) und erstmals eine verstärkte Expression von miR-187 beobachtet (Abb. 3.9 A).<sup>188</sup> miR-124a dagegen wurde in Anwesenheit des viralen Replikons nicht differentiell reguliert und schied damit für die Regulierung von IκBζ im HCV-Kontext aus (Abb. 3.8 A). Weitere Untersuchungen zu der miRNA miR-187 ergaben entgegen der Literaturbefunde keinen Hinweis auf dessen Beteiligung an der Hemmung der IκBζ-Expression (Abb. 3.9 B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die untersuchten miRNAs nicht bei der Regulierung der IκBζ-Expression durch das Hepatitis C Virus involviert sind. Dies schließt jedoch nicht aus, dass andere miRNAs an diesem Prozess beteiligt sind, da die IκBζ-mRNA Bindestellen für eine Vielzahl an miRNAs aufweist.

Die typischen IkB-Proteine werden durch proteasomale Degradierung reguliert, we shall be so großem Interesse war, ob auch die  $I\kappa B\zeta$ -Expression in humanen Hepatozyten auf diese Weise gesteuert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Ubiquitinylierung des Proteins beobachtet (Abb. 3.5 B) und mit Hilfe von Proteasom-Inhibitoren der Abbau von IκBζ in Hepatomazellen, aber auch in primären humanen Hepatozyten verhindert (Abb. 3.4 B, C). Da durch die Hemmung des Proteasoms auch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und damit die Induktion von I $\kappa$ B $\zeta$ generell verhindert wird, war es in diesen Untersuchungen von großer Bedeutung vor Gabe des Proteasom-Inhibitors mit IL-1 $\beta$  zu stimulieren und so die I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression zu ermöglichen. Anschließend wurde durch Zugabe des Inhibitors das Proteasom gehemmt und die Bedeutung des Proteasoms für die Regulierung von IkBC näher untersucht. Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde lassen die Schlussfolgerung zu, dass das Proteasom zwar für den Abbau von IkBC in humanen Hepatozyten relevant ist, jedoch nur von untergeordneter Bedeutung für die Hemmung der Expression von IκBζ durch HCV ist (Abb. 3.5 A). Zudem konnte keine signifikante Verstärkung der Ubiguitinylierung von  $I\kappa B\zeta$  in Anwesenheit des HCV Replikons beobachtet werden (Abb. 3.5 B), wodurch die Annahme gestützt wird, dass IκBζ im Kontext von HCV keinem verstärkten proteasomalen Abbau unterliegt.

Der Abbau eines Proteins kann jedoch nicht nur durch das Proteasom erfolgen, sondern auch Protease-vermittelt verlaufen. So wurde unter anderem ein Calpainvermittelter Abbau des IκB-Proteins IκBα durch das Hepatitis C Virus beschrieben.<sup>135</sup> Die hier vorgelegten Befunde legen nahe, dass HCV die IL-1β-induzierte Expression von IkB<sup>2</sup> Calpain-abhängig unterdrückt, da sich die Expression von IkB<sup>2</sup> durch einen Inhibitor des Calpain-vermittelten Abbaus wiederherstellen lässt (Abb. 3.6 A). Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die für den Abbau von  $I\kappa B\zeta$ verantwortliche Calpain-Isoform zu identifizieren. Ein *knockdown* der am häufigsten vertretenen Isoformen Calpain-1 und Calpain-2, deren Expression in den durchgeführten Experimenten interessanterweise durch HCV verstärkt war, ergab keinen Effekt auf die Expression von  $I\kappa B\zeta$  in HCV Replikonzellen (Abb. 3.6 B). Da es insgesamt fünfzehn verschiedene Calpain-Isoformen gibt, die teilweise ubiquitär und teilweise Organ- und Zelltyp-spezifisch exprimiert werden, gestaltete sich die Identifizierung der beteiligten Isoform schwierig und wurde nicht weiter verfolgt.<sup>165,166</sup> Aufgrund einer hohen Redundanz zwischen den verschiedenen Calpain-Isoformen ist eine kompensatorische Funktion der einzelnen Calpaine wahrscheinlich. Entsprechend wurde die Identifikation der verantwortlichen Calpain-Isoform zurück gestellt.

Interessanterweise legen die dargelegten Ergebnisse nahe, dass in den hier untersuchten Systemen die HCV-vermittelte Degradierung von  $I\kappa B\alpha$  nicht Calpainsondern Proteasom-abhängig vermittelt wird (Abb. 3.7 A, B). Woher die Diskrepanz zwischen den Literaturbefunden und den Beobachtungen dieser Arbeit rührt ist unklar, die Verwendung von unterschiedlichen Systemen könnte hierbei aber eine Rolle spielen. Während *Warris et al.* mit Hepatomazellen arbeiteten, in denen NS5A überexprimiert wurde, stammen die Befunde aus dieser Arbeit aus subgenomischen Replikonlinien, die alle Nicht-Strukturproteine des Virus exprimieren.<sup>135</sup> Die durchgeführten Untersuchungen liefern zudem Hinweise darauf, dass das HCV Replikon nicht nur die IL-1 $\beta$ -induzierte Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  verstärkt, sondern vor allem auch die im Anschluss an den Abbau folgende Neusynthese des Proteins verhindert. Der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren bewirkte auch hier die Wiederherstellung von I $\kappa$ B $\alpha$  in den HCV-Replikonzellen. Die Hemmung der

endogenen  $I\kappa B\alpha$ -Expression bleibt jedoch durch HCV unbeeinflusst. Zusammenfassend weisen sowohl die verstärkte Degradierung, als auch die Unterdrückung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinsynthese auf eine verstärkte und lang anhaltende Aktivierung von NF-kB durch das Hepatitis C Virus hin. Die Bedeutung dieses Befundes für die HCV-vermittelte Regulierung NF-kB-abhängiger Gene wird in Kapitel 4.3 diskutiert. Neben den Untersuchungen zum Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  wurde auch die Regulierung des HCV-unabhängigen  $I\kappa B\beta$  in Hepatomazellen betrachtet. Im Gegensatz zu  $I\kappa B\alpha$  legen die zu  $I\kappa B\beta$ vorgelegten Daten nahe, dass dieses Protein nach IL-1β-Stimulation zwar auch proteasmal degradiert wird, aber ein noch weitaus stärkerer Abbau von IkBß durch Calpaine erfolgt (Abb. 3.7 A, B). Im Kontext des murinen Moloney Leukämie-Virus beobachteten Kim et al. 2001 interessanterweise in Astrozyten einen zu diesen Befunden gegenteiligen Effekt. Während Calpain insbesondere an der Degradierung von  $I\kappa B\alpha$  beteiligt war, wurde  $I\kappa B\beta$  vor allem proteasomal abgebaut.<sup>192</sup> Trotz der gegensätzlichen Mechanismen zum Abbau von IkBa durch das Hepatits C Virus und dem murinen Moloney Läukemie-Virus, wird die Bedeutung der hierdurch bedingten 

Das Hepatitis C Virus wechselwirkt mit einer Vielzahl von verschiedenen Signalwegen, die einen Einfluss auf den Calpain-vermittelten Abbau von IkBC haben könnten. So interferiert HCV zum Beispiel mit dem Akt-Signalweg und dem MAPK-Signalweg, die beide durch das Virus verstärkt aktiviert werden.<sup>25,59,61</sup> Wang et al. beobachteten 2012, dass TNF $\alpha$  in Hepatozellulären Karzinom-Zellen die Interleukin-8 Synthese NF- $\kappa$ B-abhängig induziert. Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung erfolgte hierbei durch die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 sowie des PI3K/Akt-Signalweges.<sup>193</sup> Da NF-κB wiederum für die Induktion der ΙκΒζ-Expression eine bedeutende Rolle spielt, sollte im Rahmen dieser Arbeit auch eine mögliche Wechselwirkung der MAP-Kinasen und des Akt-Signalweges mit der IKBZ-Expression untersucht werden. Zudem verläuft die Wachstumsfaktor-abhängige Phosphorylierung und damit Aktivierung von Calpain-2 ERK1/2-abhängig, weshalb die Untersuchung der MAPK-Signalwege von besonderem Interesse war.<sup>173</sup> Die Stimulation der Huh7 und Huh9-13 Zellen mit Interleukin-1ß resultierte in einer Aktivierung von p38 und Akt, die durch das HCV-Replikon verstärkt wurde. Eine Inhibierung dieser Signalwege, beeinflusste jedoch nicht die IkBζ-Expression (Abb.

132

3.10 A, B). Im Gegensatz dazu führten die Hemmung des MEK1/2- und des JNK-Signalweges in Huh7 Zellen zu einer verminderten I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression, die in etwa dem Effekt durch HCV gleicht (Abb. 3.11 A, B). In Analogie zu der Hemmung der IL-1βinduzierten Proteinexpression von IκBζ durch das Hepatitis C Virus, wirkt sich der MEK1/2-Inhibitor ebenfalls nur auf der Ebene des Proteins aus, wogegen die IkBζ-Transkription durch den Inhibitor unbeeinflusst bleibt (Abb. 3.12). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der Inhibitor nicht die Aktivierung von NF-kB beeinflusst, die für die Transkription von IkB<sup>2</sup> von Bedeutung ist, sondern auf der Stufe der Translation oder post-translationell wirkt. Der MEK1/2- und JNK-Inhibitor simulieren daher den Effekt von HCV auf die IL-1β-induzierte IκBζ-Expression in Hepatomazellen. Es gilt noch zu klären, ob MEK1/2 und JNK parallel zueinander die Expression von  $I\kappa B\zeta$ beeinflussen, oder in der Signalkaskade nacheinander agieren. MEK1/2 und JNK werden, wie einleitend erläutert, durch eine HCV-Infektion verstärkt aktiviert. Während die HCV-vermittelte Aktivierung von JNK als IL-1β-abhängig beschrieben wird, ist für MEK1/2 bislang nur eine Stimulus-unabhängige Aktivierung durch das Virus beschrieben.<sup>194, 195, 196</sup> Aufgrund der in dieser Arbeit vorgelegten Daten ist davon auszugehen, dass MEK1/2 und JNK für die IL-1β-induzierte Expression von IκBζ in Hepatozyten erforderlich sind, dass aber das Hepatitis C Virus auf der einen Seite MEK1/2 und JNK verstärkt und auf der anderen Seite IkBC hemmt. Dies legt einen Zwischenschritt in der Signalkaskade nahe, der durch HCV modifiziert wird und zu einer Herabregulierung der IL-1 $\beta$ -induzierten I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression führt.

# 4.3 Die Herabregulierung der ΙκΒζ-Expression resultiert in der Hemmung der Lipocalin-2 Expression

Das Hepatitis C Virus reguliert eine Vielzahl von Wirtsfaktoren, um seine Replikation zu gewährleisten, die Immunantwort der Zelle zu unterlaufen und seinen Wirt am Leben zu erhalten. Da I $\kappa$ B $\zeta$  nicht nur als NF- $\kappa$ B-Inhibitor dient, sondern auch als positiver oder negativer Regulator der Transkription fungiert, sollte die Relevanz der I $\kappa$ B $\zeta$ -Suppression für das Hepatitis C Virus näher untersucht werden. Bei der Untersuchung möglicher Zielgene wurden Gene betrachtet, die in der Literatur als

133

IκBζ-abhängig beschrieben wurden und welche, die sich im Rahmen eines Gene- $I\kappa B\alpha$ -stabil exprimierenden HepG2-Zellen als NF- $\kappa$ B-abhängig Arrays mit herausgestellt haben (unveröffentlichte Daten Albrecht, Bode et al.). Alle als NF-κBabhängig definierten Gene aus Tabelle 3.2 wurden unter IL-1ß-Einfluss in den HCV-Replikonzellen verstärkt exprimiert, jedoch konnte bei keinem dieser Gene eine IkBζ-Abhängigkeit beobachtet werden. Die Gene mit den größten HCV-bedingten Expressionsunterschieden wurden näher untersucht. Die Expression der Gene CXCL8 (Abb. 3.14 A), Gbp1 (Abb. 3.16 B), TNFAIP3 (Abb. 3.17 B) und IL-18 (Abb. 3.18 A) wurde durch IL-1 $\beta$  induziert und HCV-abhängig verstärkt. Ihre rasche Transkription nach Stimulation deutet auf die bereits im array beobachtete NF-κB-Abhängigkeit dieser Gene hin. Dagegen wurden die Gene CXCL5 (Abb. 3.14 B), Birc2 und Birc3 (Abb. 3.15 A, B) erst sechs Stunden nach der IL-1β-Stimulation durch HCV heraufreguliert. Dieser Befund legt nahe, dass für die Induktion dieser Gene zwar, wie im array beobachtet, NF- $\kappa$ B erforderlich ist, aber ihre HCV-bedingte Verstärkung möglicherweise von weiteren Faktoren abhängig ist. Auch die IL-1βinduzierte Expression der Gene CEBP $\delta$  (Abb. 3.16 A) und TNF $\alpha$  (Abb. 3.17 A) wurde durch das HCV-Replikon reguliert. Hierbei legen die vorgelegten Daten iedoch nahe. dass HCV die Transkription dieser Gene nicht verstärkt sondern aufrecht erhält während in uninfizierten Zellen die mRNA-Konzentration bereits wieder abnimmt. Ein Grund für diesen Effekt könnte die durch HCV lang anhaltende NF-kB-Aktivierung sein. Abweichend von den übrigen untersuchten Genen, konnte für Gbp2 zwar auch eine verstärkte Expression durch das HCV-Replikon beobachtet werden, jedoch keine IL-1β-Abhängigkeit festgestellt werden (Abb. 3.18 B). Für die NF-κBabhängigen Gene Birc3, Gbp2 und TNFAIP3 konnte zudem der auf der Transkriptebene beobachtete verstärkende Effekt durch das Hepatitis C Virus auch auf der Proteinebene bestätigt werden (Abb. 3.18 B). Die durch das Hepatitis C Virus verstärkte IL-1β-induzierte Expression von CXCL8 passt zu Vorbefunden aus der Literatur, wonach die TNF $\alpha$ -induzierte Expression des Chemokins in NS5A-197 exprimierenden HeLa-Zellen ebenfalls heraufreguliert ist. Ebenso ist übereinstimmend mit den hier vorgelegten Befunden für CXCL5 bereits eine verstärkte Expression im Serum chronisch infizierter HCV Patienten beschrieben.<sup>198</sup> Ebenso wurde die verstärkte Expression von Mitgliedern der Apoptose-Inhibitoren-Familie, zu der auch Birc2 und Birc3 zählen, bereits 2009 von Zhang et al. in infizierten Huh7.5 Zellen beobachtet. 199 Erstmals konnte in dieser Arbeit auch die langanhaltende Expression des Transkriptionsfaktors CEBP $\delta$  in IL-1 $\beta$ -stimulierten HCV-Replikonzellen beschrieben werden (Abb. 3.15 A). Obwohl Vorbefunde aus der Literatur eine Beteiligung von IkBC an der Regulierung dieses Faktors nahe legen (Yamamoto et al., 2004), konnte dies durch den knockdown von  $I\kappa B\zeta$  in Hepatomazellen nicht bestätigt werden. Auch für die Heraufregulierung von Gbp2 gibt es in der Literatur bereits Vorbefunde. Miller et al. beobachteten 2004 die verstärkte Expression von GBP2 durch das virale Protein Core.<sup>200</sup> Die in dieser Arbeit beschriebene Heraufregulierung dieses Genes wurde jedoch in der beobachtet, subgenomischen Replikonlinie Huh9-13 die nur die Nicht-Strukturproteine des Virus enthält. Daher ist anzunehmen, dass verschiedene virale Proteine an der Regulierung von GBP2 beteiligt sind. Ebenso reguliert HCV auch die Expression von anti-apoptotischen Faktoren, wie TNFAIP3. Vorbefunde legen auch hier eine Regulierung dieses Proteins durch das HCV-Protein Core nahe.<sup>201</sup> Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten lassen zusätzlich eine Regulierung der IL-1βinduzierten Expression durch die HCV Nicht-Strukturproteine vermuten. Interessantwerweise konnte im Rahmen dieser Arbeit in den verwendeten Hepatomazellen und den HCV-Replikonzellen auch die Expression von TNF $\alpha$  auf der mRNA-Ebene beobachtet werden. Ebenso wie bei den zuvor beschriebenen Genen, führten die HCV Proteine zu einer gesteigerten TNF $\alpha$ -Expression (Abb. 3.17 A). Obwohl Yamamoto et al. 2004 eine gesteigerte TNF $\alpha$ -Produktion in I $\kappa$ B $\zeta$ -defizienten Mäusen beobachten konnten, resultierte ein IκBζ-knockdown in Hepatomazellen nach IL-1 $\beta$ -Stimulation in keinem signifikanten Effekt auf die TNF $\alpha$ -Expression. Die Begründung für die dargestellten Unterschiede könnte die Nutzung verschiedener Systeme sein. Ergebnisse aus Mäusen und Hepatomazellen können daher voneinander abweichen. An dieser Stelle ist jedoch auch zu erwähnen, dass Hepatozyten keine klassischen TNFa-produzierenden Zellen sind und die Expression von TNF $\alpha$  in dieser Arbeit lediglich auf der Ebene des Transkriptes untersucht wurde. Die Umsetzung des Transkriptes zum TNFα-Protein wurde jedoch nicht weiter untersucht. Die durch das Hepatitis C Virus verstärkte IL-1ß-induzierte IL-18 Expression in Hepatozyten stimmt mit Vorbefunden aus Makrophagen überein, die durch die Behandlung mit HCV-enthaltenden Überständen vermehrt IL-18 sekretieren.<sup>134</sup> Außerdem lassen Vorbefunde aus der Literatur annehmen, dass IL-18 IκBζ-abhängig reguliert wird.<sup>106</sup> Durch den *knockdown* von IκBζ konnte zwar ein Trend in diese Richtung beobachtet werden, jedoch kein eindeutiger Hinweis auf eine Beteiligung von IκBζ erhalten werden.

Ein weiteres Protein, welches hinsichtlich seiner Beeinflussbarkeit durch HCV und auf eine IkBC-Abhängigkeit hin untersucht wurde, ist Lipocalin-2. Dieses Protein spielt, wie bereits einleitend erläutert (Kapitel 1.5), eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunantwort des Wirtes und wird NF-kB-abhängig reguliert. Außerdem gibt es einige Hinweise aus der Literatur, die nahe legen, dass Lipocalin-2 nicht nur NF-kB für seine Transkription benötigt, sondern auch das hierbei als Co-Faktor agierende IkBC.<sup>105,144,145</sup> Die hier vorgelegten Daten belegen erstmals, dass das Hepatitis C Virus die IL-1β-vermittelte Induktion von IκBζ supprimiert und auf diesem Wege die Transkription von Lipocalin-2 hemmt (Abb. 3.19). Die Herabregulierung der LCN2-Expression nach IL-1β-Stimulation konnte sowohl in den subgenomischen Replikonzellen Huh9-13, als auch in der Volllängen-Replikonlinie Huh21-5 und in mit dem HCV-Klon JC1 infizierten Zellen beobachtet werden. Die beobachtete Beteiligung von IκBζ an der Regulierung der LCN2-Expression stimmt mit den Befunden aus der Literatur überein.<sup>144</sup> Anders als diese Befunde annehmen lassen, wurde im Lebergewebe HCV-infizierter Patienten eine Herauf- und keine Herabregulierung der Expression von LCN2 beschrieben.<sup>161</sup> Bei der Diskussion dieser Daten ist jedoch zu berücksichtigen, dass die vorliegende Arbeit nur die Hepatozyten und nicht die übrigen Nichtparenchymzellen untersucht und dass insbesondere diese Entzündungszellen verstärkt LCN2 produzieren. Dementsprechend legen Literaturbefunde nahe, dass eine verstärkte LCN2-Expression vor allem bei Patienten mit fortgeschrittener Zirrhose zu beobachten ist.<sup>161</sup> Die Daten lassen keine Aussage zu, ob diese verstärkte LCN2-Expression noch durch das Hepatitis C Virus reguliert wird oder eine Entgleisung durch die Entzündung darstellt und am Ende wohlmöglich dem Virus sogar schadet. Ziel dieser Arbeit war jedoch nicht die Untersuchung des Einflusses von HCV im fortgeschrittenen Infektionsverlauf sondern die Frage, welche Gen-Regulierungen das Virus zu Beginn einer Infektion vollzieht.

Die Beteiligung von  $I\kappa B\zeta$  an der Regulierung der LCN2-Transkription im Hepatozyten wird weiterhin dadurch bestätigt, dass die Inhibierung des MEK-Signalweges wie zuvor beschrieben nicht nur die Induktion des  $I\kappa B\zeta$ -Proteins verhindert, sondern

ebenfalls zu einer Herabregulierung der LCN2-Transkriptmenge führt (Abb. 3.21). Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass ein gemeinsamer Faktor in der MEK-Signalkaskade der Proteinsynthese von  $I\kappa B\zeta$  und der Transkription von LCN2 vorgeschaltet ist und durch das Hepatitis C Virus wahrscheinlich gehemmt wird.

## 4.4 HCV hemmt die Aktivität der MAPKAP-Kinase-2 und supprimiert hierdurch die IκBζ-Proteinsynthese und die darausfolgende LCN2-Expression

Zeitgleich zu diesen Studien wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Gen-array mit Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen, MK2-defizienten Mäusen murinen und MK2/MK3-defizienten Mäusen, die mit LPS stimuliert waren, durchgeführt. Hierbei wurde beobachtet, dass die LPS-induzierte Lipocalin-2-Expression durch die MK2-Defizienz gehemmt wird (unveröffentlichte Daten, Ehlting, Bode et al.). Die Regulierung der LCN2-Expression erfolgte hier bereits auf der Transkriptebene (Abb. 3.22). Außerdem konnten zudem Hinweise dafür gesammelt werden, dass ein zusätzlicher knockout der MAPKAP-Kinase-3 sogar zu einer weiteren Reduzierung der LCN2-Expression (Abb. 3.22 A) führt. In Übereinstimmung mit den Daten aus murinen Makrophagen konnte auch in murinen Hepatozyten eine Beteiligung der MK2 an der IL-1β-vermittelten LCN2-Expression beobachtet werden. (Abb. 3.22 C). Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten bestätigen diese Befunde zudem in humanen Hepatozyten. Auch in diesem System findet die IL-1<sup>β</sup>-vermittelte Expression von LCN2 bereits auf der Transkriptebene statt und kann auf der Proteinebene bestätigt werden (Abb. 3.23 A, B). Zusammengefasst ergeben die Beobachtungen aus murinen und humanen Zellen eine eindeutige Beteiligung der MK2 an der IL-1<sub>β</sub>-induzierten LCN2-Expression in Makrophagen Regulierung der und Hepatozyten.

Das Hepatitis C Virus ist nicht nur an der Herabregulierung der LCN2-Expression beteiligt, sondern hemmt auch die IL-1 $\beta$ -vermittelte Aktivierung der MK2. Dies konnte in Übereinstimmung mit Vorbefunden unserer Arbeitsgruppe (unveröffentlichte Daten *Karthe, Bode et al.*) bei den Untersuchungen zu dem Einfluss der MEK- und JNK-Inhibitoren auf die I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression beobachtet werden (Abb. 3.11). MK2 spielt durch

die Regulierung proinflammatorischer Zytokine im Makrophagen eine wichtige Rolle in der Entzündungsantwort der Zelle. So konnte in MK2-defizienten Mäusen eine Hemmung der LPS-vermittelten Expression von TNF $\alpha$  und IL-6 beobachtet werden.<sup>64,65</sup> Zudem beobachteten Ehlting et al. 2011, dass in LPS-stimulierten MK2defizienten Makrophagen die I $\kappa$ B $\alpha$ -Expression gehemmt ist.<sup>66</sup> In Hepatozyten ist dagegen die Funktion der MK2 weitestgehend unbekannt und muss noch untersucht werden. Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde legen nahe, dass die MK2 in Hepatozyten an der Regulierung der IL-1β-induzierten Expression von IκBζ beteiligt ist (Abb. 3.23 C). Der diesem Effekt zu Grunde liegende Mechanismus ist bislang unklar und wird daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Denkbar wäre, dass die MK2 durch seine Kinase-Aktivität IkBζ phosphoryliert und somit vor einer Calpain-vermittelten Degradierung schützt oder die Aktivität von Calpain hemmt. In diesem Modell würde HCV durch die Hemmung der MK2 mit der Signalübertragung interferieren, über welche IL-1 $\beta$  in Abwesenheit von HCV die Degradierung von I $\kappa$ B $\zeta$ durch Calpain verhindert. Die Tatsache, dass die IL-1ß-induzierte Aktivierung der MK2 in Huh7 Zellen MEK1/2- und JNK-abhängig verläuft (Abb. 3.11 A, C) und die Hemmung von MEK1/2 (Abb. 3.11 A), JNK (Abb. 3.11 B) und MK2 (Abb. 3.23 C) zu einer Herabregulierung der IL-1 $\beta$ -induzierten Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  führt, legt nahe, dass die MK2 das Bindeglied zwischen MEK1/2, JNK und der Hemmung des Abbaus von IκBζ darstellt, dessen Aktivität durch HCV beeinflusst wird. Die spezifischen MEK1/2- und JNK-Inhibitoren simulieren daher den hemmenden HCV-Effekt auf die IL-1β-induzierte IκBζ-Expression durch die Inhibierung der MK2-Aktivität. Wieso allerdings der p38-Inhibitor keinen Einfluss auf die IkBζ-Expression ausübte (Abb. 3.10 B), obwohl diese MAP-Kinase als Hauptaktivator der MK2 gilt, ist unklar und wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Die HCV-bedingte Hemmung der IkBC-Expression durch die Interferenz mit der MK2-Aktivität resultiert anschließend in der Herabregulierung der LCN2-Transkription.

### 4.5 HCV hemmt die Expression von Lipocalin-2, um dessen negativen Effekt auf die Zellproliferation von Hepatozyten zu verringern

Persistierende Viren, so auch das Hepatitis C Virus, müssen das Überleben ihrer Wirtszelle sichern und hierbei vor allem die durch die Virus-Infektion selbst ausgelösten pro-apoptotischen Signale in der Zelle neutralisieren. Sowohl für IkBζ, als auch für LCN2 gibt es eine Reihe von Literaturbefunden, die diese Proteine mit der Induktion von Seneszenz und Apoptose in Verbindung bringen. So bewirkt der *knockdown* von  $I\kappa B\zeta$  eine Resistenz der Zelle gegen die TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose.<sup>84</sup> Außerdem reguliert I $\kappa$ B $\zeta$  in Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp die Expression von Cytokinen und induziert dadurch die Seneszenz einer Zelle.<sup>113</sup> Die Überexpression von Lipocalin-2 in Hepatoma-Zelllinien führt zu einer verstärkten Apoptose der Zellen, induziert Seneszenz und hemmt die Zellviabilität.<sup>158</sup> Auch in HCC-Zellen und in einem Maus-Modell führt die Überexpression von LCN2 zu einer Suppression des Tumorwachstums.<sup>159,160</sup> Aufgrund dieser Literaturbefunde wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass das Hepatitis C Virus die Aktivierung der MK2 und damit die Expression von IκBζ und Lipocalin-2 hemmt, um einen Einfluss auf die Zellproliferation seiner Wirtszelle zu nehmen und Apoptose zu verringern. Zellproliferationsassays legen eine Hemmung der Zellproliferation in Hepatozyten mit steigender LCN2-Konzentration nahe (Abb. 3.24 A, B). Die Zellen in diesen Experimenten wurden zuvor mit dem Apoptose-induzierenden Zytostatikum Actinomycin-D behandelt, wordurch die Wirkung von LCN2 in apoptotischen Zellen untersucht wurde. Daher könnte der beobachtete Zellproliferations-hemmende Effekt von LCN2 auch eine Verstärkung der Actinomycin-D-bedingten Apoptose durch LCN2 annehmen lassen. Um unterscheiden zu können, ob LCN2 lediglich die Zellproliferation hemmt oder auch die Apoptose der Zelle bedingt, wurde die Expression des Apoptosemarkers PARP in HCV-Replikonzellen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen nahe, dass sowohl TNF $\alpha$ , als auch IL-1 $\beta$ die Actinomycin-D-induzierte Apoptose verstärken. LCN2 dagegen übte keinen Einfluss auf die Expression von PARP aus (Abb. 3.24 C). Auf welcher Ebene Lipocalin-2 mit der Zellproliferation bzw. Apoptoseinduktion interferiert konnte im Rahmen dieser Arbeit letztendlich nicht geklärt werden. Die Experimente legen LCN2 Einfluss jedoch nahe, dass den von Faktoren, die mit der

Proliferationsfähigkeit von Zellen interferieren, verstärkt. Es wäre denkbar, dass die Hemmung der LCN2 Expression durch HCV einen Mechanismus darstellt, über den HCV Signale antagonisiert, die ansonsten dazu beitragen würden, die Überlebensfähigkeit der infizierten Zelle zu reduzieren.

#### 4.6 Fazit dieser Arbeit

Die in Kapitel 4 diskutierten Ergebnisse ermöglichen die Erstellung eines vorläufigen Modells zum Mechanismus und der funktionellen Relevanz der HCV-vermittelten Hemmung der IL-1 $\beta$ -induzierten Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  (Abb. 4.1). In Hepatozyten wird durch IL-1 $\beta$  der proteasomale Abbau des typischen NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  induziert. Dadurch werden die NF-κB-Dimere freigesetzt und translozieren in den Nukleus, wo sie die Expression einer Vielzahl von Zielgenen, darunter Chemokine und Apoptose-Inhibitoren, regulieren. NF-kB induziert desweiteren auch die Expression seiner eigenen Inhibitoren I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\zeta$ . I $\kappa$ B $\alpha$  inhibiert wiederum in einem negativen *feedback loop* die NF- $\kappa$ B-Aktivität. Die IL-1 $\beta$ -induzierte Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  wird in Hepatozyten sowohl durch proteasomalen Abbau, als auch durch einen Calpainvermittelten Abbau reguliert. Neben dem NF-kB-Signalweg induziert IL-1ß auch die Aktivierung der MAP-Kinasen MEK1/2, JNK und p38, die wiederum die Aktivität der MAPKAP-Kinase-2 induzieren. Zudem spielt die Aktivierung von MEK1/2, JNK und der MK2, aber nicht die der p38, eine bedeutende Rolle für die Expression von  $I\kappa B\zeta$ in Hepatozyten. I $\kappa$ B $\zeta$  wiederum dient als transkriptioneller Regulator bei der IL-1 $\beta$ vermittelten Expression von Lipocalin-2, welches möglicherweise die Proliferation von Hepatozyten hemmt (Abb. 4.1).

Das Hepatitis C Virus modifiziert Signalwege in Hepatozyten, um seine eigene Replikation zu gewährleisten und das Überleben der Wirtszelle zu sichern. Eine HCV-Infektion führt zu einer verstärkten und langanhaltenden IL-1 $\beta$ -vermittelten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges, indem es den proteasomalen Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ verstärkt und die Wiederherstellung dieses NF- $\kappa$ B-Inhibitors verhindert. Eine Folge dieser verstärkten Aktivität ist die Heraufregulierung einer Reihe möglicher NF- $\kappa$ B-Zielgene. Hierzu zählen Chemokine, wie CXCL8 und CXCL5, aber auch Apoptose-

Inhibitoren, wie Birc2 und Birc3 (siehe Abb. 4.1). HCV reguliert jedoch nicht nur den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , sondern auch die IL-1 $\beta$ -vermittelte Expression des NF- $\kappa$ B-Inhibitors IκBζ. Dies geschieht am ehesten durch einen verstärkten Calpain-vermittelten Abbau von  $I\kappa B\zeta$ . Die Hemmung der  $I\kappa B\zeta$ -Expression durch HCV führt auch zu einer Herabregulierung von Lipocalin-2. Daher wird der Zellproliferations-hemmende Effekt von Lipocalin-2 auf diese Weise durch das Hepatitis C Virus vermindert. Neben dem NF-kB-Signalweg verstärkt HCV auch die IL-1ß-induzietre Aktivierung der MAP-Kinase p38. Ebenso legen Literaturbefunde eine verstärkte Aktivierung der MAP-Kinasen MEK1/2 und JNK durch das Hepatitis C Virus nahe. Im Gegensatz dazu hemmt HCV die IL-1β-induzierte Aktivierung der MAPKAP-Kinase-2, die durch MEK1/2, JNK und p38 reguliert wird. Dass die MK2 an der Regulierung der Expression von  $I\kappa B\zeta$  in Hepatozyten beteiligt ist, legt nahe, dass die Hemmung der Kinase durch HCV auch in der Herabregulierung von ΙκΒζ resultiert. Am ehesten ist anzunehmen, dass die MK2 in Hepatozyten ΙκΒζ vor einem Calpain-vermittelten Abbau schützt und durch die Hemmung der MK2 durch HCV das Protein verstärkt abgebaut wird. Dies gilt es jedoch weiter aufzuklären (Abb. 4.1).



### Abb. 4.1: HCV supprimiert die IL-1 $\beta$ -induzierte I $_{\kappa}B\zeta$ -Expression unter Beteiligung von Calpain und durch die Hemmung der MK2-Aktivität.

Eine HCV-Infektion führt zu einer verstärkten und langanhaltenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch den proteasomalen Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und die Hemmung der Wiederherstellung dieses Proteins. Dies resultiert in einer Heraufregulierung der IL-1 $\beta$ -vermittelten Expression von NF- $\kappa$ B-Zielgenen. Desweiteren hemmt HCV die IL-1 $\beta$ -induzierte Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  durch einen verstärkten Calpain-vermittelten Abbau des Proteins. Der verstärkte Abbau von I $\kappa$ B $\zeta$  durch HCV wird am ehesten durch die Hemmung der MAPKAP-Kinase-2 bedingt und resultiert in einer Herabregulierung der IL-1 $\beta$ -induzierten LCN2-Expression. Auf diese Weise verringert HCV den Zellproliferations-hemmenden Effekt von LCN2.

#### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Interferenz des Hepatitis C Virus mit dem NF-kB-Signalweg und im speziellen mit seinen Inhibitoren, den IkB-Proteinen. NF-κB ist eine wichtige Komponente der intra-zellulären proinflammatorischer Signalübertragung Zytokine wie Interleukin-1β. Als Transkriptionsfaktor reguliert NF-kB die Transkription einer Vielzahl von Genen, die eine wichtige Rolle in der Entzündungs- und Immunantwort spielen. Da bereits in der Literatur der verstärkte Abbau von IkBa durch das Hepatitis C Virus beschrieben ist, war das Ziel dieser Arbeit die Wechselwirkung mit anderen Mitgliedern der IkB-Proteinfamilie nach Interleukin-1β-Stimulation zu untersuchen. Hierbei konnte nicht nur die bereits beschriebene, verstärkte Degradierung von  $I\kappa B\alpha$  durch HCV bestätigt werden, sondern auch eine Hemmung der Wiederherstellung dieses Proteins beobachtet werden. Die Folge dieser verstärkten und langanhaltenden IL-1βvermittelten NF-kB-Aktivierung ist eine Heraufregulierung NF-kB-abhängiger Zielgene, darunter Chemokine und Apoptose-Inhibitoren. Erstmals konnten im Rahmen dieser Arbeit auch Belege für eine stark verminderte Expression des IkB-Proteins IkB<sup>C</sup> durch das Hepatitis C Virus gesammelt werden. Die Herabregulierung von  $I\kappa B\zeta$  durch das Hepatitis C Virus erfolgt am ehesten auf der Proteinebene, da nur ein sehr geringer Einfluss auf die I $\kappa$ B $\zeta$ -Transkription und kein Effekt auf die I $\kappa$ B $\zeta$ -Transkriptstabilität beobachtet wurde. Ergebnisse aus den Untersuchungen zu dem Mechanismus, der der HCV-vermittelten Hemmung der durch IL-1β-induzierten Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  zu Grunde liegt, legen nahe, dass durch IL-1 $\beta$ -Induktion I $\kappa$ B $\zeta$  in Hepatozyten proteasomal degradiert wird. Im Kontext des HCV-bedingten Abbaus von  $I\kappa B\zeta$  scheint jedoch ein Calpain-vermittelter Abbau von Bedeutung zu sein, während der proteasomale Abbau allenfalls eine untergeordnete Rolle spielt. Desweiteren konnte keine Beteiligung der miRNAs miR-124a oder miR-187 an der Beeinflussung der IκBζ-Expression durch HCV in Hepatozyten festgestellt werden. Ebenso scheinen weder der Akt-Signalweg, noch der p38-Signalweg an der Beeinflussung der IκBζ-Proteinsynthese beteiligt zu sein. Dagegen spielten die MAP-Kinasen MEK1/2 und JNK eine Rolle in der IL-1 $\beta$ -induzierten Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  in Hepatozyten. Da I $\kappa$ B $\zeta$  im Gegensatz zu den typischen I $\kappa$ B-Proteinen nicht nur als

Inhibitor des NF-kB-Signalweges dient sondern auch als transkriptioneller Regulator, wurden Untersuchungen zu der Relevanz der IκBζ-Suppression für das Hepatitis C Virus durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals belegt werden, dass das Hepatitis C Virus die IL-1β-vermittelte Induktion von IkBζ durch einen Calpainabhängigen Abbau hemmt und auf diesem Weg die Transkription von Lipocalin-2 herabreguliert. In Übereinstimmung mit Befunden der Gruppe aus murinen Makrophagen und Hepatozyten, die aus MK2-defizienten Tieren isoliert wurden, konnte in humanen Hepatozyten eine Beteiligung der MAPKAPK-2 an der Regulierung von LCN2 beobachtet werden. Ebenso konnte, wie in Vorbefunden der Gruppe bereits belegt, eine Hemmung der IL-1β-vermittelten MK2-Aktivierung durch das HCV-Replikon festgestellt werden. Inhibitor-Experimente zu der Interferenz von MK2 mit der IκBζ-Expression legen zudem nahe, dass die HCV-bedingte Hemmung der MK2-Aktivität zu einer Herabregulierung von IkBC auf Proteinebene führt und in einer Hemmung der IκBζ-abhängigen Genexpression resultiert. Da die vorliegenden Untersuchungen nahe legen, dass LCN2 in den untersuchten Zelllinien die Zellproliferation hemmt, ist es denkbar, dass HCV unter anderem über die Hemmung der IkBC-abhängigen Expression von LCN2 Faktoren antagonisiert, die sich negativ auf die Überlebensfähigkeit der infizierten Wirtszelle auswirken.

#### 6 SUMMARY

The present study analyses the interference of HCV with regulators of the NF $\kappa$ B pathway and in particular with its inhibitors, the  $I\kappa B$ -proteins. NF- $\kappa B$  is involved in cellular response to proinflammatory cytokines like Interleukin-1ß and regulates a broad range of genes which play an important role in inflammatory and immune response. Because it was recently shown that HCV increases degradation of  $I\kappa B\alpha$ , this work focused on interactions of the virus with the IL-1ß-induced expression of other members of this protein family. Collected data not only confirmed an increase of  $I\kappa B\alpha$ -degradation by HCV but showed also an inhibition of the recovery of the protein. Following this reinforced and long-lasting IL-1β-induced activation of NF-κB NF-kB-dependent genes, like chemokines and inhibitors of apoptosis, are upregulated. In the course of these studies it was shown for the first time that the IL-1 $\beta$ induced expression of  $I\kappa B\zeta$  is down-regulated by HCV. Of note only IL-1 $\beta$  but not TNF $\alpha$  was able to induce the expression of I $\kappa$ B $\zeta$  in the Hepatoma cell line Huh7. The findings implicate that downregulation of IkBC occured on the level of protein and not on transcript level. While investigating the underlying mechanism by which HCV averts IL-1 $\beta$ -induced expression of I $\kappa$ B $\zeta$  it could be demonstrated that in hepatocytes under normal conditions  $I \kappa B \zeta$  is degradated by proteasome. In context of HCVmediated degradation of IkBC Calpain seems to be of importance while proteasomal degradation seems to be of less relevance. Furthermore it was not possible to show an involvement of the miRNAs miR-124a and miR-187 in regulation of IkBZexpression in the Hepatoma cell line Huh7. In addition inhibition of other signallingpathways known to be activated by HCV, such as the p38-pathway and Aktdependent signalling, had no effect on IκBζ-expression. In contrast the MAP-kinases MEK1/2 and JNK seems to play an important role in IL-1<sub>β</sub>-induced expression of  $I\kappa B\zeta$  in hepatocytes.

Compared to typical I $\kappa$ B-proteins, I $\kappa$ B $\zeta$  does not only act as a NF- $\kappa$ B-inhibitor but also as a transcriptional regulator. Therefore it was of particular interest to investigate the functional relevance of I $\kappa$ B $\zeta$  down-regulation by HCV. Based on the literature known interaction of I $\kappa$ B $\zeta$  and Lipocalin-2, this gene could be identified to be
regulated by HCV via Calpain-dependent inhibition of IL-1 $\beta$ -induced I $\kappa$ B $\zeta$  expression. In accordance with results of this group in murine macrophages and hepatocytes, isolated from MK2-defficient mice, it could be shown that MK2 is involved in regulation of LCN2 transcription in human hepatocytes. In addition, IL-1 $\beta$ -induced MK2-activation is prevented by HCV in replicon harbouring cells. Inhibitor-experiments concerning the interference of MK2 with I $\kappa$ B $\zeta$ -expression implicate that HCV suppresses I $\kappa$ B $\zeta$ -expression by inhibition of MK2-activation and thereby avoid transcription of Lipocalin-2. Furthermore research indicates that LCN2 inhibits cellproliferation in the examined celllines. Therefore it is possible that HCV antagonizes factors, which have a negative effect on survivability of infected host cells, by inhibition of I $\kappa$ B $\zeta$ -dependent LCN2 expression.

## 4 LITERATURVERZEICHNIS

<sup>1</sup> World Health Organisation, *Fact Sheet N°164*. Stand April **2014**; Online erhältlich, URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/.

<sup>2</sup> Feinstone, S. M. *et al.* (**1975**). Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *N. Engl. J. Med.* **292**, 767-770.

<sup>3</sup> Choo, Q-I. *et al.* (**1989**). Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* **244**, 359-362.

<sup>4</sup> Bukh, J. *et al.* (**1995**). Genetic Heterogeneity of Hepatitis C Virus: Quasispecies and Genotypes. *Semin. Liver Dis.* **15** (1), 41-63.

<sup>5</sup> Simmonds, P. (**2012**). The origin of hepatitis C virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **369**, 1-15.

<sup>6</sup> Simmonds, P. (**2001**). The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J. of. Gen. Virol.* **82**, 693-712.

<sup>7</sup> Suzuki, T. *et al.* (**2007**). Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1200-1212.

<sup>8</sup> Bartenschlager, R. *et al.* (**2000**). Replication of hepatitis C virus. *J. of Gen. Virol.* **81**, 1631-1648.

<sup>9</sup> Gastaminza, P. *et al.* (**2010**). Ultrastructural and Biophysical Characterization of Hepatitis C Virus Particles Produced in Cell Culture. *J. of Virol.* **84** (21), 10999-11009.

<sup>10</sup> André, P. *et al.* (**2002**). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J. of Virol.* **76** (14), 6919-6928.

<sup>11</sup> Barth, H. *et al.* (**2003**). Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J. of Biol. Chem.* **278**, 41003-41012.

<sup>12</sup> Agnello, V. *et al.* (**1999**). Hepatitis C Virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *PNAS* **96** (22), 12766-12771.

<sup>13</sup> Scheel, T. K. *et al.* (**2013**). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature Medicine* **19** (7), 837-849.

<sup>14</sup> Kim, C. W. *et al.* (**2013**). Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin. Mol. Hepatol.* **19** (1), 17-25.

<sup>15</sup> Scarselli, E. *et al.* (**2002**). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO J.* **21** (19), 5017-5025.

<sup>16</sup> Schaefer, E. A. K. *et al.* (**2013**). HCV and Host Lipids: An Intimate Connection. *Semin. Liver Dis.* **33**, 358-368.

<sup>17</sup> Zona, L. *et al.* (**2014**). CD81-Receptor Associations-Impact for Hepatitis C Virus Entry and Antiviral Therapies. *Viruses* **6**, 875-892.

<sup>18</sup> Lupberger, J. *et al.* (**2011**). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature Medicine* **17** (5), 589-596.

<sup>19</sup> Sainz, B. Jr. *et al.* (**2012**). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature Medicine* **18** (2), 281-285.

<sup>20</sup> Dubuisson, J. *et al.* (**2008**). Early steps of the hepatitis C virus life cycle. Cell. *Microbiol.* **10** (4), 821-827.

<sup>21</sup> Bode, J. G. *et al.* (**2009**). Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication. *Biol. Chem.* **390** (10), 1013-1032.

<sup>22</sup> Lupberger, J. *et al.* (**2012**). Cholesterol uptake and hepatitis C virus entry. J. *of Hepatol.* **57**, 215-217.

<sup>23</sup> Street, A. *et al.* (**2004**). The Hepatitis C Virus NS5A Protein Activates a Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Survival Signaling Cascade. *J. Biol. Chem.* **279**, 12232-12241.

<sup>24</sup> Park, C.-Y. *et al.* (**2009**). Hepatitis C Virus Nonstructural 4B Protein Modulates Sterol Regulatory Element-binding Protein Signaling via the AKT Pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 9237-9246.

<sup>25</sup> Brenndörfer, E. D. *et al.* (**2009**). 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* **49** (6), 1810-1820.

<sup>26</sup> Pfannkuche, A. *et al.* (**2011**). C-Src is required for complex formation between the hepatitis C virus-encoded proteins NS5A and NS5B: A prerequisite for replication. *Hepatology* **53** (4), 1127-1136.

<sup>27</sup> Lohmann, V. *et al.* (**1999**). Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* **285**, 110-113.

<sup>28</sup> Lohmann, V. *et al.* (**2001**). Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *J. Virol.* **75** (3), 1437-1449.

<sup>29</sup> Krieger, N. et al. (2001). Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. J. Virol. 75 (10), 4614-4624.

<sup>30</sup> Pietschmann, T. *et al.* (**2002**). Persistent and Transient Replication of Full-Length Hepatitis C Virus Genomes in Cell Culture. *J. of Virol.* **76** (8), 4008-4021.

<sup>31</sup> Pietschmann, T. *et al.* (2009). Production of Infectious Genotype 1b Virus Particles in Cell Culture and Impairment by Replication Enhancing Mutations. *PLoS Pathogens* 5 (6), e1000475.

<sup>32</sup> Kato, T. *et al.* (**2003**). Efficient Replication of the Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon. *Gastroenterology* **125**, 1808-1817.

<sup>33</sup> Kato, T. *et al.* (**2001**). Sequence Analysis of Hepatitis C Virus Isolated From a Fulminant Hepatitis Patient. *J. of Med. Virol.* **64**, 334-339.

<sup>34</sup> Wakita, T. *et al.* (**2005**). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **11** (7), 791-796.

<sup>35</sup> Lindenbach, B. D. *et al.* (**2005**). Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* **309**, 623-626.

<sup>36</sup> Pietschmann, T. *et al.* (**2006**). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis c virus chimeras. *PNAS* **103** (19), 7408-7413.

<sup>37</sup> Lohmann, V. *et al.* (**2003**). Viral and Cellular Determinants of Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *J. Virol.* **77** (5), 3007-3019.

<sup>38</sup> Blight, K. J. *et al.* (**2002**). Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* **76** (24), 13001-13014.

<sup>39</sup> Sumpter, R. *et al.* (**2005**). Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *J. Virol.* **79** (5), 2689-2699.

<sup>40</sup> Akazawa, D. *et al.* (**2007**). CD81 Expression Is Important for the Permissiveness of Huh7 Cell Clones for Heterogeneous Hepatitis C Virus Infection. *J. of Virol.* **81** (10), 5036-5045.

<sup>41</sup> Wilson, G. K. *et al.* (**2012**). In Vitro Systems fort he Study of Hepatitis C Virus Infection. *Int. J. of Hepatol.* **2012**, p. 292591.

<sup>42</sup> Woerz, I. *et al.* (**2009**). Hepatitis C virus replicons: dinosaurs still in business? *J. of Viral Hepatitis* **16**, 1-9.

<sup>43</sup> Tellinghuisen, T. L. *et al.* (**2007**). Studying Hepatitis C Virus: Making the Best of a Bad Virus. *J. of Virol.* **81** (17), 8853-8867.

<sup>44</sup> Akdis, M. *et al.* (**2011**). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. *Allergy and Clinical Immunol.* **127** (3), 701-721e70.

<sup>45</sup> Dinarello, C. A. *et al.* (**2013**). Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Sem. in Immunol.* **25**, 389-393.

<sup>46</sup> Lopez-Castejon, G. *et al.* (**2011**). Understanding the mechanism of IL-1β secretion. *Cytokine & Growth Factor Rev.* **22**, 189-195.

<sup>47</sup> Sims, J. E. *et al.* (**2010**). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Rev. Immunol.* **10**, 89-102.

<sup>48</sup> Borashi, D. *et al.* (**2013**). The Interleukin-1 receptor family. *Sem. in Immunol.* **25**, 394-407.

<sup>49</sup> Negash, A. A. *et al.* (**2013**). IL-1β Production through NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. *PLOS Pathogens* **9** (4), e1003330.

<sup>50</sup> Burdette, D. *et al.* (**2012**). Hepatitis C virus activates interleukin-1β via caspase-1inflammasome complex. *J. of. Gen. Virol.* **93**, 235-246.

<sup>51</sup> Cargnello, M. *et al.* (**2011**). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **75** (1), 50-83.

<sup>52</sup> Kyriakis, J. M. *et al.* (**2012**). Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiol. Rev.* **92**, 689-737.

<sup>53</sup> Cuadrado, A. *et al.* (**2010**). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* **429**, 403-417.

<sup>54</sup> Sehgal, V. *et al.* (**2013**). Network Motifs in JNk Signaling. *Genes & Cancer* **4** (9-10), 409-413.

<sup>55</sup> Bryk, D. *et al.* (**2014**). Mitogen-activated protein kinases in atherosclerosis. *Postepy. Hig. Med. Dosw. (Online)* **68**, 10-22.

<sup>56</sup> Sullivan, R. J. *et al.* (**2013**). MAP kinase signaling and inhibition in melanoma. *Oncogene* **32**, 2373-2379.

<sup>57</sup> Kim, E. K. *et al.* (**2010**). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. et Biophys. Acta* **1802**, 396-405.

<sup>58</sup> Min, L. *et al.* (**2011**). Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. *Sem. in Cancer Biol.* **21**, 10-20.

<sup>59</sup> Zhao, L. J. *et al.* (**2007**). Mitogen-activated protein kinase signalling pathways triggered by the hepatitis C virus envelope protein E2: implications fort he prevention of infection. *Cell Proliferation* **40** (4), 508-521.

<sup>60</sup> Frelin, L. *et al.* (**2006**). The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumor necrosis factor  $\alpha$  mediated liver disease. *Gut* **55**, 1475-1483.

<sup>61</sup> Li, B. *et al.* (**2010**). The effects of hepatitis C virus non-structural protein 3 on cell growth mediated by extracellular signal-related kinase cascades in human hepatocytes *in vitro*. *Int. J. of Mol. Med.* **26**, 273-279.

<sup>62</sup> Menzel, N. *et al.* (**2012**). MAP-Kinase Regulated Cytosolic Phospholipase A2 Activity is Essential for Production of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *PLoS Pathog.* **8** (7), e1002829. <sup>63</sup> Gaestel, M. (**2006**). MAPKAP kinases- MKs- two's company, three's a crowd. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7** (2), 120-130.

<sup>64</sup> Kotlaryov, A. *et al.* (**1999**). MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- $\alpha$  biosynthesis. *Nature Cell Biol.* **1**, 94-97.

<sup>65</sup> Neininger, A. *et al.* (**2002**). MK2 Targets AU-rich Elements and Regulates Biosynthesis of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6 Independently at Different Post-transcriptional Levels. *J. Biol. Chem.* **277**, 3065-3068.

<sup>66</sup> Ehlting, C. *et al.* (**2007**). Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) mRNA Stability by TNF- $\alpha$  Involves Activation of the MKK6/p38<sup>MAPK</sup>/MK2 Cascade. *J. of Immunol.* **178** (5), 2813-2826.

<sup>67</sup> Guay, J. *et al.* (**1997**). Regulaton of actin filament dynamics by p38 map kinasemediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. of Cell Sci.* **110**, 357-368.

<sup>68</sup> Manke, I. A. *et al.* (**2005**). MAPKAP Kinase-2 Is a Cell Cycle Checkpoint Kinase that Regulates the G<sub>2</sub>/M Transition and S Phase Progression in Response to UV Irradiation. *Mol. Cell* **17**, 37-48.

<sup>69</sup> Hegen, M. *et al.* (**2006**). MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collageninduced arthritis. *J. Immunol.* **177** (3), 1913-1917.

<sup>70</sup> Baltimore, D. *et al.* (**1986**). Inducibility of  $\kappa$  Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein NF- $\kappa$ B by a Posttranslational Mechanism. *Cell* **47**, 921-928.

<sup>71</sup> Gerondakis, S. *et al.* (**1999**). Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-κB and IkB function: transgenics and knockouts. *Oncogene* **18** (49), 6888-6895.

<sup>72</sup> Abbadie, C. *et al.* (**1993**). High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell* **75** (5), 899-912.

<sup>73</sup> Gilmore, T. D. *et al.* (**2006**). Good cop, bad cop: the different faces of NF- $\kappa$ B. *Cell Death and Differentiation* **13**, 759-772.

<sup>74</sup> Napetschnig, J. *et al.* (**2013**). Molecular Basis of NF-κB Signaling. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 443-468.

<sup>75</sup> Ghosh, S. et al. (**1998**). NF-κB and Rel-Proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260.

<sup>76</sup> Hoffmann, A. *et al.* (**2011**). A single NFkB system for both canonical and noncanonical signaling. *Cell Research* **21**, 86-102.

<sup>77</sup> Baldwin, A. S. (**1996**). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B Proteins: New Discoveries and Insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**. 649-681.

<sup>78</sup> Gilmore, T. D. *et al.* (**2006**). Introduction to NF-kB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684.

<sup>79</sup> Ghosh, S. *et al.* (**2008**). New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. *Nature Rev. Immunol.* **8** (11), 837-848.

<sup>80</sup> Oeckinghaus, A. *et al.* (**2009**). The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1** (4), a000034.

<sup>81</sup> Yamamoto, M. *et al.* (**2008**). Role of nuclear IκB proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* **14**, 265-269.

<sup>82</sup> Kitamura, H. *et al.* (**2000**). MAIL, a novel nuclear I<sub>K</sub>B protein that potentiates LPSinduced IL-6 production. *FEBS Letters* **485**, 53-56.

<sup>83</sup> Haruta, H. *et al.* (**2001**). Isolation of a Novel Interleukin-1-inducible Nuclear Protein Bearing Ankyrin-repeat Motifs. *J. of Biol. Chem.* **276** (16), 12485-12488.

<sup>84</sup> Yamazaki, S. *et al.* (**2001**). A Novel IκB Protein, Induced by Proinflammatory Stimuli, Negatively Regulates Nuclear Factor-κB in the Nuclei. *J. of Biol. Chem.* **276** (29), 27657-27662.

<sup>85</sup> Motoyama, M. *et al.* (**2005**). Positive and Negative Regulation of Nuclear FactorkB-mediated Transcription by  $I\kappa$ B- $\zeta$ , an Inducible Nuclear Protein. *J. Biol. Chem.* **280** (9), 7444-7451.

<sup>86</sup> Totzke, G. *et al.* (**2006**). A Novel Member oft he I $\kappa$ B Family, Human I $\kappa$ B- $\zeta$ , Inhibits Transactivation of p65 and Its DNA Binding. *J Biol. Chem.* **281** (18), 12645-12654.

<sup>87</sup> Kitamura, H. *et al.* (**2003**). Bacterial lipopolysaccharide-induced expression of the IκB protein MAIL in B-lymphocytes and macrophages. *Arch. Histol. Cytol.* **66** (1), 53-62.

<sup>88</sup> Ueta, M. *et al.* (**2005**). Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **331**, 285-294.

<sup>89</sup> Yamazaki, S. *et al.* (**2005**). Stimulus-specific Induction of a Novel Nuclear Factor- $\kappa$ B Regulator, I $\kappa$ B- $\zeta$ , via Toll/Interleukin-1 Receptor Is Mediated by mRNA Stabilization. *J. Biol. Chem.* **280** (2), 1678-1687.

<sup>90</sup> Muta, T. *et al.* (**2003**). I $\kappa$ B- $\zeta$ , a new anti-inflammatory nuclear protein induced by lipopolysaccharide, is a negative regulator for nuclear factor- $\kappa$ B. *J. Endotoxin Res.* **9** (3), 187-191.

<sup>91</sup> Eto, A. *et al.* (**2003**). Essential roles of NF- $\kappa$ B and a Toll/IL-1 receptor domainspecific signal(s) in the induction of I $\kappa$ B-ζ. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **301**, 495-501.

<sup>92</sup> Ohba, T. *et al.* (**2011**). Identification of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 as a critical component that induces post-transcriptional activation of  $I\kappa$ B- $\zeta$ . *FEBS J.* **279** (2), 211-222.

<sup>93</sup> Ito, T. *et al.* (**2004**). Transcriptional regulation of the MAIL gene in LPS-stimulated RAW264 mouse macrophages. *Gene* **342**, 137-143.

<sup>94</sup> Kim, E-Y. *et al.* (**2010**). ATF3 Plays a Key Role in Kdo2-Lipid A-Induced TLR4-Dependent Gene Expression via NF-κB Activation. *PLoS ONE* **5** (12), e14181.

<sup>95</sup> Lindenblatt, C. *et al.* (**2009**). ΙκΒζ expression is regulated by miR-124a. *Cell Cycle* **8** (13), 2019-2023.

<sup>96</sup> Rossato, M. *et al.* (**2012**). IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *PNAS* **109** (45), E3101-E3110.

<sup>97</sup> Trinh, D. V. *et al.* (**2008**). The Nuclear IκB Protein IκBζ Specifically Binds NF-κB p50 Homodimers and Forms a Ternary Complex on κB DNA. *J. Mol. Biol.* **379**, 122-135.

<sup>98</sup> Manavalan, B. *et al.* (**2010**). Molecular modeling-based evaluation of dual function of  $I\kappa B\zeta$  ankyrin repeat domain in toll-like receptor signalling. *J. of Mol. Recognit.* **24** (4), 597-607.

<sup>99</sup> Yamazaki, S. *et al.* (2008). Gene-specific Requirement of a Nuclear Protein, IκB-ζ, for Promoter Association of Inflammatory Transcription Regulators. *J. Biol. Chem.* 283, 32404-32411.

<sup>100</sup> Seshardi, S. *et al.* (**2009**). MAIL Regulates Human Monocyte IL-6 Production. *J. Immunol.* **183**, 5358-5368.

<sup>101</sup> Hildebrand, D. G. *et al.* (**2013**). I $\kappa$ B $\zeta$  is a Transcriptional Key Regulator of CCL2/MCP-1. *J. of Immunol.* **190**, 4812-4820.

<sup>102</sup> Kannan, Y. *et al.* (**2011**). IκBζ augments IL-12- and IL-18-mediated IFN- $\gamma$  production in human NK cells. *Blood* **117** (10), 2855-2863.

<sup>103</sup> Miyake, T. *et al.* (**2010**). I $\kappa$ B $\zeta$  is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18. *PNAS* **107** (41), 17680-17685.

<sup>104</sup> Hijioka, K. *et al.* (**2007**). Induction of the nuclear I $\kappa$ B protein I $\kappa$ B- $\zeta$  upon stimulation of B cell antigen receptor. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **356**, 476-480.

<sup>105</sup> Matsuo, S. *et al.* (**2007**). Crucial roles of binding sites for NF- $\kappa$ B and C/EBPs in I $\kappa$ Bζ-mediated transcriptional activation. *Biochem. J.* **405**, 605-615.

<sup>106</sup> Yamamoto, M. *et al.* (**2004**). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I<sub>κ</sub>Bζ. *Nature* **430** (6996), 218-222.

<sup>107</sup> Disanto, G. *et al.* (**2014**). DNase hypersensitive sites and association with multiple sclerosis. *Human Mol. Gen.* **23** (4), 942-948.

<sup>108</sup> Nozawa, K. *et al.* (**2013**). Inhibition of Connective Tissue Growth Factor Ameliorates Disease in a Murine Model of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **65** (6), 1477-1486.

<sup>109</sup> Ueta, M. *et al.* (**2005**). Spontaneous Ocular Surface Inflammation and Goblet Cell Disappearance in  $I\kappa B\zeta$  Gene-Disrupted Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46** (2), 579-588.

<sup>110</sup> Shiina, T. *et al.* (**2004**). Targeted Disruption of MAIL, a Nuclear IκB Protein, Leads to Severe Atopic Dermatitis-Like Disease. *J. of Biol. Chem.* **279** (53), 55493-55498.

<sup>111</sup> Krappmann, D. (**2013**). Shaping oncogenic NF-κB activity in the nucleus. *Blood* **122** (13), 2146-2147.

<sup>112</sup> Wu, Z. *et al.* (**2009**). Nuclear protein I<sub>κ</sub>B- $\zeta$  inhibits the activity of STAT3. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **387**, 348-352.

<sup>113</sup> Alexander, E. *et al.* (**2013**). I $\kappa$ B $\zeta$  is a regulator oft he senescence-associated secretory phenotype in DNA damage- and oncogene-induced senescence. *J. of Cell Sci.* **126**, 3738-3745.

<sup>114</sup> Stark, G. R. *et al.* (**2002**). NFκB-dependent signaling pathways. *Experimental Hematology* **30**, 285-296.

<sup>115</sup> Delhase M. *et al.* (**1999**). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* **284**, 309-313.

<sup>116</sup> Kanarek N. *et al.* (**2012**). Regulation of NF- $\kappa$ B by ubiquitination and degradation of the I $\kappa$ Bs. *Immunological Reviews* **246**, 77-94.

<sup>117</sup> Hiscott, J. *et al.* (**1993**). Characterization of a functional NF-kappa B sit in human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell. Biol.* **13** (10), 6231-6240.

<sup>118</sup> Yong-Hae M. S. *et al.* (**2008**). Roles of MAPK and NF-κB in Interleukin-6 induction by Lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J. of Cardiovascular Pharmacology* **51** (1), 71-77.

<sup>119</sup> Kang H-B. *et al.* (**2007**). Enhancement of NF-κB expression and activity upon differentiation of human embryonic Stem cell line SNUhES3. *Stem Cells and Development* **16**, 615-623.

<sup>120</sup> Israël, A. *et al.* (**1989**). TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF-kB-like anhancer binfing activity which displaces constitutive factors. *The EMBO J.* **8** (12), 3793-3800.

<sup>121</sup> Bunting K. *et al.* (**2007**). Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF-kB Transcription factor c-Rel. *The J. of Immunol.* **178**, 7097-7109.

<sup>122</sup> Catz S. D. *et al.* (**2001**). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor  $\kappa$ B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* **20**, 7342-7351.

<sup>123</sup> Turner D. J. *et al.* (**2007**). Bile salts induce resistance to apoptosis through NF- $\kappa$ B-mediated XIAP expression. *Ann. Surg.* **245**, 415-425.

<sup>124</sup> Stark, G. R. *et al.* (**2004**). Cytokine Overexpression and constitutive NF $\kappa$ B in Cancer. *Cell Cycle* **3** (9), 1114-1117.

<sup>125</sup> Rogler, G. *et al.* (**1998**). Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* **115** (2), 357-369.

<sup>126</sup> Mandrup-Poulsen, T. *et al.* (**2010**). Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nature Rev. Endocrinology* **6**, 158-166.

<sup>127</sup> Morel, J. C. *et al.* (**2001**). Interleukin-18 induces rheumatoid athritis synovial fibroblast CXC chemokine production through NFkappaB activation. *Lab. Invest.* **81** (10), 1371-1383.

<sup>128</sup> Kwon J. A. *et al.* (**2002**). Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site. *Biochem. Cell. Biol.* **80** (4), 445-455.

<sup>129</sup> Griffin, G. E. *et al.* (**1989**). Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- $\kappa$ B. *Nature* **339**, 70-73.

<sup>130</sup> Simonin, Y. *et al.* (**2013**). Lymphotoxin Signaling is Initiated by the Viral Polymerase in HCV-linked Tumorigenesis. *PLOS Pathogenesis* **9** (3), 1-11.

<sup>131</sup> Yu, G-Y. *et al.* (**2012**). Hepatic Expression of HCV RNA-Dependent RNA Polymerase Triggers Innate Immune Signaling and Cytokine Production. *Molecular Cell* **48**, 313-321.

<sup>132</sup> Brenndörfer, E. D. *et al.* (**2010**). Anti-Tumor Necrosis Factor a Treatment Promotes Apoptosis and Prevents Liver Regeneration in a Transgenic Mouse Model of Chronic Hepatitis C. *Hepatology* **52**, 1553-1563).

<sup>133</sup> Lu, L. *et al.* (**2008**). NS3 protein of hepatitis C virus regulates cyclooxygenase-2 expression through multiple signaling pathways. *Virology* **371**, 61-70.

<sup>134</sup> Shrivastava, S. *et al.* (**2013**). Hepatitis C Virus Induces Interleukin-1b (IL-1b)/IL-18 in Circulatory and Resident Liver Macrophages. *J. Virol.* **87** (22), 12284-12290.

<sup>135</sup> Waris, G. *et al.* (**2003**). Hepatitis C Virus NS5A ans Subgenomic Replicon Activate NF- $\kappa$ B via Tyrosine Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and Its Degradation by Calpain Protease. *J. of Biol. Chem.* **278** (42), 40778-40787.

<sup>136</sup> Borkham-Kamphorst, E. *et al.* (**2013**). Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1832**, 660-673.

<sup>137</sup> Kjeldsen, L. *et al.* (**1993**). Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase. *J. Biol. Chem.* **268** (14), 10425-10432.

<sup>138</sup> Kjeldsen, L. *et al.* (**2000**). Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim. et Biophys. Acta* **1482**, 272-283.

<sup>139</sup> Flower, D. R. *et al.* (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* **318**, 1-14.

<sup>140</sup> Devireddy, L. R. *et al.* (**2005**). A Cell-Surface Receptor for Lipocalin 24p3 Selectively Mediates Apoptosis and Iron Uptake. *Cell* **123** (7), 1293-1305.

<sup>141</sup> Hvidberg, V. *et al.* (**2005**). The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters* **579**, 773-777.

<sup>142</sup> Meheus, L. A. *et al.* (**1993**). Identification by Microsequencing of Lipopolysaccharide-Induced Proteins Secreted by Mouse Macrophages. *J. Immunol.* **151**, 1535-1547.

<sup>143</sup> Zhao, P. *et al.* (**2014**). The Induction of Lipocalin-2 Protein Expression in *Vivo* and in *Vitro. J. Biol. Chem.* **289** (9), 5960-5969.

<sup>144</sup> Cowland, J. B. *et al.* (**2006**). IL-1 $\beta$ -Specific Up-Regulation of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Controlled by I $\kappa$ B $\zeta$ . *J. Immunol.* **176**, 5559-5566.

<sup>145</sup> Karlsen, J. R. *et al.* (**2010**). Induction of Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Expression by Co-stimulation with Interleukin-17 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Is Controlled by I $\kappa$ B $\zeta$  but neither by C/EBP- $\beta$  or C/EBP- $\delta$ . *J. Biol. Chem.* **285** (19), 14088-14100.

<sup>146</sup> Sommer, G. *et al.* (**2009**). Lipocalin-2 Is Induced by Interleukin-1 $\beta$  in Murine Adipocytes *in Vitro*. *J. of Cell. Biochem.* **106**, 103-108.

<sup>147</sup> Jayaraman, A. *et al.* (**2005**). Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Discriminatory Marker of the Hepatocyte-Secreted Protein Response to IL-1 $\beta$ : a Proteomic Analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **91** (4), 502-515.

<sup>148</sup> Zhang, Y. *et al.* (**2012**). NGAL and NGALR overexpression in human hepatocellular carcinoma toward a molecular prognostic classification. *Cancer Epidemiology* **36**, e294-e299.

<sup>149</sup> Bouchet, S. *et al.* (**2014**). Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Pro-Matrix Metalloproteinase-9 (pro-MMP-9) and Their Complex Pro-MMP-9/NGAL in Leukaemias. *Cancers* **6** (2), 796-812.

<sup>150</sup> Flo, T. H. *et al.* (**2004**). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron. *Nature* **432**, 917-921.

<sup>151</sup> Goetz, D. H. *et al.* (**2002**). The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell* **10**, 1033-1043.

<sup>152</sup> Yang, J. *et al.* (**2002**). An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin. *Molecular Cell* **10**, 1045-1056.

<sup>153</sup> Shashidharamurthy, R. *et al.* (**2013**). Differential role of lipocalin-2 during immunecomplex mediated acute and chronic inflammation. *Arthritis Rheum.* **65** (4), 1064-1073.

<sup>154</sup> Wang, Y. *et al.* (**2007**). Lipocalin-2 Is an Inflammatory Marker Closely Associated with Obesity, Insulin Resistance, and Hyperglycemia in Humans. *Clinical Chem.* **53** (1), 34-41.

<sup>155</sup> Yan, Q-W. *et al.* (**2007**). The Adipokine Lipocalin 2 Is Regulated by Obesity and Promotes Insulin Resistance. *Diabetes* **56**, 2533-2540.

<sup>156</sup> Li, C. *et al.* (**2011**). Lipocalin 2 regulation and its complex role in inflammation and cancer. *Cytokine* **56**, 435-441.

<sup>157</sup> Mishra, J. *et al.* (**2004**). Amelioration of Ischemic Acute Renal Injury by Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 3073-3082.

<sup>158</sup> Chien, M-H. *et al.* (**2012**). Lipocalin-2 Induces Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cells Through Activation of Mitochondria Pathways. *Cell. Biochem. Biophys.* **64**, 177-186.

<sup>159</sup> Lee, E-K. *et al.* (**2011**). Inhibition of the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by lipocalin 2 through blockade of JNK and PI3K/Akt signaling. *J. of Oncology* **38** (2), 325-333.

<sup>160</sup> Wang, Y-P. *et al.* (**2013**). Lipocalin-2 Negatively Modulates the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma Through the Epidermal Growth Factor (TGF-beta1)/Lcn2/Twist1 Pathway. *Hepatology* **58** (4), 1349-1361.

<sup>161</sup> Melino, M. *et al.* (**2012**). Macrophage secretory products induce an inflammatory phenotype in hepatocytes. *World J. of Gastroenterol.* **18** (15), 1732-1744.

<sup>162</sup> Guroff, G. (**1964**). A Neutral, Calcium-activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain. *J. of Biol. Chem.* **239**, 149-155.

<sup>163</sup> Dayton, W. R. *et al.* (**1976**). A Ca2+-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* **15** (10), 2150-2158.

<sup>164</sup> Murachi, T. *et al.* (**1980**). Intracellular Ca2+-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv. Enzyme Requl.* **19**, 407-424.

<sup>165</sup> Campbell, R. L. *et al.* (**2012**). Structure-function relationshipsin calpains. *Biochem. J.* **447**, 335-351.

<sup>166</sup> Sorimachi, J. *et al.* (**2011**). Impact of genetic insights into calpain biology. *J. of Biochem.* **150** (1), 23-37.

<sup>167</sup> Wheelock, M. J. (**1982**). Evidence for Two Structurally Different Forms of Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup>-activated Protease. *J. of Biol. Chem.* **257**, 12471-12474.

<sup>168</sup> Croall, D. E. *et al.* (**2007**). The calpains: modular designs and functional diversity. Genome Biol. **8** (6), 218.

<sup>169</sup> Sato, K. *et al.* (**2001**). Calpain Function in the Modulation of Signal Transduction Molecules. *Biol. Chem.* **382** (5), 743-751.

<sup>170</sup> Wendt, A. *et al.* (**2004**). Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol. Chem.* **385**, 465-472.

<sup>171</sup> Friedrich, P. *et al.* (**2005**). Digestive versus regulatory proteases: on calpain action *in vivo. Biol. Chem.* **386** (7), 609-612.

<sup>172</sup> Mehendale, H. M. *et al.* (**2005**). Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends Pharmacol. Sci.* **26** (5), 232-236.

<sup>173</sup> Glading, A. *et al.* (**2004**). Epidermal Growth Factor Activates m-Calpain (Calpain II), at Least in Part, by Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **24** (6), 2499-2512.

<sup>174</sup> Pànico, P. *et al.* (**2014**). Role of Calpain-10 in the Development of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Arch. of Med. Res.* **45**, 103-115.

<sup>175</sup> Miyazaki, T. *et al.* (2013). Calpain And Atherosclerosis. *J. of Atheroscler. Thromb.*20, 228-237.

<sup>176</sup> Gong, G. *et al.* (**2001**). Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- $\kappa$ B. *PNAS* **98** (17), 9599-9604.

<sup>177</sup> Kalamvoki, M. *et al.* (**2004**). Calcium-Dependent Calpain Proteases Are Implicated in Processing of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *J. of Virol.* **78** (21), 11865-11878.

<sup>178</sup> Waris, G. *et al.* (**2005**). Hepatitis C Virus Stimulates the Expression of Cyclooxygenase-2 via Oxidative Stress: Role of Prostaglandin  $E_2$  in RNA Replication. *J. of Virol.* **79** (15), 9725-9734.

<sup>179</sup> Iqbal, J. *et al.* (**2013**). Mechanism of Hepatitis C Virus (HCV)-induced Osteopontin and Its Role in Epithelial to Mesenchymal Transition of Hepatocytes. *J. of Biol. Chem.* **288**, 36994-37009.

<sup>180</sup> Simonin, Y. *et al.* (**2009**). Calpain Activation by Hepatitis C Virus Proteins Inhibits the Extrinsic Apoptotic Signaling Pathway. *Hepatology* **50** (5), 1370-1379.

<sup>181</sup> Bradford, M. (**1976**). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

<sup>182</sup> Laemmli, U. K. (**1970**). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (970).

<sup>183</sup> Blake, M. S. *et al.* (**1984**). A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175.

<sup>184</sup> Kangro, H. O. (**1996**). Virology Methods Manual. *Elsevier Science*.

<sup>185</sup> Schäfer, A. (**2011**). Charakterisierung der funktionellen Relevanz des Wirtsfaktors c-Src für die Ausbildung des viralen Replikationscomplexes und Identifikation weiterer Wirtsfaktoren, mit denen der Hepatitis C Virus interferiert. Dissertation, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Experimentelle Hepatologie.

<sup>186</sup> Steuerwald, N. M. *et al.* (**2010**). Parallel microRNA and mRNA expression profiling of (genotype 1b) human hepatoma cells expressing hepatitis C virus. *Liver Int.* **30** (10), 1490-1504.

<sup>187</sup> Liu, X. *et al.* (**2010**). Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology* **398** (1), 57-67.

<sup>188</sup> Braconi, C. *et al.* (**2010**). Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes. *Clin. Cancer Res.* **16** (3), 957-966.

<sup>189</sup> Kaminski, R. *et al.* (**2014**). Interplay of Rad51 with NF-κB Pathway Stimulates Expression of HIV-1. *PlosOne* **9** (5), e98304.

<sup>190</sup> Löser, P. *et al.* (**1998**). Reactivation of the Previously Silenced Cytomegalovirus Major Immediate-Early Promoter in the Mouse Liver: Involvement of NF- $\kappa$ B. *J. of Virol.* **72** (1), 180-190.

<sup>191</sup> Gregory, D. *et al.* (**2004**). Efficient Replication by Herpes Simplex Virus Type 1 Involves Activation of the IκB Kinase-IκB-p65 Pathway. *J. of Virol.* **78** (24), 13582-13590.

<sup>192</sup> Kim, H. T. *et al.* (**2001**). Enhanced proteolysis of IkappaBalpha and IkappaBbeta proteins in astrocytes by Moloney murine leukemia virus (MoMuLV)-ts1 infection: a potential mechanism of NF-kappaB activation. *J. of Neurovirol.* **7** (5), 466-475.

<sup>193</sup> Wang *et al.* (**2012**). Regulatory mechanisms of interleukin-8 production induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in human hepatocellular carcinoma cells. *J. of. Cell. Mol. Med.* **16** (3), 496-506.

<sup>194</sup> Tsutsumi, T. *et al.* (**2002**). Alteration of Intrahepatic Cytokine Expression and AP-1 Activation in Transgenic Mice Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. *Virology* **304**, 415-424.

<sup>195</sup> Matsuzaki, K. *et al.* (**2007**). Virus Infection Perturbs Hepatic Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling, Promoting Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **46** (1), 48-57.

<sup>196</sup> Zhang, Q. *et al.* (**2012**). Activation of the Ras/Raf/MEK Pathway Facilitates Hepatitis C Virus Replication via Attenuation of the Interferon-JAK-STAT Pathway. *J. Virol.* **86** (3), 1544-1554.

<sup>197</sup> Polyak, S. J. *et al.* (**2001**). Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein Induces Interleukin-8, Leading to Partial Inhibition of the Interferon-Induced Antiviral Response. *J. of Virol.* **75** (13), 6095-6106.

<sup>198</sup> Zekri, A.-R. N. *et al.* (**2013**). Dynamic interplay between CXCL levels in chronic Hepatitis C patients treated by Interferon. *Virol. J.* **10** (218), 1-14.

<sup>199</sup> Zhang, X. *et al.* (**2009**). Altered regulation of extrinsic apoptosis pathway in HCVinfected HCC cells enhances susceptibility to mapatumumab-induced apoptosis. *Hepatol. Res.* **39** (12), 1178-1189.

<sup>200</sup> Miller, K. *et al.* (**2004**). Effects of the Hepatitis C Virus Core Protein on Innate Cellular Defense Pathways. *J. of Interferon & Cytokine Res.* **24**, 391-402.

<sup>201</sup> Nguyen, H. *et al.* (**2006**). Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology* **354** (1), 58-68.

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes Bode, unter dessen Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde. Ich möchte ihm für die Unterstützung, die anregenden Diskussionen und das Vertrauen danken, dass er mir während meiner Arbeit zukommen ließ.

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

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. 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 Prof. Dr. Bartenschlager danke ich für die Bereitstellung verschiedener Zellkultursysteme und die Möglichkeit im Institut für Molekulare Virologie der Universität Heidelberg Methoden für die Etablierung des Infektionssystems zu erlernen. Frau Stefanie Kallis danke ich herzlich für ihre Unterstützung hierbei und ihre Bereitschaft auftretende Fragen zu beantworten.

Ich danke allen Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie für die gute Zusammenarbeit, insbesondere den Mitgliedern unserer kleinen HCV-Gruppe Christina Gröpper, Maike Talajlo und Sabine Eisenbürger. Durch Euch waren die langen Tage im S3-Labor nur halb so schlimm.

Ein besonderer Dank geht an Carina, Chrissi, Judith, Leah, Maike, Max, Steffi und Uschi. Die Freundschaft mit Euch hat die letzten Jahre unvergesslich gemacht und ich baue darauf, dass wir auch in der Zukunft noch viele lustige Stunden zusammen verbringen werden.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich stets unterstützt hat und mir liebevoll beiseite stand. Im Besonderen danke ich meinem Ehemann dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich in schwierigen Zeiten immer wieder motiviert und aufgebaut hat. Ich danke Euch, dass Ihr an mich und meine Arbeit geglaubt habt und immer für mich da seid. Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist. 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 08.10.2014

Sanaz Spitzley