# Untersuchungen zur Rekonstruktion von c-Src-NS5A-NS5B sowie EDD E3-β-Catenin – zweier krankheitsrelevanter Proteinkomplexe

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Olga Valdau (geb. Schimanowski) aus Saratow

Jülich, November 2014

Aus dem Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Dieter Willbold Koreferent: Prof. Dr. Johannes Bode

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2014

Die Tragödie der Wissenschaft – das Erschlagen einer schönen Hypothese durch eine hässliche Tatsache. *Thomas Henry Huxley* 

Meiner Familie

# • Inhaltsverzeichnis

1.	Ein	leitur	ng	. 11
	1.1.	Kra	nkheiten als Störungen auf molekularer Ebene	. 11
	1.2.	Wn	t-Signalweg	. 11
	1.2	.1.	β-Catenin	. 12
	1.2	.2.	Kanonischer (β-Catenin-abhängiger) Wnt-Transduktionsweg	. 13
	1.3.	Ubi	quitinylierung	. 15
	1.3	.1.	Ubiquitin	. 15
	1.3	.2.	Ubiquitinylierungs-Mechanismus	. 16
	1.3	.3.	EDD E3 Ligase	. 17
	1.3	.4.	Interaktion der EDD E3 Ligase mit β-Catenin	. 18
	1.4.	Das	s Hepatitis C Virus	. 19
	1.4	.1.	Entdeckung, Verbreitung und Therapie	. 19
	1.4	.2.	Aufbau und Organisation	. 21
	1.5.	HC	V Proteine	. 21
	1.5	.1.	Strukturelle Proteine	. 21
	1.5	.2.	Nicht strukturelle Proteine	. 22
	1.6.	HC	V und zelluläre Proteine	. 27
	1.7.	Src	-Tyrosinkinasen	. 28
	1.7	.1.	Aufbau und Regulation	. 28
	1.7	.2.	c-Src	. 31
	1.7	.3.	Interaktionen von c-Src mit anderen Proteinen	. 31
	1.8.	Zie	setzung der Arbeit	. 33
2.	Ma	terial	ien und Methoden	. 35
	2.1.	Mat	terialien	. 35
	2.1	.1.	Bakterielle Zelllinien	. 35

2.1.2.	Plasmide	35
2.1.3.	Oligonukleotide	36
2.1.4.	Geräte	37
2.1.5.	Puffer und Lösungen	38
2.1.6.	Proteine	39
2.1.7.	Kits und Chemikalien	41
2.1.8.	Datenbasen und Software	41
2.2. Ba	akterielle Zellkultur	42
2.2.1.	Anzucht von Bakterienzellen	42
2.2.2.	Bestimmung des Zell-Wachstums	42
2.2.3.	CaCl <sub>2</sub> -Methode zur Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	42
2.2.4.	Transformation von <i>E. coli</i>	43
2.3. M	olekularbiologische Methoden	43
2.3.1.	Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	43
2.3.2.	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	43
2.3.3.	Kolonie-PCR mit <i>E. coli</i>	44
2.3.4.	Restriktionsverdau	44
2.3.5.	Ligation	44
2.3.6.	Agarosegelelektrophorese	44
2.4. Pr	roteinaufreinigung	45
2.4.1.	SDS-PAGE	45
2.4.2.	Färben von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Blue	46
2.4.3.	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	46
2.4.4.	Zell-Aufschluss	46
2.4.5.	GSH-Affinitätschromatographie	46
2.4.6.	Ni-NTA-Affinitätchromatographie	47

	2.4.7.	Protein-Spaltung	. 47
	2.4.8.	Größenausschlusschromatographie (SEC)	. 47
	2.4.9.	UBAs-, β-Catenin-, Axin- und c-Src-Reinigung	. 47
	2.4.10.	pTyr-NS5A-Reinigung	. 48
	2.4.11.	Analyse der pTyr-NS5A-Phosphorylierung	. 49
	2.4.12.	NS5B-Reinigung	. 49
	2.4.13.	Absorptionsspektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentrat 49	tion
	2.4.14.	Präparation von Replikon-Zelllysaten	. 49
2	.5. Pro	tein-Protein-Interaktionsmessungen	. 50
	2.5.1.	Pulldown-Assays	. 50
	2.5.2.	SPR	. 52
	2.5.3.	β-Catenin Kopplung	. 53
	2.5.4.	Gleichgewichts-Auswertung (steady state)	. 53
	2.5.5.	ITC	. 54
	2.5.6.	MST	. 55
	2.5.7.	Protein-Markierung	. 55
2	.6. Imr	nunoblotting	. 55
	2.6.1.	Verwendete Antikörper	. 55
	2.6.2.	Verwendete Puffer	. 56
	2.6.3.	Proteintransfer	. 56
	2.6.4.	Proteindetektion	. 57
3.	Ergebni	sse	. 58
3 K	.1. <i>In</i> complexe	<i>vitro</i> Rekonstruktion des EDD E3 Ligase (UBA-Domäne)-β-Cater s	nin- . 58
	3.1.1. bindend	Expressionsvektoren für EDD E3 UBAs, β-Catenin und β-Cater	nin- . 58

	3.1.2.	Reinigung des β-Catenins	58
	3.1.3.	Reinigung der β-Catenin bindenden Domäne von Axin(435-541)	59
	3.1.4.	Funktionalität des gereinigten β-Catenins	60
	3.1.5.	UBA-Domäne der EDD E3 Ligase	61
	3.1.6.	Funktionalität der gereinigten UBA-Domänen	62
	3.1.7.	Pulldown-Assays mit UBAwt und β-Catenin	66
	3.1.8.	SPR-Analyse der UBAs-β-Catenin-Interaktion	67
	3.1.9.	ITC-Analyse der UBAs-β-Catenin-Interaktion	72
	3.1.10.	MST-Analyse der UBAwt-Ubiquitin-Interaktion	74
3	.2. In v	<i>itro</i> Rekonstruktion des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes	76
	3.2.1.	Expressionskonstrukte für c-Src, NS5A und NS5B	76
	3.2.2.	c-Src-Konstrukte	76
	3.2.3.	NS5B	78
	3.2.4.	Untersuchungen zum binären c-Src-SH3-NS5B-Komplex	80
	3.2.5.	NS5A	84
	3.2.6.	Produktion von pTyr-NS5A	86
	3.2.7.	Massenspektroskopische (MS) Charakterisierung von pTyr-NS5A	88
	3.2.8.	Untersuchungen zum binären pTyr-NS5A-NS5B-Komplex	89
	3.2.9.	Untersuchungen zum binären Komplex c-Src∆SH1-pTyr-NS5A	91
	3.2.10.	Untersuchung zum ternären c-Src-NS5A-NS5B-Komplex	91
	3.2.11.	Klonierung von weiteren NS5A- und c-Src-Konstrukten	94
4.	Diskuss	ion	96
4 K	.1. <i>In</i> a	<i>vitro</i> Rekonstruktion des EDD E3 Ligase (UBA-Domäne)-β-Cater s	nin- 96
	4.1.1. Axin(43	Heterologe Expression und Reinigung von UBAs, β-Catenin τ 5-541) konnten etabliert werden	und 97

4.1.2. Konzipierte Funktionalitäts-Assays wurden erfolgreich angewendet97

4.1.3. Rekombinante UBAs zeigen keine Bindung an rekombinantes  $\beta$ -Catenin 98

4.2. In vitro Rekonstruktion des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes ...... 100 Heterologe Expression und Reinigung von c-Src-Konstrukten und 4.2.1. Heterologe Expression und Reinigung des pTyr-NS5A-Proteins 4.2.2. 4.2.3. Analyse der posttranslationalen Modifikationen des pTyr-NS5A-Proteins 101 4.2.4. Konzipierte Funktionalitäts-Assays für c-Src-Konstrukte und NS5B-Protein wurden erfolgreich angewendet ...... 105 4.2.5. Untersuchungen zum binären pTyr-NS5A-NS5B-Komplex belegten eine Interaktion der beiden Proteine...... 105 Der binäre c-Src-SH3-NS5B-Komplex wurde mit verschiedenen 4.2.6. 4.2.7. Der binäre Komplex c-Src∆SH1-pTyr-NS5A wurde mittels Pulldown-Assay untersucht...... 107 4.2.8. In vitro Untersuchungen zum ternären c-Src-NS5A-NS5B-Komplex wurden mittels Pulldown-Assay durchgeführt...... 107 5. 6. 7. 8. 9.

#### Zusammenfassung

In der Wissenschaftsgeschichte gingen die Forscher den Ursachen von Krankheiten immer tiefer auf den Grund. Heutzutage versucht man die molekularen Zellprozesse zu begreifen, um das Entstehen einzelner Krankheiten basierend auf verschiedenen Störungen bzw. Änderungen auf molekularer Ebene zu verstehen und darauf aufbauend neue Therapiestrategien zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von  $\beta$ -Catenin, einem Schlüsselprotein des Wnt-Signalweges, mit der UBA-Domäne der EDD E3 Ligase *in vitro* untersucht. Diese Interaktion gehört laut Zellkultur-Experimenten unserer Kooperationspartner zu einem neuartigen Regulationsmechanismus der  $\beta$ -Catenin Stabilität und steuert dadurch die Expression der Wnt-regulierten Gene, wie z.B. c-Myc und Cyclin D.

Hier wurden in *E. coli* Expressions- und Reinigungsprotokolle für β-Catenin, UBA und Axin(435-541) etabliert, die eine schnelle Extraktion des rekombinanten Zielproteins in mg-Mengen erlauben. Zusätzlich wurden diverse Funktionalitäts-Assays zur Prüfung der präparierten Proteine konzipiert und mit Erfolg eingesetzt.

Es konnte jedoch keine UBA-β-Catenin-Wechselwirkung *in vitro* detektiert werden. Dieser Befund deutet auf die *in vivo* Anwesenheit von regulierenden posttranslationalen Modifikationen hin. Somit sind die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wegweisend für die zukünftige Erforschung der UBA-β-Catenin-Interaktion. In nachfolgenden Studien sollten die posttranslationalen Proteinmodifikationen und ihre regulierende Funktion analysiert werden.

Im Weiteren wurde die Interaktion der humanen c-Src-Kinase mit den HCV Proteinen NS5A und NS5B untersucht. Durch die in Zellkultur (Huh9-13) beobachtete Assemblierung des heterotrimeren c-Src-NS5A-NS5B Komplexes wird c-Src den intrazellulären Signalkaskaden entzogen, wodurch diese auf pathogene Weise gestört werden. Im Verlauf dieser Arbeit konnten diverse c-Src-Konstrukte, Tyrosin-phosphoryliertes NS5A und NS5B Proteine in *E. coli* hergestellt und in mg-Mengen gereinigt werden. Im Rahmen der Arbeit entwickelte Kontrollbindungs-Assays belegten die Funktionalität der präparierten Proteine. Obwohl die Assemblierung des heterotrimeren Komplexes *in vitro* nicht erreicht werden konnte, stellt diese Arbeit eine gute Basis für die zukünftige Erforschung der HCV-Pathogenität dar.

Summary

For years, researches have deepened our understanding of the causes of disease. Nowadays, scientists try to understand molecular processes in the cell in order to understand the origin of certain diseases associated with different disorders and changes on the molecular level. Using this information, new therapeutic approaches could be developed.

In this work, the interaction of  $\beta$ -catenin, one of the key proteins in Wnt signaling pathway, with the UBA-domain of the EDD E3 ligase was studied *in vitro*. This interaction, according to the cell culture experiments of our cooperation partner, belongs to a new type of regulatory mechanisms for  $\beta$ -catenin stability and thus controls the expression of the Wnt signaling pathway genes, such as c-Myc or Cyclin D.

Within this work, protocols for *E. coli* expression and purification of  $\beta$ -catenin, UBA and axin (431-541) were established allowing fast purification of recombinant protein in mg quantities. Additionally, functionality assays of the target proteins were developed and successfully used.

No *in vitro* interaction between UBA and  $\beta$ -catenin was detected. This result suggests presence of regulatory posttranslational modifications *in vivo*. Hence, the studies presented in this work are crucial for future studies of the UBA/ $\beta$ -catenin interaction. In further experiments, posttranslational protein modifications and their regulatory effects should be analyzed.

As well, the interaction of the human c-Src kinase with the HCV proteins NS5A and NS5B was studied. Due to the formation of the heterotrimeric c-Src-NS5A-NS5B-complex in hepatocellular carcinoma cells, c-Src is removed from the intracellular signal cascades and thus destructs them in a pathogenic way.

Within this work different c-Src constructs, NS5B and tyrosine phosphorylated NS5A proteins were expressed in *E. coli* and purified in mg quantities. Control assays were established and successfully proved the functionality of those proteins. Although, the assembly of heterotrimeric complex was not demonstrated *in vitro*, those results are a good basis for future studies of HCV pathogenesis.

## 1.1. Krankheiten als Störungen auf molekularer Ebene

Das Verstehen der molekularen Pathogenese ist eine der größten Herausforderungen der heutigen Zeit.

In der Wissenschaftsgeschichte gingen die Forscher den Ursachen der Krankheiten immer tiefer auf den Grund. Heutzutage versucht man das molekulare Zellgeschehen zu begreifen, um das Entstehen einzelner Krankheiten basierend auf verschiedenen Störungen bzw. Änderungen auf molekularer Ebene zu verstehen. Das exponentiell wachsende Wissen der kausalen Zusammenhänge in Zellen führte in den letzten Jahrzehnten zum besseren Verständnis der zellulären Funktionsweisen und Funktionsstörungen sowie neuen therapeutischen Lösungsansätzen.

## 1.2. Wnt-Signalweg

Wnt-Signalweg ist ein Signaltransduktionsweg, durch den die Zelle auf äußere Reize reagieren kann. Der Name des Signalweges ist ein Akronym aus Wg und Int-1. Wg steht für *"wingless*" ein Begriff aus *Drosophila melanogaster* Forschung: Die Mutation im *wingless*-Gen führt bei den Taufliegen zur Entwicklung von flügellosen Mutanten (Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980). Das *Int1*-Gen (*integration1*) führt bei Mäusen im Falle der Aktivierung durch das Mäuse-Retrovirus MMTV (Maus-Mammatumorvirus) zur Entwicklung von Brustkrebs (Nusse and Varmus 1982). Die beiden Gene sind homolog und waren die ersten identifizierten Protoonkogene der Wnt-Familie.

Der Wnt-Signalweg reguliert mehrere Prozesse. Während der embryonalen Entwicklung ist dieser Transduktionsweg für Vorgänge wie Determinierung der Achsen, Zellwanderung und Organogenese verantwortlich. Im erwachsenen Organismus kontrolliert der Wnt-Signalweg die Gewebehomöostase und die Selbsterneuerung von Stammzellen. (Logan and Nusse 2004; Reya and Clevers 2005; Clevers 2006).

Man unterscheidet zwischen den nicht-kanonischen ( $\beta$ -Catenin-unabhängigen) Wnt-Signalwegen und dem kanonischen ( $\beta$ -Catenin-abhängigen) Wnt-Signalweg. Die nicht-kanonischen Transduktionswege sind nur wenig erforscht. Man unterscheidet zwischen zwei verschiedenen zellulären Signalkaskaden dem PCP-Signalweg (engl. *planar cell polarity*) und dem Calcium-Signalweg. Der PCP-Signalweg ist für die Orientierung der Strukturen wie z.B. Haarfollikel und Stereozilien (Sinneszellen im Innenohr) verantwortlich (Wang and Nathans 2007; Ezan and Montcouquiol 2013). Der Wnt-Calcium-Signalweg reguliert die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-lonen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und reguliert so das intrazelluläre Calcium-Level. Die Calcium-Ionen spielen dabei die Rolle des zweiten Signalmoleküls und modulieren ihrerseits Ca<sup>2+</sup>-abhängige Prozesse (Kohn and Moon 2005).

#### 1.2.1. β-Catenin

Das zentrale Molekül des kanonischen Wnt-Übertragungsweges ist  $\beta$ -Catenin.  $\beta$ -Catenin gehört zu den Cateninen (lat. *catena* für Kette), einer Gruppe von Verbindungsproteinen, die Zelladhäsionsmoleküle mit dem Zytoskelett verknüpfen. Das Protein hat allerdings noch eine zusätzliche Funktion, es fungiert als Transkriptionskofaktor des Wnt-Signalweges. Die Struktur des  $\beta$ -Catenin-Moleküls besteht aus einer großen Zentralregion aus zwölf aneinandergereihten Armadillo-Motiven aus je drei Helices, die eine Superhelix bilden (Abb. 1) (Huber, Nelson et al. 1997).



## Abb. 1: Kristallstruktur der Armadillo-Motive, β-Catenin (Maus)

PDB: 2BCT, (Huber, Nelson et al. 1997)

Die Armadillo-Motive sind in Richtung vom Nzum C-Terminus in Farben des Regenbogens gefärbt.

Die N- und C-terminale Region des Proteins ist jeweils intrinsisch unstrukturiert. Die N-terminale Region ist für die Interaktion mit β-TrCP1 E3 Ubiquitin-Ligase (engl. *beta-transducin repeat containing protein*) verantwortlich. Der C-Terminus agiert als Transkription-Transaktivator (Cox, Pai et al. 1999). Ein Teil des C-Terminus ist in der Lage eine helikale Struktur die sogenannte Helix C zu formen. Die Helix C bindet an das Armadillo-Motiv aber auch an andere Proteine (Xing, Takemaru et al. 2008).

#### 1.2.2. Kanonischer (β-Catenin-abhängiger) Wnt-Transduktionsweg

Ist der Wnt-Signalweg inaktiv (Abb. 2, links), so befindet sich das  $\beta$ -Catenin im Zytosol und ist an den  $\beta$ -Catenin-Degradations-Komplex gebunden. Dabei handelt es sich um einen Multiprotein-Komplex, der aus Axin, APC (Adenomatous-polyposis-coli), CK1 (Casein Kinase 1) und GSK-3 $\beta$  (Glykogen-Synthase Kinase 3 $\beta$ ) gebildet wird. Das Axin spielt dabei die zentrale Rolle, da es mit allen Bestandteilen des Komplexes direkt interagiert.

Im ersten Schritt nach der Bindung an den Degradations-Komplex wird  $\beta$ -Catenin durch CK1 an S45 phosphoryliert. Die Phosphorylierung dient als Erkennungssignal für GSK-3 $\beta$ . Die Kinase phosphoryliert ihrerseits die Reste S33, S37 und T41 (Kimelman and Xu 2006). Nun wird das phosphorylierte  $\beta$ -Catenin von E3 Ligasen (z.B  $\beta$ -TrCP1) ubiquitinyliert. Die Ubiquitinylierung führt zum Abbau des  $\beta$ -Catenins in Proteasomen (Aberle, Bauer et al. 1997).



#### Abb. 2: Kanonischer Wnt-Signalweg

**Links:** Inaktiver Wnt-Signalweg. Wnt-Rezeptoren FZ und LRP sind nicht an den Liganden gebunden. CK1 und GSK3 $\beta$  phosphorylieren  $\beta$ -Catenin, das daraufhin von  $\beta$ -TrCP erkannt wird. Die anschließende Ubiquitinilierung von  $\beta$ -Catenin führ zu seiner proteosomalen Degradation. Im Zellkern inhibiert Groucho die Transkription der Wnt-Zielgene.

**Rechts:** Aktivierter Wnt-Signalweg. Wnt-Ligand bindet an die Korezeptoren Fz und LRP. Dadurch wird Dsh von Fz aktiviert. LRP wird von GSK3 $\beta$ /CK1 $\gamma$  phosphoryliert und rekrutiert anschießend die Axin-Moleküle. Dadurch wird  $\beta$ -Catenin-Degradations-Komplex zerstört, was zur  $\beta$ -Catenin Stabilisation beiträgt. Im Zellkern verdrängt  $\beta$ -Catenin Groucho von nTcf/Lef und aktiviert die Expression der Wnt-regulierten Gene.

#### Abbildung nach (Clevers 2006)

Im Falle der Aktivierung des Wnt-Signalweges (Abb. 2, rechts) bindet ein Mitglied der Wnt-Familie an den Korezeptor-Komplex Fz-LRP5/6 (Frizzled, low-density lipoprotein receptor related proteins 5/6). Frizzled ist ein Transmembranrezeptor, der über sieben Transmembrandomänen und eine extrazelluläre N-terminale Cystein-reiche Domäne verfügt. Wnt-Moleküle binden an die N-terminale Domäne des Fz-Rezeptors, dabei können mehrere Fz-Moleküle durch ein Wnt-Molekül aktiviert werden (Bhanot, Brink et al. 1996). Auch das LRP5/6 ist für das Weiterleiten des Wnt-Signals essentiell (Pinson, Brennan et al. 2000).

Durch die Wnt-Aktivierung interagiert Fz mit Dsh (Dishevelled), einem zytoplasmatischen Protein, dessen Phosphorylierung durch den Wnt-Signalweg

reguliert wird (Wallingford and Habas 2005). Der LRP-Korezeptor wird anscheinend durch CK1 $\gamma$  und GSK-3 $\beta$  phosphoryliert. Durch die Modifikation ist LRP in der Lage Axin zu rekrutieren, was zum Zerfall des Degradations-Komplexes führt (Davidson, Wu et al. 2005; Zeng, Tamai et al. 2005). Das  $\beta$ -Catenin wird nun nicht mehr abbaufördernd markiert und akkumuliert im Zellkern. Die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern führt zum Verdrängen des Groucho Korepressors von Transkriptionsfaktoren TCF/Lef (T-cell factor/ lymphoid enhancing factor) (Behrens, von Kries et al. 1996; van de Wetering, Cavallo et al. 1997). Als Transkriptionskofaktor fördert  $\beta$ -Catenin die Transkription der Wntregulierten Gene. Viele Zielgene des Wnt-Signalweges sind gewebespezifisch. Besonders interessant sind jedoch c-Myc und Cyclin D1, da diese in Prozesse wie Genexpression und Zellzyklusregulation involviert sind und Krebsentstehung begünstigen können (Giles, van Es et al. 2003).

## 1.3. Ubiquitinylierung

Um die zellulären Abläufe zu modulieren, entwickelten sich zahlreiche posttranslationale Proteinmodifikationen. Unter anderem werden Proteine durch das Anhängen von anorganischen Gruppen wie z.B. Phosphat- oder Sulfat-Gruppen oder kleinen organischen Molekülen wie z.B. Saccharide oder Ubiquitin modifiziert.

## 1.3.1. Ubiquitin

Unter Eukaryoten ist die Ubiquitin-Sequenz hoch konserviert. Es handelt sich um ein kleines Protein aus 76 AS (8,5 kDa). Über das C-terminale G76 wird Ubiquitin an das Zielprotein kovalent gebunden. Über sieben Lysine in der AS-Sequenz (K6, K11, K27, K29, K33, K48 and K63) wird das Ubiquitin mit weiteren Ubiquitin-Molekülen verkettet, wobei die einzelnen Moleküle über die Isopeptidbindung G76-K miteinander verknüpft werden. Dank der Kettenbildung ist die Ubiquitinylierung eine der vielfältigsten Modifikationen von Proteinen. Ubiquitin kann als Mono- oder Poly-Ubiquitin an das Zielmolekül gebunden werden. Durch die Art der Kopplung der einzelnen Ubiquitin-Moleküle unterscheidet sich die Wirkung der Modifikation (Haglund and Dikic 2005; Welchman, Gordon et al. 2005).

Die Mono-Ubiquitinylierung reguliert viele zelluläre Prozesse wie z.B. DNA-Reparatur oder Rezeptortransport (Hicke and Dunn 2003; Ramanathan and Ye 2012).

Die am besten untersuchte Verlinkung der Ubiquitin-Moleküle ist die Verkettung über Lysin 48. Die Poly-Ubiquitinylierung über das K48 ist ein Signal zum proteasomalen Abbau der markierten Proteine (Hershko and Ciechanover 1998). A. Ciechanover, A. Hershko und I. Rose erhielten in Jahr 2004 einen Nobelpreis für Chemie "für die Entdeckung des Ubiquitin-gesteuerten Proteinabbaus".

Die Poly-Ubiquitinylierung über das K63 ist z.B. für die Aktivierung von Kinasen und für die DNA-Reparatur verantwortlich (Krappmann and Scheidereit 2005; Zhu, Yan et al. 2014).

Die Verlinkung der Ubiquitin-Moleküle über K29 und K11 ist hingegen wenig erforscht.

#### 1.3.2. Ubiquitinylierungs-Mechanismus

Am Mechanismus der Ubiquitinylierung sind drei Enzyme E1, E2 und E3 beteiligt (Abb. 3). Durch die Aktivität des E1 Enzyms, auch als Modifikation aktivierendes Enzym bekannt, wird eine Thioesterbindung zwischen einem E1-Cystein und der C-terminalen Carboxygruppe des Ubiquitins ausgebildet. Der Prozess ist ATP abhängig und "aktiviert" das Ubiguitin. Im nächsten Schritt erfolgt die Übergabe des aktivierten Ubiguitins an das E2-Enzym (Modifikation konjugierendes Enzym), wobei eine neue Thioesterbindung gebildet wird. Der letzte Schritt der Ubiguitinylierung hängt vom Typ der beteiligten E3 Ligase ab. Im Falle der E3 Ligasen vom HECT- oder RBR-Typ (engl. homologous to the E6-AP carboxyl terminus, RING-between RING) wird das Ubiquitin auf die E3 Ligase übertragen, wobei eine dritte Thioesterbindung gebildet wird. Die E3 Ligase bildet daraufhin eine Isopeptidbindung zwischen G76 des Ubiquitins und einem Lysin des Zielproteins, das auch an die E3 Ligase gebunden ist. Im Falle der E3 Ligasen mit RING-Finger-Domänen entsteht keine direkte Interaktion zwischen E3-Ligase und Ubiquitin. Das Ubiquitin wird von dem E2 Enzym an das an die E3 Ligase gebundene Substrat übertragen (Callis 2014).



#### Abb. 3: Ubiquitinylierungs-Mechanismus

Ubiquitin wird von E1 "aktiviert", wobei ATP verbraucht wird. Das aktivierte Ubiquitin wird an E2 weitergegeben. E2 Proteine vom RING-Typ bindet Ubiquitin direkt an das Substrat. E2 Proteine vom HECT- oder RBR-Typ übergeben Ubiquitin an E3. Im letzten Schritt wird dann Ubiquitin von E3 Ligase an das Substrat gebunden. Abbildung nach www.abcam.com.

#### 1.3.3. EDD E3 Ligase

Die EDD E3 Ligase (engl. *E3 ligase identified by differential display*) gehört zu den HECT-Typ Ligasen (Abb. 4). Das ist ein multifunktionales Protein, das in viele zelluläre Prozesse wie z.B. Zellzyklus-Kontrolle und miRNA Silencing involviert ist (Munoz, Saunders et al. 2007; Su, Meng et al. 2011). Zudem beobachtete man eine EDD-Überexpression in Zusammenhang mit Krebs (Clancy, Henderson et al. 2003; Bradley, Zheng et al. 2014).

EDD E3 Ligase ist ein Protein von ca. 300 kDa. Die Ligase besteht aus vier Domänen: UBA, UBR, PABC und HECT.

Die N-terminale UBA (engl. *ubiquitin associated*) Domäne bindet an das Monound Poly-Ubiquitin (Wilkinson, Seeger et al. 2001). Zudem wurde noch die Bindung von UBA an das  $\beta$ -Catenin nachgewiesen (Hay-Koren, Caspi et al. 2011; Hay-Koren 2012).

Bei der UBR Domäne (engl. *ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin*) handelt es sich um eine Cystein- und Histidin-reiche Zinkfinger-Domäne, die in der Lage ist N-Degrons zu erkennen (N-End rule) (Tasaki, Mulder et al. 2005).

Die Domäne PABC (homolog zu dem C-Terminus von *poly(A)-binding protein*) ist in den mRNA-Metabolismus und in Protein-Wechselwirkungen involviert (Henderson, Russell et al. 2002).

Die C-terminale HECT Domäne interagiert mit dem E2 Enzym und sorgt für die katalytische Aktivität von EDD E3 (Kamadurai, Qiu et al. 2013).



#### Abb. 4: Schematischer Aufbau der EDD E3 Ligase

Gezeigt sind die Domänenstruktur sowie die Lage der Kernlokalisationssignale von EDD E3 Ligase. UBA-Domäne (*ubiquitin associated*), UBR (*ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin*), PABC (*poly(A)-binding protein*), HECT (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*) und NLS (*nuclear localization signal*, Kernlokalisations-Signale).

Abbildung nach (Hay-Koren 2012)

Im weiteren beinhaltet die Sequenz von EDD drei mögliche Kernlokalisations-Signale (NLS, nuclear localization signal) (Henderson, Russell et al. 2002).

#### 1.3.4. Interaktion der EDD E3 Ligase mit β-Catenin

Die multifunktionale EDD E3 Ligase interagiert unter anderem mit  $\beta$ -Catenin. Die UBA Domäne des EDD-Proteins wurde dabei im Labor unseres Kooperationspartners Rina Rosin-Arbesfeld als Interaktionspartner des  $\beta$ -Catenins identifiziert (Hay-Koren 2012).

In Folge dieser Interaktion wird  $\beta$ -Catenin ubiquitinyliert, wobei die Poly-Ubiquitinketten über die Lysine 11 und/ oder 29 verknüpft sind. Die Ubiquitinylierung führ zur Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins und Hochregulation der Wnt-gesteuerten Genexpression (Hay-Koren, Caspi et al. 2011).

Daraus folgend ist die EDD E3 Ligase ein positiver Modulator des Wnt-Signalweges. Dies macht sie zu einem wichtigen Faktor der Krebsentwicklung.

Genauere Kenntnisse der UBA-β-Catenin-Interaktion auf molekularer Ebene sind eine notwendige Grundlage, um darauf mögliche Ansätze zur Beeinflussung der

Wnt-Signalweg-Regulation aufzubauen und somit die Vorarbeit zur Entwicklung neuartiger Krebs-Therapiestrategien.

## 1.4. Das Hepatitis C Virus

#### 1.4.1. Entdeckung, Verbreitung und Therapie

Mehr als 170 Millionen Menschen oder ca. 3% der Weltbevölkerung sind mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert (WHO), wobei die Prävalenz der Erkrankung länderspezifisch ist (Abb. 5). Die Chronifizierungsrate ist mit rund 80% sehr hoch und führ dazu, dass eine Hepatitis C Infektion weltweit eine der häufigsten Ursachen für Leberschädigung wie Leberzirrhose und Leberzellkarzinom darstellt (Seeff 1997; Freeman, Dore et al. 2001; Lee, Yang et al. 2014).



#### Abb. 5: Weltweite Prävalenz der HCV Infektion

Quelle: wwwnc.cdc.gov, Yellow book 2012

Die Infektion wird durch das Hepatitis C Virus (HCV) verursacht. Man geht davon aus, dass die Krankheit einen zoonotischen Ursprung hat. Von welchem Tier der Erreger auf den Menschen übertragen wurde, konnte jedoch bisher nicht eindeutig

geklärt werden. Man nimmt an, das Virus sei von kleinen Nagetieren und Fledermäusen auf den Menschen übertragen worden (Drexler, Corman et al. 2013; Quan, Firth et al. 2013). Eine andere Theorie vermutet, der Speziessprung ginge vom Hund aus (Kapoor, Simmonds et al. 2011).

Erstmals entdeckt und beschrieben wurde das Virus im Jahre 1975 von S.M. Feinstone (Feinstone, Kapikian et al. 1975). Das Identifizieren und Charakterisieren des bis dahin als Non-A-Non-B-Hepatitis bezeichneten Virus gelang erst vierzehn Jahre später (Choo, Kuo et al. 1989). Das HC Virus wird hauptsächlich durch direkten Kontakt mit infiziertem Blut übertragen z.B. durch gemeinsamen Gebrauch von Injektionsutensilien bei Drogenkonsumenten, durch Organtransplantationen und Bluttransfusion (Yen, Keeffe et al. 2003; Rafiq, Banik et al. 2014).

Trotz intensiver Forschung ist eine Impfung gegen HCV bis heute nicht möglich. Bis zum Jahr 2013 basierte die HCV-Therapie auf pegyliertem Interferon-Alpha (IFN-α) und dem Virostatikum Ribavirin. Der Erfolg der Therapie hing maßgeblich vom Genotyp des Virus ab. Bei den Genotypen 1, 4, 5 und 6 führte die Therapie in nur 40 – 50% der Fälle zur Heilung. Bei der Infektion mit HCV Genotyp 2 und 3 stiegen die Heilungschancen auf 80% (Poynard, Yuen et al. 2003). Zudem zeigte die viele Monate dauernde Therapie bei vielen Patienten starke Nebenwirkungen wie Fieber und Schüttelfrost (pegyliertes Interferon-Alpha) und Blutarmut (Ribavirin). Der neue Therapieansatz basiert auf Anwendung der Medikamente aus der Klasse der HCV-Polymerase-Hemmer (NS5B-Hemmer) bzw. der NS5A-Hemmer. Die neuen Medikamente wie z.B. Sofosbuvir und Daclatasvir veränderten die Situation grundlegend. Die Heilungschancen der HCV Genotyp 1 infizierten Patienten stiegen auf 98%. Bei den Patienten mit HCV Genotyp 2 beträgt der Heilungserfolg nun 92%, beim Genotyp 3 ist die Medikamenten Kombination in 89% der Fälle wirksam (Sulkowski, Gardiner et al. 2014). Zudem wird die neue Therapie von vielen Patienten besser vertragen, da die neuen Therapieschemata Interferon-frei sind. Beide Medikamente sind seit 2014 auch in der EU zugelassen.

#### 1.4.2. Aufbau und Organisation

Das HCV (Abb. 6) gehört zu der Familie der *Flaviviridae*. Der Name kommt vom lateinischen Wort *flavus* "gelb" und wurde von dem Namensgeber der Familie dem Gelbfieber-Virus abgeleitet. *Flaviviridae* sind behüllte einzelsträngige (+)RNA-Viren. Die Familie schließt drei Gattungen *Flavivirus* (u.a. Dengue Fieber, Gelbfieber und West-Nil-Fieber Viren), *Pestivirus* (z.B. Schweinepest und Border Disease Viren) und *Hepaciviren* (HCV) ein.



#### Abb.6: Aufbau vom Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist von einer vom Wirt abstammenden Membran umgeben. Das einzelsträngige RNA-Genom wird vom viralen Capsid geschützt.

Der offene Leserahmen des HC Virus, der für das HCV Polyprotein kodiert, ist Genotyp abhängig und umfasst ca. 9100 Nukleotide. Er kodiert ein Polyprotein, das ca. 3000 Aminosäuren (AS) lang ist. Das Polyprotein wird von zellulären und viralen Proteasen in mindestens zehn strukturelle und nicht-strukturelle (NS) Proteine geschnitten (Suzuki, Suzuki et al. 1999).

## 1.5. HCV Proteine

## 1.5.1. Strukturelle Proteine

#### Core

Das Core Protein des HCV hat viele verschiedene Funktionen. Eine wichtige ist die Bildung des viralen Capsids. Das Protein wird in drei Domänen unterteilt. Die Domäne I ist basisch und hydrophil. Sie ist für die RNA-Bindung und Assemblierung des Capsids verantwortlich. Domäne II ist hydrophob und

interagiert mit Lipiden und Membranproteinen. Domäne III ist ebenfalls hydrophob. Sie wird vom Core Protein abgeschnitten, ist jedoch für Core Stabilität und Funktionen wichtig (McLauchlan 2000).

Zudem reguliert das Core Protein zahlreiche Prozesse in Wirtszellen wie z.B. Proliferation oder Transkriptionskontrolle (Otsuka, Kato et al. 2000; Bataller, Paik et al. 2004).

#### E1 und E2

Das Capsid von HCV ist von einer von der Wirtszelle abstammenden Membran umgeben. Die Envelope Glykoproteine E1 und E2 bilden ein Heterodimer (Deleersnyder, Pillez et al. 1997). Die C-terminalen Regionen der Proteine sind hydrophob und in der viralen Membran verankert (Michalak, Wychowski et al. 1997). Die Proteine sind für das Eindringen des Virus in die Wirtszelle und somit für Interaktionen mit zellulären Oberflächenproteinen verantwortlich.

#### F-Protein

Das F-Protein kommt durch eine Leserahmenverschiebung in der Core kodierenden Region zu Stande und ist in der ER-Membran der Wirtszelle lokalisiert worden. Die Kolokalisation des Proteins mit HCV NS Proteinen lässt vermuten, dass ihm eine Aufgabe bei der viralen Replikation zukommt (Xu, Choi et al. 2003). In einer weiteren Studie wurde die Rolle des F-Proteins beim Modulieren der Immunantwort herausgearbeitet (Samrat, Li et al. 2014).

#### **P7**

P7 ist ein Membranprotein, das durch Oligomerisieren einen Ionen-Kanal bildet (Griffin, Beales et al. 2003). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Assemblierung und Freisetzung der viralen Partikel (Atoom, Taylor et al. 2014).

#### 1.5.2. Nicht strukturelle Proteine

#### NS2 und NS2/3 Protease

Die NS2/3 Protease ist eine der beiden viruseigenen Proteasen, die für das Prozessieren des viralen Polyproteins notwendig ist. Die NS2/3 Protease ist autokatalytisch aktiv und spaltet NS3 von NS2 ab (Grakoui, McCourt et al. 1993). Sie ist für die virale Replikation essentiell (Kolykhalov, Mihalik et al. 2000) und

reguliert die IRES-abhängige (interne ribosomale Eintrittstelle) Translation und NS5B-Aktivität (She, Han et al. 2009).

Nach der Abspaltung von NS3 wird NS2 in die ER Membran integriert. Es ist unter anderem an der Inhibition der Genexpression beteiligt (Dumoulin, von dem Bussche et al. 2003) und reguliert zusammen mit E1 und E2 die Apoptose (Machida, Tsukiyama-Kohara et al. 2001)

#### NS3-NS4A und NS3

Bei NS3-NS4A handelt es sich um eine Serinoprotease, die zweite virale Protease. Sie ist für das Abspalten der nicht strukturellen Proteine (einzige Ausnahme: NS2-NS3 Spaltung) verantwortlich. Dabei ist NS4A als Kofaktor notwendig, um die Aktivität der NS3-Protease zu erhöhen (Bartenschlager, Lohmann et al. 1995).

Das C-terminale Ende des NS3-Proteins besitzt zudem die Nukleosid-Triphosphatase- und Helikase-Aktivität und ist für die virale Replikation essentiell (Suzich, Tamura et al. 1993; Kim, Gwack et al. 1995; Kolykhalov, Mihalik et al. 2000).

#### NS4B

NS4B ist ein hydrophobes nicht strukturelles HCV Protein. Es wird angenommen, dass es die Aktivität des NS5B-Proteins (RNA-abhängige RNA-Polymerase, RdRp) hemmt (Piccininni, Varaklioti et al. 2002). Das Protein hemmt unter anderem auch die Interferon-Antwort des Wirtes (Ding, Cao et al. 2013).

#### NS5A

Das NS5A-Protein ist ein essentieller Bestandteil des viralen Replikationskomplexes, zudem moduliert das Protein zahlreiche Prozesse in den Wirtszellen wie z.B. Zellwachstum und Proliferation. Das Protein ist auch für die Resistenzentwicklung der Wirtszellen gegen die antivirale Wirkung von Interferon-Alpha verantwortlich (Gale, Korth et al. 1997).



#### Abb. 7: Domänen-Organisation von NS5A

Graue Balken stellen die einzelnen Domänen dar; LCS (low complexity sequences); PP (PxxP Motive).

Proteinstrukturen: N-terminale amphipatische Helix (PDB: 1R7C(Penin, Brass et al. 2004)), D1 (PDB: 1ZH1(Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2005)), D2-D3 Region (Verdegem, Badillo et al. 2011; Feuerstein, Solyom et al. 2012). Abbildung entnommen aus (Aladag 2012).

Die Aminosäuresequenz von NS5A ist ungewöhnlich Prolin-reich. Das Protein ist zum großen Teil hydrophil und hat keine Transmembrandomänen. In den Zellen ist das Protein im Zytoplasma (Ide, Zhang et al. 1996), an der Kernmembran und ER lokalisiert (Tanji, Hijikata et al. 1995; Polyak, Paschal et al. 1999).

Die Membranverankerung erfolgt durch die N-terminale amphipathische  $\alpha$ -Helix (Abb. 7) (Brass, Bieck et al. 2002). Diese Region ist in allen HCV-Genotypen hoch konserviert. Mit Hilfe von NMR-Spektroskopie (Kernspinresonanz, engl. *nuclear magnetic resonance*) konnte ihre Struktur aufgeklärt werden, die amphipathische  $\alpha$ -Helix erstreckt sich von der Aminosäure 5 bis 25 (Penin, Brass et al. 2004). Die Helix ist nicht nur für die Verankerung in der Membran verantwortlich, sondern auch für die Replikation von HCV essentiell (Elazar, Cheong et al. 2003).

Das NS5A-Protein wird in drei Domänen unterteilt (Abb. 7): Domäne 1 (D1) (AS 1-213), Domäne 2 (D2) (AS 250-342) und Domäne 3 (D3) (AS356-447) (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004).

Die Struktur der Domäne 1 wurde aufgeklärt (Abb. 7) (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004; Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2005). Es handelt sich um eine Zink-bindende Domäne, somit ist NS5A ein Zink-Metalloprotein. Das Zink bindende Motiv ist unter *Hepaciviren* und *Pestiviren* konserviert und für die Stabilität und Funktionalität des NS5A Proteins sowie für die virale Replikation unentbehrlich (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die D1 von NS5A dimerisiert (Love, Brodsky et al. 2009).

NMR-Studien haben gezeigt, die NS5A-Domänen 2 und 3 unstrukturiert sind. Man konnte jedoch in beiden Domänen transiente Sekundärstrukturen in Form von  $\alpha$ -Helices nachweisen (Abb. 7) (Verdegem, Badillo et al. 2011; Feuerstein, Solyom et al. 2012).

In menschlichen Zellen wird das NS5A Protein posttranslational modifiziert. So wurden verschiedene Phosphorylierungsstadien des Proteins gefunden. Sie werden entsprechend ihrer Auftrennung im SDS-Gel bezeichnet: p56 (56 kDa) ist die basale Phosphorylierung und bei p58 (58 kDa) handelt es sich um die hyperphosphorylierte Form des Proteins (Kaneko, Tanji et al. 1994; Tanji, Kaneko et al. 1995). Bei den Phosphorylierungen handelt es sich hauptsächlich um Serin-Phosphorylierungen und einem kleineren Anteil an phosphorylierten Threoninen. Die Hyperphosphorylierung des Proteins führt zur erhöhten Degradation des Proteins in den Zellen (Huang, Staschke et al. 2007). Es wird vermutet, dass das Verhältnis von p56 und p58 NS5A die virale RNA-Replikation reguliert (Neddermann, Quintavalle et al. 2004; Appel, Pietschmann et al. 2005). Die basale NS5A-Phosphorylierung ist für die Virionen-Produktion essentiell, wobei die NS5A-Phosphorylierung die Interaktion von NS5A und Core reguliert (Masaki, Suzuki et al. 2008).

#### NS5B

Bei NS5B handelt es sich um eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (Abb. 8). Das HCV Genom besteht aus (+) RNA. Die (+) RNA dient zugleich der Translation

sowie als Template für die Produktion von (-) RNA. Die (-) RNA dient ihrerseits als Template für weitere (+) RNA Moleküle.

Das Molekül hat einen Membrananker am C-Terminus. Diese Region ist hydrophob und essentiell für die virale Replikation (Moradpour, Brass et al. 2004). Um die heterologe Expression (z.B. in *E. coli*) des Proteins zu ermöglichen, wird diese Region generell deletiert. Die am häufigsten verwendeten Deletionsmutanten sind NS5BΔ21 und NS5BΔ55.

Die Struktur des NS5B-Proteins konnte mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden (Ago, Adachi et al. 1999; O'Farrell, Trowbridge et al. 2003).



Abb.8: Bändermodell der HCV RNA-abhängigen RNA-Polymerase

Blau: Finger-Domäne, magenta: Handfächen-Domäne, grün: Daumen-Domäne. Abbildung entnommen aus (O'Farrell, Trowbridge et al. 2003)

Das Enzym weist die typische Polymerasenfaltung auf. Die sogenannte "rechte Hand" wird aus Finger-, Daumen- und Handflächen-Domänen zusammengesetzt. Die NS5B-Polymerase unterscheidet sich von den anderen viralen Polymerasen durch die starke Interaktion zwischen Finger- und Daumen-Domänen. Dadurch kommt ein eingekreistes aktives Zentrum zustande (engl. *fully encircled active site*) (Lesburg, Cable et al. 1999).

Wie auch bei anderen Polymerasen findet man in der Handflächen-Domäne zwei konservierte Aminosäuresequenzen D-X-D und GDD, die für den Transfer der Nukleotide erforderlich sind (Ago, Adachi et al. 1999).

Eine zusätzliche niedrig affine GTP-spezifische (Guanosintriphosphat) Bindungsstelle wurde zwischen Finger- und Daumen-Domänen identifiziert (Bressanelli, Tomei et al. 2002). Mutationsstudien haben gezeigt, dass die GTP-Bindungsstelle für die *in vivo* Replikation von HCV nicht essentiell ist. Für die *in vitro* RdRp Aktivität ist sie jedoch notwendig (Cai, Yi et al. 2005).

Das Protein oligomerisiert *in vitro*, zwei Aminosäuren sind dabei von besonderer Bedeutung E18 und H502. Vermutlich wird die RNA-Synthese durch die Bildung von Homodimeren begünstigt (Qin, Luo et al. 2002).

NS5B interagiert mit mehreren HCV NS-Proteinen. So wurden bereits NS5B-Interaktionen mit NS3 und NS5A nachgewiesen (Piccininni, Varaklioti et al. 2002; Shirota, Luo et al. 2002). Durch die Interaktion zwischen NS5B und NS3 wird die NS3 Helikase-Aktivität fünffach gesteigert (Zhang, Cai et al. 2005). Bei niedrigen NS5A-Konzentrationen (bis 0,1 molarem Verhältnis zu NS5B) steigert NS5A die RdRp-Aktivität von NS5B, bei höheren NS5A Konzentrationen wird die NS5B-Aktivität dagegen inhibiert (Shirota, Luo et al. 2002).

## 1.6. HCV und zelluläre Proteine

Um die Reproduktion bzw. die weitere Existenz zu ermöglichen, modulieren Viren bei einer Infektion zelluläre Signalwege und rekrutieren für ihre eigenen Zwecke bestimmte Wirtsproteine.

So greift das HCV in Signalkaskaden ein, die das Persistieren der Infektion sichern. Das virale NS5A-Protein interagiert mit dem Bax Protein (*Bcl2-associated X protein*) und inhibiert dadurch die Apoptose (Chung, Sheu et al. 2003). Außerdem wurde eine Bindung von NS5A an p53 und TBP (engl. *TATA box binding protein*) nachgewiesen. Diese Interaktionen modulieren das Transkriptionsprofil der Zelle und stören deren DNA-Reparaturmechanismen. Die Einschränkungen der DNA-Reparatur führen zu einer erhöhten Mutationsrate und begünstigen anscheinend die Krebs-Entwicklung (Qadri, Iwahashi et al. 2002). Durch das Interagieren mit 2-50AS (engl. *oligoadenylate synthase*) und PTX1

(engl. *pituitary homeobox*) führt das NS5A-Protein zur Resistenzbildung gegen die antivirale Wirkung von IFN-α (Ghosh, Majumder et al. 2003; Taguchi, Nagano-Fujii et al. 2004).

Die viralen Proteine NS5A und NS5B rekrutieren auch die zelluläre Src-Kinase (Pfannkuche, Buther et al. 2011). Die Signalkaskaden an denen c-Src in nicht infizierten Zellen beteiligt ist, können dadurch gestört werden. Somit hätte die HCV-Infektion z.B. einen Einfluss auf Zell-Proliferation oder Proteolyse.

Viele der Interaktionen von HCV-Proteinen mit zellulären Kofaktoren werden heute intensiv erforscht. Die Ergebnisse der Studien geben uns einen besseren Einblick in die Hepatitis C Pathogenese. Das Verstehen der Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Aufklärung der Interaktionen auf Strukturebene sind einer der ersten Schritte auf dem Weg zur Identifizierung neuer Therapiestrategien und der Entwicklung von neuen antiviralen Medikamenten.

## 1.7. Src-Tyrosinkinasen

Die Src-Kinasen (<u>sarcoma</u>) gehören zu den nicht-Rezeptor-abhängigen Tyrosinkinasen. Die Gruppe umfasst mit dem Protoonkogen Tyrosinproteinkinase Src (Src) verwandte Kinasen wie z.B. zelluläre Src (c-Src) und Fyn sowie Lyn verwandte Kinasen wie z.B. Lyn und Blk (Robinson, Wu et al. 2000).

Die Vertreter der Familie sind an der Regulation von zahlreichen zellulären Prozessen wie Apoptose oder Zellproliferation beteiligt (Thomas 2013).

## 1.7.1. Aufbau und Regulation

Alle Vertreter der Src-Familie sind in ihrem grundlegenden Aufbau identisch (Abb. 9). Man unterscheidet vier SH (Src Homologie) Domänen.

Am C-Terminus befindet sich die katalytische SH1-Kinasedomäne, deren Aufgabe die Übertragung einer Phosphatgruppe auf die Aminosäure Tyrosin eines anderen Proteins ist. Zudem hat die SH1-Domäne eine regulatorische Funktion. Durch die Phosphorylierung von Src-Y416 wird die enzymatische Aktivität von Src autoreguliert (Brown and Cooper 1996).

Die SH2-Domäne vermittelt die Interaktionen mit anderen Proteinen. Sie ist in der Lage phosphorylierte Tyrosine zu erkennen und zu binden (Huang, Li et al. 2008).

Die SH3-Domäne ist für die Erkennung bzw. Bindung an Proteine mit einer Prolinreichen Region häufig mit einer Kernkonsensussequenz PxxP verantwortlich (Pawson and Schlessingert 1993).

Somit können sowohl, sind SH2- als auch SH3-Domänen die Interaktion von Src-Kinasen mit ihren Substraten vermitteln.

Die SH4-Domäne (unique) am N-terminalen Ende ist für die Membranverankerung des Proteins verantwortlich. Die Membranassoziation wird durch die Myristoylierung vom Glycin an der Position zwei sowie Palmitylierung von Cysteinresten gewährleistet (Yeatman 2004).



Abb. 9: Aufbau der c-Src-Kinase

SH1-Domäne: katalytische Kinase-Domäne, SH4-Domäne: unique. Abbildung entnommen aus (Schindler, Sicheri et al. 1999)

Die Kinaseaktivität wird auf mehreren Wegen reguliert (Abb. 10). So führt die bereits erwähnte Y416 Autophosphorylierung zur Aktivierung der Kinase.



#### Abb. 10: Regulation der c-Src-Kinase-Aktivität

Die Phosphorylierung von Y530 (humanes Y530 entspricht Y527 beim Huhn) führt zur Inaktivierung von c-Src. SH2 erkennt und bindet pY530. Zusätzlich interagiert SH3 mit dem Prolin-reichen Linker zwischen SH2 und SH1.

Die Dephosphorylierung von Y530 und Phosphorylierung von Y416 aktivieren die Kinase.

Im Gegensatz dazu wird die Aktivität des Enzyms durch die Phosphorylierung von Y530 am C-terminalen Ende des Proteins inhibiert (Ingley 2008). Dieser Rest wird von C-terminaler Src-Kinase (CSK) oder von der CSK homologen Kinase (CHK) phosphoryliert (Okada 2012). Dieses Phosphotyrosin (pTyr) wird von der SH2-Domäne erkannt und gebunden. So wird die Src-Kinase in die geschlossene Konformation überführt. Zusätzlich zu der pTyr-SH2-Bindung interagiert die SH3-Domäne mit einer Prolin-reichen Region im SH2-SH1-Domänen-Linker (Gonfloni, Williams et al. 1997). In der geschlossenen Konformation ist die Kinase inaktiv. Um die Src-Kinase zu reaktivieren, wird das phosphorylierte Tyrosin 530 durch Phosphatasen wie z.B. Protein Tyrosin Phosphatase  $\alpha$  oder T-Zell Protein Tyrosin Phosphatase dephosphoryliert (Yeatman 2004). Die Dephosphorylierung von

Y530 und Phosphorylierung von Y416 führen zu der offenen Konformation, in der die Kinase aktiv ist.

#### 1.7.2. **c-Src**

Peyton Rous, ein US-Amerikanischer Pathologe, experimentierte am Anfang des 20. Jahrhunderts mit Hühnertumoren. Im Jahr 1911 gelang es ihm durch Injektion eines Ultrafiltrates vom Hühner-Muskeltumors in gesunden Hühnern Krebs hervorzurufen (Rous 1983). Das in den Filtraten enthaltene Virus wurde erst später, nach der Entwicklung von modernen Methoden der Molekularbiologie, beschrieben und charakterisiert. Es wurde nach seinem Entdecker Rous-Sarkom-Virus (RSV) benannt. Im Jahr 1966 erhielt Peyton Rous den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin "für seine Entdeckung auf dem Gebiet der tumorerzeugenden Viren".

In weiteren Studien zu RSV konnte das v-Src (Akronym aus <u>viral sarcoma</u>) als virales Onkogen bestimmt werden. In den 1970er Jahren entdeckten J. Michael Bishop, Harold E. Varmus das zelluläre Homolog des *v-Src*-Gens, das *c-Src* (<u>cellular sarcoma</u>) (Stehelin, Varmus et al. 1976). Bishop und Varmus erhielten 1989 einen Nobelpreis "für ihre Entdeckung des zellulären Ursprungs retroviraler Onkogene".

Evolutionär gesehen wurde das *c-Src*-Gen durch Rekombination auf das RSV übertragen. Die virale Variante des Gens (*v-Src*) unterscheidet sich jedoch von der zellulären durch die Deletion des C-terminalen Endes. Durch das Fehlen des regulierenden Y530 ist die v-Src Kinase somit konstitutiv aktiv (Takeya and Hanafusa 1982). Da c-Src in Regulation von Prozessen wie z.B. Apoptose oder Zellproliferation eingebunden ist, erklärt sich die tumorerzeugende Wirkung von RSV. Unterstützend zu dieser These konnte ein erhöhtes Src-Expressionslevel in vielen menschlichen Tumoren nachgewiesen werden (Irby and Yeatman 2000). Auch die Punktmutationen in der regulierenden C-terminalen Region von c-Src, die eine erhöhte Aktivität von c-Src zur Folge haben, wurden als Ursache für die Malignomentwicklung identifiziert (Irby, Mao et al. 1999).

#### 1.7.3. Interaktionen von c-Src mit anderen Proteinen

## Zelluläre Proteine und c-Src

Wie bereits erwähnt ist die c-Src-Kinase in viele zelluläre Prozesse eingebunden.

So inhibiert c-Src die Apoptose durch die Aktivierung von MAPK/ERK (MAPK mitogen-activated protein kinases, MAPK ist auch unter dem Namen ERK bekannt extracellular signal-regulated kinases) Signalkaskade, die ihrerseits die erhöhte Degradation vom Bik (BCL-2 interacting killer) zur Folge hat (Lopez, Hesling et al. 2012). Die Zellproliferation wird über die SH2-Bindung an den PDGF-Rezeptor (platelet derived growth factor) und dessen Aktivierung im G2-Stadium der Zellteilung beeinflusst (Barone and Courtneidge 1995; Roche, Fumagalli et al. 1995). Zudem konnte eine c-Src-abhängige Regulation c-Myc von (Myelocytomatose) gezeigt werden (Bowman, Broome et al. 2001).

#### Virale Proteine und c-Src

Zahlreiche virale Proteine interagieren mit c-Src, um die Existenz und das Replizieren von Viren zu ermöglichen. Im Hinblick auf das Hepatitis C Virus ist bekannt, dass das die Prolin-reiche C-terminale Region von HCV NS5A-Protein mit den SH3-Domänen interagiert und die Aktivität zahlreicher Src-Typ Kinasen wie Hck, Lyn oder Fyn moduliert (Macdonald, Crowder et al. 2004). In früheren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass c-Src mit den HCV Proteinen NS5A und NS5B einen heterotrimeren Komplex bildet. Erste Experimente lassen dabei vermuten, dass die c-Src Domäne SH2 mit NS5A und SH3-Domäne mit NS5B Protein interagiert (Pfannkuche, Buther et al. 2011) (Abb. 11).



#### Abb. 11: Ein Model der Assemblierung des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes

Dargestellt ist der hypothetische Aufbau des heterotrimeren c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes. c-Src und NS5B Proteine interagieren über eine kanonische SH3-PxxP-Bindung. Zudem interagiert c-Src-SH2 mit NS5A über eine Phosphotyrosin-Bindung. Auch die Proteine NS5A und NS5B binden aneinander. Wobei alle drei Proteine über ihre Membrananker an einer Membran gebunden sind.

Genauere Kenntnisse von Interaktion der c-Src-Kinase mit HCV-Proteinen auf molekularer Ebene sind eine notwendige Grundlage zum Verständnis der HCV-Pathogenese, um darauf basierend neuartige Therapiestrategien aufzubauen.

## 1.8. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die UBA-β-Catenin-Interaktion näher charakterisiert werden. Folgende Aufgaben sollten dabei gelöst werden:

- Etablieren der Expression- und Reinigungsprotokolle für UBA-Domäne und ihre Mutanten sowie β-Catenin
- Konzipieren und Durchführen von Funktionalitäts-Assays für die benötigen Proteine
- Untersuchung der UBA-β-Catenin-Interaktion mit verschiedenen biophysikalischen Methoden
- Kartierung der UBA-β-Catenin-Bindungsepitope

Im Weiteren sollte der c-Src-NS5A-NS5B-Komplex *in vitro* assembliert werden. Folgende Grundlagen sollten hierzu geschaffen werden:

- Etablieren der NS5A und NS5B Expressions- und Reinigungsprotokolle
- Etablieren eines Systems zur Tyrosin-Phosphorylierung von NS5A in E. coli
- Ausarbeiten von Kontrolltests zur Prüfung der Funktionalität der präparierten Proteine
- Versuche zur *in vitro* Assemblierung der binären Komplexe: c-Src-SH3-NS5B, c-Src-SH2-NS5A und NS5A-NS5B
- Versuche zur *in vitro* Assemblierung des heterotrimeren Komplexes c-Src-NS5A-NS5B

Zusammengenommen sollten die Ergebnisse der durchgeführten Experimente eine Abschätzung der Machbarkeit der angestrebten *in vitro* Assemblierung der untersuchten Zielkomplexe erlauben. Langfristig sollten solche Untersuchungen zum genauen Verständnis der β-Catenin Regulation und der HCV-Pathogenese beitragen.

# 2. Materialien und Methoden

## 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Bakterielle Zelllinien

#### Tab. 1: Eingesetzte bakterielle Zelllinien

Stamm	Genotyp	Referenz
E. coli BL21	F⁻, <i>omp</i> T, <i>hsdS</i> B, (rB⁻, mB⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i>	Novagen, Darmstadt
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>omp</i> T, <i>hsdS</i> B, (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3)	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
E. coli BL21(DE3) T1 <sup>R</sup>	F <sup>-</sup> , <i>omp</i> T, <i>hsdS</i> B, (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , gal, λ(DE3); recA , endA- , lacI q ; tonA	Novagen, Darmstadt
E. coli BL21 TKB1	B F₋dcm ompT hsdS (r₅-m₅-) gal λ(DE3) [pTK Tetr]	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
E.coli Mach 1	F´lacl <sup>q</sup> Tn10(Tet <sup>R</sup> );mcrA; Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC); Φ80lacZΔM15; ΔlacX74; deoR; recA1; araD139; Δ(ara-leu)7697;galU; galK; rpsL; endA1; nupG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

#### 2.1.2. Plasmide

#### Tab. 2: Verwendete Plasmide

Name	Resistenz	Тур	Quelle
pGEX-6P-2	Ampicillin	Expressionsvektor	Amersham Biosciences, Freiburg
pET15b	Ampicillin	Expressionsvektor	Novagen, Darmstadt
pET41c	Kanamycin	Expressionsvector	Novagen, Darmstadt

#### Tab. 3: Während dieser Doktorarbeit klonierte Expressionsvektoren

Bezeichnung	Resistenz	Produkt

pGEX-6P-2-Axin(435-541)	Ampicillin	GST-Axin(435-541)
pGEX-6P-2-UBAwt <sub>c</sub>	Ampicillin	GST-UBAwt <sub>c</sub>
pGEX-6P-2-UBAV196K <sub>c</sub>	Ampicillin	GST-UBAV196K <sub>c</sub>
pGEX-6P-2-UBAL224K <sub>c</sub>	Ampicillin	GST-UBAL224Kc
pET15b-strep-Δ24NS5A	Ampicillin	strep(II)-(TEV)-Δ24NS5Ahis
pET15b-strep-D2D3	Ampicillin	strep(II)-(TEV)-D2D3His
pET15b-strepD1(25-202)	Ampicillin	strep(II)-(TEV)-D1(25-202)His
pET15b-strepD1(25-213)	Ampicillin	strep(II)-(TEV)-D1(25-213)His
pET41c-D1(1-202)	Kanamycin	D1(1-202)-His
pET41c-D1(1-213)	Kanamycin	D1(1-213)His
pGEX-6P-2-SH2	Ampicillin	GST-SH2
pGEX-6P-2-SH3SH2	Ampicillin	GST-SH3SH2

## 2.1.3. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez, Berlin hergestellt.

#### Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotitdsequenz (5'→3')	Verwendung
T7-Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	Klonierung, Sequenzierung
T7-Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Klonierung, Sequenzierung
pGEX-5′	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	Klonierung, Sequenzierung
pGEX-3′	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Klonierung,
		Sequenzierung
------------------------------	---	---------------
UBA-cys.fw	GGCCGCATCGTGACTTGCTGACGAT CTGCCTCGC	Mutagenese
UBA-cys.rev	GCGAGGCAGATCGTCAGCAAGTCA CGATGCGGCC	Mutagenese
SH3SH2hum.fw	GGAGGAGGATCCGAAAACCTGTATT TTCAGGGCCCGCTGGCCGGTGGAG TGACC	Klonierung
SH2hum.fw	GGAGGAGGATCCGAAAACCTGTATT TTCAGTCCGACTCCATCCAGGCTGA GG	Klonierung
SRChum.rev	GGAGGACTCGAGTTAGGGGCACAC GGTGGTGAGGCG	Klonierung
NS5A_His-213.rev	GGAGGACTCGAGTTAGTGGTGGTG GTGGTGGTGGGTGGGTTTCTGCGGTAATA TGGCTCGG	Klonierung
NS5A_His-202.rev	GGAGGACTCGAGTTAGTGGTGGTG GTGGTGGTGCATACTGGTCAGCAC GGTAACATCC	Klonierung
TEV(/Ser)NS5A_D2D3.fw	GGAGGACCATGGCAAGCTGGAGCC ACCCGCAGTTCGAAAAGGGTGCAG AAAACCTGTATTTTCAGAGCGAACC GGAACCGGATGTTACC	Klonierung
TEV(/Ser)_ NS5A_delta1-24.fw	GGAGGACCATGGCAAGCTGGAGCC ACCCGCAGTTCGAAAAGGGTGCAG AAAACCTGTATTTTCAGAGCAAACT GCTGCCTCGTCTGC	Klonierung

# 2.1.4. Geräte

#### Tab. 5: Benutzte Geräte

Gerät	Hersteller
BiaCore T200	GE Healthcare, München
ChemiDoc MP	Bio-Rad, München
DNA – Elektrophorese	Amersham Biosciences, Freiburg
FPLC: HiPrep 26/10 Desalting Column, HiLoad 26/60 Superdex 75 pg column,	Amersham Biosciences, Freiburg
GelDoc	Bio-Rad, München
Inkubatoren: Unitron und Multitron	Infors-HT, Einsbach
ITC200	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
MST	NanoTemper Technologies, München
PCR : PTC 200	Biozym, Oldendorf
SDS-PAGE: Mighty Small II	Hoefer/ Amersham Bioscience, Freiburg
Tischzentrifugen: 5415D, 5804R	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Turbo	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Ultrasonificator, Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA
UV/VIS Spektrometer, Lambda 25	PerkinElmer, Skelton, MA, USA
Vis-Photometer PrimLight	Schott instruments, Mainz
Zentrifuge: Avanti J-20 XP	Beckman-Coulter, Brea, Kalifornien USA

# 2.1.5. Puffer und Lösungen

Ampicillin-Stock (1:1000)	200 mg/ml Ampicillin in H2O bidest.,
	steril filtriert
APS:	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
	in H2O bidest.

Kanamycin-Stock (1:1000)	100 mg/ml Kanamycin in H <sub>2</sub> O bidest.,
	steril filtriert
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 19 g NaCl auf 1 L H <sub>2</sub> O bidest.
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Coomassie-Färbelösung	0.05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R- 250, 45% (v/v) Methanol, 9.2 % Essigsäure

#### 2.1.6. Proteine

#### Tab. 6: Aminosäuresequenzen der eingesetzten Proteine

Bezeichnung	Sequenz
UBAwt	GPLGSSGRSSAGARDSRRQTRVIRTGRDRGSGLLGSQPQPVIPASVIPEELIS QAQVVLQGKSRSVIIRELQRTNLDVNLAVNNLLSRDDEDGDDGDDTASESYLP
(142-247)	GVDSSGRIVTD*
UBAV196K	GPLGSSGRSSAGARDSRRQTRVIRTGRDRGSGLLGSQPQPVIPASVIPEELIS
(142-247)	QAQVKLQGKSRSVIIRELQRTNLDVNLAVNNLLSRDDEDGDDGDDTASESYLP GVDSSGRIVTD*
UBAL224K	GPLGSSGRSSAGARDSRRQTRVIRTGRDRGSGLLGSQPQPVIPASVIPEELIS
(142-247)	QAQVVLQGKSRSVIIRELQRTNLDVNLAVNNLKSRDDEDGDDGDDTASESYLP GVDSSGRIVTD*
Axin(435-541)	CHKLPPAPAWHHFPPRCVDMGCAGLRDAHEENPESILDEHVQRVLRTPGRQSP
	GEGUKSEDSGUANMEANDGGAASGUGVUAEVSGAVTDAAGTUUUVUAUUUU.
Strep(II)-	MASWSHPQFEKGAENLYFQSKLLPRLPGVPFLSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCP CGAQIAGHVKNGSMRIVGPRTCSNTWHGTFPINAYTTGPCTPSPAPNYSRALW
∆24NS5A-His	RVAAEEYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKCPCQVPAPEFFTEVDGVRLHRYAPA CKPLLREDVTFQVGLNQYLVGSQLPCEPEPDVTVLTSMLTDPSHITAETAKRR
	RVESENKVVILDSFEPLHAEGDEREISVAAETLRKSRKFPSALPIWARPDYNP
	PLLESWKDPDYVPPVVHGCPLPPTKAPPIPPPRRKRTVVLTESNVSSALAELA
	TKTFGSSGSSAVDSGTATALPDLASDDGDKGSDVESYSSMPPLEGEPGDPDLS
	DGSWSTVSEEASEDVVCCHHHHHH*

NS5A (FL)	MSGSWLRDVWDWICTVLTDFKTWLQSKLLPRLPGVPFLSCQRGYKGVWRGDGIM
	QTTCPCGAQIAGHVKNGSMRIVGPRTCSNTWHGTFPINAYTTGPCTPSPAPNYS
	RALWRVAAEEYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKCPCQVPAPEFFTEVDGVRLHRY
	APACKPLLREDVTFQVGLNQYLVGSQLPCEPEPDVTVLTSMLTDPSHITAETAK
	RRLARGSPPSLASSSASQLSAPSLKATCTTHHDSPDADLIEANLLWRQEMGGNIT
	RVESENKVVILDSFEPLHAEGDEREISVAAEILRKSRKFPSALPIWARPDYNPPL
	LESWKDPDYVPPVVHGCPLPPTKAPPIPPPRRKRTVVLTESNVSSALAELATKT
	FGSSGSSAVDSGTATALPDLASDDGDKGSDVESYSSMPPLEGEPGDPDLSDGSW
	STVSEEASEDVVCCENLYFQGHHHHHHHH*
NS5BΔ21(1b)	MKSMSYTWTGALITPCAAEESKLPINPLSNSLLRHHNMVYATTSRSASLRQKKV
	TFDRLQVLDDHYRDVLKEMKAKASTVKAKLLSIEEACKLTPPHSAKSKFGYGAK
	DVRNLSSRAVNHIRSVWEDLLEDTETPIDTTIMAKSEVFCVQPEKGGRKPARLIV
	FPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQAVMGSSYGFQYSPKQRVEFLVNTWKSKKCPMG
	FSYDTRCFDSTVTESDIRVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGGPLTNSKG
	QNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKATAACRAAKLQDCTMLVNGDDLVVICES
	AGTQEDAAALRAFTEAMTRYSAPPGDPPQPEYDLELITSCSSNVSVAHDASGKRV
	YYLTRDPTTPLARAAWETARHTPINSWLGNIIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAQ
	EQLEKALDCQIYGACYSIEPLDLPQIIERLHGLSAFTLHSYSPGEINRVASCLRK
	LGVPPLRTWRHRARSVRAKLLSQGGRAATCGRYLFNWAVRTKLKLTPIPAASQLD
	LSGWFVAGYSGGDIYHSLSRARPRHHHQHH
NS5B∆21(2a)	MKSMSYSWTGALITPCSPEEEKLPINPLSNSLLRYHNKVYCTTTKSASLRAKK
	VTFDRMQVLDSYYDSVLKDIKLAASKVTARLLTMEEACQLTPPHSARSKYGFG
	AKEVRSLSGRAVNHIKSVWKDLLEDSETPIPTTIMAKNEVFCVDPTKGGKKAA
	RLIVYPDLGVRVCEKMALYDITQKLPQAVMGASYGFQYSPAQRVEFLLKAWAE
	KKDPMGFSYDTRCFDSTVTERDIRTEESIYRACSLPEEAHTAIHSLTERLYVG
	GPMFNSKGQTCGYRRCRASGVLTTSMGNTITCYVKALAACKAAGIIAPTMLVC
	GDDLVVISESQGTEEDERNLRAFTEAMTRYSAPPGDPPRPEYDLELITSCSSN
	VSVALGPQGRRRYYLTRDPTTPIARAAWETVRHSPVNSWLGNIIQYAPTIWARM
	VLMTHFFSILMAQDTLDQNLNFEMYGAVYSVSPLDLPAIIERLHGLDAFSLHTY
	TPHELTRVASALRKLGAPPLRAWKSRARAVRASLISRGGRAAVCGRYLFNWAVK
	TKLKLTPLPEARLLDLSSWFTVGAGGGDIYHSVSRARSRHHHHHH
cSrc-SH3	GPLGSAGPLAGGVTTFVALYDYESRTETDLSFKKGERLQIVNNTEGDWWLAHS LSTGQTGYIPSNYVAPSDSIQAEE
cSrc∆SH1	GPLGSPNSMGSNKSKPKDASQRRRSLEPAENVHGAGGGAFPASQTPSKPASAD
	GHRGPSAAFAPAAAEPKLFGGFNSSDTVTSPQRAGPLAGGVTTFVALYDYESR

YFGKITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESETTKGAYCLSVSDFDNAKGLNVKH
YKIRKLDSGGFYITSRTOFNSLOOLVAYYSKHADGLCHRLTTV*
~ ~~

#### 2.1.7. Kits und Chemikalien

Acrylamide 4 K solution (30%) (Mix 29:1)	AppliChem, Darmstadt
Agarose SeaKem	Fluka, Neu-Ulm
Bis-Tris	Roth, Karlsruhe
Complete-Protease-Inhibiting tablet	Roth, Karlsruhe
PhosStop	Roth, Karlsruhe
dNTPs (desoxy-Nukleosid-Triphosphate)	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Glutathion, reduced	Sigma, München
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Ni-NTA Sepaharose	Qiagen, Hilden
Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Midi Nucleobond AX 20und AX100 Kit	Machery-Nagel, Düren
Pierce Ko-Immunoprezipitation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
3-Indoleacryl Säure (IAA)	Sigma, München
Ubiquitin (bovine)	Sigma, München

#### 2.1.8. Datenbasen und Software

Das Bioinformatik-Portal ExPASy wurde benutzt, um diverse Parameter für Proteinsequenzen zu bestimmen. Die PDB-Datenbank (Protein-DatenBank) diente als Quelle für Proteinstruktur-Informationen. ApE Software wurde für die DNA-Analysen und Primerdesign verwendet. Image Lab Software (Bio-Rad) wurde für die Aufnahme und Analyse der Gel- und Western Blot-Bilder verwendet. Die

Auswertung der ITC-Daten wurde mit Origin7SR4 Software (GE Healthcare) durchgeführt. PyMol (The PyMol Molecular Graphics System, Version 1.6, Schrodinger LLC) wurde zur Darstellung von 3D-Proteinabbildungen verwendet.

# 2.2. Bakterielle Zellkultur

# 2.2.1. Anzucht von Bakterienzellen

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen erfolgte auf LB-Platten bei 37°C im Brutschrank (Memmert, Schwabach). Das Wachstum im Flüssigmedium erfolgte bei 37°C und 170 rpm in einem Rotationsschüttler (Unitron/Multitron Infors-HT, Einsbach). Zur Selektion wurden entsprechende Antibiotika dem Medium beigefügt.

Für die langfristige Stammaufbewahrung wurden die Zellen in 50%igem (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert.

# 2.2.2. Bestimmung des Zell-Wachstums

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wurde durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem PrimLight Photometer (Schott instruments) verfolgt.

# 2.2.3. CaCl<sub>2</sub>-Methode zur Herstellung kompetenter E. coli Zellen

Die Behandlung von *E. coli* Zellen mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen bewirkt aufgrund eines bisher nicht verstandenen Mechanismus, die hoch effiziente Aufnahme von Plasmid-DNA in die behandelten Zellen.

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml über Nacht *E. coli* Kultur angeimpft. Nach der Inkubation der Flüssigkultur bis zu einer  $OD_{600}$  von ca. 0,6 wurden die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 2000 xg geerntet. Auf diese Weise wurde das Waschen mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung drei Mal wiederholt. Danach wurden die Zellen in 5 ml einer 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin Lösung vorsichtig resuspendiert, aliquotiert und im flüssigen Stickstoff schock gefroren.

Die so präparierten Zellen konnten ca. 6 Monate lang bei -80 °C aufbewahrt werden

# 2.2.4. Transformation von E. coli

Zu 100 µl CaCl<sub>2</sub>-behandelte kompetente *E. coli* Zellen (Kap. 2.2.3) wurden 10 µl des jeweiligen Ligationsansatzes oder ca. 100 ng Plasmid-DNA hinzugefügt. Die Ansätze wurden anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt folgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Nach der Zugabe von 100 µl LB-Medium wurden die Zellen unter leichtem Schütteln (300 rpm) und 37 °C regeneriert. Abschließend wurden *E. coli* Zellen auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert.

Die Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) überprüft.

# 2.3. Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1. Isolierung der Plasmid-DNA aus E.coli

Die *E. coli* Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Plasmid DNA Purification Nucleobond PC100 Kit (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Hierbei wurde nach dem Hersteller Protokoll gearbeitet.

#### 2.3.2. Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

PCR ist eine Methode zur *in vitro* Vervielfältigung der DNA (Mullis, Faloona et al. 1986). Ein PCR-Reaktionsansatz enthält standardmäßig: DNA-Matrize (Template) mit zwei synthetischen Oligonukleotiden (Primer), die zu der Anfangs- und Endsequenz des Templates komplementär sind, das Enzym DNA-Polymerase und dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) sowie andre chemische Komponenten.

Die Methode basiert auf Temperaturzyklen, die mehrfach wiederholt werden. Einzelne Teilschritte in einem Zyklus sind dabei: DNA-Denaturierung, Anlagerung der Primer und DNA-Synthese. Da die neu gebildete DNA im nächsten Zyklus als Template agiert, erhöht sich die Menge des amplifizierten DNA-Fragments exponentiell.

Zur Amplifizierung von DNA wurden standardmäßig Reaktionen mit einem Volumen von 50 µl angesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt: 0,5 U VENT (NEB) oder Taq (Fermentas) Polymerase, 5 µl des entsprechenden Polymerase-Puffers

43

(10x), je 30 pmol des nötigen Primer-Paares und 0,25 mM von jedem dNTP. Mg<sub>2+</sub> Ionen und DNA wurden in variablen Mengen eingesetzt.

Die Annealingtemperatur wurde dem Primer-Paar entsprechend festgelegt. Die Zeit der Elongation war von der Länge des erwünschten Fragments abhängig (1 min für 1 kb DNA-Sequenz).

# 2.3.3. Kolonie-PCR mit E. coli

Zur Bestätigung des Klonierungserfolges wurde die Kolonie-PCR eingesetzt. Die gewählte Primer-Kombination und Größe der PCR-Fragmente dienten der Überprüfung der Ligation. Es wurde Taq-Polymerase (Fermentas) eingesetzt. Als Template dienten *E. coli* Kolonien, die durch Transformation die erwartete Antibiotikumresistenz aufwiesen.

#### 2.3.4. Restriktionsverdau

Für Restriktionsverdaus wurden Endonukleasen der Firma Fermentas mit dem von dem Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Pro 1 µg DNA wurde 1 U des Restriktionsenzyms eingesetzt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### 2.3.5. Ligation

Um PCR-Produkte mit dem jeweiligen Vektor zu ligieren, wurde T4-DNA-Ligase (Fermentas) mit entsprechendem Puffer verwendet. Die Ligation erfolgte bei RT über Nacht, wobei verschiedene Verhältnisse Vektor zu Verhältnisse Insert getestet wurden.

#### 2.3.6. Agarosegelelektrophorese

Es wurden 0,8%ige Agarosegele in TAE verwendet. Zum Auftragen auf das Gel wurde die DNA-Lösung mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt. Die bei einer Laufzeit von 30-60 min angelegte Spannung betrug 70-90 V.

Zum Sichtbarmachen der DNA-Banden im Gel wurde Ethidiumbromid dem Gel zugesetzt (5 µl/100 ml Gel). Gele wurden unter UV-Licht an der GelDoc (Bio-Rad, München) fotografiert. Die Größe der DNA-Fragmente wurde aus dem Vergleich mit dem Laufverhalten der DNA-Fragmente des 1 kb DNA Ladder Plus Markers oder Middle Range Marker von Fermentas bestimmt.

#### Materialien und Methoden

<u>1 x TAE</u>	-Puffer:	<u>6 x DNA-Probenpuffer:</u>
40 mM	Tris	30% (w/w) Glycerin
45 mM	Borsäure	0,25% (w/v)Bromphenolblau
1 mM	EDTA	0,25% (w/v)Xylencyanol

# 2.4. Proteinaufreinigung

#### 2.4.1. **SDS-PAGE**

Der Verlauf der Proteinreinigung wurde mittels einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektroporese (SDS-PAGE) in Modifikation nach Lämmli (Laemmli 1970) überprüft. Sie wurden als vertikale Plattenelektrophorese (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Die Gele hatten eine Größe von 10 x 10,5 cm bei einer Dicke von 0,75 mm. Es wurden 15%ige und 12%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die Polymerisation wurde durch 6 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin) und 60 µl einer 10%igen (w/v) APS-Lösung (Ammoniumperoxodisulfat) pro 10 ml Gel gestartet. Die Proteintrennung erfolgte bei 40 mA und dauerte insgesamt ca. 30 min.

Die Proteinproben wurden vor der SDS-PAGE mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

4x Lämmli-Puffer: 8% SDS 200 mM Tris/HCl, pH6,8 50% Glycerin 4% β-Mercaptoethanol 0,04% Bromphenolblau 10x SDS-Laufpuffer: 250 mM Tris 1% SDS 1,92 M Glycin

Sammelgel (5%):

5% (v/v) Acryl/Bisacrylamid 0,125 M Tris (pH 6,8) 0,1% (w/v) SDS Trenngel (15%) bwz. (12%):

15% (v/v) bzw. 12% Acryl/Bisacrylamid 0,39 M Tris (pH 8,8) 0,1% (w/v) SDS

Anschließend wurden die Proteinbanden durch Färbung mit Coomassie sichtbar gemacht (Kap. 2.4.2).

# 2.4.2. Färben von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Blue

Das Färben von Polyacrylamid-Gelen wurde in Anlehnung an Meyer und Lamberts (Meyer and Lamberts 1965) durchgeführt. Es wurde der Farbstoff Coomassie Blue R 250 von Serva (Heidelberg) verwendet (Kap. 2.1.5).

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel zur Färbung in Coomassie-Lösung im Wasserbad erwärmt und für ca. 15 min eingelegt. Nach Abgießen der Färbelösung wurde das Gel mit Wasser gewaschen, in der Mikrowelle aufgekocht und bis zum gewünschten Grad entfärbt.

# 2.4.3. Heterologe Expression in E. coli

# E. coli BL21, BL21(DE3), BL21(DE3)T1

*E. coli* Kulturen wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 bis 0,8 im LB-Medium inkubiert. Dann wurde die Proteinexpression (2-4 h, 37 °C) mittels Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach erfolgter Expression wurden die Bakterien-Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 *xg*, 30 min).

# TKB1

Dieser *E. coli* Stamm trägt auf einem zusätzlichen Plasmid das für die Elk-Tyrosinkinase kodierende Gen. Die Überexpression der Elk-Kinase wird über den *trp*-Promoter gesteuert, der durch die IAA-Zugabe aktiviert werden kann.

Expression und posttranslationale Modifikation des NS5A-Proteins erfolgte nach dem Standard-Protokoll für *E. coli* TKB1 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

# 2.4.4. Zell-Aufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte entweder durch die Zellyse unter Zugabe von Lysozym oder durch Sonifizieren der Zellen mit dem Branson Sonifier 250.

# 2.4.5. GSH-Affinitätschromatographie

Die GST-Fusionsproteine wurden mittels GSH-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Zelllysate wurden nach dem Zellaufschluss zentrifugiert (40.000-50.000 xg, 45 min). Der Überstand mit löslichen Bestandteilen der Zellen wurde mit der prääquilibrierter Glutathion Sepharose 4B (GSH-Sepharose) im Batch 30-60 min lang inkubiert. Durch Waschen wurden anschließend die nicht-gebundenen Proteine entfernt. Darauf wurde das Zielprotein eluiert (20 mM Glutathion).

# 2.4.6. Ni-NTA-Affinitätchromatographie

Für His-getaggte Proteine wurde Ni-NTA-Affinitätschromatographie nach dem Standard-Protokoll von Qiagen, Hilden durchgeführt. Nach der Zelllyse bzw. Aufschluss wurden die Lysate mit Zentrifugation in lösliche und nicht-lösliche Fraktionen getrennt (40.000-50.000 xg, 45 min). Die gelösten Proteine wurden im Batch an die prääquilibrierte Ni-NTA-Sepharose gebunden (1-2 h). Nach anschließenden Waschschritten wurden die gebundenen Proteine mit Imidazolhaltigen Puffern von der Sepharose eluiert (Kap. 2.4.10 und 2.4.12).

# 2.4.7. Protein-Spaltung

PreScission Protein-Spaltung fand über Nacht bei 4 °C im folgenden Puffer statt:

Puffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), pH 8.0.

# 2.4.8. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Eine Hiload 26/60 Superdex 75 pg Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde mit 600 ml entsprechendem Gelfiltrationspuffer (entgast) equilibriert. Die Eluatfraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (Kap. 2.4.1).

# 2.4.9. UBAs-, β-Catenin-, Axin- und c-Src-Reinigung

GST-Fusionsproteine wurden nach dem Standardprotokoll von GE Healthcare gereinigt. Für die Präparation der Fusionsproteine wurden sie nach der GSH-Affinitätschromatographie von der Sepharose eluiert (Puffer + 20 mM Glutathion). Im Falle der Reinigung von Tag-losen Proteinen wurde die *on-column* Protein-Spaltung über Nacht durchgeführt (Kap. 2.4.7). Anschließend wurden die präparierten Proteine nach Bedarf mittels SEC (2.4.8) von den Verunreinigungen getrennt.

Verwendete Puffer: PBS pH 7,4 oder 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0

Das GST-c-Src∆SH1 Fusionsprotein wurde von Stefan Klinker gereinigt und freundlicherweise für dieses Projekt zur Verfügung gestellt.

#### 2.4.10. pTyr-NS5A-Reinigung

#### Reinigung für anschließende Pulldown-Assays

Lysis-Puffer: 40 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM β-ME, 5% Glycerol, Complete Proteaseinhibitoren EDTA free (Roche, Basel, Schweiz), PhosStop (Roche, Basel, Schweiz)

Sarkosyl-Lösung: 3% Sarkosyl in Wasser

Rückfaltungspuffer: 40 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -ME, 1 CMC DPC (0,05%), Complete Proteaseinhibitoren (Roche)

Waschpuffer 1: 40 mM Tris pH 8,0, 1 M NaCl, 1 CMC DPC, 30 mM Imidazol, 2 mM  $\beta$ -ME

Waschpuffer 2: 40 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 CMC DPC, 80 mM Imidazol, 2 mM  $\beta$ -ME

Elutionspuffer: 40 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 CMC DPC, 500 mM Imidazol 2 mM β-ME

E. coli Pellets wurden in 10 ml Lysispuffer/1 g Zellpellet resuspendiert und 6x 30 s auf Eis sonifiziert. Nach der Zugabe von 5 mg Lysozym/ 1 g Zellpellet wurde die Zellen zusätzlich für 1 h bei RT lysiert. Die Lysate wurden anschließend 30 min bei 15000 xg zentrifugiert. Darauf folgend wurde das Pellet in Sarkosyl aufgenommen (2 ml/1 g Pellet) und für min. 1 h bei RT inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation (40.000 xg, 30 min), wurde der Überstand tröpfchenweise in ein zehnfaches Volumen an Rückfaltungspuffer hinzugefügt und an Ni-NTA-Sepharose gebunden (Kap. 2.4.6). Im letzten Schritt wurde Protein das mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Wobei die Sepharose mit 5x SV (Säulenvolumina) Waschpuffer 1 und 3x SV Waschpuffer 2 gewaschen wurde. Elution erfolgte durch die Zugabe von 2x SV Elutionspuffer.

# Reinigung des pTyr-NS5A Proteins für Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung

48

Lysis-Puffer: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,0, 10 mM Tris/HCl, 8 M Urea, 20 mM Imidazol

Die *E. coli* Zellen wurden im Lysis-Puffer resuspendiert (5 ml/ 1 g Pellet) und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 6x 30s auf Eis sonifiziert. Danach erfolgte die Zentrifugation 45 min bei 40000xg. Der dabei erhaltene Überstand wurde mit der Ni-NTA-Sepharose inkubiert. Im letzten Schritt wurde das pTyr-NS5A Protein mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt.

# 2.4.11. Analyse der pTyr-NS5A-Phosphorylierung

Analyse der Phosphorylierung des präparierten NS5A-Proteins erfolgte am MLP (molecular Proteomics Laboratory) der HHU Düsseldorf (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Die Auswertung der Daten wurde von A. Stefanski durchgeführt.

# 2.4.12. NS5B-Reinigung

Das NS5B-Protein wurde wie in (Bellon-Echeverria, Lopez-Jimenez et al. 2010) beschrieben gereinigt.

# 2.4.13. Absorptionsspektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die spektroskopische Messung erfolgte am Perkin Elmer Instruments Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Wellesley MA, USA) Spektralphotometer. Der Absorptionwert der Proteine bei 280 nm wurde zur Konzentrationsbestimmung nach dem Lambert-Beerschem Gesetz ausgewertet. Der molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten wurden ExPASy ProtParam tool bestimmt mit (www.expasy.org).

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

E- Absorptionswert,  $\epsilon$  – Extinktionskoeffizient [M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>], c- Konzentration [M], d – Schichtdichte [cm]

# 2.4.14. Präparation von Replikon-Zelllysaten

Die Replikon-Zelllysate wurden aus Huh9-13 Zellen von Stefan Klinker wie in (Pfannkuche, Buther et al. 2011) beschrieben hergestellt.

Lysis-Puffer: 1% Triton-X100, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 136 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 20 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM Na3VO4, 4 mM Benzamidin, 0,2 mM Pefabloc, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 0,2% SDS, 10% Glycerin.

# 2.5. Protein-Protein-Interaktionsmessungen

# 2.5.1. Pulldown-Assays

# Ubiquitinagarose (BostonBiochem) und UBA

 $3x 50 \mu$ l Ubiquitin-Agarose wurden mit je 10 SV (Säulenvolumina) Puffer equilibiriert. Die equilibrierte Agarose wurde mit 50 µg UBAwt, UBAV196K oder UBAL224K für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Agarose in 3 Waschschritten mit je 2x SV gewaschen, wobei der Durchfluß durch Schwerkraft erfolgte. Um die an die Agarose gebundenen Proteine zu solubilisieren wurde die Ubiquitinagarose in 100 µl 1x Lämmli für 5 min bei 95 °C erwärmt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE analysiert (Kap. 2.4.1).

Puffer: 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT

# GST-β-Catenin und UBAwt

Die GSH-Sepharose (50 μl) mit gebundenem GST-β-Catenin bzw. GST-Protein (Kontrolle) wurde mit 10 SV Puffer equilibriert und für 1 h bei RT mit dem UBAwt Protein (100 μg) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit 10 SV Puffer gewaschen, wobei der Durchfluss durch Schwerkraft erfolgte, und mit Lämmli-Puffer für 5 min bei 95°C erwärmt.

Puffer: 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT

# Rekombinantes GST-c-Src∆SH1 und NS5A aus Replikon-Zelllysat

50 µl GSH-Sepharose mit gebundenem GST-c-Src $\Delta$ SH1-Protein (200 µg) bzw. GST (100 µg) wurden mit Replikon-Zelllysat (300 µg) für 1 h inkubiert. Nach Waschen mit 8x SV Puffer (Zentrifugation für 1 min bei 1000 xg, Überstand mit der Pipette abgenommen), wurde die Sepharose im Lämmli-Puffer aufgekocht.

Puffer: 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1mM DTT, 1% Triton-X100

# Rekombinantes NS5B und NS5A aus Replikon-Zelllysat

#### Materialien und Methoden

50 µl NHS-Sepharose (Kopplung nach dem Protokoll Pierce Co-IP Kit, ThermoScientific) mit dem gekoppelten rekombinanten NS5B $\Delta$ (1b)-Protein (100 µg) bzw. NHS-Sepharose als Kontrolle wurden für 1 h bei RT mit dem HCV-Replikon-Zelllysat (200 µg Gesamtprotein) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose in 4 Schritten mit insgesamt 8 SV Puffer gewaschen (Zentrifugation für 1 min bei 1000 *xg*, Überstand mit der Pipette abgenommen) und im Lämmli-Puffer aufgekocht.

Puffer: 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1mM DTT, 1% Triton-X100

# NS5B und cSrc-SH3

Verschiedene NS5BΔ21-Genotypen wurden via His-Tag an die Ni-NTA-Sepharose gebunden. Danach wurden die Separose mit 100 µg SH3-Domäne für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit 10x SV Puffer gewaschen (Durchfluss erfolgte durch Schwerkraft). Die gebundenen Proteine wurden mit 2x SV Elutionspuffer eluiert.

Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% Glycerin, 1% Triton

Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% Glycerin, 1% Triton, 250 mM Imidazol

#### **Rekombinantes NS5B und rekombinantes NS5A**

50 µl NHS-Sepharose mit dem gekoppelten rekombinanten NS5B(1b)-Protein (100 µg) bzw. NHS-Sepharose als Kontrolle wurden für 1 h bei RT mit pNS5A(FL) (ca. 100µg) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit 8 SV Puffer gewaschen (Zentrifugation für 1 min bei 1000 xg, Überstand mit der Pipette abgenommen) und im Lämmli-Puffer aufgekocht.

Puffer: PBS pH 7,4, 0,25% DPC

# cSrc∆SH1 und pTyr-NS5A

Je 50 μl NHS-Sepharose mit gekoppeltem GST-SrcΔSH1 (200 μg) bzw. GST-Protein (100 μg) als Kontrolle wurde über Nacht bei 4 °C mit dem pNS5A(FL) (100 μg) Protein inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit 8 SV Puffer gewaschen (Zentrifugation für 1 min bei 1000 xg, Überstand mit der Pipette abgenommen) und im Lämmli-Puffer aufgekocht.

Puffer: PBS pH 7,4, 0,25% DPC

#### cSrc∆SH1 und Proteingemisch aus pTyr-NS5A und NS5B

100 µl NHS-Sepharose wurden mit dem cSrc $\Delta$ SH1 Protein (200 µg) gekoppelt. Anschließend wurde die cSrc $\Delta$ SH1 Sepharose und freie NHS Sepharose mit dem präinkubiertem pTyr-NS5A und NS5B-Gemisch (200 µg je Protein) für 1 h bei RT inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit je 2x SV (Zentrifugation für 1 min bei 1000 *xg*, Überstand mit der Pipette abgenommen) wurde die Sepharose in zwei Ansätze aufgeteilt. Je ein Ansatz von cSrc $\Delta$ SH1- und Kontroll-Sepharose wurde mit 2x SV Elutionspuffer eluiert (Pierce Co-IP Kit), die beiden anderen Ansätze wurden mit Lämmli-Puffer für 5 min bei 95 °C erwärmt.

Puffer: PBS pH 7,4, 0,25% DPC, 1% Triton-X100

#### 2.5.2. **SPR**

Zur Charakterisierung der Protein-Protein Interaktion wurde die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) angewendet. Das System BiacoreT200 ist ein optischer Analysator welcher auf dem Prinzip der SPR arbeitet. Das Gerät detektiert Änderungen des Brechungsindex an einer Edelmetall-Puffer-Grenzfläche und ermöglicht darüber eine Analyse von Molekülwechselwirkungen in Echtzeit.

Gold ist als dünner Film auf ein Prisma aufgebracht. Dieser Film wird durch das Prisma mit polarisiertem Licht bestrahlt. Durch die Bestrahlung werden Oberflächenplasmonen angeregt. Die Messung des Intensitätsspektrums vom total reflektieren Licht ist winkelabhängig. Oberflächenplasmonen werden durch die kollektive, longitudinale Anregung von Leitungselektronengasen in Halbleitern und Metallen generiert. Sie sind das Produkt einer Menge von Leitungselektronen welche gegenüber Ionenrümpfen oszillieren. Diese Oberflächenplasmonen dispergieren in strahlungslosen, elektromagnetischen Oberflächenmoden. Dabei ist deren wichtigste Messeigenschaft, dass ihre Dispersion stark vom Brechungsindex des senkrecht zur Goldoberfläche angrenzenden Mediums abhängt.

52

An die Goldoberfläche schließt sich die Matrix und das Umgebungsmedium mit dem ausgewählten Analyten an. Bei einer Bindung von Analyten an die Membran ändert sich der Brechungsindex des Umgebungsmediums.

Für die Messungen wurden CM5-Chips (Biacore) verwendet. Die erhaltenen Daten wurden zweifach referenziert.

Die Injektionen des Analyten wurden im *single cycle* Verfahren durchgeführt. Im Unterschied zum klassischen *multi cycle* Verfahren wird dabei das Analyt in steigenden Konzentrationen ohne Regeneration der Chip-Oberfläche injiziert. Der Vorteil der *single cycle* Methode liegt somit in fehlender Regeneration der Oberfläche, da die Suche nach passenden Regenerationsbedingungen unter Umständen zeitaufwendig sein kann.

Die UBAs Injektionen wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min und einer Injektionsdauer von 90 s ausgeführt.

Laufpuffer: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA

#### 2.5.3. β-Catenin Kopplung

Im Rahmen der Messung wurde β-Catenin an der Oberfläche eines CM5-Chips immobilisiert. Die Immobilisierung lief unter folgenden Bedingungen ab:

Laufpuffer: PBS pH 7,4

Aktivierung der Chip-Oberfläche: NHS/EDC, 5 µl/min, 10 min

β-Catenin-Immobilisierung: 30 μM β-catenin (10 mM HEPES, 0,25 mM TCEP, pH 7.3) 5 μl/min, 10 min

Deaktivierung der Chip-Oberfläche: 1 M Ethanolamin-Hydrochlorid pH 8,5, 5 µl/min, 7 min

#### 2.5.4. Gleichgewichts-Auswertung (steady state)

Für eine Gleichgewichtsreaktion A+B↔AB ist die Dissoziationkonstante als

 $K_D$ =[A][B]/[AB] definiert. Der  $K_D$ -Wert ist ein Maß für die Stabilität einer Bindung. Bei SPR handelt es sich um ein Durchfluss-System, deswegen kann angenommen werden, dass [A] konstant bleibt. [B] ist dann die Anzahl der freien Bindestellen auf dem Chip im Gleichgewicht. [AB] ist die gebundene Menge des Analyten im Gleichgewicht. Im Falle einer 1:1 Bindung entspricht sie der Anzahl der belegten Bindungsstellen auf dem Chip.

Wenn [AB] im Gleichgewicht gegen [A] aufgetragen wird, bekommt man eine Sättigungskurve, aus der sich die Gesamtzahl der Bindungsstellen und der  $K_{D}$ -Wert bestimmen lassen.

# 2.5.5. **ITC**

Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine quantitative Methode zur Messung der Protein-Protein Interaktionen. Zu den Vorteilen der Methode zählt unteranderem die fehlende Immobilisierung und Markierung der Bindungspartner. Somit wird eine maximale Annäherung der Messkonditionen an die intrazelluläre Bedingungen erreicht. Zu den Nachteilen der Methode zählen Einschränkungen bezüglich des K<sub>D</sub>-Wertes der messbaren Interaktionen. So können mit der ITC nur die Bindungen mittlerer Affinität (1 nM<K<sub>D</sub><100 µM) untersucht werden. Zudem zeichnet sich die Methode durch einen hohen Proteinverbrauch aus.

Während des Experiments werden genau bekannte Mengen des Analyten zum Liganden in der Messzelle titriert, was zu einer Wärmeänderung in der Zelle führt, da die Energie bei der Bindung freigesetzt oder verbraucht wird. Durch einen Rückkopplungsmechanismus wird die Temperatur der Mess- und der Reaktionszelle gleich gehalten. Die Energie die hierzu zugeführt werden muss wird vermessen. Bei der Auswertung wird die vermessene Energie/ pro Mol Analyt gegen das Verhältnis der Reaktionspartner aufgetragen. Daraus können die Enthalpie-Änderung, die Stöchiometrie und der K<sub>D</sub>-Wert ermittelt werden.

Eine entgaste Ligand-Lösung wurde in die Messzelle vorgelegt (ca. 250 µl), die Referenzzelle wurde mit Wasser gefühlt. 40 µl Bindungsprotein wurden anschließend in 25 Injektionen je 1,5 µl zum Ligand titriert. Die Drehgeschwindigkeit der Spritze betrug 1000 rpm (Rotationen pro Minute).

Im Weiteren wurden die erhaltenen Rohdaten mittels ITC200 Evaluierungs-Software Origin7SR4 v.7.0552 (B552) von GE Healthcare ausgewertet.

54

# 2.5.6. **MST**

MST (*microscale thermophoresis*) ist eine quantitative Methode zur Messung von Protein-Protein-Interaktionen. Eins der Bindungspartner wird dabei mit einem Fluorophor markiert und in konstanter Konzentration vorgelegt. Der zweite Bindungspartner wird in verschiedenen Konzentrationen vorgelegt. Die Messkapillaren werden mit dem Proteingemisch befüllt und im Gerät durch einen Laserstrahl erwärmt, dabei wird die Wanderung der fluoreszierenden Moleküle beim Aufwärmen und Abkühlen der Kapillaren registriert. Da die freien Protein-Moleküle sich in ihrem Wanderungsverhalten von den Proteinkomplexen unterscheiden, können dadurch Rückschlüsse auf die Protein-Protein-Interaktionen gezogen werden.

Für die Messung der UBAwt<sub>c</sub>-Alexa 488-Ubiquitin-Interaktion wurden hydrophile Kapillaren verwendet. Die markierte UBA-Domäne wurde in einer Konzentration von 100 nM vorgelegt, wobei diverse Ubiquitin-Konzentrationen in Form einer 1:2 Verdünnungsreihe ausgehend von 1,18 mM eingesetzt wurden.

Puffer: PBS pH 7,4

# 2.5.7. Protein-Markierung

Zum Markieren mit Alexa 488 Fluorophor wurde folgender Ansatz über Nacht bei RT inkubiert: Alexa 488 333  $\mu$ M, UBAwt<sub>c</sub> 33  $\mu$ M in 300  $\mu$ I PBS pH 7,4, 1 mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine).

Anschließend wurde das markierte Protein vom restlichen Alexa 488 Fluorophor mittels SEC mit einer SD75 Säule (60 ml) getrennt.

# 2.6. Immunoblotting

# 2.6.1. Verwendete Antikörper

#### Tab. 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-NS5A-AK, ab13833	Abcam, Cambridge, UK

Anti-NS5B-AK (Primärantikörper), ab35586	Abcam, Cambridge, UK	
Penta His-AK, 34660	Qiagen, Hilden	
Anti-pTyr-AK, 05-321	Millipore, Darmstadt	
Pierce Goat anti mouse (Peroxidase- konjugierter Sekundärantikörper), 31430	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	
Pierce Goat anti rabbit (Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper), 31460	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	

Tab. 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper.

#### 2.6.2. Verwendete Puffer

Kathodenpuffer: 25 mM Tris/HCl, 40 mM Glycin pH 9,4

Anodenpuffer 1: 0,3 M Tris/HCl pH 10,4

Anodenpuffer 2: 25 mM Tris/HCl pH 10,4

TBS: 24,7 mM Tris, 2,7 mM KCl, 136 mM NaCl pH 7,4

TBST: TBS + 0,1 % Tween

#### 2.6.3. Proteintransfer

Proteine aus SDS-PAGE Gelen wurden im Semi-dry Verfahren auf eine PVDF-Membran mit Porengröße 0,45 µm (Roth) mit dem Trans-Blot Turbo System (GE Healthcare) transferiert.

Anodenpuffer 1 und 2 wurden vor dem Gebrauch mit je 10% Methanol versetzt.

Aufbau des Blots:

- Drei Lagen Whatman-Papier angefeuchtet mit Anodenpuffer 1
- Drei Lagen Whatman-Papier angefeuchtet mit Anodepuffer 2
- In Methanol aktivierte PVDF-Membran
- SDS-PAGE Gel

- Drei Lagen Whatman-Papier angefeuchtet mit Kathodenpuffer Bloten: 1 h, 0,3 A und 10 V.

# 2.6.4. Proteindetektion

Nach dem Bloten wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen und anschließend für 1 h in TBST+5% Milchpulver geblockt. Danach wurde die Membran für 2 bei RT in TBST+Primärantikörper (1:1.000) inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschritten in TBST wurde die Membran für 2 h in TBST+ Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper (1:10.000) inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut 3x 5 min in TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgte an der ChemiDoc MP unter Verwendung von Super Signal West dura und Super Signal West pico Detektionskits (Thermo Fisher Scientific).

# 3.1. *In vitro* Rekonstruktion des EDD E3 Ligase (UBA-Domäne)β-Catenin-Komplexes

# 3.1.1. Expressionsvektoren für EDD E3 UBAs, $\beta$ -Catenin und $\beta$ -Cateninbindende Domäne von Axin

Im Rahmen des EDD-Projekts wurden folgende Proteine oder Proteindomänen heterolog exprimiert und gereinigt:  $\beta$ -Catenin, die EDD E3 UBA-Domänen (AS 142-247) UBAwt, UBAV196K, UBAL224K und die  $\beta$ -Catenin-bindende Domäne von Axin (AS 435-541).

Die β-Catenin und UBA Konstrukte wurden uns freundlicherweise von unserer Kooperationspartnerin Rina Rosin-Arbesfeld (University Tel Aviv) zur Verfügung gestellt. Die Protein-kodierenden Sequenzen waren im Expressionsvektor pGEX-6P-2 N-terminal an die Sequenz des GST-Proteins (Glutathion-S-Transferase) fusioniert.

Das synthetische Gen für das Axin-Konstrukt wurde im Laufe dieser Arbeit als Kontrolle für das präparierte  $\beta$ -Catenin entworfen und von der Firma *GenArt Life technologies* in einem Standardvektor geliefert. Anschließend wurde die Axin-Gensequenz in den pGEX-6P-2 Vektor umkloniert. So konnte die  $\beta$ -Catenin-bindende Domäne des Axins als GST-Axin(435-541) Fusionsprotein exprimiert und gereinigt werden (Kap. 2.4.9).

Alle Proteine wurden in *E. coli* BL21T1 exprimiert. Die Reinigung erfolgte nach dem GE Healthcare Protokoll für GST-getaggte Proteine (Kap. 2.4.9).

Zusätzlich wurde Ubiquitin, zur Funktionalitätskontrolle der präparierten UBAs als Pulver von Sigma (München) bezogen.

# 3.1.2. Reinigung des β-Catenins

Das β-Catenin wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert (Kap. 2.4.3) und mittels Affinitätschromatographie gereinigt (Kap. 2.4.5 und 2.4.9). Anschließend wurde der GST-Tag mit Hilfe von PreScission Protease abgespalten (Kap. 2.4.7). Die

Proteinausbeute wurde absorptionsspektroskopisch bestimmt (Kap. 2.4.13) und betrug ca. 2 mg/1I LB, bei einer Reinheit von ca. 95% (Abb.12).



#### Abb. 12: Reinheit von β-Catenin

Es wurden etwa 15 μg des gereinigten β-Catenins mittels SDS-PAGE Gel (15%) getrennt und mit Coomassie gefärbt (Vgl. Kap. 2.4.9 und 2.4.2)

M: Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)

#### 3.1.3. Reinigung der β-Catenin bindenden Domäne von Axin(435-541)



#### Abb. 13: Reinheit des Axins (435-541)

Es wurden etwa 2 µg des gereinigten Axins (435-541) mittels SDS-PAGE Gel (15%) getrennt und mit Coomassie gefärbt (Vgl. Kap. 2.4.9)

M: Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)

Die β-Catenin-bindende Domäne von Axin(435-541) wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert und mittels GSH-Affinitätschromatographie gereinigt (Kap. 2.4.3, 2.4.5 und 2.4.9). Anschließend wurde der GST-Tag mit Hilfe von PreScission Protease abgespalten (Kap. 2.4.7). Die Proteinausbeute wurde absorptionsspektroskopisch bestimmt (Kap. 2.4.13) und betrug ca. 1 mg/1 I LB, bei einer Reinheit von ca. 80% (Abb.13).

# 3.1.4. Funktionalität des gereinigten β-Catenins

Um die Funktionsfähigkeit des gereinigten  $\beta$ -Catenins zu überprüfen wurde dessen Bindefähigkeit für die  $\beta$ -Catenin bindende Domäne von Axin untersucht.



# Abb. 14: Sensogramm der Bindung von Axin (435-541) an das $\beta$ -Catenin (zweifach referenziert)

β-Catenin wurde an die Oberfläche eines CM5 Chips Amin-gekoppelt.

Dargestellt ist ein Sensogramm in Response Einheiten (RU, responce units), welches durch die Injektion von 5 µM Axin (435-541) in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA ausgelöst wurde. Die Injektionszeit betrug 90 s bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min.

Zu diesem Zweck wurde das  $\beta$ -Catenin kovalent an die Oberfläche eines CM5 Chips Amin-gekoppelt (Basislinie von 4100 RU) (Kap. 2.5.3) und die Bindung von Axin (435-541) an diesen Chip mittels SPR vermessen (Kap. 2.5.2). Bei einem RU-Wert von 4100 als Basislinie (nach Kopplung) beträgt der ausgerechnete R<sub>max</sub>-Wert für Axin 550 RU. Durch die Injektion von 5  $\mu$ M Axin konnte die Maximalantwort von 500 RU erreicht werden.

Wie man u.a. aus der sehr steilen Assoziationsphase des Sensogramms aus der Abb. 14 entnehmen kann, zeigte Axin eine hohe Affinität zum  $\beta$ -Catenin. Das Sensogramm belegt: i) dass funktionelles  $\beta$ -Catenin erhalten wurde und ii) dass die verwendete Amin-Kopplung die Funktionalität des Proteins nicht beeinträchtigt.

Zudem war die Bindung von Axin (435-541) an β-Catenin so stark, dass deren Dissoziation, also ein Absinken des RU-Wertes im Beobachtungszeitfenster von ca. 1 h auf das Ausgangsniveau, nicht erreicht werden konnte. Weder wiederholtes Waschen mit Laufpuffer, noch harscheres Waschen mit diversen Zusätzen (siehe unten) führten zu einer Beschleunigung der Dissoziation. Folgende Regenerations-Schritte wurden dabei getestet:

- Injektionen von 50%, 75% und 100% Ethylenglykol
- Injektionen von 1 M und 2 M MgCl<sub>2</sub>
- Injektionen von 10 mM Glycin, pH 3,0, 2,5 und 1,5
- Injektion von 0,002% SDS

Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der Experimente die Kontrollen der β-Catenin Funktionsfähigkeit jeweils erst nach den Versuchsreihen zur Messung der UBA-β-Catenin-Interaktion durchgeführt.

#### 3.1.5. UBA-Domäne der EDD E3 Ligase

Bei UBA handelt es sich um die UBA-Domäne der EDD E3 Ligase (Kap. 1.3.3). Die Bindung zwischen dieser UBA-Domäne und Ubiquitin wurde bereits von Kozlov et al. untersucht. Folgende UBA-Reste wurden dabei als die für die Interaktion mit Ubiquitin verantwortlichen identifiziert: V196, L224, N221, S225, V216 und N217. In Mutationsstudien konnte zudem gezeigt werden, dass die UBA-Mutanten V196K und L224K trotz ihrer korrekten Faltung das Ubiquitin nicht mehr binden konnten (Kozlov, Nguyen et al. 2007).

Diese beiden Mutanten wurden auch für die ersten Zellkultur-Pulldowns zur Untersuchung der der UBA- $\beta$ -Catenin-Interaktion eingesetzt (Kap. 1.3.4). Im Falle der UBAV196K-Mutante konnte keine Bindung zwischen UBA und  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden. Hingegen zeigte die UBAL224K-Mutante eine im Vergleich zu UBAwt stärkere Bindung an das  $\beta$ -Catenin (Hay-Koren 2012).

Aus diesem Grund wurden neben der UBAwt Domäne auch die UBA-Mutanten V196K und L224K rekombinant exprimiert und gereinigt (Abb. 15 und Kap. 2.4.9), um diese anschließend für die *in vitro* Untersuchungen der UBA-β-Catenin-

Interaktion im Rahmen dieses Projekts verwenden zu können. Die Proteinausbeute betrug ca. 1 mg/1 I LB, bei einer Reinheit von über 95%.



Abb. 15: Reinheit von UBAwt, UBAV196K und UBAL224K, SDS-PAGE Gel (15%)

Es wurden etwa je 5 µg der gereinigten UBA-Domänen mittels SDS-PAGE (15%) getrennt und mit Coomassie gefärtbt.

M: Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas), Angabe in kDa.

#### 3.1.6. Funktionalität der gereinigten UBA-Domänen

Um die Funktionalität der gereinigten UBAs (UBAwt, UBAV196K und UBAL224K) zu untersuchen wurde ihre Bindung an Ubiquitin mittels Pulldown-Assay (Kap. 2.5.1) und ITC (Kap. 2.5.5) untersucht.

Im Pulldown wurde die Ubiquitin-Agarose (Ubiquitin hier kovalent gekoppelt) in drei Ansätzen mit der entsprechenden UBA-Variante für 30 min inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die an die Ubiquitin Agarose gebundenen Moleküle durch Aufkochen im Lämmli-Puffer solubilisiert.



# Abb. 16: Pulldown-Assay zur Untersuchung der Interaktion zwischen UBAwt, UBAV196K, UBAL224K und Ubiquitin, SDS-PAGE (15%)

Ubiquitin Agarose (BostonBiochem) wurde mit den UBA-Domänen inkubiert. Der Vergleich der Wasch- und Output-Fraktionen zeigt einen deutlichen Unterschied im Bindungsverhalten des UBAwt Proteins und der Ubiquitin-bindungsdefizienten Mutanten UBAV196K und UBAL224K

M: Unstained Protein Molecular Weight Marker, FT: Durchfluss, W: Waschfraktionen

In der Abbildung 16 ist das Ergebnis der Pulldown-Assays der einzelnen UBA-Proteine dargestellt. Man sieht einen deutlichen Unterschied im Bindungsverhalten von UBAwt und der UBA-Mutanten. Beide Mutanten wurden vornehmlich in den Durchfluss- sowie den Waschfraktionen detektiert, dagegen konnte zumindest ein Teil von UBAwt erst im Eluat erhalten werden. Um die UBA-Ubiquitin-Interaktion quantitativ zu untersuchen wurde zusätzlich die Methode der ITC angewandt (2.5.5).



# Abb. 17: ITC-Titration von Ubiquitin zum UBAwt-Protein

Ubiquitin (900  $\mu$ M) wurde zum UBAwt Protein (101  $\mu$ M) titriert.

Puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 8,0 Temperatur: 30 °C

Oben: Rohdaten, unten: differenzieller Auftrag der Messdaten (MicroCal ITC200 Evaluierungs-Software)

Die Auswertung der Messergebnisse mit der MicroCal ITC200 Software ergab einen KD-Wert von 56 µM.

Mittels ITC konnte die Affinität von UBAwt zu Ubiquitin gemessen werden (Abb. 17). Der so bestimmte  $K_D$ -Wert von 56  $\mu$ M bei einer 1:1 Stöchiometrie der Bindungspartner stimmt mit dem bereits publizierten Wert von 60  $\mu$ M gut überein (Kozlov, Nguyen et al. 2007).

Somit konnte eine Bindung der in dieser Arbeit präparierten UBAwt-Domäne zu Ubiquitin mit zwei unabhängigen Methoden nachgewiesen werden. Auch das Bindungsverhalten der beiden präparierten UBA-Mutanten stimmt mit den bereits publizierten Daten überein (Kozlov, Nguyen et al. 2007).

Um zusätzlich sicher zu stellen, dass die beiden UBA-Mutanten nativ gefaltet sind, wurden von allen drei UBAs 500  $\mu$ M Proben in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH7,4, 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O für die 1D-NMR Spektroskopie hergestellt.

In der Abbildung 18 sind die von Philipp Neudecker aufgenommenen 1D-<sup>1</sup>H-NMR Spektren der drei UBA-Proteine aufgeführt.



Abb. 18: 1D-<sup>1</sup>H-NMR Spektren von UBA-Proteinen (12,4 kDa)

500  $\mu$ M Protein in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH7,4, 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O. Die Spektren entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Neudecker.

Man sieht, dass alle drei Spektren einander ähneln. Die Dispersion der Signale von 0,5 bis 9 ppm belegte, dass alle drei verwendeten UBAs strukturiert sind, da die Signale unstrukturierter Proteine (*random coil*) eine geringere Dispersion aufweisen würden.

Zudem deutet die Anhäufung der Signale um ca. 8,3 ppm auf ein überwiegend helikales Protein (Wishart and Sykes 1994). Das stimmt mit der publizierten UBA-Struktur überein (Kozlov, Nguyen et al. 2007).

Insgesamt belegen die gezeigten Ergebnisse der Pulldown-Assays, ITC und 1D-<sup>1</sup>H-NMR Experimente die native Faltung und Funktionalität der gereinigten UBA-Proteine, so dass diese, wie auch das präparierte β-Catenin im Folgenden für Bindungsstudien der UBAs an β-Catenin eingesetzt werden konnten.

#### 3.1.7. Pulldown-Assays mit UBAwt und β-Catenin

Die Proteininteraktionen können mit einer Reihe verschiedener Methoden untersucht werden, von denen jede ihre Vor- bzw. Nachteile hat.

In der Abbildung 19 sind die Ergebnisse des  $\beta$ -Catenin-UBAwt-Pulldown-Assays dargestellt. Die GSH-Sepharose wurde bei dem Versuch als Trägermaterial eingesetzt. Das GST- $\beta$ -Catenin wurde über den GST-Tag an die Sepharose gebunden. Um eine unspezifische möglicherweise auftretende unspezifische Wechselwirkung von UBAwt an den GST-Fusionspartner sichtbar zu machen, wurde die GSH-Sepharose mit gebundenem GST-Protein als Kontrolle eingesetzt (Kap. 2.5.1).

Die eingesetzten Sepharosen stammen aus der Reinigungs-Prozedur für β-Catenin (Kap. 2.4.9). GST-β-Catenin-Sepharose ist demnach die GSH-Sepharose mit gebundenen Bestandteilen des Zell-Lysates, was den Anteil an GST-Abbruch erklärt. Die GST-Sepharose ist dabei die Sepharose nach der *on-column* PreScission-Spaltung des Fusionsproteins.



# Abb.19:Pulldown-AssayzurUntersuchungderβ-Catenin-UBAwt-Interaktion, SDS-PAGEGel (15%)

Die GSH-Sepharose (50 μl) mit gebundenem GST-β-Catenin bzw. GST (Kontrolle) wurde für 1 h mit dem UBAwt Protein (100 μg) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit 10 SV Puffer gewaschen und mit Lämmli-Puffer 5 min bei 95°C erwärmt.

M: Unstained Protein Molecular Weight Marker, Input: UBAwt-Protein, Output: aufgekochte Sepharose nach dem Waschen.

Wie man der Abbildung 19 entnehmen kann, ließ sich kein Unterschied im Elutionsverhalten von UBAwt detektieren, egal ob GST- $\beta$ -Catenin gekoppelte oder GST gekoppelte Sepharose angeboten wurde. Das Fehlen einer UBAwt-Bande in beiden Output-Fraktionen deutet somit darauf hin, dass die Bindung von UBAwt und  $\beta$ -Catenin zu schwach war, um die Waschprozedur zu überstehen.

# 3.1.8. SPR-Analyse der UBAs-β-Catenin-Interaktion

Im Folgenden wurde die Interaktion von UBAs mit β-Catenin mittels SPR einer hoch sensitiven, quantitativen Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht.

Zu diesem Zweck wurde das  $\beta$ -Catenin-Protein, wie schon bei den Axin (435-54)-Kontrollmessungen (Kap. 3.1.4) irreversiebel an die Oberfläche eines CM5 Chips Amin-gekoppelt (Kap. 2.5.3). Das jeweilige UBA-Protein wurde in einem *single cycle* Verfahren injiziert (Kap. 2.5.2).

Die Abbildung 20 zeigt ein repräsentatives Sensogramm der UBAwt-Bindung an das  $\beta$ -Catenin. Fünf verschiedene UBAwt-Protein Konzentrationen wurden mit der *single cycle* Methode injiziert. Die *steady state* Auswertung (Kap 2.5.4) der zweifach referenzierten Daten ergab eine Gerade als Bindungskurve. Im Falle einer spezifischen Interaktion von Proteinen hat die Bindungskurve die Form einer Sättigungskurve. Bei dem vorliegenden Ergebnis weist die Bindungskurve keinen Sättigungseffekt auf. Daraus folgt, dass bei diesem Experiment keine spezifische Interaktion zwischen UBAwt und  $\beta$ -Catenin detektiert werden konnte.



#### Abb. 20: SPR-Analyse der UBAwt-β-Catenin-Interaktion

**Oben: Sensogramm der Bindung von UBAwt an das β-Catenin (zweifach referenziert).** Das β-Catenin ist an die Oberfläche eines CM5-Chips gebunden. Die fünf UBAwt-Injektionen erfolgen in einem *single cycle* Verfahren. Die jeweiligen Konzentrationen des UBAwt-Proteins sind: 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M und 80  $\mu$ M.

**Unten:** Gleichgewichts-Auswertung (steady state). Die ermittelte Bindungskurve ist eine Gerade. Eine spezifische Bindung von UBAwt an das  $\beta$ -Catenin wurde nicht detektiert.





#### Abb. 21: SPR-Analyse der UBAL224K-β-Catenin-Interaktion

**Oben: Sensogramm der Bindung von UBAL224K an das β-Catenin (zweifach referenziert).** Das β-Catenin ist an die Oberfläche eines CM5-Chips gebunden. Die fünf UBAL224K-Injektionen erfolgen in einem *single cycle* Verfahren. Die jeweiligen Konzentrationen des UBAL224K-Proteins sind: 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM und 80 μM.

**Unten:** Gleichgewichts-Auswertung (steady state). Die ermittelte Bindungskurve ist eine Gerade. Eine spezifische Bindung von UBAL224K an das  $\beta$ -Catenin wurde nicht detektiert.

Wie schon für UBAwt gezeigt, weist auch die Bindungskurve des rekombinanten Proteins UBAL224K keinen Sättigungseffekt auf (Abb. 21). Daraus folgt, dass

ebenfalls keine spezifische Interaktion zwischen UBAL224K und  $\beta$ -Catenin detektiert werden konnte.



#### Abb. 22: SPR-Analyse der UBAV196K-β-Catenin-Interaktion

**Oben:** Sensogramm der Bindung von UBAV196K an das β-Catenin (zweifach referenziert). Das β-Catenin ist an die Oberfläche eines CM5-Chips gebunden. Die fünf UBAV196K-Injektionen erfolgen in einem *single cycle* Verfahren. Die jeweiligen Konzentrationen des UBAV196K-Proteins sind: 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M und 80  $\mu$ M.

**Unten: Gleichgewichts-Auswertung (steady state).** Die ermittelte Bindungskurve ist eine Gerade. Eine spezifische Bindung von UBAV196K an das  $\beta$ -Catenin wurde nicht detektiert.

Abschließend wurde die Interaktion von UBAL224K mit  $\beta$ -Catenin untersucht. Aus Vorversuchen war bekannt, dass beide Proteine, wenn in Zellkultursystem exprimiert, nicht miteinander interagieren sollten. Somit stellte diese Kombination eine gute Möglichkeit dar, zu überprüfen, ob die in den Abbildungen 20 und 21 dargestellten Ergebnisse tatsächlich ausschließlich unspezifischen Bindungsereignissen zugeschrieben werden können. Abb. 22 zeigt das Ergebnis des zugehörigen SPR-Experiments. Auch in diesem Fall konnte keine spezifische Interaktion zwischen UBAL224K und  $\beta$ -Catenin detektiert werden (Abb. 22, unten).

Nach den Untersuchungen der UBA- $\beta$ -Catenin-Interaktionen wurde eine Axin(435-541)-Injektion (5  $\mu$ M) durchgeführt, um die Funktionalität der  $\beta$ -Catenin-Schicht zu kontrollieren. Die Kontrolle ergab, dass das am CM5-Chip gekoppelte  $\beta$ -Catenin in der Lage war Axin(435-541) zu binden (Ergebnisse nicht gezeigt).





Blau: UBAwt, rot: UBAV196K, grün: UBAL224K

Wie die Zusammenstellung der Sensogramme in der Abb. 23 zeigt, ist der Verlauf der einzelnen Sensogramme (UBAwt: Farbe blau, UBAV96K: Farbe rot, UBAL224K: Farbe grün) nahezu identisch. Das belegt den ausschließlich unspezifischen Charakter der aufgenommenen Signale aller drei Messungen unter den gewählten Bedingungen. Eine Änderung vom Brechungsidex aufgrund des in der Injektionslösung vorhandenen Proteins könnte dabei z.B. die erhaltenen

Kurvenverläufe erklären.

#### 3.1.9. ITC-Analyse der UBAs-β-Catenin-Interaktion

Um auszuschließen, dass die für die SPR-Messung notwendige Immobilisierung des  $\beta$ -Catenins via Aminkopplung dessen putative UBA-Bindung negativ beeinflusste, wurde eine weitere Messmethode verwendet, die den Einsatz beider Interaktionspartner in Lösung erlaubte. Zu diesem Zweck wurden ITC-Titrationen durchgeführt (Kap. 2.5.5). Da die Löslichkeit der UBA-Proteine (bis ca .500  $\mu$ M) höher als die des  $\beta$ -Catenins (ca. 50  $\mu$ M) ist, wurde das  $\beta$ -Catenin-Protein als Ligand in der Messzelle eingesetzt. Die jeweilige UBA-Variante wurde als Bindungsprotein zu dem  $\beta$ -Catenin dazu titriert.

In der Abbildung 24 sind Messergebnisse einer repräsentativen UBAwt zu  $\beta$ -Catenin Titration aufgeführt. Im Falle einer Bindung der eingesetzten Reaktanten würde die aus den Rohdaten ermittelte Bindungskurve einen sigmoidalen Verlauf auf. Im dargestellten Plot (Abb. 24, unten) schwanken die Punkte jedoch um die Null-Linie. Somit konnte eine UBAwt- $\beta$ -Catenin-Bindung unter den getesteten Bedingungen nicht detektiert werden.


### Abb.24:ITC-TitrationvonUBAwt zum β-Catenin

UBAwt (718  $\mu$ M) wurde zum  $\beta$ -Catenin (34  $\mu$ M) titriert.

Puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 8,0 Temperatur: 30 °C

Oben: Rohdaten, unten: differenzieller Plot der Messdaten (ITC200 Evaluierungs-Software)

Bei einer ITC-Messung wird die Enthalpie ( $\Delta$ H), die pro Mol Bindungspartner freigesetzte Wärme, bestimmt (Kap. 2.5.5). Das  $\Delta$ H ist Temperatur-abhängig ( $\Delta$ H= $\Delta$ G+T $\Delta$ S). Somit muss die Bindung bei verschiedenen Temperaturen untersucht werden, um auszuschließen, dass der gemessene  $\Delta$ H-Wert von 0 nicht durch eine ungünstige Temperatureinstellung des Systems zu Stande gekommen ist.

Aus diesem Grund wurde die UBAwt- $\beta$ -Catenin-Interaktion wiederholt untersucht. Im Unterschied zum ersten Versuchsaufbau, wurde die Temperatur des Systems auf 25 °C festgelegt. Auch in diesem Fall wurde keine Interaktion zwischen UBAwt und  $\beta$ -Catenin detektiert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Untersuchungen der  $\beta$ -Catenin-Interaktionen mit UBAV196K und UBAL224K kamen zum gleichen Ergebnis. Mittels ITC konnte unter den getesteten Bedingungen keine Bindung der UBA-Mutanten an das  $\beta$ -Catenin detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

#### 3.1.10. MST-Analyse der UBAwt-Ubiquitin-Interaktion

Frühere, vorläufige Ergebnisse von Peixiang Ma, die unter Verwendung von GST-UBA(180-230) und GST- $\beta$ -Catenin und der MST-Technik erhalten wurden ließen eine spezifische Bindung von GST-UBAwt an das GST- $\beta$ -Catenin vermuten. In dieser Arbeit sollte das gleiche Experiment unter Verwendung von Proteinen ohne einen GST-Tag durchgeführt werden. Diese Änderung an den Konstrukten war notwendig, um zweifelsfrei ausschließen zu können, dass das in früheren Experimenten beobachtete Bindungsverhalten zwischen GST-UBAwt und GST- $\beta$ -Catenin durch eine tatsächliche Interaktion von UBAwt und  $\beta$ -Catenin und nicht möglicherweise durch Eigenschaften des GST-Tags hervorgerufen worden war, da bekannt ist, dass GST Homodimere bilden kann (Kaplan, Husler et al. 1997).

Für die MST-Experimente muss einer der Bindungspartner mit einem Fluorophor markiert werden. Um den Alexa 488 Fluorophor an das UBA-Protein binden zu können, wurde zunächst der C-terminale Rest, Asparaginsäure, zu einem Cystein mutiert. Somit war eine orientierte Markierung von UBA via Alexa 488 möglich, da keine weiteren Cysteine in der UBA-Proteinsequenz vorhanden waren (Kap. 2.5.6).

Das resultierende, sogenannte UBAwt<sub>C</sub>-Protein wurde, wie die anderen UBA-Konstrukte exprimiert und gereinigt (Ausbeute: ca. 1 mg/1 I LB) und daraufhin mit Alexa 488 markiert, wobei die Markierungsrate ca. 50% betrug (2.5.7).

Um die Funktionsfähigkeit des markierten Proteins zu prüfen, wurde zunächst die Interaktion des UBAwt<sub>C</sub>-Alexa 488 Proteins mit Ubiquitin untersucht. Diese Wechselwirkung konnte bereits für das nichtmodifizierte Protein mittels Pulldown-Assay und ITC im Rahmen dieses Projekts gezeigt werden (Abb. 15 und 16).

In der Abbildung 25 sind die Ergebnisse einer MST-Messung der UBAwt<sub>c</sub>-Ubiquitin-Interaktion zusammengefasst. Bei einer MST-Messung wird ein Bindungsereignis durch die Änderung des Wanderungsverhaltes der Fluoreszenzmarkieren Moleküle in einem Temperaturgradienten und die dadurch hervorgerufene Änderung des Fluoreszenz-Levels angezeigt. Allerdings korrelierte im Falle der in dieser Arbeit präparierten UBAwt<sub>c</sub>-Alexa 488 die Höhe der Fluoreszenz-Signale nicht mit der Änderung der Ubiquitin-Konzentration.





#### Abb. 25: MST-Messung der UBAwt<sub>c</sub>-Ubiquitin-Interaktion

Hydrophile Kapillaren enthielten je 100 nM UBAwt<sub>c</sub> Protein. Eine 1:2 Verdünnungsreihe der Ubiquitin-Lösung (höchste Konzentration 1,18 mM) wurde bei der Messung eingesetzt.

Die eingesetzten Ubiquitin-Konzentrationen in nM und die Positionen einzelner Kapillare in mm sind in der Tabelle zusammengefasst.

Puffer: PBS pH 7,4

Somit konnte bei dieser MST-Messung keine Bindung zwischen UBAwt<sub>c</sub>-Alexa 488 und Ubiquitin detektiert werden. Dies widerspricht den bereits gezeigten Interaktionsstudien mit dem nichtmodifiziertem WT Protein (Kap. 3.1.6). Die Änderung im Bindungsverhalten des UBA-Proteins könnte durch die Mutation  $(D\rightarrow C)$  oder durch die Markierung des Proteins mit Alexa 488 hervorgerufen worden sein.

Da die Kontrollmessung mit Ubiquitin und UBAwt<sub>c</sub>-Alexa 488 Unzulänglichkeiten im System aufdeckte, erschienen weitere Interaktionsstudien zur Untersuchung von UBA-β-Catenin-Wechselwirkung mit diesem System als wenig aussichtsreich und wurden daher nicht weiter verfolgt.

#### 3.2. *In vitro* Rekonstruktion des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes

#### 3.2.1. Expressionskonstrukte für c-Src, NS5A und NS5B

Im Rahmen des hier vorgestellten HCV-Projekts wurden c-Src, NS5B und NS5A Proteine oder Domänen dieser Proteine exprimiert und gereinigt.

Der verwendete pGEX-6PX-SH3(c-Src) Vektor wurde bereits beschrieben (Tran, Hoffmann et al. 2005). Der pET41c-NS5A(FL) Expressionsvektor wurde von Peixiang Ma hergestellt. Die pGEX-6PX-SrcΔSH1 (Pfannkuche, Buther et al. 2011) und pET11c-NS5Bcon1Δ21 Konstrukte wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe J. Bode (HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pDEST14-NS5BΔ21(1b) und pDEST14-NS5BΔ21(2a) kamen aus dem Labor A. Mas (Clemente-Casares, Lopez-Jimenez et al. 2011).

#### 3.2.2. c-Src-Konstrukte

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene c-Src-Konstrukte benutzt. Die SH3-Domäne für die Untersuchungen der c-Src-NS5B-Interaktion und c-ScrΔSH1, welche neben der Src-unique-Domäne das SH3-SH2-Domänenpaar umfasst, für die Untersuchungen der c-Src-NS5A- und c-Scr-NS5A-NS5B-Wechselwirkungen.

Die c-Src-Konstrukte wurden in BL21DE3T1 exprimiert und mittels Affinitätschromatographie via GST-Tag gereinigt.

Um zu überprüfen, ob die präparierte c-Src-SH3-Domäne funktionsfähig ist, wurde deren Interaktion mit einem PxxP-Peptid, der Sequenz HSKRPLPPLPSH, dessen c-Src-SH3-Bindung in unserem Institut schon mittels SPR untersucht wurde (A. Aladag, nicht publiziert) analysiert.



#### Abb. 26: ITC-Titration des PxxP-Peptides zum c-SrcSH3-Protein

PxxP-Peptid (0,55 mM) wurde zum c-SrcSH3 Protein (100  $\mu$ M) titriert.

Oben: Rohdaten, unten: differenzieller Auftrag der Messdaten (MicroCal ITC200 Evaluierungs-Software)

Der mit der Evaluierungs-Software bestimmte  $K_D$ -Wert der Interaktion beträgt 7  $\mu$ M.

Puffer: PBS pH7,4, Temperatur: 30 °C

Peptid-Sequenz: HSKRPLPPLPSH

Zu diesem Zweck wurde eine ITC-Titration durchgeführt, deren Ergebnis in der Abbildung 26 dargestellt ist. Der ermittelte K<sub>D</sub>-Wert der Bindung beträgt 7  $\mu$ M. Dieser Wert stimmt gut mit dem bereits mittels SPR ermittelten K<sub>D</sub>-Wert von 2  $\mu$ M aus früheren Arbeiten überein und belegt die Funktionsfähigkeit der während dieser Arbeit präparierten c-Src-SH3-Domäne.

Zur Kontrolle des präparieren c-SrcΔSH1 wurde seine Interaktion mit dem NS5A-Protein aus Replikon-Zelllysat untersucht. Wie die Abb. 27 zeigt war das von Stefan Klinker gereinigte GST-c-SrcΔSH1 Protein in der Lage das NS5A-Protein aus dem Replikon-Zelllysat zu binden.



### Abb. 27: Pulldown-Assay zur Untersuchung der Interaktion zwischen dem rekombinanten GST-c-Src∆SH1 und dem zellulären NS5A-Protein, Western-Blot mit anti-NS5A-AK

Die GSH-Sepharose mit gebundenem rekombinanten GST-c-Src∆SH1-Protein bzw. GST als Kontrolle wurden für 1 h bei RT mit dem HCV-Replikon-Zelllysat inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit 8 SV Puffer gewaschen und im Lämmli-Puffer aufgekocht.

Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), Input: Replikon-Zelllysat, Output 1: im Lämmli-Puffer aufgekochte GST-Sepharose, Output 2: im Lämmli-Puffer aufgekochte GST-c-Src∆SH1-Sepharose

#### 3.2.3. **NS5B**

Bei den NS5B-Konstrukten handelt es sich um NS5B-Proteine, bei welchen die Cterminale Transmembrandomäne deletiert worden war (NS5BΔ21).

In der Abbildung 28 ist beispielhaft die Expression und Aufreinigung des NS5B $\Delta$ 21(1b) Proteins dokumentiert. Die Aufreinigung der Proteine NS5B $\Delta$ 21(2a) und NS5B $\Delta$ (con1) erfolgte auf gleiche Weise (nicht gezeigt).



# Abb.28:ExpressionundAufreinigungdesNS5BΔ21(1b)-Proteins, SDS-PAGE (15%)

M: Unstained Protein Molecular Weight Marker, - IPTG: vor der IPTG-Induktion, + IPTG: 4 h nach der IPTG-Induktion, Pellet: unlösliche Bestandteile des Zell-Lysates, Überstand: lösliche Bestandtteile des Zell-Lysates , DF: Durchfluss, W1-W3: Waschfraktionen, Elution 1-3: Elutionsfraktionen

Auf diese Weise konnten ungefähr 5 mg NS5B aus 1 I LB gereinigt werden.

Um die Funktionsfähigkeit des rekombinanten NS5BΔ21-Proteins zu prüfen, wurde mittels Pulldown-Assay untersucht, ob das hier präparierte, rekombinante NS5B-Protein, seinen bekannten physiologischen Interaktionspartner, das NS5A-Protein (Shirota, Luo et al. 2002), in diesem Fall gewonnen aus einem HCV-Replikon-Zelllysat binden kann. Das Replikon-Zelllysat wurde mir freundlicher Weise von der AG J. Bode (HHU Düsseldorf) und Stefan Klinker zur Verfügung gestellt.

Das in der Abbildung 29 gezeigte Pulldown-Assay belegt die Funktionsfähigkeit des rekombinanten NS5B-Proteins. Es ist in der Lage das zelluläre NS5A-Protein aus dem Zelllysat zu binden.



### Abb. 29: Pulldown-Assay zur Untersuchung der Interaktion zwischen dem rekombinanten NS5B- und dem zellulärem NS5A-Protein, Western-Blot mit anti-NS5A-AK

Die NHS-Sepharose mit dem gekoppelten rekombinanten NS5BΔ(1b)-Protein bzw. NHS-Sepharose als Kontrolle wurden für 1 h bei RT mit dem HCV-Replikon-Zelllysat inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit 8 SV Puffer gewaschen und im Lämmli-Puffer aufgekocht.

M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), Input: Replikon-Zelllysat, DF: Durchfluss, W1-4: Waschfraktionen, Output: im Lämmli-Puffer aufgekochte Sepharose

#### 3.2.4. Untersuchungen zum binären c-Src-SH3-NS5B-Komplex

Entsprechend dem aufgestellten Modell interagiert das NS5B-Protein aus dem Zelllysat im heterotrimeren Kompex c-Src-NS5A-NS5B direkt mit der SH3-Domäne von c-Src. In der vorangegangenen Studien wurden zwei Regionen identifiziert, die PxxP-Motive beinhalten und damit an der Bindung von c-Src-SH3 an NS5B, nimmt man eine kanonische SH3-PxxP-nteraktion an, beteiligt sein könnten (Pfannkuche, Buther et al. 2011). Die dazugehörigen PxxP-Peptide M1(341-360) TEAMTRYSAPPGDPPKPEYD und M2(384-400) YLTRDPTTPLARAAWET wurden uns freundlicherweise von der AG J. Bode zur Verfügung gestellt.

Die c-Src-SH3-Interaktion mit M1 und M2 wurde mittels ITC untersucht. Die Ergebnisse der Messung und ihre Auswertung sind in der Abb. 30 zusammengefasst. Die im Plot dargestellte Kurve (Abb. 30, unten) zeigt keine Sättigung, allerdings konnten, wegen der begrenzt vorhandenen Peptidmenge, keine höheren Peptidkonzentrationen verwendet werden.





M1 (0,690 mM) wurde zu c-SrcSH3 (100  $\mu\text{M})$  titriert.

Oben: Rohdaten, unten: differenzieller Auftrag der Messdaten (MicroCal ITC200 Evaluierungs-Software)

Der mit der Evaluierungs-Software bestimmte  $K_{D}$ -Wert der Interaktion beträgt 90  $\mu$ M.

Puffer: PBS pH7,4, Temperatur: 30 °C

M1(341-360): TEAMTRYSAPPGDPPKPEYD

Die Auswertung der Rohdaten (Abb. 30, unten) ergab einen  $K_D$ -Wert von ca. 90  $\mu$ M. Der erhaltene Wert kann jedoch nicht als unzweifelhaft übernommen werden. Die im Plot gezeigte Kurve weist keinen sigmoidalen Verlauf auf, sie zeigt lediglich eine leichte Krümmung. Deswegen ist der erhaltene Wert nur als grober Richtwert und nicht als eine exakte Bestimmung zu bewerten.

Auch die c-SrcSH3-M2-Interaktion wurde mittels ITC untersucht. Die Ergebnisse und die Auswertung der Titration sind in der Abbildung 31 zusammengefasst. Die Auswertung dieser Messreihe ergab einen groben Richtwert von über 700 µM.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die kalkulierten Dissoziationskonstanten am Rande bzw. außerhalb des Messbereiches der verwendeten Methode lagen (vgl. Kap. 2.5.5). Unter Berücksichtigung dieser Einschränkung kann für M1 und c-Src-SH3 eine Dissoziationskonstante im Bereich um die 100 µM abgeschätzt werden. Für M2 kann von einer noch deutlich geringeren Affinität ausgegangen werden. Somit stellen die isolierten M1 und M2 Regionen aus NS5B keine hochaffinen Bindungsstellen für c-Src-SH3 dar.





M2 (0,560 mM) wurde zum c-SrcSH3 Protein (100  $\mu$ M) titriert.

Oben: Rohdaten, unten: differenzieller Auftrag der Messdaten (MicroCal ITC200 Evaluierungs-Software)

Der mit der Evaluierungs-Software bestimmte  $K_D$ -Wert der Interaktion beträgt über 700  $\mu$ M.

Puffer: PBS pH7,4, Temperatur: 30 °C M2(384-400) YLTRDPTTPLARAAWET

In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass die Affinität des Gesamtproteins und der dazugehörigen isolierten Peptide stark variieren können. So liegt der K<sub>D</sub>-Wert der Hck-SH3-Nef-Bindung bei 0,25  $\mu$ M, wohingegen die Hck-SH3-Nef<sub>PxxP</sub>-Bindung einen K<sub>D</sub> von nur 91  $\mu$ M aufweist (Lee, Leung et al. 1995).

Da ein ähnlicher Effekt auch im Falle der c-Src-SH3-NS5B<sub>PxxP</sub>-Bindung möglich wäre, wurde im Weiteren die Interaktion von c-Src-SH3 mit dem NS5BΔ21-Protein untersucht. Diese binäre Interaktion wurde mit Pulldown-Assays und ITC unter Verwendung der in dieser Arbeit präparierten rekombinanten Proteine analysiert.



Abb. 32: Pull-downs zur Untersuchung der NS5B-SH3-Interaktion.

M: Unstained Protein Molecular Weight Marker, 1: NS5B gebunden an die Ni-NTA-Sepharose, 2: Input SH3, 3: Durchfluss nach Inkubation, 4: Elution

Mit den in der Abbildung 32 dargestellten Pulldowns konnte unter den verwendeten Bedingungen (Kap. 2.5.1) keine NS5B-SH3-Interaktion zwischen rekombinantem NS5B und c-Src-SH3 Proteinen nachgewiesen werden. Die SH3-Domäne wurde von keinem der untersuchten NS5B-Proteine, welche immobilisiert an Ni-NTA vorlagen, zurückgehalten. Demnach fand sich in keinem der Fälle cin Elutionsfraktion, Src-SH3 der sondern ausschließlich in den Durchflussfraktionen. Darüber hinaus wurden diese Pulldown-Assays in veränderter Form wiederholt. Die Proteine GST-c-Src-SH3 und GST(Kontrolle) wurden an die GSH-Sepharose gebunden. Anschließend wurden die so modifizierten Sepharosen jeweils mit einer NS5B-Proteinlösung inkubiert. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass alle drei getesteten NS5B-Proteine dazu tendieren unter den gewählten Bedingungen an der Sepharose zu präzipitieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Übereinstimmend konnte auch mittels ITC unter den verwendeten Bedingungen keine Interaktion der beiden rekombinanten Proteine nachgewiesen werden (Abb. 33).



### Abb. 33: ITC-Titration von c-SrcSH3 zum NS5B(1b)-Protein

c-SrcSH3 (2,8 mM) wurde zum NS5B $\Delta$ 21(1b)-Protein (117  $\mu$ M) titriert.

Puffer: 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM ß-ME, 1% Triton (vgl. (Pfannkuche, Buther et al. 2011)

Temperatur: 30 °C

Oben: Rohdaten, unten: differenzieller Auftrag der Messdaten (MicroCal ITC200 Evaluierungs-Software)

Der Versuch wurde bei einer Temperatur von 25 °C wiederholt. Auch ein anderes Verhältnis des Liganden zu dem Bindungsprotein wurde getestet (c-Src-SH3 (1,4 mM)/ NS5B (117 µM)). Trotzt dieser Änderungen im Versuchsaufbau, war es nicht möglich eine Bindung des rekombinanten c-SrcSH3-Proteins ans NS5B(1b)-Protein zu detektieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Ebenfalls konnte weder für rekombinantes NS5B(2a) noch für rekombinantes NS5B(con1) eine Interaktion mit c-Src-SH3 mittels ITC nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

#### 3.2.5. **NS5A**

In früheren Studien erwies sich die Aufreinigung von rekombinantem NS5A-Volllängen-Protein als schwierig, da der N-terminale Membrananker, in diesem Fall eine amphipatische Helix, die Löslichkeit des Volllängen-Proteins reduzierte. So wurde bislang unter anderem mit solchen Konstrukten wie  $\Delta$ 32NS5A (Love, Brodsky et al. 2009) bzw.  $\Delta$ 24NS5A (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004) gearbeitet.

Im Rahmen dieses Projekts wurde ausgehend vom pET41c-NS5A(FL) Vektor ein pET15b-strep(II)-Δ24NS5A-His Konstrukt kloniert, mit dem Ziel die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen. Durch zwei Tags (C- und N-terminal) sollte zudem eine einfache Reinigung des Volllängen-Expressionsprodukts mittels zweifacher Affinitätschromatographie ermöglicht werden. Zwischen dem Strep(II)-Tag und dem NS5A-Protein wurde eine TEV-Schnittstelle eingebaut, um die anschließende Trennung des Tags vom gereinigten Protein zu ermöglichen. Wie Abb. 34 zeigt, konnte dieses NS5A-Konstrukt erfolgreich in *E. coli* BL21DE3 exprimiert werden.

Im Folgenden erwies sich, trotz der Deletion der amphipatischen Helix, das strep(II)- $\Delta$ 24NS5A-His als schwerlöslich. Eine Reihe von Detergenzien wie z.B. CHAPS (*3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*), DDM (*n-Dodecyl β-D-maltoside*), LDAO (*Lauryldimethylamine-Oxid*), Brij, NP-40 (Nonidet P-40) und Triton-X100 wurde getestet. Sie konnten jedoch keine nennenswerten Mengen des Proteins in die Lösung bringen. Da die D1-Domäne des NS5A-Proteins strukturiert ist, sollten während der Reinigung am besten keine denaturierenden Chemikalien wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid verwendet werden.



Strep(II)-∆24NS5A-His

# Abb. 34: Expression von strep(II)- $\Delta$ 24NS5A-His in *E. coli* BL21DE3, SDS-PAGE (12%)

M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), 0 min: vor der IPTG-Induktion, 30 min: 30 min nach der IPTG-Induktion, 2 h: 2 h nach der IPTG-Induktion

MW strep(II)-Δ24NS5A-His 48,64 kDa

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Deletions-Mutante wurde im weiteren Verlauf des Projekts doch das Volllängen NS5A eingesetzt.

#### 3.2.6. Produktion von pTyr-NS5A

Nach der aufgestellten Hypothese interagiert NS5A im heterotrimeren Kompex c-Src-NS5A-NS5B direkt mit der SH2-Domäne von c-Src (Pfannkuche, Buther et al. 2011). Da bekannt ist, dass SH2-Domänen phosphorylierte Tyrosine in ihren Liganden erkennen (Huang, Li et al. 2008), musste das NS5A-Protein, geht man von einer kanonischen SH2-Bindung aus, posttranslational modifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurde das NS5A(FL)-Protein in *E. coli* TKB1 Zellen, in welchen eine Proteintyrosinkinase (Elk) nach erfolgter Expression des Wunschproteins koexprimiert wird, als phospho-Tyrosin (pTyr) NS5A(FL) exprimiert.

In der Abb. 35 ist die Expression von pTyr-NS5A(FL) in TKB1 Zellen dargestellt. Beim Vergleich der 0 min- und 2 h- Proben sieht man die Überexpression eines Proteins mit einem Molekulargewicht (MW) um 55 kDa, welches gut mit dem erwarteten MW von 50,6 kDa für unmodifiziertes NS5A übereinstimmte.



#### Abb. 35: Expression von NS5A(FL) in *E. coli* TKB1, SDS-PAGE (12%)

M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), 0 min: vor der IPTG-Induktion, 2 h: 2 h nach der IPTG-Induktion, 4 h: 2 h nach der IAA-Induktion bzw. 4 h nach der IPTG-Induktion

MW NS5A(FL) 50,6 kDa

Immunoblots mit penta His-AK sowie anti-pTyr-AK, wie in der Abb. 36 dargestellt ergaben, dass es sich bei der überexprimierten Bande um ein Tyrosinphosphoryliertes, His-getaggtes Protein und dami mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine pTyr-Variante bzw. ein Gemisch aus verschiedenen pTyr-Versionen von NS5A(FL) handelte. Vergleichte man die Signale in Western Blots, so sah man, dass das His-getaggte NS5A(FL)-Protein wie erwartet erst nach der IPTG-Induktion produziert wurde. Nach der IAA-Induktion der Elk-Kinase im Minimalmedium blieb das NS5A-Level konstant (Abb. 36, links). Hingegen erfolgte ein deutlicher Anstieg des pTyr-Signals erst nach der IAA-Induktion der Elk-Kinase (Abb. 36, rechts). Somit belegen diese Immunoblots, dass das NS5A-Protein zu einem großen Anteil posttranslational modifiziert wurde.



## Abb. 36: NS5A(FL) Überexpression in *E. coli* TKB1, Western Blot mit pentaHis-AK und pTyr-AK

M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), 0 min: vor der IPTG-Induktion, 2 h: 2 h nach der IPTG-Induktion, 4 h: 2 h nach der IAA-Induktion bzw. 4 h nach der IPTG-Induktion

#### MW NS5A(FL) 50,6 kDa

**Links: Western Blot mit pentaHis-AK.** Das NS5A(FL)-Protein wird nach der IPTG-Induktion produziert. Nach der IAA-Induktion der Elk-Kinase bleibt das NS5A-Level konstant.

**Rechts: Western Blot mit pTyr-AK.** Die Tyrosin-Phosphorylierung kann bereits in der 2 h Probe nachgewiesen werden. Nach der IAA-Induktion der Elk-Kinase nimmt das Phosphorylierungs-Level des NS5A-Proteins deutlich zu.

Die Reinigung des pTyr-NS5A(FL)-Proteins für weitere Pulldown-Assays erfolgte über die Ni-NTA Affinitätschromatographie unter Verwendung von Sarkosyl- und DPC-haltigen Puffern (Kap. 2.4.10 und Abb. 37).



### Abb. 37: Ni-NTA Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von pTyr-NS5A(FL)

M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), DF: Durchfluss, W1-W3: Waschfraktionen und Elutionsfraktion.

#### 3.2.7. Massenspektroskopische (MS) Charakterisierung von pTyr-NS5A

In der Aminosäuresequenz des NS5A-Proteins sind insgesamt zehn Tyrosine vorhanden. Somit galt es zu klären, ob jedes dieser Tyrosine im gleichen Ausmaß von Elk-Kinase als Substrat erkannt wurde. Zu diesem Zweck wurde eine Analyse der posttranslationalen Modifikationen, einer entsprechend gereinigten pTyr-NS5A(FL)-Probe (Kap. 2.4.10) am MLP (Molekular Proteomics Laboratory) am BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die von Anja Stefanski durchgeführte Auswertung der Analyse ergab, dass acht der zehn Tyrosine in phosphorylierter Form in der abgegebenen pTyr-NS5A(FL)-Probe vorlagen (Abb. 38).

Im Detail konnte für sechs der insgesamt sieben Tyrosine der D1-Domäne Phosphorylierung gezeigt werden. Es handelte sich um die Tyrosine in folgenden Positionen: 93, 106, 118, 129, 161 und 182. Wobei Y93 und Y129 einen niedrigeren Phosphorylierungsgrad aufweisen, nur etwa 10% der Tyrosine in diesen Positionen trugen eine Phosphorylierung. Im Vergleich dazu waren die restliche Tyrosine Y106, Y118, Y161 und Y182 zu einem Level von etwa 50% phosphoryliert. Das Y43 enthaltende Peptid wurde bei der MS-Analyse nicht gefunden, somit kann sein Phosphorylierungsstatus nicht beurteilt werden.

Von den drei Tyrosinen der D2-D3-Region sind zwei Tyrosine in phosphorylierter Form gefunden worden: Y321 und Y334, wobei das Tyrosin 344 in der LCSII lokalisiert ist (vgl. Abbildung 38).

Das in dieser Studie verwendete NS5A-Konstrukt hat noch ein artifizielles Tyrosin in der Position 451, das in der TEV-Schnittstelle zwischen dem NS5A und dem Cterminalen His-Tag vorhanden ist. Das dazugehörige Peptid wurde bei der MS-Analyse nicht gefunden, somit können keine Angaben zu seinem Phosphorylierungsstatus gemacht werden. Wenn man das Entstehen eines putativen artifiziellen Phosphotyrosins vermeiden möchte, sollte man in zukünftigen Bindungsstudien ein angepasstes NS5A-Konstrukt ohne zusätzliches Tyrosin einsetzen.



#### Abb. 38: pTyr-NS5A, schematische Darstellung

Tyrosine sind als Dreiecke dargestellt. Phosphorylierungsraten sind farbkodiert. Die zweite LCS-Reigon ist vergrößert dargestellt. Abbildung modifiziert nach (Aladag 2012).

Rot: 50%, orange: 10%, blau: 0%, grau: keine Angabe.

#### 3.2.8. Untersuchungen zum binären pTyr-NS5A-NS5B-Komplex

Um die Funktionsfähigkeit des in dieser Arbeit präparierten, rekombinanten pTyr-NS5A(FL)-Proteins zu prüfen, wurde mittels Pulldown-Assay untersucht, ob dieses pTyr-NS5A-Protein seinen bekannten physiologischen Interaktionspartner, das NS5B-Protein (Shirota, Luo et al. 2002), das in diesem Fall auch rekombinant produziert wurde, binden kann.

Im Unterschied zum bereits gezeigten Assay (Abb. 29) wurden bei diesem Versuch beide Interaktionspartner rekombinant in *E. coli* exprimiert und im Rahmen dieses Projekts gereinigt.

Der in Abbildung 39 dargestellte Immunoblot mit anti-NS5A-AK belegt die Bindung zwischen pTyr-NS5A und NS5B.

Unter den verwendeten Bedingungen (Kap. 2.5.1) konnte das an der NHS-Sepharose immobilisierte NS5B(1b)-Protein das rekombinante pTyr-NS5A zurückhalten. Man sieht einen deutlichen Bindungsunterschied bei der NS5Bgekoppelten und der freien NHS-Sepharose. Im Falle der freien NHS-Sepharose wurde das NS5A-Protein vornehmlich in den Durchfluss- sowie Waschfraktionen detektiert. Im Falle der mit NS5B gekoppelten NHS-Sepharose wurde das NS5A-Protein erst im Eluat vorgefunden (Abb. 39)



### Abb. 39: Pulldown-Assay zur Untersuchung der Interaktion zwischen NS5B und pNS5A, Western Blot mit anti-NS5A-AK

Die NHS-Sepharose mit dem gekoppelten rekombinanten NS5B-Protein bzw. NHS-Sepharose als Kontrolle wurden 1 h lang mit dem pNS5A(FL)-Protein inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit 8 SV Puffer gewaschen und im Lämmli-Puffer aufgekocht.

M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), Input: pNS5A(FL)-Protein, DF: Durchfluss, W1-4: Waschfraktionen, Output: Im Lämmli-Puffer aufgekochte Sepharose

Allerdings kann aus diesen Ergebnissen nicht geschlossen werden, ob und zu welchem Maße die hier detektierte pTyr-NS5A-NS5B-Bindung von den Tyrosin-Phosphorylierungen des eingesetzten NS5A-Proteins beeinflusst wurde. Um diese Frage aufzuklären bedarf es weiterer Untersuchungen.

#### 3.2.9. Untersuchungen zum binären Komplex c-SrcΔSH1-pTyr-NS5A

Nimmt man eine kanonische SH2-Bindung für NS5B an, und geht man gleichzeitig davon aus, dass durch die Koexpression der Elk-Kinase der für die Erkennung durch c-Src-SH2 notwendige NS5A-Tyrosinrest zumindest teilweise phosphoryliert wurde (also nicht Y43 oder Y413), sollte zumindest ein Teil der eingesetzten pTyr-NS5A Probe an die c-SrcΔSH1, welche die SH2-Domäne beinhaltet, binden. Um dies zu überprüfen, wurde ein Pulldown-Experiment mit an GSH-Sepharose immobilisiertem GST-c-SrcΔSH1-Protein sowie GST als Kontrolle und einer pTyr-NS5A-Probe (Kap. 2.5.1) durchgeführt. In der Abbildung 40 sieht man, dass bei Einsatz der GST-c-SrcΔSH1-Sepharose ein Großteil der pTyr-NS5A-Probe erst in der Elutionsfraktion aufzufinden war. Allerdings ergab sich das gleiche Bild, wenn eine nur mit GST-gekoppelte Sepharose verwendet wurde. Dieser Befund deutet auf eine unspezifische Bindung von NS5A an das GST hin.



## Abb. 40: Pull-down zur Untersuchung der c-Src∆SH1-pNS5A(FL)-Interaktion, Western Blot mit penta His-AK

Die NHS-Sepharose mit gekoppeltem GST-Src∆SH1 bzw. GST als Kontrolle wurde über Nacht bei 4 °C mit dem pNS5A(FL)-Protein inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit 8 SV Puffer gewaschen und im Lämmli-Puffer aufgekocht.

M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), Input: pNS5A(FL)-Protein, DF: Durchfluss, W1-2: Waschfraktionen, Output: Im Lämmli-Puffer aufgekochte Sepharose

#### 3.2.10. Untersuchung zum ternären c-Src-NS5A-NS5B-Komplex

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Interaktion zwischen den rekombinanten Proteinen c-SrcSH3 und NS5B detektiert werden. Dies könnte möglicherweise auf die Abwesenheit des NS5A-Proteins in den bisherigen binären Bindungsassays

zurückzuführen sein. Es wäre denkbar, dass das NS5A-Protein beim Binden an das c-Src-SH2 bzw. das NS5B-Protein konformationelle Änderungen verursachen könnte, die die c-Src-SH3-NS5B-Bindung begünstigen würden.

Auf dieser Annahme basierend wurde das rekombinante pTyr-NS5A-Protein exprimiert und gereinigt. Somit waren alle drei Komponenten für die *in vitro* Assemblierung des heterotrimeren c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes vorhanden.

Die erste Untersuchung zum Nachweis der Komplex-Bildung wurde mittels Pulldown-Assay durchgeführt.

Es wurde berücksichtigt, dass das pTyr-NS5A eine unspezifische Bindung an das GST-Protein gezeigt hat (Abb. 40). Deswegen wurde beim diesem Versuch das Tag-freie c-SrcΔSH1-Protein als Basis für Komplex-Assemblierung direkt an die NHS-Sepharose gekoppelt. Die freie NHS-Sepharose wurde als Kontrolle mitgeführt, bei der entsprechend der Abb. 39 nur wenig unspezifische Bindung von pTyr-NS5A zu sehen war. Die Proteine NS5A und NS5B wurden präinkubiert und abzentrifugiert, anschließend wurde c-SrcΔSH1-gekoppelte sowie freie NHS-Sepharose mit dem NS5A-NS5B-Protein-Gemisch 1 h lang bei RT inkubiert. Um zwischen einer spezifischen und einer unspezifischen Bindung unterscheiden zu können, wurden die Sepharosen vor dem Elutionsschritt auf jeweils zwei Ansätze verteilt. Bei je einer Hälfte erfolgte die Elution durch die pH-Änderung, somit waren in den Output 1 Fraktionen die spezifisch gebundenen Proteine zu finden. Die andere Hälfte der Sepharose wurde im Lämmli-Puffer aufgekocht, um alle an ihr gebundenen Proteine zu solubilisieren. Diese Fraktion wurde als Output 2 bezeichnet.

Die Ergebnisse des Pull-downs sind in der Abbildung 41 zusammengefasst.

Vegleicht man die Durchfluss und Wasch 1 sowie Wasch 2 Fraktionen des mit anti-NS5B-detektierten Ansatzes, so vermutet man zunächst eine stärkere Bindung von NS5B an die mit c-SrcΔSH1 beladene Sepharose, da hier die Signale im Vergleich zur freien Sepharose deutlich schwächer ausfielen. Dies wäre evtl. durch die Anwesenheit vom NS5A-Protein zu erklären, da ohne NS5A keine Bindung des NS5B-Proteins an c-Src-SH3 detektiert werden konnte (Kap. 3.2.4).

Allerdings spiegelt sich dieses Bild nicht im Vergleich der beiden Output Fraktionen wider. Weder im Falle der c-SrcΔSH1-gekoppelten, noch im Falle der freien NHS-Sepharose konnte ein NS5B-Signal in den Output 1 Fraktionen detektiert werden. Hingegen wurde in den beiden Output 2 Fraktionen ein etwa gleichstarkes NS5B-Signal detektier. Dies deutet auf eine unspezifische Bindung des NS5B-Proteins hin (Abb. 41).

Mit NS5B vorinkubiertes pTyr-NS5A zeigte im Falle der c-Src $\Delta$ SH1-gekoppelten Sepharose ein ähnliches Bindungsverhalten wie mit der freien NHS-Sepharose (Abb. 41), so dass mit dieser Versuchsanordnung wiederum keine Bindung vom pTyr-NS5A(FL) an das verwendete c-Src $\Delta$ SH1 nachgewiesen werden konnte.

Vergleicht man die Output 2 Fraktionen der beiden Ansätze, so stellt man fest, dass entgegen den in der Abb. 39 dargestellten Ergebnissen, eine leichte unspezifische Bindung von pTyr-NS5A an die freie NHS zu detektieren war.

Wie in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde (Abb. 39) interagieren die rekombinanten pTyr-NS5A und NS5B Proteine miteinander. Da das NS5B-Protein bei diesem Versuch zum Teil unspezifisch an die NHS-Sepharose gebunden hat (Abb. 41, oben), wurde dort möglicherweise das an NS5B-Protein gebundene pTyr-NS5A in der Output 2 Fraktion detektiert. Der Unterschied im Bindungsverhalten des pTyr-NS5A-Proteins an die freie Sepharose wäre evtl. noch mit der geänderten Puffer-Zusammensetzung zu erklären. Das Pulldown-Assay in der Abbildung 39 wurde in PBS pH 7,4, 0,25% DPC durchgeführt. Im Unterschied dazu wurde der hier dargestellte Pulldown in PBS pH7,4, 0,25% DPC, 1% Triton-X100 durchgeführt.



#### Abb 41: Pull-down zur Untersuchung der *in vitr*o Assemblierung des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes, Western Blots mit anti-NS5B-AK und anti-NS5A-AK

M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), Input: präinkubiertes NS5A-NS5B-Protein-Gemisch, DF: Durchfluss, W1-W3: Waschfraktionen, Output 1: Elution der spezifischgebundenen Proteine durch die pH-Änderung, Output 2: Sepharose aufgekocht im Lämmli-Puffer.

Um ein klares Bild von den Interaktionen zu erhalten müsste dieser Versuch wiederholt werden. Aufgrund des begrenzten Projekt-Zeitraums war jedoch das weitere Erforschen des heterotrimeren Komplexes c-Src-NS5A-NS5B im Zuge dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Mögliche Ursachen und daraus folgende Verbesserungsoptionen für zukünftige Versuchsplanungen sind in der Diskussion (Kap. 4.2.8) erläutert.

#### 3.2.11. Klonierung von weiteren NS5A- und c-Src-Konstrukten

Im Rahmen dieses Projekts wurden folgende NS5A-Expressionsvektoren ausgehend vom pET41c-NS5A(FL) kloniert: pET15b-strep(II)-Δ24NS5A-His, pET15b-strep(II)-D2D3-His, pET15b-strep(II)-D1(25-202)-His, pET15b-strepII-D1(25-213)-His, pET41c-D1(1-202)-His, pET41c-D1(1-213)-His (vgl. Kap. 2.1.2).

Zudem wurden noch folgende c-Src-Konstrukte ausgehend vom pGEX-6P2-cSrc Plasmid hergestellt: pGEX-6P-2-cSrc-SH2 und pGEX-6P-2-cSrc-SH3SH2 (vgl. Kap 2.1.2).

Die Expression aller NS5A-Konstrukte mit Ausnahme von pET41c-D1(1-202) und pET41c-D1(1-213) wurde in *E. coli* BL21DE3 und TKB1 Zellen getestet. Wobei eine Überexpression und im Falle der TKB1-Zellen auch eine Tyrosin-Phosphorylierung des Expressionsproduktes mit Immunoblots belegt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt, strep(II)- $\Delta$ 24NS5A-His Expression in Kapitel 3.2.5).

Die klonierten c-Src-Konstrukte wurden in Form von GST-getaggten Proteinen in *E. coli* BL21 exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt, wobei eine Proteinausbeute im mg-Bereich erzielt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die hier aufgeführten Konstrukte können in nachfolgenden Studien zur Kartierung der Bindungsepitope herangezogen werden.

Im begrenzten Zeitraum dieses Projekts konnten keine weiteren Untersuchungen zu der Assemblierung des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes unter Verwendung dieser Konstrukte durchgeführt werden.

#### 4.1. *In vitro* Rekonstruktion des EDD E3 Ligase (UBA-Domäne)β-Catenin-Komplexes

Die Motivation zu diesem Projekt beruht auf den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten von A. Hay-Koren. In Zellkultur-Experimenten wurde eine Interaktion der UBA-Domäne der EDD E3 Ligase mit  $\beta$ -Catenin nachgewiesen. Dabei wurden GST-UBA und HA- $\beta$ -Catenin im TnT Retikulozyten System (Promega) und in HEK293T (engl. *human embryonic kidney*) Zellen überexprimiert und in GST-Pulldown-Assays eingesetzt (Hay-Koren, Caspi et al. 2011; Hay-Koren 2012). Diese Interaktion ist ein neuartiger Regulationsmechanismus der  $\beta$ -Catenin-Stabilität. In Folge dieser Protein-Protein-Wechselwirkung wird  $\beta$ -Catenin von der EDD E3 Ligase ubiquitinyliert, wobei die noch wenig erforschten über Lysin 29 und/ oder Lysin 11 verknüpften Polyubiquitin-Ketten mit  $\beta$ -Catenin verlinkt werden. Diese Ubiquitinylierung führt zur Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins und Hochregulation der Wnt-gesteuerten Genexpression (Hay-Koren, Caspi et al. 2011).

Um diesen neuartigen Mechanismus der Modulation des Wnt-Signalweges besser zu verstehen, war geplant die Bindung der UBA-Domänen (UBAwt, UBAV196K und UBAL224K) an das  $\beta$ -Catenin in unserem Institut strukturbiologisch zu untersuchen. Als Grundlage hierfür musste zunächst gezeigt werden, dass die hierzu in *E. coli* rekombinant exprimierten Proteine, ein ähnliches Bindeverhalten aufwiesen, wie die Bindungspartner im Zellkultursystem.

Erste vorläufige Untersuchungen dieser Interaktion mit rekombinanten Proteinen wurden in unserem Institut unter Verwendung von GST-UBA Konstrukten (wt und die Mutanten V196K, L224K) sowie GST-β-Catenin durchgeführt. Dabei deuteten die vorläufigen Ergebnisse der damaligen MST-Messung auf eine mögliche Interaktion der beiden rekombinanten noch als GST-Fusion vorliegenden Proteine hin (Peixiang Ma, persönliche Mitteilung). Im Rahmen dieser Dissertation sollten diese Experimente vertieft und optimiert werden.

Auf den Vorarbeiten aufbauend wurde die UBA-β-Catenin-Interaktion im Rahmen dieser Arbeit mit mehreren unabhängigen Methoden wie Pulldown-Assays, SPR, ITC und MST untersucht.

# 4.1.1. Heterologe Expression und Reinigung von UBAs, $\beta$ -Catenin und Axin(435-541) konnten etabliert werden

Im Rahmen dieses Projekts wurde ein Expressionsvektor zur Axin(435-541)-Produktion kloniert. Das entsprechende synthetische Gen wurden in den Expressionsvektor pGEX-6P-2 umkloniert, um die Expression des GST-Axin(435-541)-Fusionsproteins zu ermöglichen.

Mehrere Proteine bzw. Protein-Domänen wurden während dieses Projekts in *E. coli* BL21DE3 heterolog exprimiert: UBAwt, UBAV196K, UBAL224K, UBAwt<sub>c</sub>,  $\beta$ -Catenin und die  $\beta$ -Catenin-bindende Domäne von Axin(435-541). Sie wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Bei der Reinigung dieser Proteine konnten Proteinausbeuten im mg-Bereich erzielt werden, so dass alle Ausgangsmoleküle in ausreichenden Mengen für die geplanten Messungen zur Verfügung gestellt werden konnten (Abb.12-14).

#### 4.1.2. Konzipierte Funktionalitäts-Assays wurden erfolgreich angewendet

Um die Funktionsfähigkeit der rekombinanten Proteine zu testen, wurden mehrere Kontroll-Interaktionsstudien durchgeführt, wobei bekannte Liganden zum Einsatz kamen. So wurde die Interaktion der UBAwt, UBAV196K und UBAL224K Domänen mit Ubiquitin (Kozlov, Nguyen et al. 2007) mittels Pulldown-Assay und ITC untersucht. Zu der  $\beta$ -Catenin-Axin-Wechselwirkung (Xing, Clements et al. 2003) wurden eine SPR-Studie durchgeführt. Die Interaktion des UBAwt<sub>c</sub>-Proteins mit Ubiquitin wurde mittels MST untersucht. Hinweise zur Faltung der UBA-Domänen (wt und Mutanten) lieferten zudem 1D-NMR-Spektren der Proteine (Kap. 3.1.6, Abb.18).

Mit Ausnahme von UBAwt<sub>c</sub> zeigten alle der in dieser Arbeit präparierten, rekombinanten Proteine in den Funktionalitäts-Assays die erwarteten Interaktionen mit ihren bereits bekannten Interaktionspartnern. Somit konnte die Funktionalität von UBAwt, UBAV196K, UBAL224K, Axin(435-541) und  $\beta$ -Catenin belegt werden. Ebenso wurde die Faltung der UBA-Domänen mittels 1D-<sup>1</sup>H-NMR kontrolliert. Die

Funktionalität der UBAwt<sub>c</sub>-Mutante, die mit Alexa 448 Fluorophor markiert wurde, konnte mittels MST nicht bestätigt werden.

Infolgedessen kann festgehalten werden, dass die in dieser Arbeit präparierten UBAs (wt, V196K, L224K), Axin(435-541) und β-Catenin, soweit wie mit den verwendeten Kontroll-Liganden überprüfbar, in funktioneller Form gereinigt werden konnten. Zudem sind im Rahmen des Projekts Kontroll-Assays zur Überprüfung der Funktionalität dieser Proteine ausgearbeitet worden.

# 4.1.3. Rekombinante UBAs zeigen keine Bindung an rekombinantes $\beta$ -Catenin

Die Interaktion der UBAs mit dem  $\beta$ -Catenin-Protein wurde während dieser Arbeit mit verschiedenen unabhängigen Methoden wie Pulldown, SPR, ITC untersucht.

Mittels Pulldown-Assay konnte keine Interaktion der UBAwt-Domäne mit dem  $\beta$ -Catenin-Protein nachgewiesen werden. Die Methode ist jedoch ziemlich insensitiv und qualitativ. Deswegen wurde die Interaktion zusätzlich mit hoch-sensitiven, quantitativen Methoden wie SPR und ITC untersucht. In diesen Studien konnte keine Interaktion der UBA-Domänen mit  $\beta$ -Catenin detektiert werden. Da mit drei verschiedenen, unabhängigen Methoden keine Wechselwirkung der UBA-Domänen mit  $\beta$ -Catenin demonstriert werden konnte, kann eine Bindung zwischen den rekombinant hergestellten und somit nicht-modifizierten UBAs (wt, V196K, L224K) und  $\beta$ -Catenin praktisch ausgeschlossen werden.

Dieser Befund widerspricht den Befunden der oben erwähnten Vorarbeiten zu dieser Studie. Dem könnten mehrere Uhrsachen zu Grunde liegen. Zum einen werden viele Proteine in eukaryotischen Zellen posttranslational modifiziert, um z.B. ihre Aktivität zu regulieren. Der Wnt-Signalweg ist aufgrund seiner wichtigen Bedeutung für Regulation der intrazellulären Prozesse streng reguliert. Somit unterliegen die Proteine der Wnt-Signalkaskade zahlreichen Modifikationen. So ist bekannt, dass z.B. das β-Catenin an zahlreichen Stellen phosphoryliert wird (Gao, Xiao et al. 2014). Das Fehlen dieser posttranslationalen Modifikationen könnte das Ausbleiben der Interaktion bei Studien mit rekombinanten Proteinen verursacht haben. Zum anderen könnte auch eine nicht vollständige Integrität der verwendeten rekombinanten Proteine trotz der positiven Resultate der

durchgeführten Funktionalitäts-Assays ein Grund für die fehlende Interaktion darstellen. Zwar wurden im Rahmen dieses Projekts mehrere Kontrollen zur Analyse der Funktionsfähigkeit der präparierten Proteine etabliert. Allerdings könnten die UBA- $\beta$ -Catenin-Bindungsepitope andere Proteinregionen wie die getesteten umfassen. Deshalb kann trotz positiver Ergebnisse in den Kontrollmessungen nicht ausgeschlossen werden, dass für die UBA- $\beta$ -Catenin-Wechselwirkung relevante Bereiche eine Fehlfaltung im rekombinanten Protein aufweisen. Dies könnte bedeuten, dass die an den durchgeführten Assays beteiligten Epitope zwar korrekt gefaltet und funktionsfähig sind, andere Protein-Regionen jedoch nicht in funktioneller Form vorliegen. Die Komplex-Struktur in der Abbildung 42 zeigt z.B. dass die  $\beta$ -Catenin bindende Domäne von Axin lediglich mit den N-terminal gelegenen Armadillo-Motiven 3 und 4 interagiert (Xing, Clements et al. 2003). Somit sagt die detektierte Bindung des rekombinanten Axinfragmentes an rekombinantes  $\beta$ -Catenin nichts über die Funktionalität dessen mittlerer und C-terminaler Regionen aus.



Abb. 42: Bindung der  $\beta$ -Catenin bindenden Domäne von Axin an  $\beta$ -Catenin Abbildung entnommen aus (Xing, Clements et al. 2003)

β-Catenin bindende Domäne von Axin (435-504), β-Catein (133-665)

Alle Armadillo-Motive außer Motiv 7 bestehen aus je 3 Helices, die als blau, grün und gelb gefärbte Zylinder dargestellt sind. Die Axin (435-504)-Region ist als rote Helix im Bändermodell hervogehoben.

In dieser Arbeit wurden freie Proteine eingesetzt und es konnte keine UBA-β-Catenin-Wechselwirkung detektiert werden. Dies steht auf den ersten Blick in einem Widerspruch mit den Vorversuchen von P. Ma. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Vorstudie durch den Einfluss der GST-Tags der eingesetzten Proteine beeinflusst wurde.

Basierend auf den hier dargestellten Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass den in dieser Arbeit eingesetzten rekombinanten Proteinen mindestens eine intakte Bindungsstelle fehlt. Dies könnte strukturelle Ursachen haben oder durch das Fehlen einer oder mehrerer bindungsrelevanten(r) Modifikation(en) im rekombinanten System verursacht sein.

Basierend auf den präsentierten Resultaten können jedoch einige Vorschläge für die zukünftigen Studien gemacht werden.

Zuerst könnten die Zellkulturexperimente wiederholt werden. Dabei sollte jeweils eine der Komponenten als rekombinantes Protein im Pulldown-Assay eingesetzt werden, um herauszufinden, ob beide Partner oder nur einer für die UBA-β-Catenin-Interaktion modifiziert sein müssten. Im Weiteren könnte man zur näheren Bestimmung der Modifikationen z.B. die Pulldown-Assays in Gegenwart von Phosphatasen durchführen, um ihre mögliche Abhängigkeit von Phosphorylierungen zu testen. Unter anderem wäre es denkbar die Proteine für die Interaktionsmessungen in Insektenzellen überexprimieren.

Aufgrund des begrenzten Zeitraums wurden die aufgeführten Strategien jedoch nicht mehr verfolgt.

#### 4.2. In vitro Rekonstruktion des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes

In Zellkulturexperimenten wurde das Vorliegen von c-Src, NS5A und NS5B in einem Komplex nachgewiesen Der Nachweis erfolgte mittels Pulldown-Assay, wobei die eingesetzten c-Src-Konstrukte als GST-Fusionen rekombinant in *E. coli* produziert wurden. In einem GST-Pulldown-Assay, konnte die Bindung beider viralen Proteine NS5A und NS5B an das rekombinante c-Src gezeigt werden (Pfannkuche, Buther et al. 2011).

Im Rahmen dieses Projekts sollten die Interaktionen der beteiligten Proteine in *in vitro* Studien genauer untersucht werden, um u.a. die für Bindung verantwortlichen Epitope zu lokalisieren. Auf diesen erhofften Ergebnissen basierend, sollte mittelfristig eine Suche nach inhibitorischen Liganden, die die Bindung der viralen Proteine an das humane c-Scr-Protein aufheben ohne dabei die Funktionalität der

c-Src selbst zu beeinträchtigen, durchgeführt werden. Langfristig könnten in der Zukunft neuartige Therapiestrategien auf diesen Erkenntnissen aufgebaut werden.

Die ursprüngliche Strategie zur Untersuchung des heterotrimeren Komplexes bestand in der Reduzierung des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes zu einzelnen Minimalkomplexen: c-Src-NS5B und c-Src-NS5A.

# 4.2.1. Heterologe Expression und Reinigung von c-Src-Konstrukten und NS5B wurden etabliert

Mehrere Proteine bzw. Protein-Domänen wurden während dieser Arbeit in *E. coli* heterolog exprimiert und gereinigt. Die NS5B-Konstrukte NS5BΔ21(1b), NS5BΔ21(2a) und NS5BΔ21(con1) wurden in *E. coli* BL21DE3T1 exprimiert und über Ni-NTA gereinigt, wobei Proteinausbeute von ca. 5 mg/ 1 I LB erzielt wurde (Kap. 3.2.3).

Die c-Src-Konstrukte wurden als GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 exprimiert und mittels GSH-Affinitätschromatographie gereinigt. Eine Proteinausbeute im zweistelligen mg-Bereich konnte dabei erreicht werden (vgl. Kap. 2.4.9).

Somit wurden alle benötigten Proteine in ausreichenden Mengen für die geplanten Messungen zur Verfügung gestellt.

# 4.2.2. Heterologe Expression und Reinigung des pTyr-NS5A-Proteins wurde etabliert

Das NS5A(FL)-Protein wurden in TKB1 Zellen exprimiert. Durch die Koexpression der Elk-Tyrosinkinase könnte das Protein auch in *E. coli* posttranslational modifiziert werden. Die Expression des pTyr-NS5A-Proteins wurde mit Immunoblots nachgewiesen (Abb. 36). Für nachfolgende Interaktionsstudien wurde das Protein unter Verwendung von Sarkosyl- und DPC-haltigen Puffern mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Dabei konnte eine Proteinausbeute von ca. 1 mg/1 I LB erzielt werden (Kap. 2.4.10).

#### 4.2.3. Analyse der posttranslationalen Modifikationen des pTyr-NS5A-Proteins

Für die Analyse der posttranslationalen Modifikationen des pTyr-NS5A-Proteins wurde das Protein unter Verwendung von Harnstoff-haltigem Puffer mittels Ni-NTA

Affinitätschromatographie gereinigt. Für die geplante Analyse war die native Faltung der D1-Domäne unbedeutend, deswegen wurde die Reinigungsmethode mit der höheren Proteinausbeute (ca. 2 mg/1 | LB) bevorzugt (Kap. 2.4.10).

Die Analyse der posttranslationalen Modifikationen wurde am MLP der HHU Düsseldorf durchgeführt. Die dort durchgeführte Auswertung der Daten ergab, dass acht von zehn Tyrosinen des NS5A-Proteins durch die Expression in TKB1 phosphoryliert wurden (A. Stefanski, persönliche Mitteilung).

Für die D1 wurden dementsprechend sechs von sieben Tyrosinen phosphoryliert. Folgende Tyrosine wurden bei der Analyse in Form von pTyr vorgefunden: Y93, Y106, Y118, Y129, Y161 und Y182. Wobei die Phosphorylierungsrate von Y93 und Y129 etwa 10% betrug, in anderen Positionen war die Phosphorylierungsrate etwa 50%. Das Y43 enthaltende Peptid wurde bei der MS-Analyse nicht gefunden, somit konnte keine Angabe über sein Phosphorylierungsstatus gemacht werden.

In der Abb. 43 sind die Tyrosine in der Dimer-Struktur des NS5A-Proteins (PDB: 3FQQ) markiert. Die meisten der Tyrosine Y93, Y106, Y129, Y161 und Y182 sind laut dieser Struktur zumindest teilweise Oberflächen-exponiert und können somit von der Elk erkannt werden. Die Reste Y43 bzw. Y118 zeigen allerdings eher nach Innen und sollten demnach nicht von Elk modifiziert werden. Der Y118 Rest ist in der hier analysierten Probe jedoch hoch-phosphoryliert (50%). Dies könnte damit zu erklären sein, dass das hier präparierte NS5A-Protein in Lösung nicht notwendigerweise die gleiche Struktur wie die oben gezeigte (Abb. 39) Kristallstruktur aufweist.

Es wären aber auch andere Gründe denkbar. So könnte z.B. das hier präparierte Protein inkorrekt gefaltet sein. Zudem zeigt die Abb. 36, dass die Elk-Kinase während der NS5A-Expressionsphase nicht vollständig inhibiert war, somit könnten einige der Phosphorylierungsereignisse bereits kotranslational erfolgt sein.



#### Abb. 43: Tyrosin-phosphorylierte D1-Domäne von NS5A

Struktur PDB: 3FQQ (Love, Brodsky et al. 2009)

D1(1): hellgrün. Die Tyrosine sind farblich hervorgehoben. Magenta: Tyrosine mit einer Phosphorylierungsrate von 50%, lila: Tyrosine mit einer Phosphorylierungsrate von 10%, weiß: Y43, keine Angaben zum Phosphorylierungsstatus

D1(2): dunkel grün. Die Tyrosine sind farblich hervorgehoben Rot: Tyrosine mit einer Phosphorylierungsrate von 50%, orange: Tyrosine mit einer Phosphorylierungsrate von 10%, weiß: Y43, keine Angaben zum Phosphorylierungsstatus.

Durchgezogene Pfeile: Oberflächenexponierte Tyrosine, gepunktete Pfeile: nicht-Oberflächen-exponierte Tyrosine.

Die abgebidete Darstellung ist mit PyMol enstanden. Es handelt sich um ein Bändermodell der NS5A D1-Domänen mit zusätzlicher transparenter Oberflächendarstellung. Relevante Tyrosine sind als Stäbchenmodelle abgebildet.

Über den Phosphorylierungsstatus des Tyrosins 43 (Y43) der untersuchten Probe kann keine Angabe gemacht werden. Bei der Durchführung der Analyse wurde pTyr-NS5A vor der MS-Analyse mit Trypsin (Chymotrypsin) gespalten, das die Peptide nach basischen Resten (R, K) spaltet. Y43 befindet sich zwischen zwei

Argininen, R41 und R48, somit entsteht nach der vollständigen Trypsinierung ein Peptid mit einer Länge von nur sieben Aminosäuren. Peptidfragmente dieser Größenordnung werden aber in der nachfolgenden Massenanalyse unter den gewählten Einstellungen nicht erfasst. Um den Phosphorylierungsstatus von Y43 zu klären sollte man somit den Verdau des NS5A-Proteins optimieren und z.B. andere Proteasen verwenden.

Die relativ niedrige Phosphorylierungsrate der Reste Y93 und Y129 könnte ebenso über die Abweichungen in der Struktur des vorliegenden Proteins erklärt werden. Eine andere Interpretation läge in der Elk-Spezifität, evtl. werden diese Reste aufgrund ihrer Umgebung seltener von der Kinase erkannt und phosphoryliert.

Von den drei Tyrosinen der D2-D3-Region sind nur zwei Tyrosine in phosphorylierter Form gefunden worden: Y321 und Y334, wobei das Tyrosin 324 in der LCSII lokalisiert ist (vgl. Abbildung 38). Der Y413 Rest liegt in der nicht-phosphorylierten Form vor. Da die D2 und D3 Domänen unstrukturiert sind (vgl. Abb. 7) und Y413 somit zugänglich sein sollte, ist dessen fehlende Modifikation wahrscheinlich mit der Spezifität der Elk-Kinase zu erklären.

Um die Relevanz der einzelnen Modifikationen für die c-Src-SH2-Bindung aufzuklären, müssten in der Zukunft noch weitere Studien durchgeführt werden. Man könnte z.B. das an c-Src-SH2 gebundene NS5A-Protein aus Replikonlysat auf vorhandene Phosphorylierungen untersuchen, um die in der Zelle tatsächlich vorliegenden Modifikationen zu identifizieren. Im Weiteren könnte man mittels Mutationsstudien mit anschließenden Interaktionsmessungen die Rolle der einzelnen Modifikationen genauer ausarbeiten. Ähnliche Studien wurden bereits für die Bindung der Fyn SH2-Domäne an das HCV NS5A-Protein erfolgreich durchgeführt, wobei die Y334 Phosphorylierung, als bindungsrelevante Modifikation identifiziert wurde (Nakashima, Takeuchi et al. 2012).

Somit kann mit dem in dieser Arbeit verwendeten System das HCV NS5A-Protein in *E. coli* TKB1 an acht Positionen phosphoryliert werden. Wenn man annimmt, dass die für die c-Src-SH2-Bindung verantwortliche Modifikation dabei ist, können mit der so exprimierten Proteinprobe Bindungsstudien gemacht werden. Allerdings

sollten dabei die Probeninhomogenität sowie mögliche Faltungsprobleme nicht außer Acht gelassen werden.

#### 4.2.4. Konzipierte Funktionalitäts-Assays für c-Src-Konstrukte und NS5B-Protein wurden erfolgreich angewendet

Um die Funktionalität der präparierten, rekombinanten Proteine zu prüfen, wurden Kontroll-Interaktionsstudien durchgeführt, wobei bereits bekannte Interaktionspartner verwendet wurden.

So wurde zum Funktionalitäts-Nachweis der SH3-Domäne ihre Bindung an ein PxxP-Peptid mittels ITC untersucht (Kap. 3.2.2, Abb. 26). Diese Bindung wurde bereits von A. Aladag in SPR-Messungen charakterisiert. Der von ihr bestimmte K<sub>D</sub>-Wert von 2  $\mu$ M stimmt gut mit dem in dieser Arbeit erhaltenem K<sub>D</sub>-Wert von 7  $\mu$ M überein. Somit konnte die Funktionalität der hier gereinigten c-Src-SH3-Domäne geprüft werden.

Ein GST-Pulldown belegte die Bindefähigkeit des GST-c-SrcΔSH1 an das virale NS5A-Protein aus dem HCV-Replikon-Zelllysat (Kap. 3.2.2) (Pfannkuche, Buther et al. 2011). Das Assay belegte die Funktionalität des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten c-SrcΔSH1-Proteins.

Das im Rahmen dieser Arbeit präparierte rekombinante NS5B(1b)-Protein war in der Lage bei einem Pulldown-Assay seinen bekannten Interaktionspartner NS5A (Shirota, Luo et al. 2002) aus dem HCV-Replikon-Zelllysat zurückzuhalten (Abb. 29).

Somit wurden die für die Komplexassemblierung benötigten Ausgangsmoleküle im Rahmen dieser Arbeit bereitgestellt.

# 4.2.5. Untersuchungen zum binären pTyr-NS5A-NS5B-Komplex belegten eine Interaktion der beiden Proteine

In einem Pulldown-Assay wurde die Bindung der während dieser Arbeit präparierten, rekombinanten pTyr-NS5A und NS5B-Proteine untersucht (vgl. Kap. 3.2.8). Dieses Assay prüft einerseits die Funktionalität der erhaltenen pTyr-NS5A-Probe und verifiziert andererseits die Interaktion zwischen NS5A und NS5B Proteinen (Shirota, Luo et al. 2002; Pfannkuche, Buther et al. 2011).

Aus dem durchgeführten Experiment kann jedoch nicht rückgeschossen werden, ob und zu welchem Maße diese Bindung von der Phosphorylierung der Tyrosine des NS5A-Proteins beeinflusst wurde. Um das aufzuklären, müssen weitere Studien vorgenommen werden. Als erstes sollte das Experiment mit dem nichtmodifizierten NS5A-Protein wiederholt werden, um die Notwendigkeit der Tyrosin-Phosphorylierung zu untersuchen.

## 4.2.6. Der binäre c-Src-SH3-NS5B-Komplex wurde mit verschiedenen Methoden untersucht

Der binäre c-Src-SH3-NS5B-Komplex wurde im Rahmen dieses Projekts mittels Pulldown-Assay und ITC untersucht (Kap. 3.2.4). In dieser Untersuchung wurden die NS5B<sub>PxxP</sub>-Peptide M1 und M2 sowie drei verschiedene NS5B-Varianten eingesetzt: NS5B $\Delta$ 21(1b), NS5B $\Delta$ 21(2a) und NS5B $\Delta$ 21(con1). Weder im Pulldown-Assay, noch mittels ITC konnte eine Interaktion der beteiligten Proteine bzw. Peptide unter den getesteten Bedingungen nachgewiesen werden.

Einerseits könnte das Ausbleiben der Interaktion durch den in dieser Arbeit verwendeten Bindungspuffer verursacht sein. Im verwendeten Puffer war 1% Triton-X100 enthalten. Der Zusatz von Triton-X100 war notwendig, um das NS5B bei der Proteinreinigung zu solubilisieren. Das Detergenz wird jedoch in den Standardpuffern für Co-IP (Ko-Immunoprezipitation) verwendet und sollte lediglich Protein-Lipid, jedoch keine Protein-Protein-Wechselwirkungen stören. Zudem wurde das Detergenz auch während der ersten Detektion des heterotrimeren Komplexes c-Src-NS5A-NS5B verwendet (Pfannkuche, Buther et al. 2011). Somit sollte es keinen negativen Einfluss auf die Bindung der Protein c-Src und NS5B aufweisen.

Andererseits wäre es denkbar, dass das gleichzeitige Vorhandensein des NS5A-Proteins für diese Interaktion notwendig gewesen wäre. Durch die Bindung an das NS5B-Protein könnte es konformationelle Änderungen des NS5B-Proteins verursachen, die wiederum dessen Bindung an die c-Src-SH3-Domäne begünstigen würden.

#### 4.2.7. Der binäre Komplex c-Src∆SH1-pTyr-NS5A wurde mittels Pulldown-Assay untersucht

In einem GST-Pulldown-Assay wurde die Bindung des pTyr-NS5A-Proteins an das GST-c-SrcΔSH1-Protein untersucht (Kap. 3.2.9). Bei diesem Experiment wurde eine deutliche unspezifische Bindung des pTyr-NS5A-Proteins an den GST-Tag detektiert. Da es sich beim Pulldown-Assay um eine qualitative Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen handelt können keine Rückschlüsse in Bezug auf das Vorhandensein einer spezifischen c-SrcΔSH1-pTyr-NS5A-Bindung gezogen werden, da diese wenn auch vorhanden von der unspezifischen Bindung an den GST-Tag überdeckt wird.

Um die spezifische Bindung des pTyr-NS5A-Proteins an das c-SrcΔSH1 zu untersuchen, müssen zusätzliche Studien durchgeführt werden. Zum einen sollte man die Messungen mit Tag-losen Proteinen wiederholen, zum anderen wäre es sinnvoll eine sensitive, quantitative Methode wie z.B. BLI (*Bio-Layer Interferometry*) oder SPR zu bevorzugen, weil man hier Assoziations- und Dissoziationskinetiken auslesen kann.

# 4.2.8. *In vitro* Untersuchungen zum ternären c-Src-NS5A-NS5B-Komplex wurden mittels Pulldown-Assay durchgeführt

Die Untersuchung zum Nachweis der c-Src-NS5A-NS5B-Komplexbildung wurde mittels Pulldown-Assay durchgeführt.

Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen zu binären Komplexen wurden dabei berücksichtigt. So wurde das Tag-lose c-SrcΔSH1-Protein an NHS-Sepharose gekoppelt, um die unspezifische pTyr-NS5A-Bindung an GST zu eliminieren (vgl. Abb. 40). Zudem wurden die Proteine pTyr-NS5A und NS5BΔ21(1b) präinkubiert, um die Präzipitation der Proteine auszuschließen.

Kovalent an die NHS-Sepharose gekoppelte c-SrcΔSH1 wurde mit einem präinkubierten pTyr-NS5A-NS5BΔ21(1b)-Proteingemisch inkubiert. Um zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung unterscheiden zu können wurden unter verschiedenen Bedingungen eluiert. Zu einem wurde für die spezifisch gebundenen Proteine die Elution mittels pH-Shift durchgeführt, zum anderen

wurde die Sepharose im Lämmli-Puffer aufgekocht, um alle an ihr gebundenen Proteine zu solubilisieren.

Mit diesem Pulldown-Assay konnte eine spezifische Bindung des NS5B-Proteins an das c-SrcΔSH1 nicht eindeutig belegt werden. Der Vergleich der Durchfluss bzw. der Waschfraktionen deutet jedoch auf eine mögliche Bindung des NS5B-Proteins an das c-SrcΔSH1 hin, da in den Durchfluss- und Waschfraktionen bei c-SrcΔSH1-Sepharose weniger NS5B detektiert wird als bei der Kontrolle. Dieser Befund könnte auf den positiven Einfluss der NS5B-NS5A-Interaktion auf die NS5B-c-Src-Bindung hindeuten. Für die zweifelsfreie Aufklärung der Bindung müssten weitere Studien durchgeführt werden, die vor allem eine Analyse der Bindungskinetik erlauben sollten (z.B. BLI oder SPR).

Eine Bindung des pTyr-NS5A-Proteins an das Tag-lose c-SrcΔSH1 wurde in diesem Pulldown-Assay nicht gezeigt. Dies könnte auch durch die Art der c-SrcΔSH1-Kopplung an die Sepharose bedingt sein. Die kovalente Kopplung von Proteinen an die NHS-Sepharose erfolgt über Lysin-Reste, was die Bindung an das pTyr-NS5A beeinträchtigen könnte, da ein Lysin-Rest an der pTyr-Bindung der c-Src-SH2-Domäne maßgeblich beteiligt ist (Waksman, Shoelson et al. 1993). Die leichte unspezifische Bindung des pTyr-NS5A-Proteins an die NHS-Sepharose (Abb. 41), die in den Vorversuchen nicht detektiert wurde (Abb. 39), ist wahrscheinlich durch die unspezifische Bindung des NS5B-Proteins an die NHS-Sepharose zu erklären. Da, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, das NS5B-Protein mit dem pTyr-NS5A interagierte.

Um ein klares Bild von den Interaktionen zu erhalten müssten noch weitere Studien durchgeführt werden. Dabei sollten im Rahmen dieses Projekts identifizierten unspezifischen Bindungen von NS5B-Protein an die NHS- und GSH-Sepharose und die unspezifische Bindung vom pTyr-NS5A-Protein an den GST-Tag berücksichtigt werden.

Ein Verbesserungsvorschlag zum Versuchsaufbau wäre z.B. die Bindung des NS5B-Proteins an die NHS-Sepharose mit anschließender Inkubation mit dem cSrc-NS5A-Proteingemisch. Auch das Einsetzen von quantitativen Methoden wäre hier wünschenswert, um die Untersuchungen der Bindungskinetiken zu ermöglichen.
#### Diskussion

Für die geplanten strukturellen Untersuchungen des Komplexes müssten die hier verwendeten Protein-Mengen erhöht werden. Dies könnte jedoch problematisch werden, da das NS5A(FL)-Protein nur schwer-löslich ist und das NS5B Protein bei höheren Konzentrationen zur Aggregation tendiert. Die Größe des zu untersuchenden Komplexes wäre ein weiteres Hindernis. In der Ausgangshypothese wurde angenommen, dass die c-Src, NS5A und NS5B Proteine zu einem heterotrimeren Komplex assemblieren. Unabhängige Studien zeigen jedoch, dass die Proteine NS5A und NS5B unter bestimmten Umständen auch als Dimere vorliegen könnten (Qin, Luo et al. 2002; Love, Brodsky et al. 2009). Nimmt man an, dass die an der Komplexbildung beteiligten Moleküle als Dimere vorliegen, würde das die Komplexgröße enorm erhöhen.

Im begrenzten Zeitraum dieses Projekts konnten keine weiteren Untersuchungen zu der Assemblierung des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes durchgeführt werden.

In der experimentellen biologischen Forschung wird versucht den zellulären Prozessen auf den Grund zu gehen. Dabei werden die experimentellen Systeme so weit wie möglich vereinfacht. So wird das System "Zelle" in *in vitro* Versuchen auf einige wenige Komponenten wie z.B. interagierende Proteine reduziert. In vielen Fällen hilft diese Reduktion auf das Wesentliche dem besseren Verständnis der zellulären Vorgänge. Man sollte jedoch nie vergessen, dass es sich bei *in vitro* Versuchen um artifizielle Systeme handelt, die nicht immer in der Lage sind das wirkliche zelluläre Geschehen nachzubilden.

## 5. Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei unabhängige Projekte bearbeitet.

Zu einem wurde die Bindung von  $\beta$ -Catenin, einem Schlüsselprotein des Wnt-Signalweges, an die UBA-Domäne der EDD E3 Ligase untersucht. In vorausgegangenen Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass diese Interaktion einen neuartigen Mechanismus der  $\beta$ -Catenin-Regulation darstellt.

Im Rahmen dieses Projekts konnte die heterologe Expression und Reinigung folgender Proteine und Protein-Domänen etabliert werden:  $\beta$ -Catenin, UBAwt, UBAV196K, UBAL224K und Axin(435-541). Es wurden diverse Protein-Funktionalitäts-Assays ausgearbeitet, die zur Prüfung der präparierten Proteine erfolgreich eingesetzt wurden. Entgegen den Zellkultur-Experimenten von A. Hay-Koren, konnte keine Interaktion zwischen den rekombinant gereinigten Proteinen UBAwt bzw. UBAL224K und  $\beta$ -Catenin detektiert werden. Dieser Befund deutet auf die Anwesenheit von posttranslationalen Modifikationen, die die Bindung von UBA ans  $\beta$ -Catenin in menschlichen Zellen regulieren, hin.

Somit sind die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wegweisend für die zukünftige Erforschung der UBA-β-Catenin-Interaktion. In nachfolgenden Studien sollten die posttranslationalen Proteinmodifikationen und ihre regulierende Funktion analysiert werden.

Genauere Kenntnisse der β-Catenin-Regulation auf molekularer Ebene sind eine notwendige Grundlage, um darauf mögliche Ansätze zur Beeinflussung der Wntgesteuerten Genexpression aufzubauen. In der Zukunft könnten diese Erkenntnisse zur Entwicklung neuartiger Krebs-Therapiestrategien beitragen.

Beim zweiten Projekt wurden die Interaktionen der HCV-Proteinen NS5A und NS5B mit dem humanen Protoonkogen c-Src untersucht. Wobei von einer Bindung des NS5A-Proteins an die c-Src-SH2-Domäne und der Bindung des NS5B-Proteins an die c-Src-SH3-Domäne ausgegangen wurde.

Es wird angenommen, dass in humanen Zellen bei der Bildung des heterotrimeren c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes die humane c-Src-Kinase zu dem viralen Replikationskomplex rekrutiert wird. Durch die Komplexassemblierung steht sie

110

Ausblick

demzufolge den intrazellulären c-Src-abhängigen Signalkaskaden nicht mehr zur Verfügung, wodurch vermutlich zelluläre Prozesse auf pathogene Weise gestört werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten folgende Proteine rekombinant exprimiert und gereinigt werden: NS5BΔ21, c-Src-SH3, pTyr-NS5A(FL). Das NS5A-Protein wurde im *E. coli* TKB1 System erfolgreich an acht von zehn Tyrosinen durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert. Während dieser Arbeit wurden verschiedene Funktionalitäts-Assays für die zu untersuchenden Proteine ausgearbeitet und angewendet. Die Ergebnisse der Assays belegten die Funktionalität der hier präparierten Proteine. Somit ist die Basis für die geplanten Interaktionsstudien geschaffen worden.

Der heterotrimere c-Src-NS5A-NS5B-Komplex wurde in den ersten Bindungsstudien zu den binären Komplexen NS5A-NS5B, c-Src-SH3-NS5B und c-Src-ΔSH1-NS5A reduziert. Bei den Untersuchungen zu dem binären Komplex pTyr-NS5A-NS5B konnte eine Interaktion der beiden Proteine eindeutig belegt werden. Der Assay zum Nachweis der c-SrcΔSH1-pTyr-NS5A-Interaktion demonstrierte eine starke unspezifische GST-pTyr-NS5A-Wechselwirkung, die spezifische Bindung von pTyr-NS5A an das c-SrcΔSH1 konnte weder belegt noch ausgeschlossen werden. Eine Assemblierung des binären c-SrcSH3-NS5B-Komplexes konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Bei den Untersuchungen zu der Assemblierung des heterotrimeren c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes mittels Pulldown-Assay konnte keine spezifische Bindung des pTyr-NS5A-Proteins an c-SrcΔSH1 belegt werden. Dies war möglicherweise auf den Versuchsaufbau zurückzuführen. Die NS5B-c-SrcΔSH1-Bindung konnte zwar auch in Anwesenheit von pTyr-NS5A nicht eindeutig nachgewiesen werden, jedoch zeigten die Ergebnisse hier ein deutlicheres Rückhalten von NS5B an c-SrcΔSH1-Sepharose als an der Kontrollsepharose. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine durch NS5A-Bindung vermittelte konformationelle Änderung des NS5B-Proteins, welche sich positiv auf dessen SH3-Bindefähigkeit auswirken könnte.

Um ein genaues Bild von der c-Src-NS5A-NS5B-Komplexassemblierung zu erhalten, müssten noch weitere Studien durchgeführt werden. Auf den

111

Ergebnissen dieser Arbeit basierend, sollten dabei hoch-sensitive und quantitative Methoden wie BLI oder SPR bevorzugt werden.

Das Verstehen der Interaktionsmechanismen der c-Src-NS5A-NS5B-Komplexassemblierung auf molekularer Ebene ist eine notwendige Grundlage zum Erforschen der HCV-Pathogenese, um darauf basierend neuartige Therapiestrategien aufbauen zu können.

1D-1H-NMR	ein dimensionale Proton Kernspinresonanz
2-50AS	2-5 oligoadenylate synthase
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Adenomatous-polyposis-coli
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
Bik	BCL-2 interacting killer
BLI	Bio-Layer Interferometry
ca.	circa
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1- propanesulfonate
СНК	CSK homologen Kinase
CK1	Casein Kinase 1
CK1γ	Casein Kinase 1y
с-Мус	Myelocytomatose
Co-IP	Ko-Immunoprezipitation
CSK	C-terminaler Src-Kinase
c-Src	cellular sarcoma
D1,D2,D3	Domäne 1, Domäne 2, Domäne 3
DDM	n-dodecyl-β-D-maltopyranoside
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPC	n-dodecylphosphocholine

DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
E1,E2,E3	Enzym
EDD E3 Ligase	E3 ligase identified by differential display
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, engl Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ER	Endoplasmatische Retikulum
Engl.	Englisch
ERK	extracellular signal-regulated kinases
et al.	et alii, und andere
FP	Fusionsprotein
Fz	Frizzled
g	Gramm
GSK-3β	Glykogen-Synthase Kinase 3β
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HCV	Hepatitis C Virus
HECT	homologous to the E6-AP carboxyl terminus
IAA	3-Inosytolacryl Säure
IFN-α	Interferon-Alpha
Int-1	integration1
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	interne ribosomale Eintrittstelle
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie, engl. isothermal titration calorimetry
kb	Kilobase

KD	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
I	Liter
LB	engl. lysogeny broth
LDAO	Lauryldimethylamin-Oxid
Lef	lymphoid enhancing factor
LRP	lipoprotein receptor related proteins
LRP5/6	low-density lipoprotein receptor related proteins 5/6
М	Molar
МАРК	mitogen-activated protein kinases
MMTV	Maus-Mammatumorvirus
MS	Massenspektroskopie
MST	Microscale thermophoresis
MW	Molekulargewicht
NLS	Kernlokalisationssignal, engl. nuclear localization signal
NMR	Kernspinresonanz, engl. nuclear magnetic resonance
NP-40	Nonidet P-40
NS	nicht-strukturelle
OD	optischen Dichte
PABC	homolog zu dem C-Terminus von poly(A)-binding protein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. phosphate buffered saline
PCP	planar cell polarity
PCR	polymerase chain reaction
PDB	Protein Datenbank
PDGF	platelet derived growth factor

pmol	Picomol
PTX1	pituitary homeobox
pTyr	Phosphotyrosin
RBR	RING-between RING
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase, engl. RNA-dependent RNA polymerase
RNA	Ribonukleinsäure, engl. ribonucleic acid
RPC	Reverse-Phase-Chromatographie
Rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	SPR-Einheit, engl. response units
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat, sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektroporese
SH	Src Homologie
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, engl surface plasmon resonance
Tab.	Tabelle
ТВР	TATA box binding protein
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, engl. Tris-buffered saline
TCF	T-cell factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV-Protease	Tobacco Etch Virus Protease
TFA	Trifluoressigsäure
u.a.	unter anderem
UBA	ubiquitin associated

UBR	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin
v-Src	viral sarcoma
Wg	wingless
WHO	Weltgesundheitsorganisation , engl. World Health Organization
Wnt	Wingless + integrin1
wt	Wildtyp
β-TrCP1 E3	beta-transducin repeat containing protein

Abbildungsverzeichnis

## 7. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Kristallstruktur der Armadillo-Motive, β-Catenin (Maus)	12
Abb. 2: Kanonischer Wnt-Signalweg	14
Abb. 3: Ubiquitinylierungs-Mechanismus	17
Abb. 4: Schematischer Aufbau der EDD E3 Ligase	18
Abb. 5: Weltweite Prävalenz der HCV Infektion	19
Abb. 6: Aufbau vom Hepatitis C Virus	21
Abb. 7: Domänen-Organisation von NS5A	24
Abb. 8: Bändermodell der HCV RNA-abhängigen RNA-Polymerase	26
Abb. 9: Aufbau der c-Src-Kinase	29
Abb. 10: Regulation der c-Src-Kinase-Aktivität	30
Abb. 11: Ein Model der Assemblierung des c-Src-NS5A-NS5B-Komplexes	33
Abb. 12: Reinheit von β-Catenin	59
Abb. 13: Reinheit des Axins (435-541)	59
Abb. 14: Sensogramm der Bindung von Axin (435-541) an das $\beta$ -Catenin	60
Abb. 15: Reinheit von UBAwt, UBAV196K und UBAL224K	62
Abb. 16: Pulldown-Assay zur Untersuchung der Interaktion zwischen	63
UBAwt, UBAV196K, UBAL224K und Ubiquitin	
Abb. 17: ITC-Titration von Ubiquitin zum UBAwt-Protein	64
Abb. 18: 1D- <sup>1</sup> H-NMR Spektren von UBA-Proteinen (12,4 kDa)	65
Abb. 19: Pulldown-Assay zur Untersuchung der β-Catenin-UBAwt	66
-Interaktion	
Abb. 20: SPR-Analyse der UBAwt-β-Catenin-Interaktion	68
Abb. 21: SPR-Analyse der UBAL224K-β-Catenin-Interaktion	69
Abb. 22: SPR-Analyse der UBAV196K-β-Catenin-Interaktion	70
Abb. 23: Vergleich der Sensogramme der UBAs-β-Catenin-Interaktionen	71
Abb. 24: ITC-Titration von UBAwt zum β-Catenin	73
Abb. 25: MST-Messung der UBAwt <sub>c</sub> -Ubiquitin-Interaktion	75

Abb. 26: ITC-Titration des PxxP-Peptides zum c-SrcSH3-Protein	77
Abb. 27: Pulldown-Assay zur Untersuchung der Interaktion zwischen	78
dem rekombinanten GST-c-SrcΔSH1 und dem zellulären	
NS5A-Protein, Western-Blot mit anti-NS5A-AK	
Abb. 28: Expression und Aufreinigung des NS5BΔ21(1b)-Proteins	79
Abb. 29: Pulldown-Assay zur Untersuchung der Interaktion zwischen	80
dem rekombinanten NS5B- und dem zellulärem NS5A-Protein	
Abb. 30: ITC Titration von M1-Peptid zur c-Scr-SH3-Domäne	81
Abb. 31: ITC Titration von M2-Peptid zur c-Scr-SH3-Domäne	82
Abb. 32: Pull-downs zur Untersuchung der NS5B-SH3-Interaktion	83
Abb. 33: ITC-Titration von c-SrcSH3 zum NS5B(1b)-Protein	84
Abb. 34: Expression von strep(II)-Δ24NS5A-His in <i>E. coli</i> BL21DE3	85
Abb. 35: Expression von NS5A(FL) in <i>E. coli</i> TKB1	86
Abb. 36: NS5A(FL) Überexpression in <i>E. coli</i> TKB1, Western Blot mit	87
pentaHis-AK und pTyr-AK	
Abb. 37: Ni-NTA Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von pTyr-NS5A(FL)	88
Abb. 38: pTyr-NS5A, schematische Darstellung	89
Abb. 40: Pull-down zur Untersuchung der c-Src $\Delta$ SH1-pNS5A(FL)-Interaktion,	91
Western Blot mit penta His-AK	
Abb. 40: Pull-down zur Untersuchung der c-Src $\Delta$ SH1-pNS5A(FL)-Interaktion,	92
Western Blot mit penta His-AK	
Abb 41: Pull-down zur Untersuchung der in vitro Assemblierung	94
des c-Src-NS5A-NS5B Komplexes, Western Blots mit anti-NS5B-AK	
und anti-NS5A-AK	
Abb. 42: Bindung der $\beta$ -Catenin bindenden Domäne von Axin an $\beta$ -Catenin	99
Abb. 43: Tyrosin-phosphorylierte D1-Domäne von NS5A	103

## 8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Eingesetzte bakterielle Zelllinien	35
Tab. 2: Verwendete Plasmide	35
Tab. 3: Während dieser Doktorarbeit klonierte Expressionsvektoren	35
Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide	36
Tab. 5: Benutzte Geräte	38
Tab. 6: Aminosäuresequenzen der eingesetzten Proteine	39
Tab. 7: Verwendete Antikörper	55

## 9. Quellenangaben

- Aberle, H., A. Bauer, et al. (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitinproteasome pathway." <u>Embo J</u> **16**(13): 3797-3804.
- Ago, H., T. Adachi, et al. (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." <u>Structure</u> **7**(11): 1417-1426.
- Aladag, A. (2012). <u>Characterisation of the Hepatitis C Virus protein NS5A</u> <u>interaction with human SH3 domains</u>, HHU Düsseldorf.
- Appel, N., T. Pietschmann, et al. (2005). "Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain." <u>J Virol</u> **79**(5): 3187-3194.
- Atoom, A. M., N. G. Taylor, et al. (2014). "The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein." <u>Virology</u> **463**: 377-387.
- Barone, M. V. and S. A. Courtneidge (1995). "Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase-inactive Src." <u>Nature</u> **378**(6556): 509-512.
- Bartenschlager, R., V. Lohmann, et al. (1995). "Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation." J Virol **69**(12): 7519-7528.
- Bataller, R., Y. H. Paik, et al. (2004). "Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells." <u>Gastroenterology</u> **126**(2): 529-540.
- Behrens, J., J. P. von Kries, et al. (1996). "Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1." <u>Nature</u> **382**(6592): 638-642.
- Bellon-Echeverria, I., A. J. Lopez-Jimenez, et al. (2010). "Monitoring hepatitis C virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase oligomerization by a FRETbased in vitro system." <u>Antiviral Res</u> 87(1): 57-66.
- Bhanot, P., M. Brink, et al. (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." <u>Nature</u> **382**(6588): 225-230.
- Bowman, T., M. A. Broome, et al. (2001). "Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **98**(13): 7319-7324.
- Bradley, A., H. Zheng, et al. (2014). "EDD enhances cell survival and cisplatin resistance and is a therapeutic target for epithelial ovarian cancer." <u>Carcinogenesis</u> **35**(5): 1100-1109.
- Brass, V., E. Bieck, et al. (2002). "An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A." J Biol Chem **277**(10): 8130-8139.
- Bressanelli, S., L. Tomei, et al. (2002). "Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides." <u>J Virol</u> **76**(7): 3482-3492.
- Brown, M. T. and J. A. Cooper (1996). "Regulation, substrates and functions of src." <u>Biochim Biophys Acta</u> **7**: 2-3.

- Cai, Z., M. Yi, et al. (2005). "Mutagenesis analysis of the rGTP-specific binding site of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase." <u>J Virol</u> **79**(18): 11607-11617.
- Callis, J. (2014). "The ubiquitination machinery of the ubiquitin system." <u>Arabidopsis Book</u> 6(12).
- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome." <u>Science</u> **244**(4902): 359-362.
- Chung, Y. L., M. L. Sheu, et al. (2003). "Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma." Int J Cancer **107**(1): 65-73.
- Clancy, J. L., M. J. Henderson, et al. (2003). "EDD, the human orthologue of the hyperplastic discs tumour suppressor gene, is amplified and overexpressed in cancer." <u>Oncogene</u> **22**(32): 5070-5081.
- Clemente-Casares, P., A. J. Lopez-Jimenez, et al. (2011). "De novo polymerase activity and oligomerization of hepatitis C virus RNA-dependent RNA-polymerases from genotypes 1 to 5." <u>PLoS One</u> **6**(4): 0018515.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." <u>Cell</u> **127**(3): 469-480.
- Cox, R. T., L. M. Pai, et al. (1999). "Roles of the C terminus of Armadillo in Wingless signaling in Drosophila." <u>Genetics</u> **153**(1): 319-332.
- Davidson, G., W. Wu, et al. (2005). "Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction." <u>Nature</u> **438**(7069): 867-872.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, et al. (1997). "Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes." J Virol **71**(1): 697-704.
- Ding, Q., X. Cao, et al. (2013). "Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity." <u>J Hepatol</u> **59**(1): 52-58.
- Drexler, J. F., V. M. Corman, et al. (2013). "Evidence for novel hepaciviruses in rodents." PLoS Pathog **9**(6): 20.
- Dumoulin, F. L., A. von dem Bussche, et al. (2003). "Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines." <u>Virology</u> **305**(2): 260-266.
- Elazar, M., K. H. Cheong, et al. (2003). "Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication." <u>J Virol</u> **77**(10): 6055-6061.
- Ezan, J. and M. Montcouquiol (2013). "Revisiting planar cell polarity in the inner ear." <u>Semin Cell Dev Biol</u> **24**(5): 499-506.
- Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, et al. (1975). "Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B." <u>N Engl J Med</u> **292**(15): 767-770.
- Feuerstein, S., Z. Solyom, et al. (2012). "Transient structure and SH3 interaction sites in an intrinsically disordered fragment of the hepatitis C virus protein NS5A." <u>J Mol Biol</u> **420**(4-5): 310-323.

- Freeman, A. J., G. J. Dore, et al. (2001). "Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection." <u>Hepatology</u> **34**(4 Pt 1): 809-816.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, et al. (1997). "Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein." <u>Virology</u> **230**(2): 217-227.
- Gao, C., G. Xiao, et al. (2014). "Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by posttranslational modifications." <u>Cell Biosci</u> **4**(1): 2045-3701.
- Ghosh, A. K., M. Majumder, et al. (2003). "Modulation of interferon expression by hepatitis C virus NS5A protein and human homeodomain protein PTX1." <u>Virology</u> 306(1): 51-59.
- Giles, R. H., J. H. van Es, et al. (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer." <u>Biochim Biophys Acta</u> **5**(1): 1-24.
- Gonfloni, S., J. C. Williams, et al. (1997). "The role of the linker between the SH2 domain and catalytic domain in the regulation and function of Src." <u>Embo J</u> **16**(24): 7261-7271.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, et al. (1993). "A second hepatitis C virus-encoded proteinase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10583-10587.
- Griffin, S. D., L. P. Beales, et al. (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." <u>FEBS Lett</u> 535(1-3): 34-38.
- Haglund, K. and I. Dikic (2005). "Ubiquitylation and cell signaling." <u>Embo J</u> **24**(19): 3353-3359.
- Hay-Koren, A. (2012). <u>The EDD E3 ubiquitin ligase ubiquitinates</u> and up-regulates <u>b-catenin.</u>
- Hay-Koren, A., M. Caspi, et al. (2011). "The EDD E3 ubiquitin ligase ubiquitinates and up-regulates beta-catenin." Mol Biol Cell **22**(3): 399-411.
- Henderson, M. J., A. J. Russell, et al. (2002). "EDD, the human hyperplastic discs protein, has a role in progesterone receptor coactivation and potential involvement in DNA damage response." <u>J Biol Chem</u> 277(29): 26468-26478.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." <u>Annu Rev</u> <u>Biochem</u> **67**: 425-479.
- Hicke, L. and R. Dunn (2003). "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins." <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u> **19**: 141-172.
- Huang, H., L. Li, et al. (2008). "Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain." <u>Mol Cell Proteomics</u> **7**(4): 768-784.
- Huang, Y., K. Staschke, et al. (2007). "Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication?" <u>Virology</u> **364**(1): 1-9.
- Huber, A. H., W. J. Nelson, et al. (1997). "Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin." <u>Cell</u> **90**(5): 871-882.

- Ide, Y., L. Zhang, et al. (1996). "Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A." <u>Gene</u> 182(1-2): 203-211.
- Ingley, E. (2008). "Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1**: 56-65.
- Irby, R. B., W. Mao, et al. (1999). "Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers." <u>Nat Genet</u> **21**(2): 187-190.
- Irby, R. B. and T. J. Yeatman (2000). "Role of Src expression and activation in human cancer." <u>Oncogene</u> **19**(49): 5636-5642.
- Kamadurai, H. B., Y. Qiu, et al. (2013). "Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3." <u>Elife</u> **2**: e00828.
- Kaneko, T., Y. Tanji, et al. (1994). "Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **205**(1): 320-326.
- Kaplan, W., P. Husler, et al. (1997). "Conformational stability of pGEX-expressed Schistosoma japonicum glutathione S-transferase: a detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag." <u>Protein Sci</u> 6(2): 399-406.
- Kapoor, A., P. Simmonds, et al. (2011). "Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **108**(28): 11608-11613.
- Kim, D. W., Y. Gwack, et al. (1995). "C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> 215(1): 160-166.
- Kimelman, D. and W. Xu (2006). "beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." <u>Oncogene</u> **25**(57): 7482-7491.
- Kohn, A. D. and R. T. Moon (2005). "Wnt and calcium signaling: beta-cateninindependent pathways." <u>Cell Calcium</u> **38**(3-4): 439-446.
- Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, et al. (2000). "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo." J Virol **74**(4): 2046-2051.
- Kozlov, G., L. Nguyen, et al. (2007). "Structural basis of ubiquitin recognition by the ubiquitin-associated (UBA) domain of the ubiquitin ligase EDD." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 282(49): 35787-35795.
- Krappmann, D. and C. Scheidereit (2005). "A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways." <u>EMBO Rep</u> 6(4): 321-326.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> **227**(5259): 680-685.
- Lee, C. H., B. Leung, et al. (1995). "A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein." <u>Embo J</u> 14(20): 5006-5015.
- Lee, M. H., H. I. Yang, et al. (2014). "Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection." <u>World J Gastroenterol</u> **20**(28): 9270-9280.

- Lesburg, C. A., M. B. Cable, et al. (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." <u>Nat Struct Biol</u> **6**(10): 937-943.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u> **20**: 781-810.
- Lopez, J., C. Hesling, et al. (2012). "Src tyrosine kinase inhibits apoptosis through the Erk1/2- dependent degradation of the death accelerator Bik." <u>Cell Death</u> <u>Differ</u> **19**(9): 1459-1469.
- Love, R. A., O. Brodsky, et al. (2009). "Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus." <u>J Virol</u> **83**(9): 4395-4403.
- Macdonald, A., K. Crowder, et al. (2004). "The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity." J Gen Virol **85**(Pt 3): 721-729.
- Machida, K., K. Tsukiyama-Kohara, et al. (2001). "Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins." J Biol Chem **276**(15): 12140-12146.
- Martin, G. S. (2001). "The hunting of the Src." Nat Rev Mol Cell Biol 2(6): 467-475.
- Masaki, T., R. Suzuki, et al. (2008). "Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles." J Virol 82(16): 7964-7976.
- McLauchlan, J. (2000). "Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes." <u>J Viral Hepat</u> **7**(1): 2-14.
- Meyer, T. S. and B. L. Lamberts (1965). "Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips." <u>Biochim Biophys Acta</u> **107**(1): 144-145.
- Michalak, J. P., C. Wychowski, et al. (1997). "Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins." <u>J Gen Virol</u> **78**(Pt 9): 2299-2306.
- Moradpour, D., V. Brass, et al. (2004). "Membrane association of the RNAdependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication." <u>J Virol</u> **78**(23): 13278-13284.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." <u>Cold Spring Harb Symp Quant Biol</u> 1: 263-273.
- Munoz, M. A., D. N. Saunders, et al. (2007). "The E3 ubiquitin ligase EDD regulates S-phase and G(2)/M DNA damage checkpoints." <u>Cell Cycle</u> 6(24): 3070-3077.
- Nakashima, K., K. Takeuchi, et al. (2012). "HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells." <u>PLoS One</u> **7**(10): 16.
- Neddermann, P., M. Quintavalle, et al. (2004). "Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture." J Virol **78**(23): 13306-13314.

- Nusse, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." <u>Cell</u> **31**(1): 99-109.
- Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila." <u>Nature</u> **287**(5785): 795-801.
- O'Farrell, D., R. Trowbridge, et al. (2003). "Substrate complexes of hepatitis C virus RNA polymerase (HC-J4): structural evidence for nucleotide import and de-novo initiation." J Mol Biol **326**(4): 1025-1035.
- Okada, M. (2012). "Regulation of the SRC family kinases by Csk." <u>Int J Biol Sci</u> **8**(10): 1385-1397.
- Otsuka, M., N. Kato, et al. (2000). "Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability." J Biol Chem **275**(44): 34122-34130.
- Pawson, T. and J. Schlessingert (1993). "SH2 and SH3 domains." <u>Curr Biol</u> **3**(7): 434-442.
- Penin, F., V. Brass, et al. (2004). "Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A." <u>J Biol Chem</u> 279(39): 40835-40843.
- Pfannkuche, A., K. Buther, et al. (2011). "c-Src is required for complex formation between the hepatitis C virus-encoded proteins NS5A and NS5B: a prerequisite for replication." <u>Hepatology</u> **53**(4): 1127-1136.
- Piccininni, S., A. Varaklioti, et al. (2002). "Modulation of the hepatitis C virus RNAdependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein." J Biol Chem **277**(47): 45670-45679.
- Pinson, K. I., J. Brennan, et al. (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." <u>Nature</u> **407**(6803): 535-538.
- Polyak, S. J., D. M. Paschal, et al. (1999). "Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication." <u>Hepatology</u> **29**(4): 1262-1271.
- Poynard, T., M. F. Yuen, et al. (2003). "Viral hepatitis C." <u>Lancet</u> **362**(9401): 2095-2100.
- Qadri, I., M. Iwahashi, et al. (2002). "Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3." <u>Biochim Biophys Acta</u> **21**(2): 193-204.
- Qin, W., H. Luo, et al. (2002). "Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 277(3): 2132-2137.
- Quan, P. L., C. Firth, et al. (2013). "Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **110**(20): 8194-8199.
- Rafiq, S. M., G. R. Banik, et al. (2014). "Current Burden of Hepatitis C Virus Infection among Injecting Drug Users: A Mini Systematic Review of Prevalence Studies." <u>Infect Disord Drug Targets</u> 14: 14.

- Ramanathan, H. N. and Y. Ye (2012). "Cellular strategies for making monoubiquitin signals." <u>Crit Rev Biochem Mol Biol</u> **47**(1): 17-28.
- Reya, T. and H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." <u>Nature</u> **434**(7035): 843-850.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu, et al. (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome." <u>Oncogene</u> **19**(49): 5548-5557.
- Roche, S., S. Fumagalli, et al. (1995). "Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division." <u>Science</u> **269**(5230): 1567-1569.
- Rous, P. (1983). "Landmark article (JAMA 1911;56:198). Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. By Peyton Rous." <u>Jama</u> 250(11): 1445-1449.
- Samrat, S. K., W. Li, et al. (2014). "Alternate reading frame protein (F protein) of hepatitis C virus: paradoxical effects of activation and apoptosis on human dendritic cells lead to stimulation of T cells." <u>PLoS One</u> **9**(1).
- Schindler, T., F. Sicheri, et al. (1999). "Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor." <u>Mol Cell</u> **3**(5): 639-648.
- Seeff, L. B. (1997). "The natural history of chronic hepatitis C virus infection." <u>Clin</u> <u>Liver Dis</u> **1**(3): 587-602.
- She, Y., T. Han, et al. (2009). "Hepatitis C virus NS2/3 protease regulates HCV IRES-dependent translation and NS5B RdRp activity." <u>Arch Virol</u> **154**(9): 1465-1473.
- Shirota, Y., H. Luo, et al. (2002). "Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNAdependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity." <u>J Biol Chem</u> 277(13): 11149-11155.
- Stehelin, D., H. E. Varmus, et al. (1976). "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA." <u>Nature</u> **260**(5547): 170-173.
- Su, H., S. Meng, et al. (2011). "Mammalian hyperplastic discs homolog EDD regulates miRNA-mediated gene silencing." <u>Mol Cell</u> **43**(1): 97-109.
- Sulkowski, M. S., D. F. Gardiner, et al. (2014). "Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection." <u>N Engl J Med</u> 370(3): 211-221.
- Suzich, J. A., J. K. Tamura, et al. (1993). "Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes." J Virol **67**(10): 6152-6158.
- Suzuki, R., T. Suzuki, et al. (1999). "Processing and functions of Hepatitis C virus proteins." <u>Intervirology</u> **42**(2-3): 145-152.
- Taguchi, T., M. Nagano-Fujii, et al. (2004). "Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner." <u>J Gen</u> <u>Virol</u> 85(Pt 4): 959-969.

- Takeya, T. and H. Hanafusa (1982). "DNA sequence of the viral and cellular src gene of chickens. II. Comparison of the src genes of two strains of avian sarcoma virus and of the cellular homolog." J Virol **44**(1): 12-18.
- Tanji, Y., M. Hijikata, et al. (1995). "Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing." J Virol **69**(3): 1575-1581.
- Tanji, Y., T. Kaneko, et al. (1995). "Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A." <u>J Virol</u> **69**(7): 3980-3986.
- Tasaki, T., L. C. Mulder, et al. (2005). "A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons." <u>Mol Cell Biol</u> **25**(16): 7120-7136.
- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano, et al. (2004). "The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein." <u>J Biol Chem</u> **279**(47): 48576-48587.
- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano, et al. (2005). "Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase." <u>Nature</u> 435(7040): 374-379.
- Thomas, D. L. (2013). "Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity." <u>Nat Med</u> **19**(7): 850-858.
- Tran, T., S. Hoffmann, et al. (2005). "Insights into human Lck SH3 domain binding specificity: different binding modes of artificial and native ligands." <u>Biochemistry</u> 44(45): 15042-15052.
- van de Wetering, M., R. Cavallo, et al. (1997). "Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF." <u>Cell</u> **88**(6): 789-799.
- Verdegem, D., A. Badillo, et al. (2011). "Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A." <u>J Biol Chem</u> 286(23): 20441-20454.
- Waksman, G., S. E. Shoelson, et al. (1993). "Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms." <u>Cell</u> **72**(5): 779-790.
- Wallingford, J. B. and R. Habas (2005). "The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity." <u>Development</u> 132(20): 4421-4436.
- Wang, Y. and J. Nathans (2007). "Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions." <u>Development</u> **134**(4): 647-658.
- Welchman, R. L., C. Gordon, et al. (2005). "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **6**(8): 599-609.
- Wilkinson, C. R., M. Seeger, et al. (2001). "Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains." <u>Nat Cell Biol</u> **3**(10): 939-943.
- Wishart, D. S. and B. D. Sykes (1994). "Chemical shifts as a tool for structure determination." <u>Methods Enzymol</u> **239**: 363-392.

- Xing, Y., W. K. Clements, et al. (2003). "Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex." <u>Genes Dev</u> **17**(22): 2753-2764.
- Xing, Y., K. Takemaru, et al. (2008). "Crystal structure of a full-length betacatenin." <u>Structure</u> **16**(3): 478-487.
- Xu, Z., J. Choi, et al. (2003). "Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum." <u>J Virol</u> **77**(2): 1578-1583.
- Yeatman, T. J. (2004). "A renaissance for SRC." Nat Rev Cancer 4(6): 470-480.
- Yen, T., E. B. Keeffe, et al. (2003). "The epidemiology of hepatitis C virus infection." J Clin Gastroenterol **36**(1): 47-53.
- Zeng, X., K. Tamai, et al. (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." <u>Nature</u> **438**(7069): 873-877.
- Zhang, C., Z. Cai, et al. (2005). "Stimulation of hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity by the NS3 protease domain and by HCV RNA-dependent RNA polymerase." J Virol **79**(14): 8687-8697.
- Zhu, B., K. Yan, et al. (2014). "K63-linked ubiquitination of FANCG is required for its association with the Rap80-BRCA1 complex to modulate homologous recombination repair of DNA interstand crosslinks." <u>Oncogene</u> **18**(10): 229.

### Internetquellen:

Schematische Darstellung des Ubiquitinylierugns-Mechanismus, unter: http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=13555 (abgerufen am 15.09.2014)

Karte der weltweiten Prävalenz der HCV-Infektion, unter: http://www.cdc.gov/immigrantrefugeehealth/guidelines/domestic/hepatitisscreening-guidelines.html (abgerufen am 15.09.2014)

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der ausgewiesenen Hilfsmittel angefertigt habe. Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen verfügbaren Werken entnommen sind, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

[Unterschrift] Vorname Nachname

# Danksagung

Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die Schaffung der hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die Betreuung dieser Doktorarbeit.

Bei Prof. Dr. Johannes Bode bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens der vorliegenden Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Silke Hoffmann für ihre Betreuung und die vielen wissenschaftlichen Ideen und Anregungen.

Dr. Philipp Neudecker danke ich für die Unterstützung bei der Aufnahme und Auswertung von 1D-NMR-Spektren.

Bei Dr. Wolfgang Hoyer, Dr. Sameer Singh und Daniel Frenzel bedanke ich mich für die Hilfe bei experimentellen Arbeiten.

Auch Esther Jonas, Nicole Esser, Andrey Kislyannikov und Ulrike gilt ein großer Dank für die Organisation des reibungslosen Labor-Alltags.

Meinen Bürokollegen Christina Möller, Stephan Rudolph und Kun Wang danke ich für die angenehme Zeit, ein offenes Ohr und das Ertragen meiner Launen.

Stephan Weber und Laura Kukuk danke ich für spannende Diskussionen und nette Unterhaltungen, die die Wartezeiten im Labor erheblich verkürzten.

Bei Judith Fabig bedanke ich mich für die wundervollen Abende, die ich entspannt genießen konnte.

Weiterer Dank gilt allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für das nette Arbeitsklima.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meiner Familie, die mich in allen Lebensbereichen unterstützte.

Yury und Roman danke ich für das Erfüllen meines Lebens mit Sinn und Glück.

# Während dieser Arbeit wurden Beiträge zu folgenden Publikationen geleistet:

Aladağ A, Bösing C, Gremer L, Hoffmann S, Klinker S, Schwarten M, Stoldt M, **Valdau O**, Willbold D

Analysis of the Bin1 SH3 interaction with peptides derived from the hepatitis C virus protein NS5A and c-Myc reveals that NS5A can competitively displace c-Myc in vitro. European Journal of Medical Research 19(Suppl 1):S10 (2014)

Hung YF, Valdau O, Schünke S, Stern O, Koenig BW, Willbold D, Hoffmann S.

Recombinant production of the amino terminal cytoplasmic region of dengue virus non-structural protein 4A for structural studies. PLoS One, 9(1):e86482 (2014)

Stern O, Hung YF, **Valdau O**, Yaffe Y, Harris E, Hoffmann S, Willbold D, Sklan EH.

An N-terminal amphipathic helix in dengue virus nonstructural protein 4A mediates oligomerization and is essential for replication. J Virol., 87(7):4080-5 (2013)

### Posterpräsentationen:

16.-17.11.2011 Single Cell and Molecule Analysis in Münster

Poster "Biophysical characterization of the N-terminal region of Dengue virus NS4A protein" Yu-Fu Hung, Olga Valdau, Julian Glück, Pallavi Thiagarajan, Silke Hoffmann, Bernd König, Ella Sklan and Dieter Willbold

15.-16.11.2013 1. International Conference of SFB 974 "Liver Damage and Regeneration"

Poster "Insights into the structural basis of the interactions between tyrosine kinase c-Src and the Hepatitis C virus proteins NS5A and NS5B" Stefan Klinker; Olga Valdau; Lothar Gremer; Silke Hoffmann; Dieter Willbold