

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Analyse der Beeinflussung
der EGF-abhängigen zellulären Signalwege durch das
Hepatitis C Virus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Tim Karl Weitz

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Bode

Zweitgutachter: PD Dr. med. Julia Reifenberger

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	4
1.1 Das Hepatitis C Virus.....	4
1.1.1 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus.....	5
1.1.2 Der Replikationszyklus des Hepatitis C Virus	8
1.1.3 Pathophysiologie und Klinik der HCV-Infektion.....	10
1.1.4 Die zelluläre Immunantwort – eine Zusammenfassung.....	11
1.1.5 Therapie der HCV-Infektion.....	12
1.2 Der EGFR-Signalweg	14
1.3 Der PI3K-Akt-Signalweg.....	17
1.4 Der PLC γ -Signalweg	19
1.5 Modulation der PI3K/Akt- und PLC γ -abhängigen Signalübertragung durch das Hepatitis C Virus.....	22
1.6 Beschreibung der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Inhibitoren.....	23
1.7 Zielsetzung	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Materialien, Substanzen und Lösungen	25
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellbiologische Methoden	27
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.2.4 Zellproliferations-/Viabilitäts-Assays.....	34
3 ERGEBNISSE	36
3.1 Untersuchung der Relevanz des PI3K/Akt-Signalwegs für die Replikation des Hepatitis C Virus.....	36
3.1.1 Die Aktivität des EGFR und der PI3K ist für die HCV-Replikation nicht essentiell, aber für deren Steigerung unter EGF-Stimulation notwendig.....	36
3.1.2 Hemmung der PI3K hebt die verstärkte EGF-induzierte HCV-Replikation auf.....	37
3.1.3-Die HCV-induzierte konstitutive Aktivierung von Akt ist für die Replikation von HCV essentiell.....	39
3.2 Untersuchung der Relevanz des PLC γ -Signalwegs für die	43
Replikation des Hepatitis C Virus	43

3.2.1 Die EGF-induzierte Aktivierung der PLC γ wird durch HCV verstärkt	43
3.2.2 Die Aktivität von PLC- γ 1 ist für die Replikation von HCV nicht essentiell, übt jedoch tendenziell einen eher inhibitorischen Einfluss auf die virale Replikation aus	44
4 DISKUSSION	48
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	54
6 ABKÜRZUNGEN	56
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	58
8 DANKSAGUNG	65

1 EINLEITUNG

1.1 DAS HEPATITIS C VIRUS

Zu Beginn der 1970er Jahre wurde deutlich, dass ein Großteil der Fälle von Transfusions-assoziiertes Hepatitis weder durch die damals bereits bekannten Hepatitis A und B Viren, noch durch andere hepatotrope Viren wie EBV oder CMV verursacht waren. Diese Hepatitis-Fälle wurden einer neuen Krankheitsentität zugeordnet, der Non-A/Non-B-Hepatitis (NANBH), für die ein noch unbekannter Krankheitserreger verantwortlich gemacht wurde¹. Allerdings verging noch mehr als ein Jahrzehnt, bis im Jahr 1989 das Hepatitis C Virus (HCV) als Erreger der NANB-Hepatitis identifiziert und näher charakterisiert werden konnte². Bereits davor konnten jedoch mithilfe epidemiologischer Beobachtungen weitere Infektionswege oder Risikofaktoren der NANB-Hepatitis ausgemacht werden, so etwa intravenöser Drogenkonsum (IDU), berufliche Exposition gegenüber Blut und Blutprodukten und sexuelle Promiskuität³. Heute ist bekannt, dass die Hepatitis C eine globale gesundheitliche Belastung darstellt. Zwischen 130 und 170 Millionen Menschen, das heißt etwa 3 % der Weltbevölkerung, leiden an einer chronischen HCV-Infektion. 350.000 Menschen versterben jährlich an Hepatitis C. Gemeinsam mit dem Hepatitis B Virus ist das HCV die weltweit führende Ursache der Leberzirrhose und des Hepatozellulären Karzinoms (HCC). Auch in Europa ist es für 70% der Fälle von HCC verantwortlich⁴.

In Deutschland liegt die Prävalenz von HCV-Infektionen bei 0,6 % und zeigt eine mit dem Alter ansteigende Tendenz. Die Inzidenz lag 2009 bei 6,6 Neuinfektionen auf 100.000 Einwohner. Da Blutprodukte seit 1991 systematisch auf HCV getestet werden, zeigt sich bei Neuinfektionen eine Verschiebung des Hauptrisikos von Bluttransfusionen und anderen medizinischen Prozeduren hin zum intravenösen Drogenkonsum (zuletzt 34 – 45,5 % der Neuinfektionen in Deutschland). Während in Deutschland die Inzidenz rückläufig ist, steigt sie in osteuropäischen Ländern an, was besonders im Hinblick auf die stark zunehmenden Migrationszahlen relevant ist⁵.

1.1.1 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus

Beim Hepatitis C Virus handelt es sich um ein umhülltes Virus von etwa 55 bis 65 nm Durchmesser. Es besteht aus einem ikosaedrischen Nukleokapsid, das die genomische RNA enthält, und einer von der Wirtszelle stammenden Hüllmembran, in der die Glykoproteine E1 und E2 verankert sind⁶.

HCV ist molekularbiologisch der Familie der Flaviviridae zuzuordnen, der unter anderem auch das Gelbfieber- und das Denguefiebertivirus sowie die tierpathogenen Pestiviren angehören, und bildet innerhalb dieser Familie das Genus Hepacivirus. Da HCV eine hohe genetische Variabilität aufweist, wird es weiter unterteilt in sechs Genotypen, des Weiteren in Subtypen und Isolate. Auch die innerhalb eines infizierten Individuums zirkulierende Viruspopulation ist aufgrund der hohen Fehlerquote mit welcher die viruskodierte RNA-abhängige Polymerase NS5B die virale Erbinformation repliziert genetisch sehr heterogen, was durch die Bezeichnung "Quasispezies" beschrieben wird⁷.

Der in Deutschland häufigste Genotyp ist mit 67 – 80 % der chronisch Infizierten der Genotyp 1, worauf an zweiter Stelle der Genotyp 3 mit 13 bis 28 % folgt. Ebenfalls häufig ist in Deutschland der Genotyp 2 mit etwa 4 – 7 % anzutreffen. Die Verteilung ist in vielen industrialisierten Ländern ähnlich. Dabei wird seit mehreren Jahren ein Rückgang der Prävalenz des Genotyps 1b zugunsten von 1a beobachtet. Möglicherweise ist dies auf das veränderte Risikospektrum für den Erwerb einer HCV-Infektion zurückzuführen, da sowohl der Genotyp 1a als auch 3a häufiger bei Patienten mit anamnestischem intravenösen Drogenkonsum auftreten^{5,8}. Die Genotypen 4 bis 6 weisen endemische Verbreitungsgebiete auf und sind in Europa selten⁹.

Die klinische Relevanz der unterschiedlichen Genotypen wird nach wie vor diskutiert. Die Metaanalyse mehrerer Studien erbrachte jedoch für mit dem Genotyp 1b infizierte Patienten im Vergleich zu mit anderen Genotypen Infizierten ein etwa doppelt so hohes Risiko ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln¹⁰. Insgesamt ist, im Vergleich zu den Genotypen 2 und 3, für den Genotyp 1 ein deutlich schlechteres Ansprechen auf die bisherige duale Standardtherapie mit Ribavirin und pegyliertem Interferon- α bekannt¹¹.

Das Genom des Hepatitis C Virus besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül positiver Polarität mit einer Länge von circa 9.600 Nukleotiden. Dieser kodiert für einen einzelnen offenen Leserahmen (ORF), der in ein etwa 3.000 Aminosäuren

langes Polyprotein translatiert wird und von den 5'- und 3'-nichtkodierenden Sequenzen flankiert wird. Die *internal ribosomal entry site* (IRES), durch die die ribosomale Bindung der viralen RNA und ihre Translation in das Polyprotein vermittelt wird, befindet sich in der 5'-nichtkodierenden Region.

Bei der ko- und posttranslationalen Prozessierung des HCV-Vorläuferproteins durch zelluläre und virale Proteasen entstehen die reifen strukturellen und nicht-strukturellen viralen Proteine, wobei sich die strukturellen Proteine am N-Terminus des Vorläuferproteins befinden. Die Prozessierung der vier strukturellen Proteine Core, E1, E2 und p7 durch Abspaltung vom Polyprotein erfolgt durch zelluläre Signalpeptidasen, die nicht-strukturellen Proteine werden dagegen durch viruseigene Proteasen freigesetzt.

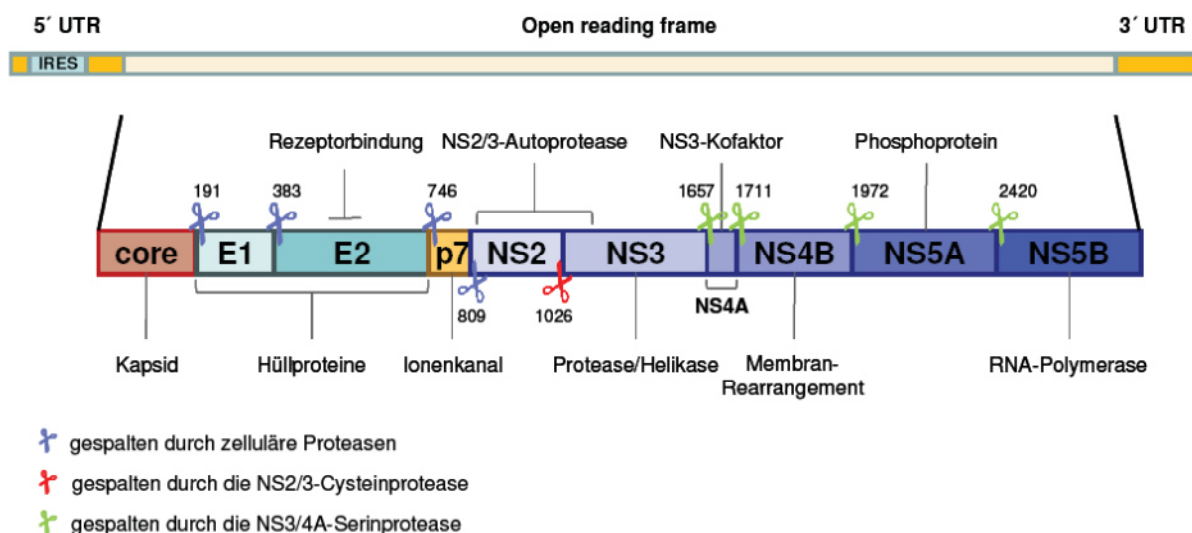


Abb. 1.1 Aufbau des HCV-Genoms und Prozessierung des HCV-Polyproteins. Die genetische Information des Hepatitis C Virus befindet sich auf einem einzelsträngigen, positiv polarisierten RNA-Molekül mit einer Länge von ~ 9.600 Basen. Die IRES, über die die für die Translationsinitiation essentielle Bindung an die Ribosomen vermittelt wird, ist in der 5'-UTR lokalisiert. Der von den 5'- und 3'-nichtkodierenden Regionen (5', 3'-UTR) flankierte offene Leserahmen kodiert für das ca. 3.000 Aminosäuren lange HCV-Polyprotein, durch dessen ko- und posttranslationelle Prozessierung die reifen strukturellen (Core, E1, E2 und p7) und nicht-strukturellen (NS2 bis NS5B) HCV-Proteine entstehen. Die an den jeweiligen Spaltungsstellen des Polyproteins agierenden Proteasen sind durch unterschiedliche Farbgebung kenntlich gemacht. (modifizierte Abbildung aus *Bode et al.*¹²)

Das Core-Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa stellt den Hauptbestandteil des viralen Nukleokapsids dar und besitzt in dieser Funktion die Fähigkeit zur Bildung von Homooligomeren und zur RNA-Bindung. Während seines von der Signalpeptid-Peptidase der Wirtszelle katalysierten Reifungsprozesses wird Core zu

sogenannten Lipid Droplets, das heißt zellulären Fettspeicherorganellen transportiert, wo die Zusammensetzung der Viruspartikel stattfindet.

Im HCV-Polyprotein folgen auf Core die beiden Hüllproteine E1 und E2, die für die Bindung des Hepatitis C Virus an Oberflächenrezeptoren und für seinen Eintritt in die Wirtszelle verantwortlich sind. Sie sind hochgradig glykosyliert und mit ihren Transmembran-Domänen in der Hüllmembran des Virus verankert, wo sie Heterodimere bilden.

Das kleine Protein p7 ist in das endoplasmatische Retikulum eingelagert und weist eine Ionenkanalaktivität auf. Während es für die Replikation von HCV verzichtbar ist, spielt es offenbar eine essentielle Rolle bei der Bildung infektiöser Viruspartikel.

Die Freisetzung der C-terminal folgenden sechs nicht-strukturellen Proteine des Hepatitis C Virus aus dem Vorläuferprotein erfolgt durch viral kodierte Proteasen. Die NS2/NS3-Bindungsstelle wird autoproteolytisch durch die zinkabhängige Cysteinprotease NS2/3 gespalten. Die C-terminal folgenden Proteine NS4A, 4B, 5A und 5B werden alle durch die Serinprotease NS3/4A freigesetzt. Während für NS2 die proteolytische Spaltung des viralen Polyproteins zwischen NS2 und NS3 die einzige bekannte Funktion ist, besitzt NS3 mehrere enzymatische Aktivitäten. An seinem N-Terminus befindet sich die ebenfalls zinkabhängige Serinprotease, für deren optimale Aktivität die Komplexbildung mit dem Kofaktor NS4A notwendig ist. Dieser verankert mithilfe einer N-terminalen hydrophoben Domäne NS3 an intrazellulären Lipidmembranen im Bereich des endoplasmatischen Retikulums¹³. Über seinen C-Terminus reguliert NS4A den Phosphorylierungszustand von NS5A. NS3 besitzt C-terminal eine RNA-Helikase/NTPase-Aktivität, die die Energie aus NTP-Hydrolyse zur Entwindung von RNA- und DNA-Homo- und Heterodimeren verwendet. Ihre genaue Funktion ist noch unbekannt.

Das integrale Membranprotein NS4B ist in der Lage, die Bildung von einfachen Membranvesikeln aus intrazellulären Membranen zu induzieren, die Bestandteile des als *membranous web* bezeichneten membranösen Gerüsts sind, in dem die HCV-Replikation stattfindet¹⁴. Auch seine RNA-bindenden Eigenschaften sind für die Replikation bedeutsam.

Das ebenfalls membranassoziierte Protein NS5A besitzt zahlreiche Serin- und Threoninreste, und liegt in hyperphosphoryliertem (58kDa) und hypophosphoryliertem (56kDa) Zustand vor. Welche zellulären Kinasen für die Phosphorylierung von NS5A verantwortlich sind, ist noch nicht abschließend

beantwortet. Lediglich für die Casein-Kinase I- α (CKI) und II, sowie für die Serin/Threonin-Kinase Polo-like-Kinase (Plk) ist bisher sicher nachgewiesen, dass sie NS5A phosphorylieren^{15,16,17}. Die funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen Phosphorylierungszustände von NS5A ist bisher nicht gut verstanden, scheint aber mit den zahlreichen für die Replikation von HCV und die Produktion infektiöser viraler Partikel essentiellen Interaktionen zwischen NS5A und zellulären Proteinen in Zusammenhang zu stehen. Für die hyperphosphorylierte p58-Form von NS5A wird eine negativ regulatorische Funktion bei der HCV-Replikation angenommen^{18,19}. Daneben kann NS5A die Entstehung intrazellulärer Doppelmembranvesikel induzieren, ist jedoch nicht alleine zur Bildung des *membranous web* in der Lage. An dessen Entstehung sind sicherlich neben NS4B und NS5A mehrere nichtstrukturelle HCV-Proteine beteiligt¹⁴.

Bei NS5B schließlich handelt es sich um die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP), die zentral für die Replikation der viralen RNA ist. Über eine C-terminale α -Helix ist NS5B ebenfalls zusammen mit den anderen nichtstrukturellen HCV Proteinen in der umorganisierten Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert und bildet mit diesen den Replikationskomplex. NS5B bindet einzelsträngige RNA in seinem aktiven Zentrum und kann RNA primerabhängig oder –unabhängig synthetisieren. Dabei wird die HCV-Replikation ähnlich wie bei anderen Plusstrang-RNA-Viren an einem Multiproteinkomplex, der sogenannten Replikase, initiiert^{20, 21}.

1.1.2 Der Replikationszyklus des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist hepatotrop, befällt also vor allem Hepatozyten. Daneben repliziert es aber auch in dendritischen Zellen und B-Zellen. Neben dem Menschen ist der Schimpanse die einzige Spezies, bei der HCV-Infektionen ebenfalls bekannt sind.

Die beiden in der Hüllmembran eingebetteten Glykoproteine E1 und E2 spielen durch ihre Interaktionen mit verschiedenen zellulären Oberflächenmolekülen eine essentielle Rolle beim Eintritt des Hepatitis C Virus in die Wirtszelle. Als erster Schritt der HCV-Infektion erfolgt das Abfangen im Plasma zirkulierender Virionen in den Lebersinusoiden und ihre Annäherung an die Hepatozyten. Hierbei haben offenbar die auf Leberendothelien bzw. Kupffer-Zellen exprimierten Mannose-bindenden Lektine L-SIGN (*liver/lymph node specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing*

nonintegrin) und DC-SIGN (*dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) wegen ihrer hohen Affinität für E2 entscheidende Bedeutung. Daneben ist der Hepatotropismus des HCV möglicherweise durch leberspezifische Glykosaminoglykan-Muster in Form von Heparansulfaten zu erklären. Glykosaminoglykane dienen vielen Viren als erste Bindungsstellen an ihren Wirtszellen.

Nach erfolgter viraler Bindung an den Hepatozyten sind verschiedene zelluläre Oberflächenmoleküle für die Initiation der HCV-Infektion verantwortlich. Unter anderem ist das Tetraspanin CD81 zu nennen, ein weitverbreitetes multifunktionales Oberflächenprotein. Die von CD81 mit dem Tight Junction-Protein Claudin-1 gebildeten Komplexe sind für den Eintritt von HCV in die Wirtszelle essentiell, möglicherweise initiieren sie diesen²². Auch der vor allem in der Leber und einigen endokrinen Drüsen exprimierte Scavenger-Rezeptor Klasse I Typ B (SR-BI) bindet an E2 und spielt beim viralen Eintritt in die Zelle eine wichtige Rolle. Als Rezeptor für die Lipoproteine HDL, LDL und VLDL ist SR-BI am transmembranären Transport von Cholesterin beteiligt. Eine große Fraktion der im Plasma zirkulierenden Hepatitis C Viren ist an Lipoproteine gebunden und wird daher möglicherweise SR-BI-vermittelt gemeinsam mit diesen über clathrinabhängige Endozytose in die Wirtszelle eingeschleust²³. Bei diesem Prozess spielen auch die Tyrosinkinaseaktivitäten des EGF-Rezeptors und von EphA2 eine essentielle Rolle. Besondere Bedeutung scheint hierbei die durch EGFR regulierte oben erwähnte Assoziation von CD81 mit Claudin-1 zu haben. Daneben ist die Aktivität von EGFR und EphA2 bei der Glykoprotein-vermittelten Membranfusion erforderlich²⁴.

Das nun in Endosomen in der Wirtszelle vorliegende Nukleokapsid wird nach endosomaler pH-Absenkung in das Zytoplasma freigesetzt und gibt die positivsträngige virale RNA ab. Diese fungiert als mRNA für die nun folgende Translation des HCV-Polyproteins, die an der hochkonservierten IRES (= Internal ribosome entry site) in der 5'-nichtkodierenden Region initiiert wird. Aufgrund der zwischen Core und E1 lokalisierten Signalsequenz transloziert das Polyprotein zur Membran des rER, wo die weitere Proteinsynthese stattfindet. Wie bereits beschrieben sind zelluläre und virale Peptidasen an der Entstehung der reifen HCV-Proteine beteiligt, die über Membrananker an die ER-Membran gebunden sind. Die auf der zytoplasmatischen Seite in der ER-Membran verankerte RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B katalysiert nun in zwei Schritten die Replikation des HCV-

Genoms. Zunächst entsteht ein negativsträngiges Zwischenprodukt, welches wiederum als Vorlage für die Erzeugung zahlreicher positivsträngiger HCV-Genome fungiert, die ihrerseits entweder als Modell für die weitere HCV-Replikation dienen oder in neu entstehende HCV-Viren verpackt werden. Dieser Prozess findet in einem Replikationskomplex statt, der die nichtstrukturellen HCV-Proteine, zelluläre Faktoren, sowie die naszenten RNA-Stränge beinhaltet und in das *membranous web*, ein Gerüst aus Membranvesikeln, die dem endoplasmatischen Retikulum entstammen, eingebettet ist. Wie oben bereits ausgeführt, wird NS4B für die hierfür notwendigen Membranalterationen verantwortlich gemacht.

Der Prozess des Zusammenbaus und der Freisetzung reifer Virionen ist noch nicht abschließend verstanden. An seinem Beginn steht vermutlich die Interaktion von Core mit genomischer viraler RNA. Dabei oligomerisieren die Core-Proteine zu sphärischen RNA-beihaltenden Nukleokapsiden von circa 60 nm Durchmesser. Das *budding* des Hepatitis C Virus in das ER-Lumen wird durch Core induziert und resultiert in der Abschnürung behüllter Viruspartikel, die über den Golgi-Apparat aus der Zelle geschleust werden^{25,26}.

1.1.3 Pathophysiologie und Klinik der HCV-Infektion

Die Erstinfektion mit dem Hepatitis C Virus verläuft in 75 % asymptomatisch, dennoch kommt es bei 60 - 80 % der Infizierten zu einer auf eine Hepatitis hinweisenden laborchemischen Erhöhung der Leberenzyme ALT und AST. 25 % der Infektionen verlaufen symptomatisch mit dem klinischen Bild einer akuten Hepatitis mit Ikterus, unspezifische Myalgien und Abgeschlagenheit. Eine Virämie ist etwa ab dem zweiten bis 14. postexpositionellen Tag nachweisbar und nach drei Wochen bis vier Monaten treten HCV-Antikörper im Serum auf. Die aus der hohen Fehlerquote der RNA-abhängigen viralen Polymerase NS5B resultierende hohe Mutationsrate von HCV mit Auftreten multipler Quasispezies ist wesentlich für die Fähigkeit von HCV verantwortlich, die adaptive Immunantwort des Wirtes zu unterlaufen und damit einer der Hauptgründe dafür, dass es in 75 % der Fälle zur Chronifizierung der Infektion kommt. Bei einem Drittel der chronisch Infizierten, definiert durch eine Infektionsdauer von über sechs Monaten, kommt es zu fortschreitenden Leberschäden und bei 18 % der Patienten liegt nach etwa 10 Jahren eine Leberzirrhose vor. Das jährliche Risiko zur Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms beträgt bei Leberzirrhose etwa 5 %. Zahlreiche patientengebundene,

virale und Umgebungsfaktoren sind Indikatoren für die Entwicklung von Spätkomplikationen. Unter anderem wirken sich ein Alter von über 40 Jahren zum Zeitpunkt der Erstinfektion, männliches Geschlecht, exzessiver Alkoholkonsum, Koinfektionen mit HIV oder HBV sowie metabolische Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus negativ auf den Infektionsverlauf aus. Der zytopathogene Effekt des HCV selbst ist dabei gering. Zu der chronischen Leberschädigung kommt es vielmehr infolge der kontinuierlichen Infiltration der Leber mit Zellen des angeborenen Immunsystems und zytotoxischen T-Zellen. Diese weisen aufgrund von viral induzierten Veränderungen inadäquate Chemokin-Rezeptor-Muster auf und sind nicht in der Lage, infizierte Hepatozyten spezifisch zu erkennen und zu eliminieren. Hierfür ist neben der gezielten Beeinflussung der Immunregulation von angeborener und adaptiver Immunität durch virale Faktoren²⁷ insbesondere auch die bereits oben beschriebene, ständige Ausbildung neuer viraler Quasispezies mit der Entstehung einer Vielzahl von sogenannten Escape Mutanten verantwortlich²⁸. Dies kulminiert schließlich in einem Phänomen, welches auch als *T-cell exhaustion* beschrieben wird²⁹. Infolge dieser ineffizienten T-Zell Aktivierung kommt es schließlich zu einer unspezifischen Entzündung ohne wirksame Elimination des HCV³⁰. Chronisch HCV-Infizierte weisen zwar eine relativ hohe 10-Jahres-Überlebensrate von 80 % auf, diese reduziert sich jedoch drastisch auf 20 - 30 % sobald Zeichen der Leberdekomensation auftreten^{31,32}.

1.1.4 Die zelluläre Immunantwort – eine Zusammenfassung

Zentraler Schritt in der initialen Bekämpfung viraler Infektionen ist die Freisetzung von Typ-1-Interferonen, in deren Folge ein antiviraler Zustand in der infizierten Zelle und dem umgebenden Gewebe induziert wird.

Am Beginn der angeborenen antiviralen Immunantwort stehen spezielle Rezeptoren (PRR = *pattern recognition receptors*), die organismusfremde, in der Wirtszelle freigesetzte virale Komponenten (sog. PAMP = *pathogene-associated molecular patterns*) erkennen und die Bekämpfung viraler Infektionen in Gang setzen können. Typische virale PAMPs sind einzel- und doppelsträngige RNA (ss bzw. ds RNA) oder nicht-methylierte CpG-Motive. Bei der Infektion von Hepatozyten mit RNA-Viren wie HCV besonders wichtige Sensoren sind Mitglieder der Familie der RIG-I-Typ-Helikasen, die virale RNA im Zytoplasma binden, während die Toll-like Rezeptoren (TLR) 3 und 7, durch endosomal vorhandene Liganden aktiviert werden³³. Nach

Detektion ihres Liganden initiieren die Rezeptoren mehrere Signalkaskaden, die in der Expression und Sekretion von Typ-1-Interferonen resultieren. Neben weiteren Transkriptionsfaktoren ist hieran insbesondere die Aktivierung von *Interferon response factor* (IRF) 3 sowie NFκB beteiligt.

In der frühen Phase der Interferonantwort dominiert Interferon-β (IFNβ), das wie alle Typ-1-Interferone auto- und parakrine Wirkungen aufweist und unter anderem über die verstärkte Expression von IRF7 die Produktion von IFNα bewirkt. Über einen auf diese Weise sich selbst verstärkenden Mechanismus induzieren IFNα und β gemeinsam die Expression von über 300 sog. IFNα/β-stimulierten Genen (ISGs). Von diesen kodieren zahlreiche für Genprodukte mit direkter antiviraler Wirkung, wie die Proteinkinase R (PKR) oder die 5'-3'-Oligoandenylyltransferase (OAS), und versetzen auf diese Weise die Wirtszelle in einen antiviralen Zustand. Neben der Induktion direkter antiviraler Effektormechanismen kommt es zur parakrinen Stimulation umgebender Zellen und hierdurch zur Limitation der Ausbreitung der Infektion. Zusätzlich sind die Typ-1-Interferone neben anderen Faktoren mitverantwortlich für die Aktivierung und Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunität und für die Induktion einer adaptiven erregerspezifischen zellulären Immunantwort. Mitglieder der Familie der Typ-1-Interferone sind damit essentiell für die effiziente Ausbildung einer antiviralen Immunantwort, wie auch durch entsprechende Untersuchungen an Knockout-Tieren belegt wurde³⁴.

1.1.5 Therapie der HCV-Infektion

Die bisherige Standardtherapie zur Behandlung einer HCV-Infektion besteht in einer Kombination aus pegyliertem Interferon-α (Peg-IFNα) (2a oder 2b) und dem Purinanalogon Ribavirin. Die Therapie wurde bislang bei allen chronisch Infizierten Patienten mit positivem HCV-Antikörperstatus und Nachweis von HCV-RNA im Serum empfohlen. Interferone werden intestinal nicht resorbiert und müssen parenteral verabreicht werden. Pegyliertes, d.h. mit Polyethylenglykol konjugiertes Interferon weist vor allem aufgrund seiner langen Halbwertszeit von 90 Stunden deutlich bessere pharmakokinetische Eigenschaften auf als Standard-Interferon. Da es nur einmal wöchentlich verabreicht werden muss, konnte durch Einführung von Peg-IFN ferner die Therapie-Compliance bei Hepatitis C-Patienten wesentlich gebessert werden³⁵. Compliance-mindernd wirken sich dagegen die Nebenwirkungen der dualen Standardtherapie aus, die von typischen Symptomen eines

grippalen Infekts, wie Erschöpfung, Fieber und Myalgien, über Depressionen und Reizbarkeit bis hin zur Knochenmarksuppression mit Anämie, Thrombopenie und/oder Leukopenie reichen. Ribavirin unterdrückt die Replikation mehrerer RNA-Viren unter anderem über kompetitive Hemmung der RNA-Polymerase oder Induktion viraler Mutationen und wird als Kombinationspartner mit Peg-IFN empfohlen^{36,37}. Die Therapiedauer ist abhängig vom Genotyp und vom Therapieansprechen. Die Standardtherapiedauer beträgt bei einer Infektion mit den viralen Genotypen 2 oder 3 24 Wochen und bei einer Infektion mit Genotyp 1 48 Wochen.

Ziel der Therapie ist die dauerhafte Viruselimination (SVR = *sustained virological response*), bei der auch 6 Monate nach Therapieabschluss keine virale RNA im Serum nachweisbar ist. Die erfolgreiche Therapie reduziert das Risiko der Spätfolgen der Hepatitis C-Erkrankung. Unter dem bisherigen Interferon-basierten Therapieschema wird dies in etwa 75 % der mit den Genotypen 2 oder 3 infizierten Patienten erreicht, bei den mit Genotyp 1 Infizierten dagegen nur in etwa 50 %⁵. Wesentlich höher liegen die Therapieerfolgsraten mit 90 % bei Therapiebeginn im akuten Stadium der HCV-Infektion. Dagegen wird teilweise auch angesichts einer Spontanheilungsrate von 25 % bei Patienten mit symptomatischer akuter Hepatitis C empfohlen, in diesen Fällen zur Vermeidung der Nebenwirkungen eine Interferontherapie erst bei Viruspersistenz nach 12 Wochen zu beginnen³⁷.

Wegen der vor allem beim Genotyp 1 relativ geringen Erfolgsrate und der zum Teil ausgeprägten Nebenwirkungen der dualen Standardtherapie wird intensiv nach neuen Behandlungsmöglichkeiten gesucht. Eine Option, die erst möglich wurde durch die Entwicklung von Zellkultursystemen, die die Untersuchung der viralen Replikation wie auch des viralen Lebenszyklus *in vitro* erlaubten³⁸.

Seit ihrer Markteinführung im Jahr 2012 wurde die anerkannte Standardtherapie um die ersten HCV-spezifischen Medikamente Telaprevir und Boceprevir erweitert. Es handelt sich hierbei um Inhibitoren der NS3/4A-Protease in ihrem aktiven Zentrum, die in Kombination mit den bisher üblichen Wirkstoffen als Tripeltherapie eingesetzt werden. Hierdurch lässt sich auch bei Patienten, die mit dem Genotyp 1 infiziert sind, in 70 bis 85% der Fälle eine dauerhafte Viruselimination erreichen. Allerdings ist diese Tripeltherapie nur bei Genotyp 1 effektiv und geht zudem mit neuen Nebenwirkungen und Resistenzentstehung einher³⁹.

Zu Beginn des Jahres 2014 wurden die Therapieoptionen durch die beschleunigte Zulassung der NS3-Proteaseinhibitoren Simeprevir, den nukleosidischen NS5B-Polymeraseinhibitoren Sofosbuvir⁴⁰, in verschiedenen Kombinationen mit und ohne Interferon, sowie den Inhibitor des NS5A-Replikationskomplexes Daclatasvir erweitert. Die Studien zu einigen der neuen Interferon-freien Therapieregime zeigen teilweise wesentlich höhere SVR-Raten von bis zu 98 % (beispielsweise Sofosbuvir plus Daclatasvir⁴¹). Zudem zeichnet sich bereits ab, dass in vielen Fällen eine verkürzte Therapiedauer von 12 Wochen bereits ausreicht, um diese SVR-Raten zu erzielen⁴².

Auch synthetische Agonisten der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) 7 und 9 oder RNA-basierte Substanzen, wie gegen die HCV-RNA gerichtete siRNA oder Antisense-Oligonukleotide, werden gegenwärtig als alternative Therapiemöglichkeiten untersucht⁴³.

Es ist davon auszugehen, dass künftig extrem effiziente und vergleichsweise nebenwirkungsarme Therapien zur Verfügung stehen werden und sich die rein orale Applikation und eine kürzere Therapiedauer positiv auf die Compliance auswirken werden^{44,45}.

Welcher Stellenwert der Entwicklung resistenter Viruspopulation unter einer Therapie mit DAADs zukommen wird, ist noch schwierig abschätzbar und Gegenstand der aktuellen Forschung. Die Entwicklung resistenter Viruspopulationen wird durch die Tatsache begünstigt, dass das HCV Genom einem starken Mutationsdruck unterliegt, welcher durch die hohe Fehlerquote der HCV kodierten RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B bedingt ist. Es ist daher durchaus wahrscheinlich, dass die Resistenz-Entwicklung in der Therapie mit DAADs ein therapierelevanter Aspekt bleiben wird.

1.2 Der EGFR-Signalweg

Rezeptortyrosinkinasen sind für die Vermittlung einer Vielzahl von Signalen im Rahmen von Zellwachstum und -differenzierung, Motilität und Apoptose verantwortlich und sind etwa 20 Untergruppen zuzuordnen. Hierzu zählt die EGFR-Subfamilie, der neben dem EGFR (auch ErbB1 oder Her1 genannt) auch die Rezeptoren ErbB2 bzw. Her2/neu, ErbB3/Her3 und ErbB4/Her4 angehören. Mindestens acht Peptide sind bekannt, die zu den EGF-ähnlichen

Wachstumsfaktoren zählen und endo-, para- oder autokrin Rezeptoren der EGFR-Subfamilie aktivieren. Unter anderem sind dies der epidermale Wachstumsfaktor EGF, TGF- α , Amphiregulin, Epiregulin, β -Cellulin, Epigen, Heregulin oder auch Neuregulin und Heparin-bindendes EGF (HB-EGF). Ihre Synthese erfolgt in Form von an die Zellmembran gebundenen Vorläuferproteinen, aus denen die reifen Rezeptorliganden durch die Aktivität von Metalloproteasen der ADAM-Familie in einem als *shedding* bezeichneten Prozess freigesetzt werden. Die verschiedenen EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren weisen jeweils eine Affinität zu spezifischen Mitgliedern der EGFR-Familie auf und aktivieren daher auch verschiedene intrazelluläre Signalwege.

Die ErbB-Rezeptoren sind in ihrem Aufbau nahe verwandt und besitzen je eine extrazelluläre Liganden-bindende Domäne, eine Transmembran-Domäne, eine zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne, sowie mehrere ebenfalls zytoplasmatisch am C-Terminus lokalisierte phosphorylierbare Tyrosin-Reste. ErbB2 unterscheidet sich von diesem Aufbau durch das Fehlen der Ligandenbindungsstelle, während ErbB3 keine funktionstüchtige Tyrosinkinasedomäne besitzt.

Bei Bindung eines Liganden an die bereits als Homo- und Heterodimere vorliegenden ErbB-Rezeptoren kommt es infolge von Konformationsänderungen zur Aktivierung der Tyrosinkinasedomänen und zur C-terminalen Trans- und Autophosphorylierung der interagierenden Rezeptoren. Die so entstehenden Phosphotyrosinreste bilden Bindungsstellen für SH(*Src-homology*)²- und PTB(*phosphotyrosine-binding*)-Domänen enthaltende Proteine. Einige davon sind selbst Enzyme, die durch den ErbB-Rezeptor phosphoryliert und aktiviert werden, andere wirken dagegen als Adaptormoleküle, die den Rezeptor mit weiteren Signalwegen verbinden.

Je nach gebundenem Ligand und beteiligten ErbB-Subtypen werden unterschiedliche Tyrosinreste phosphoryliert und dementsprechend andere Signalkaskaden bedient. Aus den vielen möglichen Kombinationen von Liganden und Dimerisierungspartnern resultieren die Komplexität des Netzwerks nachgeschalteter Signalwege und die große Zahl unterschiedlicher, durch die ErbB-Rezeptoren initiiertes zellulärer Reaktionen. Hier können nur exemplarisch einige der an den aktivierten EGF-Rezeptor rekrutierten Interaktionspartner genannt werden. So bewirkt Shc (*Src homology domain c-terminal adaptor*) nach seiner Bindung an den EGFR über mehrere Zwischenstufen die Aktivierung des MAPK-Signalwegs⁴⁶. Die

Proteinkinase c-Src (*Rous sarcoma* oncogene) interagiert bidirektional mit dem EGFR, indem sie von ihm phosphoryliert und aktiviert wird und ihrerseits wiederum den Rezeptor phosphoryliert und so dessen Aktivität steigert⁴⁷. Am Ende dieser Signalkaskaden steht die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Genen regulieren, welche die Progression des Zellzyklus, das Zellüberleben, die Differenzierung und Zellmigration beeinflussen^{48,49}. Um eine überschießende Aktivierung proliferativer und letztlich onkogener Signalwege durch den EGFR zu verhindern, existieren zahlreiche negative Regulatoren, die nach Rekrutierung an den Rezeptor beispielsweise seine Degradation verursachen oder ihn dephosphorylieren^{50, 51, 52}.

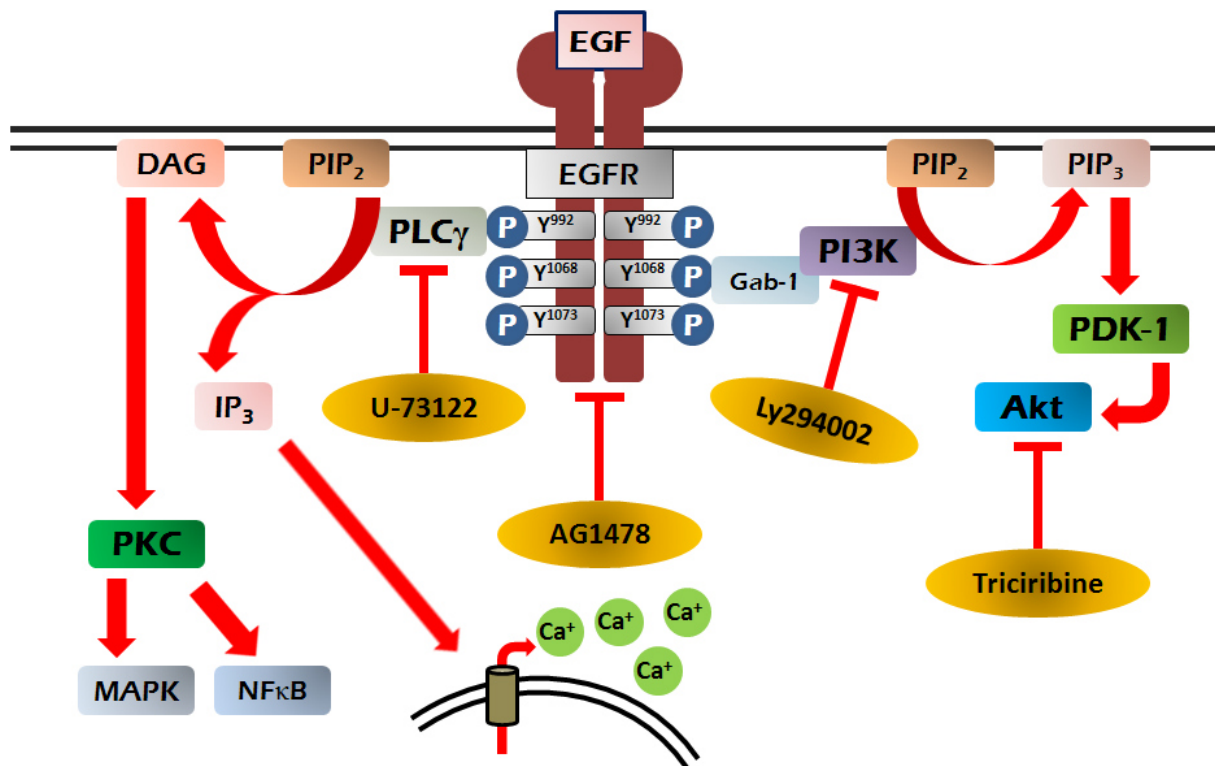


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der EGF-induzierten Signalantwort mit den Angriffspunkten der Inhibitoren AG1478, Ly294002, Triciribine und U-73122. Die Bindung von EGF und anderer Wachstumsfaktoren an ein EGFR-Dimer bewirkt dessen Aktivierung, Autophosphorylierung und unter anderem die Aktivierung der PI3K/Akt- und der PLCγ-Signalkaskade. Die roten Balken markieren die durch die eingesetzten Inhibitoren gehemmten Enzyme. (abgeändert nach Brenndörfer ED. *Modulation der intrahepatischen Signalvermittlung durch die NS3/4A Protease/Helikase des Hepatitis C Virus. Inauguraldissertation, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*)

1.3 Der PI3K-Akt-Signalweg

Die Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) wird in 4 Klassen eingeteilt. Die Mitglieder der Klasse 1 sind alle aus einer regulatorischen Untereinheit mit mehreren SH2-Domänen und einer katalytischen Untereinheit aufgebaut. Die katalytische Einheit existiert in vier Isoformen, die für die weitere Einteilung der Klasse I in die Subklassen Ia und Ib entscheidend sind. Durch Zytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren wie EGF werden die PI3K der Klasse 1 aktiviert. Hierbei bindet die regulatorische Untereinheit über ihre SH2-Domänen an Phosphotyrosinreste der entsprechenden Rezeptortyrosinkinasen und aktiviert in der Folge die katalytische Untereinheit der Lipidkinase PI3K, die Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat in der Zellmembran zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) umwandelt. Das Enzym PDK(*phosphoinositide-dependent kinase*)-1 und dessen Substrat Akt werden durch PIP₃ an die Zellmembran rekrutiert und aktiviert. Negativ reguliert wird dieser Signalweg unter anderem durch PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), welches PIP₃ dephosphoryliert⁵³.

Bei Akt handelt es sich um eine aus drei Domänen aufgebaute Serin/Threonin-Kinase, die in drei Isoformen existiert. Während Akt1 ubiquitär exprimiert wird, findet sich Akt2 vor allem in Insulin-sensiblen Geweben, wie der Skelettmuskulatur, dem Fettgewebe und der Leber. Akt3 wird am stärksten im Gehirn exprimiert und scheint eine wichtige Rolle bei höheren Gehirnfunktionen zu spielen. Neben der Kinasedomäne besitzt Akt eine C-terminale hydrophobe Domäne sowie eine N-terminale PH(*pleckstrin homology*)-Domäne, die durch ihre Affinität zu PIP₃ für die Rekrutierung von Akt an die Zellmembran verantwortlich ist. Die von PDK-1 katalysierte Phosphorylierung an Threonin 308 aktiviert Akt. Seine volle Aktivität erreicht es jedoch erst nach der Phosphorylierung an Serin 473 in der hydrophoben Domäne, die vermutlich durch mTORC2 (mTOR-Komplex 2) katalysiert wird^{54,55}.

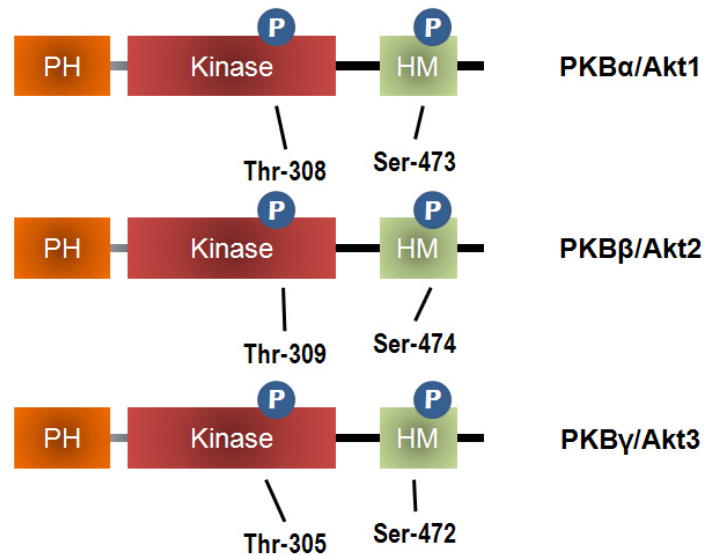


Abb. 1.3 Domänenstruktur der Akt-Isoformen. Alle drei Isoformen von Akt sind ähnlich aufgebaut: Auf die Amino-terminale PH-Domäne, die für die Interaktionen von Akt mit der Zellmembran und vermutlich auch mit Akt-Kinasen verantwortlich ist, folgt die zentrale Kinase-Domäne. Diese ist hochkonserviert und mit der anderer Mitglieder der AGC-Kinase-Familie verwandt. Am Carboxy-Terminus befindet sich ein hydrophobes Motiv (HM), welches für die Kinase-Aktivität von Akt essentiell ist. Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung eines in der Kinase-Domäne lokalisierten Threonin-Rests und eines Serin-Rests im hydrophoben Motiv. (Abbildung übernommen und modifiziert aus⁵⁶)

Über seine zahlreichen Substrate greift Akt auf komplexe Weise in die Zellbiologie ein. Eine wichtige Funktion von Akt ist die Regulation der zellulären Glukosehomöostase, indem es auf Effektorproteine wie die Glukosetransporter (GLUT) oder die Glykogensynthese Einfluss nimmt und somit die Glukoseaufnahme, Glykolyse und Glykogensynthese steigert. Zudem spielt Akt eine zentrale Rolle im Zellzyklus, -wachstum und -überleben. Durch Phosphorylierung von BAD (*Bcl2-antagonist of death*) fördert es beispielsweise die Aktivität von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen. Gleichzeitig inhibiert Akt über seinen Einfluss auf die FoxO-Transkriptionsfaktoren die Expression proapoptotischer Gene. Die stressinduzierte Apoptose wird durch Akt über seinen negativen Einfluss auf die SAPK/MAPK (*stress-activated/mitogen-activated proteinkinase*)-Signalkaskade unterdrückt⁵⁴.

Desweiteren reguliert Akt auch das Wachstum und Volumen der Zelle über die Kinase mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), welche als Bestandteil des mTORC (mTOR-Komplex) 1 nach Akt-vermittelter Aktivierung eine gesteigerte Proteinsynthese induziert⁵⁷. Gerade bei der Regeneration von Leberdefekten übernimmt die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade eine essentielle Funktion durch

Förderung der Zellzyklusprogression und Proliferation, des Wachstums und Überlebens von Hepatozyten⁵⁵.

Eine gesteigerte Aktivität von Akt ist allerdings auch bei der Entstehung maligner Tumoren mitentscheidend. Verschiedene Mutationen sowohl von Akt selbst, als auch von Proteinen, die bei der Regulation von Akt beteiligt sind, werden in Tumoren gehäuft beobachtet. Zudem fördert eine übermäßige Aktivierung von Akt unter anderem die Metastasierung und gilt als negativer prognostischer Faktor bei Krebserkrankungen⁵⁴. Auch in der Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms ist der PI3K/Akt-Signalweg bedeutend, wobei unter anderem der chronische Entzündungsreiz durch Leberoxen eine Rolle spielt. Für das Hepatitis B Virus wurde eine Suppression des negativen Akt-Regulators PTEN beobachtet. Die PI3K/Akt-Signalkaskade wird derzeit als Ziel zukünftiger medikamentöser Antitumorthérapien erforscht⁵⁸.

1.4 Der PLC γ -Signalweg

Für die Signalübertragung von Rezeptortyrosinkinasen und speziell auch von Mitgliedern der ErbB-Rezeptorfamilie spielt neben c-Src und der PI3-Kinase-abhängigen Signalvermittlung, die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) eine wichtige Rolle. Stimuliert durch Wachstumsfaktoren, Hormone oder Neurotransmitter hydrolysiert dieses Enzym in der Zellmembran enthaltenes Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu den zwei sekundären Botenstoffen Diacylglycerin (DAG), einem direkten Aktivator der Proteinkinase C (PKC), sowie Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃), das einen Anstieg der zytosolischen Konzentration an Ca²⁺ bewirkt.

Bisher sind 10 Isoformen der Phospholipase C bekannt, die in die Gruppen β , γ und δ eingeteilt werden, je nach der intramolekularen Lokalisation ihrer X- und Y-Domänen. Diese beiden Domänen bilden gemeinsam das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms, welches bei allen Isoformen eine große Ähnlichkeit aufweist. Unterschiede zwischen den einzelnen Isoenzymen liegen desweiteren in ihrer Gewebeverteilung, ihrer subzellulären Lokalisation, ihren Aktivierungsmechanismen und den von ihnen initiierten zellulären Reaktionen. Zur PLC γ gehören zwei Subtypen, deren gemeinsames Merkmal ihre Aktivierung infolge Phosphorylierung durch Rezeptor- und Nicht-Rezeptortyrosinkinasen ist. Für die Produktion von IP₃ ist

hierbei die Tyrosinphosphorylierung der PLC γ an Tyr783 notwendig. Erst durch zusätzliche Phosphorylierung an Tyr1254 erreicht die PLC γ ihre maximale enzymatische Aktivität. Verschiedene Domänen der PLC γ sind für ihre Regulation und zahlreichen Interaktionen mit Proteinen und Membranlipiden verantwortlich. Mithilfe seiner beiden SH2-Domänen, die eine Affinität für Phosphotyrosinsequenzen besitzen, erfolgt die Bindung an den C-Terminus von aktivierten EGF-Rezeptoren, von denen PLC γ seinerseits durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert wird. Gleichzeitig transloziert PLC γ durch Vermittlung seiner PH-Domänen aus dem Zytosol an die Plasmamembran, wo sich das Substrat PIP $_2$ befindet. Auch die C2-Domänen der PLC γ interagieren mit Membranphospholipiden. Die SH3-Domäne der PLC γ ist für den mitogenen Effekt des Signalenzymess essentiell.

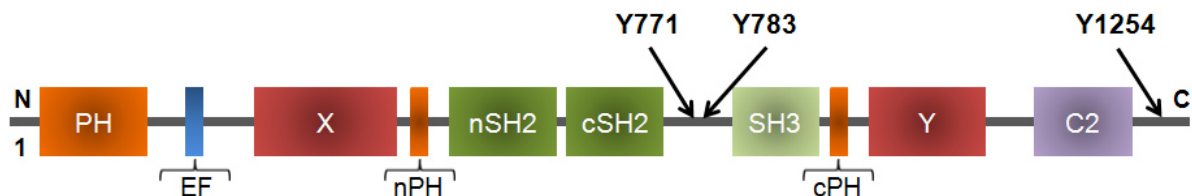


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Domänen des Proteins PLC γ 1. Die katalytischen Domänen werden als X und Y bezeichnet und bilden zusammen das aktive Zentrum des Enzyms. Über zwei SH2-Domänen tritt PLC γ 1 mit Phosphotyrosinsequenzen anderer Proteine in Kontakt, z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren, Aktin etc. Die SH3-Domäne interagiert mit Prolin-reichen Sequenzen anderer Proteine, wie SOS1, Cbl, Dynamin etc. Die PH-Domänen, von denen eine gespalten ist, erkennen PIP $_2$ und PIP $_3$, während C2 mit Ca $^{2+}$ /Phospholipiden interagiert. Besonders wichtig für die vollständige Aktivierung der PLC γ 1 ist ihre Phosphorylierung an Tyr783 und Tyr1254. (Abb. modifiziert nach⁵⁹)

Wesentliche Funktionen der PLC γ sind die Zelldifferenzierung, die Aktivierung der Zellproliferation und eine gesteigerte DNA-Synthese. Durch Beeinflussung der Konzentration mehrerer Zellzyklusregulatoren, etwa der Cycline, fördert PLC γ die Progression des Zellzyklus. In mehreren Formen benigner und maligner Neoplasien konnte eine erhöhte PLC γ -Expression nachgewiesen werden, was auf die zentrale Stellung des Enzyms bei der Tumorgenese hinweist⁶⁰.

Ihre Wirkungen auf die Zellbiologie entfaltet die Phospholipase C- γ über die von ihr generierten oben genannten sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-Trisphosphat und Diacylglycerin. Dabei greift IP $_3$ in den zellulären Kalziumhaushalt ein, indem es nach Bindung an in der ER-Membran lokalisierten IP $_3$ -Rezeptoren einen Kalziumeinstrom aus dem ER und dem Interstitium in das Zytosol induziert. Kalzium folgt dabei einem

10.000fachen Konzentrationsgradienten durch bisher nichtidentifizierte Kalziumkanäle. Es kommt zu dynamischen Veränderungen bzw. Oszillationen der zytosolischen Kalziumkonzentration, die kurzfristige Zellfunktionen wie Zellkontraktion, Sekretion oder Reorganisation des Zytoskeletts signalisieren, aber auch längerfristige Einflüsse auf Transkription, Apoptose und Zellzyklus ausüben⁶¹.

Das durch PLC γ generierte DAG aktiviert die Proteinkinase C. Die komplexen Funktionen, Interaktionen und Regulationsmechanismen dieses Enzyms können hier nur zusammenfassend erläutert werden. Seine 10 Isoformen werden eingeteilt in die klassischen PKC α , β und γ , die durch Kalzium und DAG aktiviert werden, die neuartigen PKC δ , ϵ , η und θ , für deren Aktivierung DAG ausreichend ist, und die atypischen PKC ζ und λ , die auf andere Weise aktiviert werden. Beim Aktivierungsprozess transloziert die PKC aus der gelösten zellulären Proteinfraction an die Zellmembran, wo sie an DAG-Moleküle und Anker-moleküle bindet und ihr aktives Zentrum durch Konformationsänderungen freigegeben wird. Jedes PKC-Isoenzym phosphoryliert spezifische Substrate⁶². Gerade bei der Vermittlung proliferativer Signale durch Wachstumsfaktoren wie EGF übernimmt die PKC mit ihren zahlreichen Substraten eine essentielle und zentrale Rolle. Unter anderem aktiviert PKC den MAPK-Signalweg und zahlreiche Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B, und initiiert die Proteinsynthese, indem sie die Translation von ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren fördert. Auch der Glukose- und Lipidstoffwechsel werden durch PKC beeinflusst. Ihre Aktivität wird mit Insulinresistenz und verschiedenen Spät-komplikationen des Diabetes mellitus in Verbindung gebracht. Nicht zuletzt in der Tumorgenese kommt der PKC eine große Bedeutung zu^{63,64}.

1.5 Modulation der PI3K/Akt- und PLC γ -abhängigen

Signalübertragung durch das Hepatitis C Virus

Verschiedene Signalkaskaden und Proteine der Wirtszelle sind für die Replikation des Hepatitis C Virus essentiell und werden durch Interaktionen zwischen viralen und zellulären Proteinen beeinflusst, um die viralen Replikationsbedingungen zu optimieren. Zahlreiche in diesem Rahmen bedeutende zelluläre Proteine wurden bereits als durch virale Faktoren beeinflusste Proteine identifiziert, über die Viren wie HCV in die Steuerung zellulärer Prozesse eingreifen. Das Wissen über die Interaktionen von HCV mit seiner Wirtszelle ist jedoch nach wie vor unvollständig. Mehrere Studien legen nahe, dass HCV über virale Faktoren den PI3K/Akt-Signalweg beeinflusst und eine verstärkte Aktivierung desselben wie auch der nachgeschalteten Signalproteine mTOR und p70/S6 induziert. Die Ergebnisse dieser Studien lassen darauf schließen, dass HCV hierdurch das Zellüberleben verbessert und eine effiziente HCV-Replikation ermöglicht.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten belegen, dass die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR in der Zelllinie Huh 9-13 gegenüber Wildtypzellen bis zu dreifach hochreguliert ist. Hierdurch sensitiviert das HCV die Zellen gegenüber einem EGF-Stimulus. Auch die Aktivierung von Akt ist in Gegenwart des subgenomischen Replikons schon basal verstärkt und wird durch Stimulation mit EGF noch weiter gesteigert. Grund für diese verstärkte Phosphorylierung ist eine verminderte Phosphatase-Aktivität der ubiquitär exprimierten T-Zell Proteintyrosin-Phosphatase (TC-PTP). Gemeinsam mit weiteren Phosphatasen wie PTP1B oder SHP2 ist TC-PTP ein negativer Regulator der EGFR-abhängigen Signalübertragung, indem sie den Rezeptor an Tyrosinresten dephosphoryliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Herabregulation der TC-PTP-Aktivität auf einer proteolytischen Spaltung von TC-PTP durch die Virus-kodierte NS3/4A-Serinprotease beruht, welches konsekutiv zu einer verstärkten EGF-induzierten Phosphorylierung des EGFR führt und zu der beschriebenen Aktivierung von Akt und PLC γ . Die Tatsache, dass dies unabhängig von der Modulation der EGFR-abhängigen Signalübertragung auch zur Steigerung der basalen Phosphorylierung von Akt führt, legt nahe, dass die TC-PTP für die Regulation der basalen Aktivität von Akt mitverantwortlich ist⁶⁵.

1.6 Beschreibung der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten

Inhibitoren

Bei AG1478 handelt es sich um einen hochpotenten und selektiven Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration (IC_{50}) von 3 nM. Seine IC_{50} für die Hemmung des PDGFR und von Her2-neu liegt mit 100 μ M um fünf Größenordnungen höher. Unter Inkubation mit AG1478 kommt es unter anderem auch zu einer Hemmung der EGF-vermittelten Translokation von PLC γ an den EGFR sowie einer supprimierten Proliferation von Hepatozyten⁶⁶.

Ly294002 ist ein weit verbreiteter spezifischer Inhibitor der PI3K mit reversibler Wirkung. Seine IC_{50} wird vom Hersteller mit 1,4 μ M angegeben⁶⁷.

Triciribine, auch API (Akt/PKB Signaling Inhibitor)-2 genannt, ist ein membranpermeabler Inhibitor der Tyrosinphosphorylierung von Akt 1, 2 und 3, der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Proliferation von Tumorzellen unterdrücken kann und die Apoptose induziert. Stromaufwärts gelegene Akt-Aktivatoren wie PI3K oder PDK-1 werden durch den Inhibitor nicht beeinflusst. Zurzeit wird Triciribine in mehreren klinischen Studien als Medikament zur Behandlung fortgeschrittener maligner Tumoren untersucht⁶⁸.

Durch das ebenfalls membranpermeable U-73122 wird die Agonisten-induzierte Aktivierung der PLC γ unterbunden. Seine IC_{50} beträgt 1-2,1 μ M. Für U-73122 wurden *in vitro* eine Unterdrückung der Invasivität von Lymphomzellen sowie eine gestörte Zelladhäsion beschrieben. Zudem kann U-73122 hormonell induzierte Schwankungen der zellulären Kalziumkonzentration hemmen. Es wurden allerdings auch Störungen der zellulären Kalziumhomöostase durch U-73122 beschrieben, die von seinem Effekt auf PLC γ unabhängig sind⁶⁹.

1.7 Zielsetzung

In der Hepatoma-Zelllinie (Huh 9-13), die das HCV-Replikon beherbergt, ist, wie einleitend ausgeführt, die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR gegenüber entsprechenden Kontrollzellen (Huh 7) hochreguliert. Ergebnisse der Arbeitsgruppe belegen, dass die Phosphatase TC-PTP durch die virale NS3/4A-Protease proteolytisch gespalten wird. Hierdurch wird ein wichtiger negativ-regulatorischer Rückkopplungs-Mechanismus in der intrazellulären Signalübertragung von EGF unterdrückt. Dies führt gemeinsam mit weiteren viralen Einflüssen zu einer Verstärkung der basalen Aktivität von Akt als auch der EGF-induzierten Aktivierung von Akt und PLC γ . Weiterhin legen Untersuchungen eine Reduktion der HCV-Replikation durch Hemmung der EGFR-abhängigen Signalwege nahe. Zwischen dem Hepatitis C Virus und den Strukturen der Wirtszelle, die für die Vermittlung von EGF-Signalen verantwortlich sind, existieren also enge Wechselwirkungen.

Basierend auf diesen Beobachtungen ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Relevanz der EGF-regulierten Signalwege für die virale Replikation weiter zu spezifizieren. Hierzu sollte namentlich geklärt werden, inwiefern die HCV-induzierte verstärkte basale Aktivität von Akt für die Replikation des HCV essentiell ist und welche Rolle PI3K in diesen Prozess spielt. Des Weiteren sollte die Bedeutung der verstärkten EGF-induzierten Aktivierung von PLC- γ für die virale Replikation beleuchtet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien, Substanzen und Lösungen

Material für die Zellkultur

75 cm ² Gewebekulturflaschen	Greiner; Solingen, Deutschland
6 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
10 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
96 Well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
Minisart Plus Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius; Göttingen Deutschland
Zellschaber	Conning inc.; NY, USA

Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM/Nutrient Mix F-12	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMEM/Ham's F-12 (1:1)	Biochrom AG; Berlin, Deutschland
PBS/Dulbecco - Mg / -Ca	Biochrom AG; Berlin, Deutschland
FCS	Percio; Bonn, Deutschland
G418 (Geneticin)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Cytogen; Sinn-Fleisbach, Deutschland

Reagenzien und Feinchemikalien

AG1478	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Akt Inhibitor V, Triciribine	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Ly294002	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
U-73122	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
Okadaic Acid, Potassium Salt	Calbiochem; Bad Soden, Deutschland
BSA	PAA-Laboratories; Linz, Österreich
EGF, human	Roche; Mannheim, Deutschland
WL Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer; Rodgau-Jügesheim, DE
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad; München, Deutschland
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche; Mannheim, Deutschland

Kits

QIAshredder Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Rneasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
VenorGeM Mykoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs; Berlin, Deutschland
MycTrace Kit	PAA; Cölbe, Deutschland
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche; Mannheim, Deutschland

PCR

SYBR Green PCR Master Mix

Applied Biosystems; Foster City, USA

Primärantikörper

Antikörper	Herkunft	erkanntes Epitop	Firma	eingesetzte Verdünnung
HCV NS3	Maus, monoklonal	NS3 Protein, aa 1252-1477	Abcam; Cambridge, UK	1:1.000
NCV NS5A	Maus, monoklonal	NS5A Protein	Abcam; Cambridge, UK	1:1.000 - 1:2.000
HCV NS5B	Maus, monoklonal	NS5B Protein	Enzo Life Sciences; Lörrach, Deutschland	1:1.000
PLC γ 1	Kaninchen, polyklonal	Phospholipase C- γ 1	Cell Signaling; Danvers, USA	1:1.000
Phospho-PLC γ 1 (Tyr783)	Kaninchen, polyklonal	PLC γ 1, an Tyr783 phosphoryliert	Cell Signaling; Danvers, USA	1:1.000
β -Aktin	Maus, monoklonal	Aktin, β -Isoform, N-Terminus	Abcam; Cambridge, UK	1:1.000 - 1:2.000

Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft	erkanntes Epitop	Firma	eingesetzte Verdünnung
HRP Anti-Maus	Kaninchen, polyklonal	Maus-Ig; konstante Domäne	DAKO; Herkules, USA	1:5.000
HRP Anti-Kaninchen	Ziege, polyklonal	Kaninchen-Ig; konstante Domäne	DAKO; Herkules, USA	1:5.000

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

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zelllinien

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden die Zellkultursysteme Huh7 wt und Huh 9-13 verwendet.

Die Zelllinie Huh7 wt wurde im Jahr 1982 aus dem Operationspräparat eines gut differenzierten hepatozellulären Karzinoms eines 57jährigen Japaners isoliert. Sie weist trotz hoher Proliferationsrate eine stabile Expression leberzellspezifischer Plasmaproteine und Lipoproteine auf, unter anderem Albumin, α 1-Antitrypsin, Fibrinogen, Haptoglobin, Hämopexin, α -Fetoprotein, Komplementfaktoren und Wachstumsfaktoren wie NGF. Außerdem exprimiert sie leberspezifische Enzyme des Kohlehydratstoffwechsels wie die Glukose-6-Phosphatase oder Fruktose-1,6-Diphosphatase. Die Huh7-Zellen regen somit autokrin ihr eigenes Wachstum an und sind gut für die Untersuchung hepatozytärer Genexpression und -regulation geeignet⁷⁰.

Die Zelllinie Huh 9-13 basiert auf Transfektion von genetischem Material des HCV in Zellen der Linie Huh7 wt. Diese RNA wurde aus der Leber eines chronisch mit dem Subtyp 1b infizierten und lebertransplantierten Patienten gewonnen und daraus ein Replikon konstruiert, das neben den HCV-Proteinen NS3 bis NS5b das *neo*-Gen enthält. Letzteres vermittelt eine Resistenz gegen das Antibiotikum G418. Somit sind die Zellen, welche die HCV-Proteine NS3 bis NS5b stabil exprimieren durch Zugabe von G418 in das Kulturmedium selektionierbar. Neben der effizienten Synthese von viraler RNA dient Huh 9-13 zur molekularbiologischen Untersuchung der Replikation und Pathogenese von HCV in der Zellkultur und zur Evaluation antiviraler Substanzen³⁷. Es handelt sich damit um das erste experimentelle System, das die Untersuchung der viralen Replikation im Zellkulturmodell ermöglicht und stellte eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung der aktuell auf dem Markt erscheinenden potenten DAA dar.

Die Kultivierung der humanen Hepatomazelllinie Huh7 wt erfolgte in DMEM/F-12 (supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS) in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37°C. Die das HCV-Replikon exprimierende Zelllinie

Huh 9-13 wurde in DMEM/F-12 + 10% FCS kultiviert, dem das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt wurde.

Vor dem Aussäen der Zellen in Schalen (6cm) und 96-Well-Platten, wurde die Zellzahl in einer Zählkammer der Firma Neubauer bestimmt. Da die Zelllinien Huh7 wt und Huh 9-13 ein unterschiedliches Wachstumsverhalten aufweisen, wurden jeweils in Abhängigkeit von Versuchsdauer und Zelltyp festgelegte Zellzahlen ausgesät, um zum Erntezeitpunkt immer eine 90- bis 100-%ige Konfluenz zu erhalten. Die auszusäende Zellzahl für 6cm-Schalen ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben. Bei 96-Well-Platten wurden je Well 1×10^4 Zellen ausgesät.

Versuchsdauer	auszusäende Zellzahl	
	Huh7 wt	Huh 9-13
24h	$0,7 \times 10^6$ Zellen	$0,7 \times 10^6$ Zellen
48h	$0,5 \times 10^6$ Zellen	$0,7 \times 10^6$ Zellen
72h	$0,5 \times 10^6$ Zellen	$0,5 \times 10^6$ Zellen

Vor jeder neuen Stimulation mit einem Inhibitorreagenz erfolgte ein Austausch des Nährmediums.

Die Mykoplasmen-Freiheit der verwendeten Zelllinien wurde regelmäßig mittels PCR (MycoTrace Kit, PAA) überprüft.

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese bei 60-%iger Konfluenz in Einfriermedium (DMEM/F-12 GlutaMAX + 10 % FCS + 10 % DMSO) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolierung

Die auf 6 cm Kulturschalen kultivierten Zellen wurden mit 350 µl RLT Puffer (supplementiert mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol) lysiert und mit einem Zellschaber geerntet. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Zelllysats mit dem QIASchredder Kit (Qiagen), sowie die Aufreinigung der RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen), jeweils nach den Angaben des Herstellers.

cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) unter Einsatz von 1 µg RNA je Probe verwendet. Die RNA-Konzentration wurde vorher photometrisch bei einer Wellenlänge von 260/280 nm bestimmt. Vor der cDNA-Synthese wurde die genomische DNA mittels eines DNase I-Verdau eliminiert. Die neu synthetisierte cDNA wurde nach Aufnahme in 100 µl Nuclease-freiem Wasser in der Real-Time-PCR eingesetzt.

Real-Time-PCR

Die Quantifizierung der zu untersuchenden cDNA wurde relativ zu einer Referenz mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode vorgenommen. Die Real-Time-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch während der Amplifikation die Messung der produzierten DNA-Menge durch Verwendung des Reporterfarbstoffes SYBR Green. Dieser bindet in den kleinen Furchen von dsDNA und beginnt bei Bindung zu fluoreszieren, weshalb die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produkts zunimmt. Die korrekte Quantifizierung ist nur während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion möglich.

Die Quantifizierung des Amplikons erfolgte nach der Δ CT-Methode⁷¹. Der CT-Wert („cycle threshold“) entspricht dabei dem Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals einen Schwellenwert, der signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt, überschreitet. Als Referenzgen diente bei der Untersuchung der NS3-Expression die hSDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A).

Da die Bindung von SYBR Green an doppelsträngige DNA unspezifisch erfolgt, kann das Messverfahren nicht zwischen verschiedenen PCR-Produkten unterscheiden. Daher wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die eingesetzten Primer nur spezifisch ein PCR-Produkt generieren. Mithilfe der Schmelzkurvenanalyse können unspezifische PCR-Produkte (z.B. Primer-Dimere oder Amplifikation genomischer DNA) identifiziert werden.

Die Schmelztemperatur der eingesetzten Primer betrug $59^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und ihre endständigen Sequenzen waren G/C-arm. Sie erzeugten Amplifikate von 100-150 Basenpaaren.

Für die Real-Time-PCR wurden je Probe 5 µl der 1:5 verdünnten cDNA als Template mit 50 µl SYBR Green PCR Master Mix nach den Angaben des Herstellers eingesetzt (Applied Biosystems). Die PCR-Reaktion erfolgte nach standardisierten Parametern (Annealing: 59°C, 40 Zyklen), an die sich eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Reaktionen anschloss.

Die Spezifität der Real-Time-PCR wurde durch Verwendung von bei der cDNA-Synthese durchgeführten Kontrollen ohne RNA-Einsatz bzw. ohne Reverse Transkriptase sowie durch eine cDNA-freie Kontrolle überprüft.

Oligonukleotide für die Real-Time-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
hSDHA	Forward AGA TGT GGT GTC TCG GTC GAT
	Reverse CGT GAT CTT TCT CAG GGC CA
NS3	Forward AGG TGG CTC TGT CCA GCA CT
	Reverse GGG ATG GCT TTG CCA TAA AA

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Protein-Isolierung

Die in Gewebekulturschalen (6 cm) kultivierten Zellen wurden nach Entfernung des Mediums mit PBS (supplementiert mit 0,1 mM Na₃VO₄) gewaschen und anschließend mit 150µl mTLP (1 % Triton X-100, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 µg/ml Aprotinin, 4 mM Benzamidin, 2 mM EDTA, 10 % Glycerol, 50 mM β-Glycerolphosphat, 5 µg/ml Leupeptin, 136 mM NaCl, 20 mM Natrium-Pyrophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 0,2 mM Pefabloc, 0,2 % SDS) versetzt und unter Verwendung eines Zellschabers geerntet.

Nach gründlicher Vermischung der Zellen mit dem Lysis-Puffer und 10-minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Proben mit Ultraschall (2 x 20 s) behandelt, um auch membranständige Proteine, beispielsweise HCV-Proteine, vollständig in Lösung zu bringen.

Darauf folgte eine quantifizierende Proteinbestimmung der Proben mit der Methode nach Bradford. Die Lagerung der Zelllysate erfolgte bei -20°C.

Bestimmung nach Bradford

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration kam das auf der Methode nach Bradford basierende Protein-Assay der Firma Bio-Rad zur Anwendung. Die Bradford-Methode bedient sich des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG), der in saurer Lösung an basische und aromatische Aminosäurereste von Proteinen bindet, wobei sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm im gelösten Zustand zu 595 nm im proteingebundenen Zustand verschiebt. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes bleibt über weite Konzentrationsbereiche konstant, sodass aus der Extinktion bei 595 nm die Proteinkonzentration in einer Lösung errechnet werden kann. Aus der Extinktion einer Proteinlösung bei verschiedenen Konzentrationen wird eine Eichkurve ermittelt. Nach Zugabe von Coomassie-Brilliant-Blau lässt sich die Konzentration einer Proteinlösung durch Vergleich der bei 595 nm gemessenen Extinktion mit dieser Eichkurve relativ quantifizieren.

Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, und die Extinktion bei 595 nm in einem Ultrospec Photometer (2100pro) der Firma Amersham gemessen.

SDS-PAGE

Die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, wurde im Jahr 1970 von Lämmli etabliert und dient der Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht. Es handelt sich um eine Form der diskontinuierlichen Zonenelektrophorese, wodurch ausgedrückt wird, dass das Proteingemisch während des Elektrophorese-Prozesses angetrieben von der Spannung im elektrischen Feld zwei verschiedene Gele durchläuft, zunächst ein schmales Sammelgel und darauffolgend das Trenngel. Durch seinen niedrigen Polyacrylamid-Gehalt ist das Sammelgel grobporig und das Protein wandert nach Übertritt aus der Probenflasche schnell durch das Sammelgel und bildet an der Grenze zum Trenngel eine scharfe Linie. Hierdurch wird der möglichst gleichzeitige Übergang der gesamten Probe in das Trenngel gewährleistet. Dieses ist infolge seiner höheren Polyacrylamid-Konzentration feinporiger, es erfolgt aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Für die SDS-PAGE wurde je Probe die gleiche Proteinmenge eingesetzt. Vor Durchführung der PAGE wurden die Proteinproben jeweils mit 4-mal SDS-Auftragspuffer nach Lämmli (250mM Tris/HCl [pH=6,8] + 40 % Glycerol + 5 % SDS + 0,002 % Bromphenolblau versetzt. Kurz vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 8 % β -Mercaptoethanol. Das in dem Puffer enthaltene anionische Natrium-Dodecylsulfat (SDS) bewirkt die Denaturierung der Proteine durch Auflösung ihrer Tertiär- und Sekundärstruktur. Durch β -Mercaptoethanol werden zusätzlich Disulfidbrücken lysiert und weitere Bindungsstellen für SDS werden frei. Es entstehen gleichmäßig negativ geladene Proteinkomplexe, deren Wanderungsgeschwindigkeit nicht mehr von störenden Faktoren wie der Proteinladung oder -konformation beeinflusst wird, sondern umgekehrt proportional zum Molekulargewicht ist. Um die Proteine vollkommen zu denaturieren erfolgte die Hitzeinaktivierung für 5 Minuten bei 95°C. Nachfolgend wurden die Proben für 30 s bei 13.200 rpm zentrifugiert.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgte bei 140 mV für drei bis fünf Stunden. Die Sammelgele wiesen dabei immer eine PAA-Konzentration von 5 % auf, während die PAA-Konzentration der Trenngele bei 8-10 % lag. Zur Durchführung wurde das Gelelektrophoresesystem der Firma Biometra verwendet. Durch das ebenfalls im Lämmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau wurde der Verlauf der Elektrophorese visuell verfolgbar. Als Vergleichsstandard zur Bestimmung des Molekulargewichts der entstehenden Banden wurde der Precision-Plus-Protein-Dual-Color-Standards-Marker von Bio-Rad eingesetzt.

Western Blot

Als Western Blot wird eine Methode zur Immobilisierung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf einem geeigneten Trägermaterial bezeichnet. Die Proteine werden hierbei elektrophoretisch durch einen quer zum Trenngel verlaufenden Strom auf die Trägermembran transferiert. Da die antigenen Eigenschaften der Proteine bei diesem Prozess erhalten bleiben, werden nun qualitative und quantitative Proteinanalysen mit Hilfe von Antikörpern möglich. Für die vorliegende Arbeit wurde die indirekte Nachweismethode angewandt, bei der das nachzuweisende Protein zunächst mit einem spezifischen Primärantikörper reagiert,

worauf der Nachweis gebundener Primärantikörper mittels eines markierten Sekundärantikörpers erfolgt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mit der Semidry-Blotting-Methode in einer Elektrobloiting-Apparatur (Biometra) auf eine PVDF(*Polyvinylidenfluorid*)-Membran (Amersham) übertragen. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 90 Minuten, wobei der Stromfluss durch in Blottingpuffer unterschiedlicher Ionenkonzentrationen (Anodenpuffer I: 0,3 M Tris, 20 % Methanol; Anodenpuffer II: 0,025 M Tris, 20 % Methanol; Kathodenpuffer: 0,04 M 6-Amino-Caprinsäure, 20 % Methanol) getränkte Papiere (Whatman) gewährleistet wurde.

Detektion

Um die transferierten Proteine durch Immundetektion sichtbar zu machen, wurde die PVDF-Membran zunächst mit 3 % BSA in TBS-T (20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 137 mM NaCl, 0,1 % Tween) für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Hierauf folgte die Inkubation der Membran mit einem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 - 1:2.000 (s. untenstehende Tabelle) in 3 % BSA-TBS-T wahlweise für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nachdem durch drei Waschschrte in TBS-T à 20 Minuten die unspezifisch gebundenen Antikörper entfernt worden waren, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einem HRP-(= Horseradish-Peroxidase-)gekoppelten Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:5.000 in 3 % BSA-TBS-T inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T erfolgte die Detektion der Immunkomplexe mit der Methode der Enhanced Chemiluminescence (ECL) unter Verwendung des Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus Kits (Perkin Elmer). Das in diesem Kit enthaltene Luminol wird durch die Antikörper-gebundene HRP zu 3-Aminophtalsäure oxidiert, wobei es zur Lichtemission bei 428 nm kommt, die auf ECL-Filmen (GE Healthcare) festgehalten werden kann.

Um die Membran für neue Immundetektionen einsetzen zu können, wurden die Immunkomplexe der abgeschlossenen Detektion durch 20-minütige Inkubation der Membran in einem Strippingpuffer (67 mM Tris (pH 6,7), 2 % SDS, Zugabe von 7% β -Mercaptoethanol kurz vor Verwendung) bei 70°C entfernt.

2.2.4 Zellproliferations-/Viabilitäts-Assays

WST-1 Assay

Die maximale Konzentration, bei der die verwendeten Inhibitorreagenzien keine toxische Wirkung auf die verwendeten Zellpopulationen zeigen, wurde unter Verwendung des Cell Proliferation Reagent WST-1 der Firma Roche bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine gebrauchsfertige Phosphat-gepufferte Lösung des leicht roten Farbstoffs WST-1, eines Tetrazolium-Salzes, das durch mitochondriale Dehydrogenasen zum dunkelroten Formazan metabolisiert wird. Hierbei kommt es zu einem spektralphotometrisch nachweisbaren Anstieg der Absorption im Bereich von 420-480 nm. Da diese chemische Reaktion nur in metabolisch aktiven Zellen stattfindet, korreliert der Absorptionsanstieg mit der Anzahl viabler Zellen in einer Zellkultur. Indirekt werden so Aussagen über die Zellproliferation und Zytotoxizität eingesetzter Inhibitorstoffe möglich.

Die Zellen wurden auf 96-Well-Platten in 100 µl Nährmedium pro Well kultiviert und entsprechend dem Versuchsaufbau mit unterschiedlichen Reagenzien inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden 10 µl WST-1-Lösung pro Well hinzugegeben und die Platten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 30 Minuten, sowie nach einer und zwei Stunden erfolgte die Messung der Absorption in einem ELISA-Reader (Anthos Labtech Instruments, Anthos 2001) bei der Detektionswellenlänge 450 nm. Die verwendete Referenzwellenlänge betrug 750 nm.

BrdU-Assay

Um die Proliferationsaktivität der Zellkulturen unter Einfluss von U-73122 zu messen, wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit von Roche eingesetzt.

5-Bromo-2'Desoxy-Uridin (BrdU) ist ein mit Brom substituiertes Nukleosidanalogen, das in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Durch Inkubation von Zellen in BrdU-haltigem Medium über einen festgelegten Zeitraum und anschließenden Einsatz von BrdU-spezifischen Peroxidase-gekoppelten Antikörpern kann neu synthetisierte DNA nachgewiesen werden⁷². Davor muss die DNA allerdings chemisch denaturiert werden, um das darin eingebaute BrdU für die Antikörperbindung freizugeben. Nach Zugabe von geeigneten Substraten der Antikörper-gebundenen Peroxidase, beispielsweise

Luminol oder dem Farbstoff Tetramethylbenzidin (TMB), erfolgt durch deren enzymatische Umwandlung eine Lichtemission, die luminometrisch gemessen wird, beziehungsweise ein Farbumschlag, der photometrisch bestimmbar ist. Somit kann indirekt die DNA-Synthese quantifiziert und die Proliferationsaktivität einer Zellpopulation bestimmt werden.

Der BrdU-Assay wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden auf 96-Well-Platten in 100 µl Nährmedium pro Well kultiviert. Die Markierungszeit mit Inkubation mit BrdU in der Konzentration 1:1000 (10µl Reagenz pro Well) betrug 48 Stunden. Nach Verwerfen des Mediums erfolgte die zweistündige Inkubation mit BrdU-Antikörper-Lösung. Die Absorption wurde nach kurzer Inkubation mit dem Farbstoff TMB (100 µl Colorimetrics Solution pro Well) bei der Detektionswellenlänge 450 nm und der Referenzwellenlänge 750 nm gemessen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Relevanz des PI3K/Akt-Signalwegs für die Replikation des Hepatitis C Virus

3.1.1 Die Aktivität des EGFR und der PI3K ist für die HCV-Replikation nicht essentiell, aber für deren Steigerung unter EGF-Stimulation notwendig

Wie einleitend zusammengefasst führt HCV insbesondere durch Herabregulation des TC-PTP Protein Levels zu einer verstärkten Aktivierung von EGFR. Um den Einfluss von EGF auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden Hepatoma-Zellen (Huh 9-13), die das subgenomische Replikon von HCV Genotyp 1A beherbergen, mit EGF stimuliert. Nachfolgend wurde virale RNA mittels Real-Time-PCR unter Einsatz spezifischer Primer detektiert, die die virale RNA im Bereich der für das HCV-Protein NS3 kodierenden Sequenz erkennen. Wie in Abbildung 3.1 ersichtlich, verstärkt EGF die virale Replikation. Hierbei ist die Aktivität des EGFR jedoch nicht für die basale Replikation essentiell, da die Hemmung der Kinaseaktivität des EGFR durch den spezifischen Inhibitor AG1478 nicht zu einer Reduktion der basalen viralen Replikation führt (Abbildung 3.1). Hierdurch wird lediglich die unter Stimulation mit EGF induzierte gesteigerte Replikation von HCV aufgehoben. Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf einer Hemmung der metabolischen Aktivität bzw. Viabilität der Zellen durch AG1478 beruht, wurde der Einfluss der eingesetzten Inhibitorkonzentrationen auf die metabolische Aktivität der Zellen mithilfe des WST-1-Assays untersucht. Aus der Abbildung 3.1 B geht hervor, dass die Behandlung der Zellen mit AG1478 über eine Dauer von 24 Stunden in den betreffenden Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität hat.

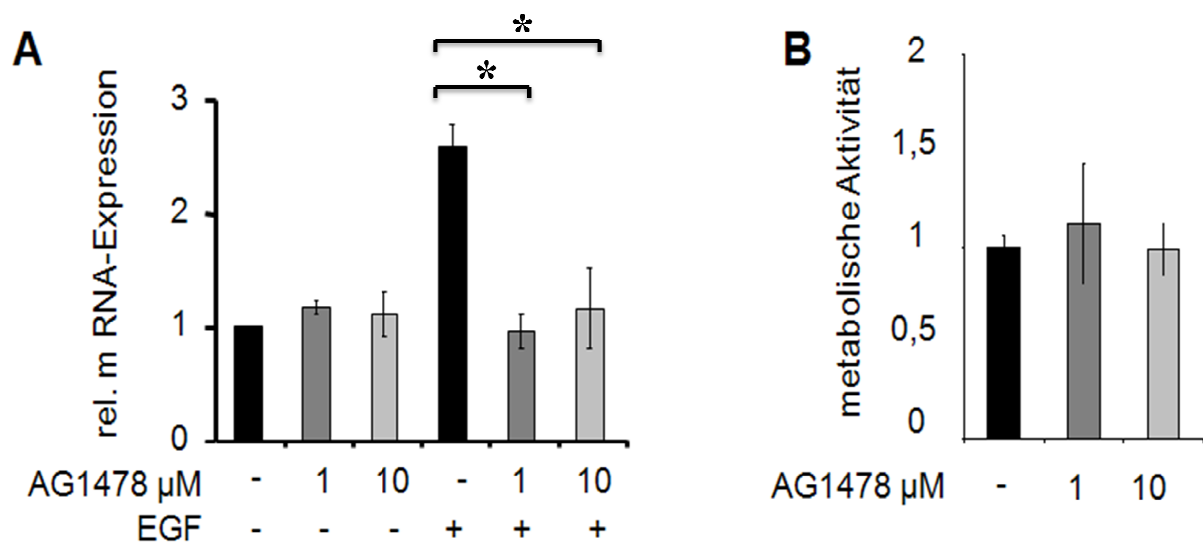


Abb. 3.1: Abnahme der EGF-induzierten, aber nicht der basalen HCV-Replikation unter Inhibition der EGFR-Aktivität. (A) Huh 9-13-Zellen wurden mit AG1478 1 bzw. 10 μM bzw. mit DMSO als Kontrolle mit oder ohne EGF 50 ng/ml für 24 h stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels spezifischer Primer die Expression von NS3 durch Real-Time-PCR bestimmt. Die Daten wurden unter Verwendung der ΔCT -Methode mit hSDHA als Referenz ausgewertet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt und auf die DMSO-Kontrolle bezogen. Die Standardabweichungen wurden auf Grundlage dreier unabhängiger Experimente erstellt. Der Student's t-Test diente der Berechnung der Signifikanz ($p < 0,05$). Die dieser Abbildung zugrunde liegenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Erwin D. Brenndörfer durchgeführt und von diesem federführend konzipiert.

(B) Um die metabolischen Einflüsse von AG1478 auf zellulärer Ebene zu analysieren, wurde das WST-1-Assay der Firma Roche durchgeführt. Huh 9-13-Zellen wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät und mit 1 bzw. 10 μM AG1478 bzw. mit DMSO als Kontrolle für 24 h stimuliert. Im Anschluss wurden jeweils 10 μl Cell Proliferation Reagent WST-1 zum Kulturmedium hinzugegeben und es erfolgte nach 30 Minuten die Messung der Absorption bei 450 nm in einem ELISA-Reader. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden auf der Grundlage von drei unabhängigen Experimenten errechnet und auf die Kontrolle normalisiert.

3.1.2 Hemmung der PI3K hebt die verstärkte EGF-induzierte HCV-Replikation auf

Die Aktivierung der PI3-Kinase durch EGF ist ein wichtiger Bestandteil der durch EGF induzierten Signalübertragung. Es sollte daher überprüft werden, inwieweit die Hemmung der PI3K Einfluss auf die virale Replikation hat. Die Hemmung der PI3K-Aktivität durch Ly294002 in den Konzentrationen 1 und 10 μM bewirkt den Verlust der durch EGF verstärkten HCV-Replikation, während in Abwesenheit von EGF die Replikation, ähnlich wie für die Hemmung des EGFR beobachtet, unbeeinträchtigt bleibt (Abb. 3.2).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Aktivität des EGFR und der PI3K für die basale HCV-Replikation nicht essentiell sind, sondern lediglich für deren verstärkte Aktivierung unter EGF-Stimulation.

Um auszuschließen, dass beobachtete Effekte auf einer Beeinflussung des zellulären Metabolismus durch den Inhibitor Ly294002 in den eingesetzten Konzentrationen 1 und 10 μM über 48 Stunden beruhen, wurde ein WST-1-Assay durchgeführt. Die Befunde legen nahe, dass Ly294002 die metabolische Aktivität der inkubierten Zellen negativ beeinflusst (Abb. 3.2B), so dass die beobachteten Veränderungen möglicherweise auch hierauf zurückgeführt werden können. Da Ly294002 jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die basale virale Replikation hat, ist Letzteres eher unwahrscheinlich.

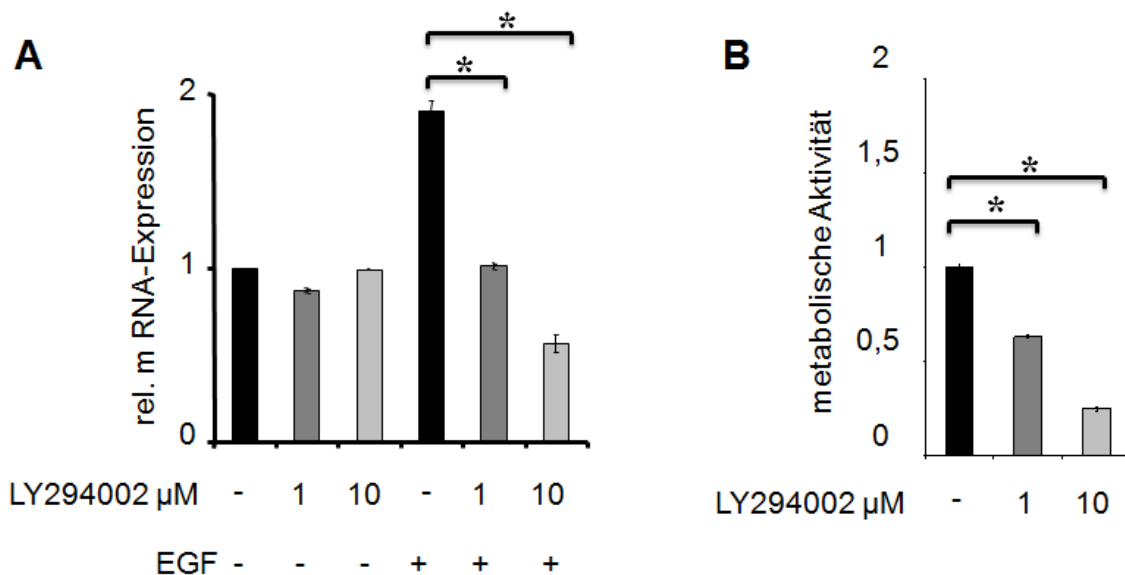


Abb. 3.2: Abnahme der EGF-induzierten, nicht aber der basalen HCV-Replikation unter Hemmung der PI3K-Aktivität. (A) Huh 9-13-Zellen wurden für 48 Stunden mit 1 bzw. 10 μM Ly294002 bzw. mit DMSO als Kontrolle mit oder ohne EGF 50 ng/ml wie angegeben stimuliert. Danach wurde die RNA isoliert und mittels Real-Time-PCR die NS3-Expression bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der ΔCT -Methode unter Verwendung von hSDHA als Referenz. Die Werte wurden auf den Kontrollwert bezogen, der gleich 1 gesetzt wurde. Die Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte auf der Grundlage von drei unabhängigen Experimenten. Der Student's t-Test diente der Berechnung der Signifikanz ($p < 0,05$). Die dieser Abbildung zugrunde liegenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Erwin D. Brenndörfer durchgeführt und von diesem federführend konzipiert.

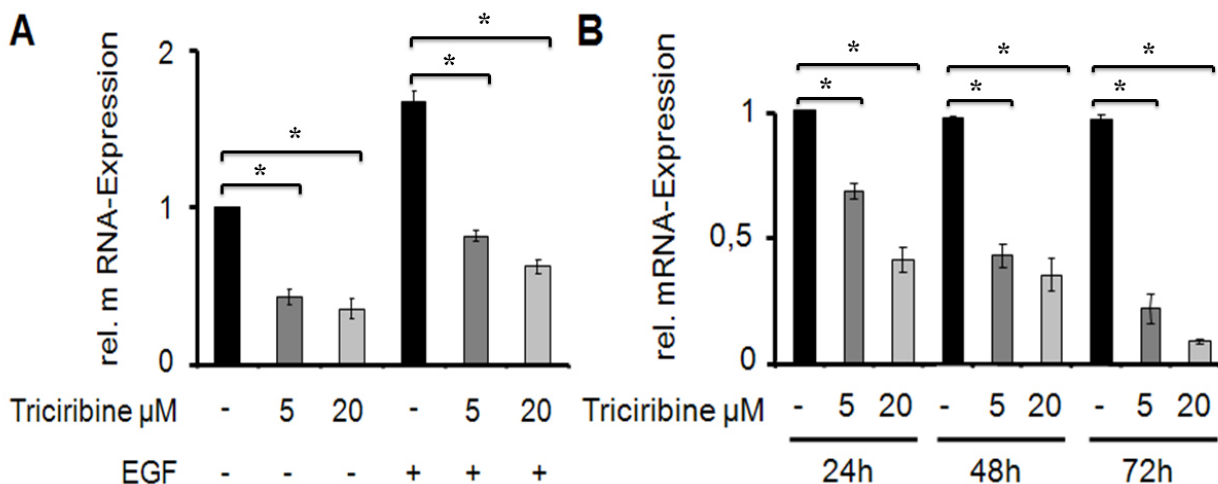
(B) Analyse der metabolischen Einflüsse von Ly294002 auf Huh 9-13. Huh 9-13-Zellen wurden auf 96-Well-Platten ausgesät und mit 1 bzw. 10 μM Ly294002 bzw. mit DMSO als Kontrolle für 48 h stimuliert. Im Anschluss wurden jeweils 10 μl Cell Proliferation Reagent WST-1 zum Kulturmedium hinzugefügt und es erfolgte nach 30 Minuten die Messung der Absorption bei 450 nm. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden auf der Grundlage dreier unabhängiger Experimente ermittelt und auf die Kontrolle normalisiert.

3.1.3 Die HCV-induzierte konstitutive Aktivierung von Akt ist für die Replikation von HCV essentiell

Wie oben ausgeführt stellt die PI3K-abhängige Aktivierung von Akt eine wichtige Komponente in der Signalübertragung von EGF dar. Hierbei erfolgt die Phosphorylierung und daraus resultierende Aktivierung von Akt über mehrere Zwischenschritte unter Beteiligung von Phospholipiden der Zellmembran. Beobachtungen der Arbeitsgruppe belegen, dass HCV einerseits die EGFR-induzierte PI3K-abhängige Aktivierung von Akt verstärkt und andererseits zu einer EGFR-unabhängigen konstitutiven Aktivierung von Akt führt.

Um zu klären, ob die Aktivierung von Akt für die HCV-Replikation relevant ist, wurden stabil mit dem HCV Replikon transfizierte Zellen mit dem selektiven Akt-Inhibitor Triciribine, auch als API-2 bezeichnet, behandelt und der Einfluss von Triciribine auf die Expression viraler RNA und Protein untersucht. Hierbei hemmt Triciribine die Phosphorylierung von Akt, indem es an dessen PH-Domäne bindet und somit die Translokation von Akt an die Zellmembran behindert. Es findet dagegen keine Inhibition von PI3K, PDK-1 oder anderer Akt-Kinasen statt⁷³. Es handelt sich bei Triciribine auch nicht um einen direkten Inhibitor der enzymatischen Aktivität von Akt⁷⁴.

Wie in Abbildung 3.3 A und B dargestellt führt die Hemmung von Akt zu einer Herabregulation der HCV-Replikation, und zwar sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter Stimulation mit EGF. Der Effekt ist am intensivsten ausgeprägt bei Inkubation der Zellen für 48 und 72 Stunden (Abb. 3.3), wobei die verwendeten Inhibitorkonzentrationen von 5 und 20 μM nicht zu einer signifikanten Beeinträchtigung des zellulären Metabolismus führten (Abb. 3.3C).



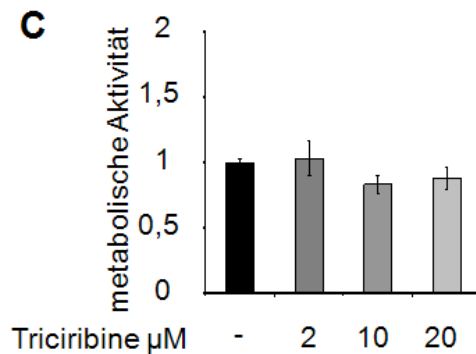
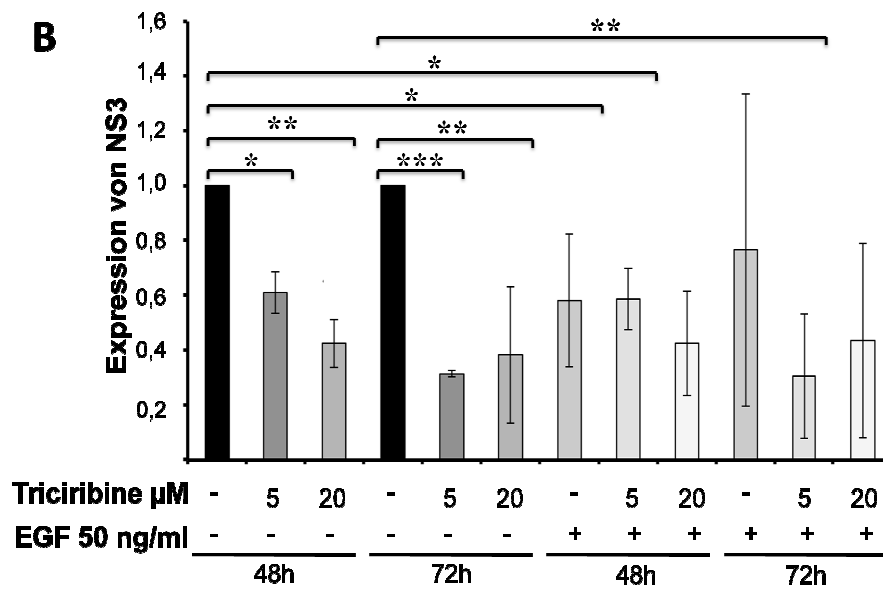
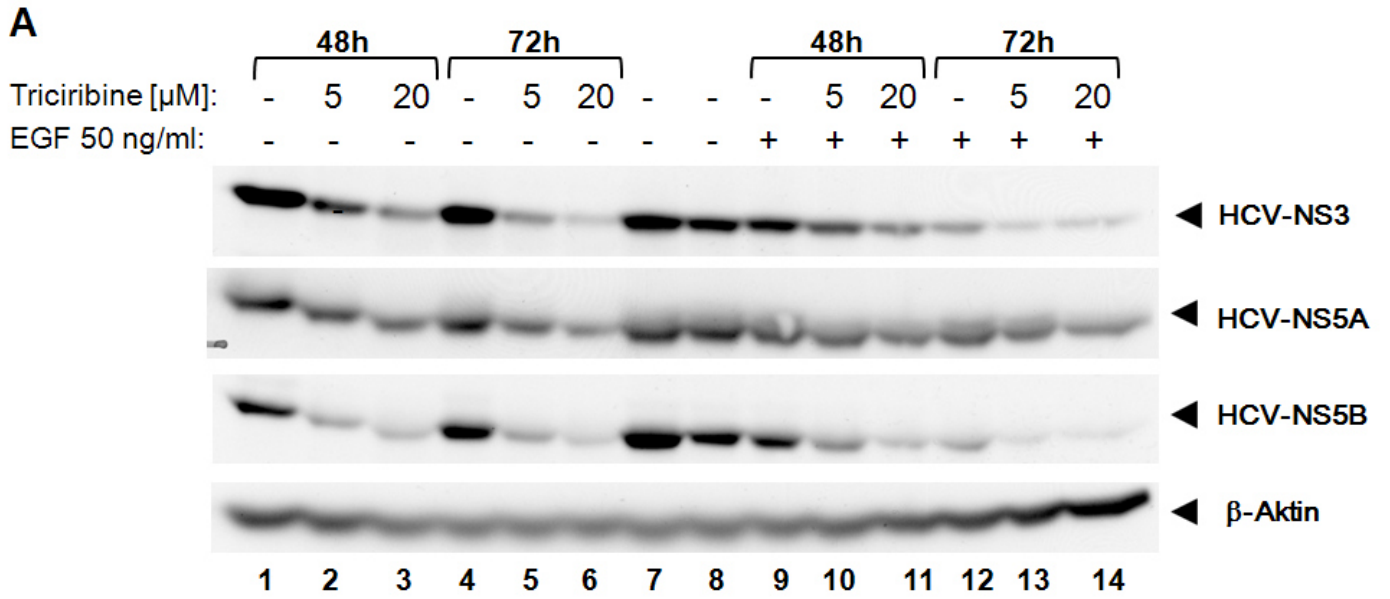


Abb. 3.3: Reduktion der HCV-Replikation basal und unter EGF-Stimulation durch Inhibition der Akt-Aktivierung. Huh 9-13-Zellen wurden mit 5 μM bzw. 20 μM Triciribine über 48 h mit oder ohne 50 ng/ml EGF (**A**) bzw. mit DMSO als Kontrolle über 24, 48 oder 72 h (**B**) wie angegeben stimuliert. Am Ende des Zeitintervalls wurde die RNA isoliert und mittels Real-Time-PCR unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von NS3 bestimmt. Zur Auswertung diente die ΔCT -Methode mit hSDHA als Referenz. Die Werte wurden auf die Kontrolle normalisiert und die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. Die Signifikanz (*) wurde mithilfe des Student's t-Tests berechnet ($p < 0,05$). Die den Abbildungen 3.3 A und B zugrunde liegenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Erwin D. Brenndörfer durchgeführt und von diesem federführend konzipiert.

(C) Analyse der Einflüsse von Triciribine auf den Zellmetabolismus. Huh 9-13-Zellen wurden auf 96-Well-Platten kultiviert und für 48 Stunden mit 5, 10 oder 20 μM Triciribine bzw. mit DMSO als Kontrolle wie angegeben stimuliert. Hierauf erfolgte die Zugabe von 10 μl Cell Proliferation Reagent WST-1 zum Kulturmedium und nach einer Stunde wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die Werte darauf bezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden auf der Grundlage dreier unabhängiger Experimente ermittelt.

Übereinstimmend mit der Herabregulation der viralen RNA kommt es in Gegenwart von Triciribine auch zu einer Unterdrückung der Expression viraler Proteine wie in Abbildung 3.4 für die Komponenten der viralen Replikationsmaschinerie NS3, NS5A und NS5B. Dabei ergab die densitometrische Auswertung der Western Blots je nach Stimulationsdauer und InhibitorKonzentration eine Senkung der viralen Proteinmenge in den Replikonzellen um bis zu etwa 60 % (Abb. 3.4 B). Diese Daten legen nahe, dass anders als bei EGFR und PI3K die Aktivierung von Akt für die Aufrechterhaltung der Replikation von HCV essentiell ist. Im Gegensatz zu den Befunden auf Transkriptionsebene ließ sich ein reproduzierbarer Einfluss von EGF auf die Expression der Virusproteine NS3, NS5A und NS5B nicht feststellen.



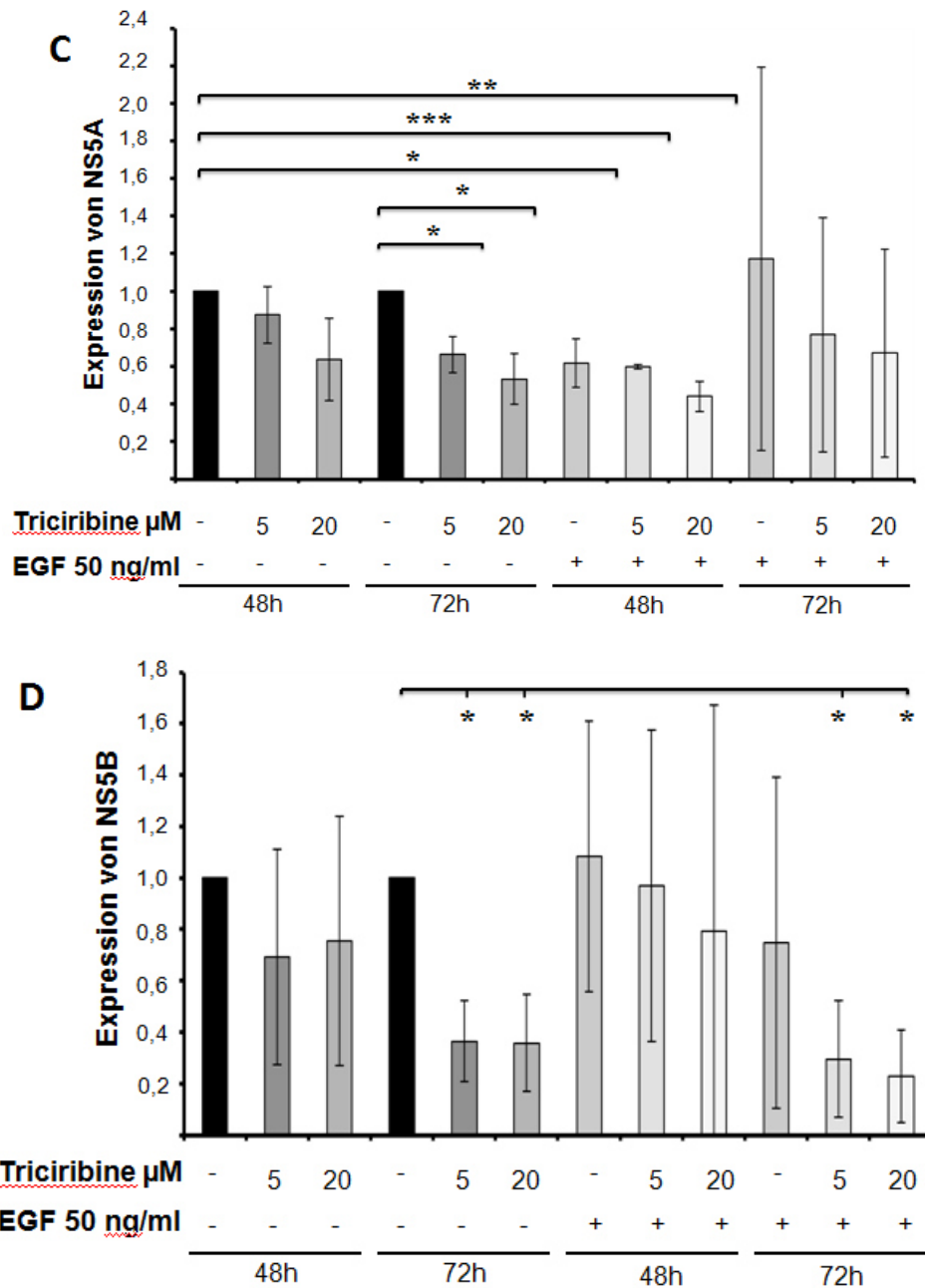
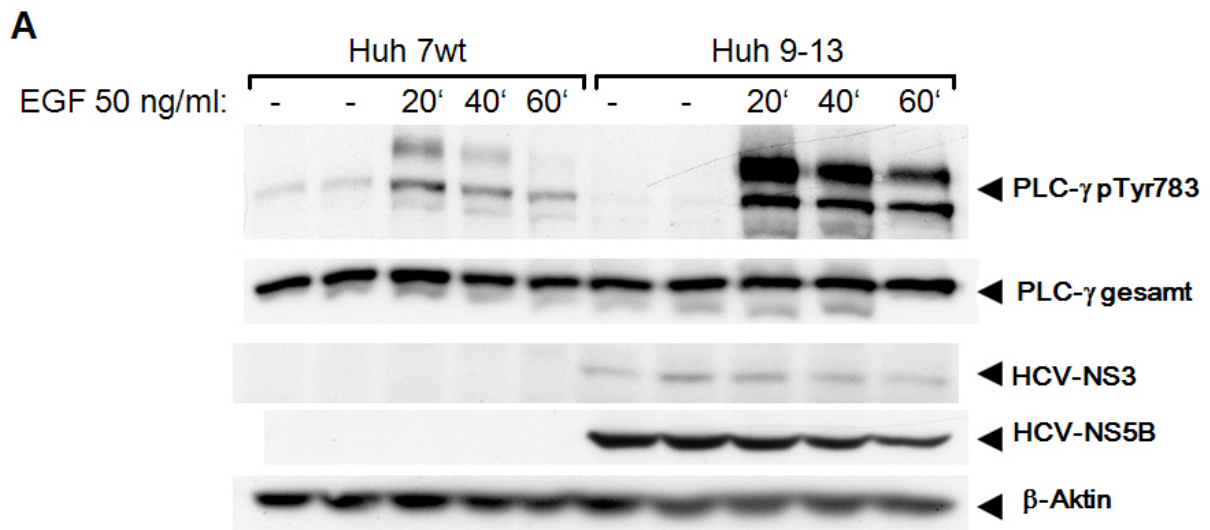


Abb. 3.4: Untersuchung der Expression der HCV-Proteine unter Hemmung der Akt-Aktivierung. Huh 9-13-Zellen wurden mit 5 bzw. 20 μM Triciribine bzw. DMSO als Kontrolle mit oder ohne EGF 50 ng/ml für 48 bzw. 72 h wie angegeben stimuliert. (A) Nach den angegebenen Zeiträumen wurden die Zellen lysiert. Jeweils 40 μg Protein/Spur wurden auf PAA-Gel aufgetragen und im Western Blot analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden NS3, NS5A, NS5B und β -Aktin (Beladungskontrolle) nachgewiesen. (B) – (D) Densitometrische Auswertung der Expression von NS3, NS5A und NS5B bezogen auf die entsprechenden β -Aktin-Banden. Die Werte wurden jeweils auf die gleich 1 gesetzte gleichzeitige DMSO-Kontrolle bezogen. Die Signifikanz wurde mittels einfacher Varianzanalyse (one way ANOVA) ermittelt.

3.2 Untersuchung der Relevanz des PLC γ -Signalwegs für die Replikation des Hepatitis C Virus

3.2.1 Die EGF-induzierte Aktivierung der PLC γ wird durch HCV verstärkt

Ein weiterer Signalweg, der über den EGFR die Generierung von aus der Zellmembran stammenden sekundären Botenstoffen induziert, wird über Aktivierung der Phospholipase (PLC) γ vermittelt. EGFR beeinflusst über die Aktivierung der PLC γ verschiedene zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation, -differenzierung und den Zellzyklus, wie auch den zellulären Kalziumhaushalt. Dabei wird die PLC γ primär durch EGFR-katalysierte Phosphorylierung an Tyrosin 783 aktiviert. Um zu klären, welchen Einfluss HCV auf die Aktivierung von PLC γ hat, wurde die EGF-abhängige Aktivierung von PLC γ in der Hepatomazelllinie Huh7 mit Zellen verglichen, die das subgenomische HCV Replikon beherbergen (Huh 9-13). Interessanterweise fand sich, im Gegensatz zu Akt, eine durch die Präsenz von HCV um etwa das 5-fache herabregulierte basale PLC γ -Aktivität, während die EGF-induzierte Aktivierung von PLC γ durch das HCV-Replikon deutlich verstärkt wird (Abb. 3.5).



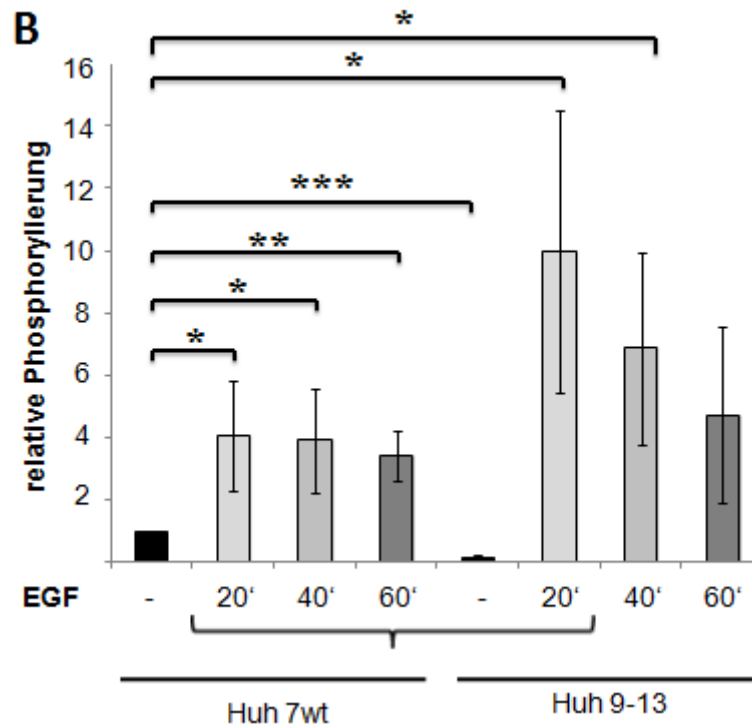


Abb. 3.5: Vergleich der basalen und EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung von PLC- γ 1 an Tyr783 in Huh7 wt und Huh 9-13. Huh7 wt- und Huh 9-13-Zellen wurden wie angegeben mit 50 ng/ml EGF für 20, 40 oder 60 Minuten bzw. als Kontrolle nicht stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und je 40 μ g Protein/Spur im Western Blot analysiert. **(A)** Mit spezifischen Antikörpern erfolgte der Nachweis der Phosphorylierung von PLC- γ 1 an Tyrosin 783, die auf die Beladungskontrolle PLC- γ 1 gesamt bezogen wurde. Weiterhin wurden NS3, NS5B und β -Aktin nachgewiesen.

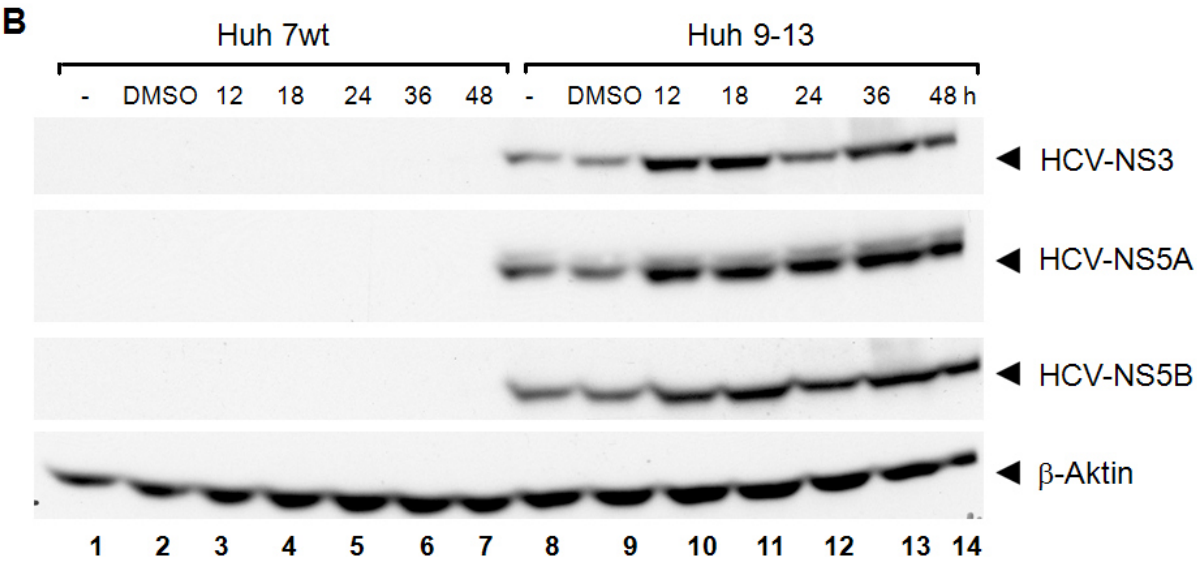
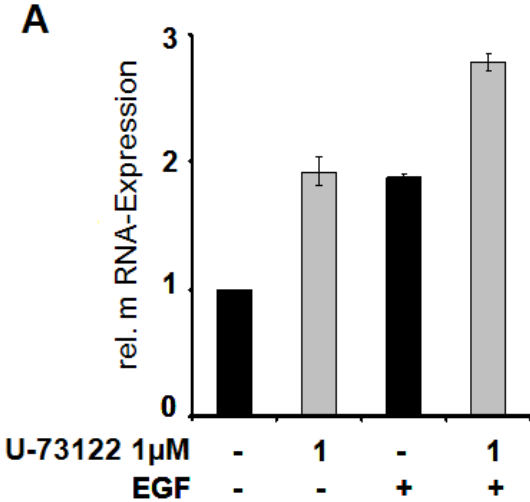
(B) Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung der PLC γ 1 an Tyrosin783. Die Werte der Tyrosinphosphorylierung wurden auf die entsprechenden Werte für PLC γ 1 gesamt bezogen. Die Phosphorylierungswerte wurden auf die auf gleich 1 gesetzte Kontrolle normalisiert. Die Standardabweichung wurde auf Grundlage von vier unabhängigen Experimenten errechnet. Die Signifikanz (*) wurde mithilfe des Student's t-Tests ermittelt.

3.2.2 Die Aktivität von PLC- γ 1 ist für die Replikation von HCV nicht essentiell, übt jedoch tendenziell einen eher inhibitorischen Einfluss auf die virale Replikation aus

Unter Einsatz des spezifischen Inhibitors der PLC γ -Aktivierung U-73122 sollte analysiert werden, inwiefern die Aktivierung von PLC γ mit der HCV-Replikation interferiert. Hierbei führt die Hemmung der PLC γ -Aktivierung durch U-73122 in der Konzentration 1 μ M zu einer signifikant verstärkten Transkription viraler RNA im Sinne einer gesteigerten Replikation (Abb. 3.6 A). Diese verstärkte Produktion viraler RNA durch Hemmung von PLC γ auf die lässt sich auf Ebene der Expression viraler

Ergebnisse

Proteine zwar wiederfinden, ist jedoch, wie vor allem aus der densitometrischen Analyse hervorgeht, nicht signifikant (Abb. 3.6 B und C).



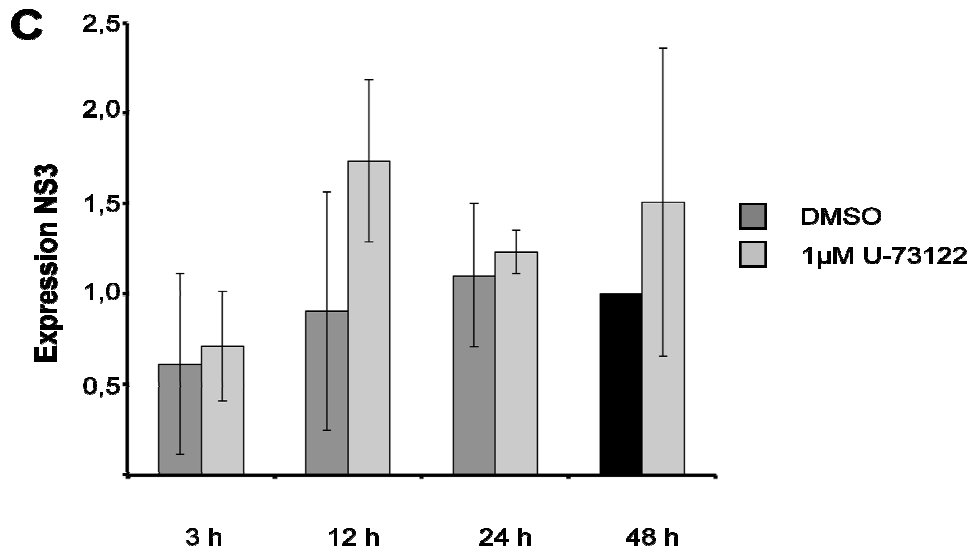


Abb. 3.6: Hemmung der PLC γ 1-Aktivität steigert die Replikation von HCV. (A) Huh 9-13-Zellen wurden mit 1 μ M U-73122 bzw. DMSO als Kontrolle mit oder ohne 50 ng/ml EGF für 48 h stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels Real-Time-PCR unter Verwendung spezifischer Primer die Expression von NS3 bestimmt. Die Δ CT-Methode diente der Auswertung der Daten mit hSDHA als Referenz. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten wurden auf die als 1 gesetzte DMSO-Kontrolle bezogen. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte mittels Student's t-Test. (B) + (C) Zeitreihe zur Analyse des Einflusses der Hemmung der PLC γ 1-Aktivität auf die HCV-Proteinexpression. Huh7 wt- bzw. Huh 9-13-Zellen wurden mit 1 μ M U-73122 bzw. mit DMSO als Kontrolle für 12, 18, 24, 36 und 48 h (B) wie angegeben stimuliert. Je 35 μ g Protein/Spur wurden durch Western Blot analysiert und mithilfe spezifischer Antikörper die Proteinmenge von NS3, NS5A, NS5B und β -Aktin (Beladungskontrolle) bestimmt. (C) Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung wurden auf die gleich 1 gesetzte 48-stündige DMSO-Kontrolle (schwarz) bezogen. Die Ermittlung der Standardabweichung wurde auf Basis dreier unabhängiger Experimente durchgeführt. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte mithilfe des Student's t-Tests.

Um einen möglichen Effekt von U-73122 auf die Zellproliferation als Ursache der gesteigerten HCV-Proteinexpression zu erfassen, wurden BrdU-Assays durchgeführt. Aus diesen Versuchen ergab sich kein Hinweis darauf, dass eine Hemmung der Aktivierung von PLC γ die Proliferation von Zellen, die das subgenomische Replikon beherbergen, im Vergleich zu entsprechenden Kontrollexperimenten signifikant positiv beeinflusst (Abb. 3.7). Es war jedoch bei längerfristiger Hemmung der PLC γ eine Beeinträchtigung der Zellproliferation festzustellen.

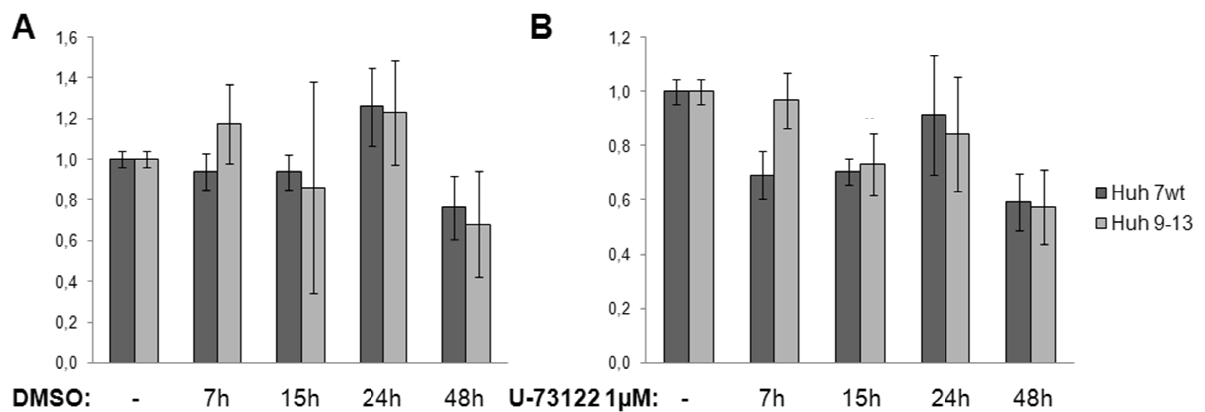


Abb. 3.7: Hemmung der PLC- γ 1 hat keine gesteigerte Zellproliferation zur Folge – BrdU-Assay. Huh7 wt- (dunkelgrau) und Huh 9-13-Zellen (hellgrau) wurden auf 96-Well-Platten ausgesät und mit DMSO (**A**) bzw. mit 1 μ M U-73122 (**B**) für 7, 15, 24 und 48 h wie angegeben stimuliert. Jedes Well wurde zeitgleich 48 Stunden mit BrdU (Cell Proliferation ELISA (colorimetric), Roche) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach den Herstellerangaben aufgearbeitet und die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Werte wurden auf den unstimulierten gleich 1 gesetzten Kontrollwert bezogen. Die Standardabweichung wurde aus 8 Messungen ermittelt.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern EGF-abhängige Signalkaskaden für die Replikation des HCV-Genoms und für die Expression der HCV-Proteine essentiell sind. Die Grundlage für diese Fragestellung bildete die Erkenntnis der Arbeitsgruppe, dass die durch den EGFR regulierten Signalproteine Akt und PLC γ in Hepatomazellen (Huh 9-13), die das HCV-Replikon beherbergen, infolge eines EGF-Stimulus stärker aktiviert werden, als in der Wildtyp-Zelllinie Huh7. Im Fall von Akt ist bereits die basale Aktivierung erhöht. Ursache hierfür ist die Spaltung der negativ regulatorischen TC-PTP durch die NS3/4A-Serinprotease des Hepatitis C Virus⁶⁵.

Um die Relevanz dieser Aktivitätssteigerungen für die virale Replikation zu überprüfen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen mit Hilfe der spezifischen Inhibitoren AG1478, Ly294002, Triciribine und U-73122 einzelne Stufen der EGFR-aktivierten Signalübertragung über den PI3K/Akt- bzw. PLC γ -Signalweg ausgeschaltet wurden. Es wurden jeweils die Folgen dieser Enzymhemmung für die HCV-Replikation ohne gleichzeitige EGF-Stimulation mit denen bei gleichzeitiger Stimulation mit 50 ng/ml EGF verglichen. Da die verschiedenen durch den EGFR regulierten Signalkaskaden, wie in der Einleitung beschrieben, in die Regulation von Zellzyklus, -proliferation, -differenzierung und -motilität sowie des Energiestoffwechsels der Zelle involviert sind, war es notwendig, die Wirkung der eingesetzten Inhibitoren auf den Zellmetabolismus bzw. auf die Proliferation zu untersuchen. Auf diese Weise ließ sich ausschließen, dass die beobachtete Steigerung bzw. Senkung der HCV-Replikation auf Inhibitor-bedingten, unspezifischen Störungen des zellulären Stoffwechsels oder der Proliferation beruhte. Die zu diesem Zweck durchgeführten Viabilitäts- bzw. Proliferationsassays dienten daneben dem Ausschluss toxischer Wirkungen der verwendeten Inhibitoren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die untersuchten Enzyme des PI3K/Akt- und des PLC γ -Signalwegs in unterschiedlichem Ausmaß für die Vermehrung des Hepatitis C Virus bedeutsam sind. Die enzymatischen Aktivitäten des EGFR und der PI3K sind jeweils nur essentiell, um die verstärkte virale Replikation unter EGF-Stimulation zu ermöglichen, während sich ihre Hemmung bei

fehlendem EGF-Stimulus nicht signifikant auf die Vervielfältigung des HCV-Genoms auswirkt (Abb. 3.1 A und 3.2 A). Die Relevanz der PI3K-Aktivität für die virale Proteinexpression wäre zwar noch zu überprüfen, vor dem geschilderten Hintergrund ist jedoch anzunehmen, dass die Aktivierung des EGFR und der PI3K als Wirtsfaktoren auch für die basale virale Proteinexpression nicht essentiell sind.

Anders verhält es sich bei der Proteinkinase Akt, die indirekt durch PI3K aktiviert wird. Die Ergebnisse der Experimente mit dem Akt-Inhibitor Triciribine lassen den Schluss zu, dass die enzymatische Aktivität von Akt eine essentielle Voraussetzung für die hinreichende Produktion von Viruskopien darstellt. Nicht nur bei der Vervielfältigung der HCV-RNA, sondern auch bei der Translation der viralen Proteine durch die Wirtszelle spielt Akt eine essentielle Rolle. Für das Virus scheint also neben dem antiapoptotischen Effekt von Akt auch die kurz- und langfristige Steigerung der Proteinsynthese, die Akt über Aktivierung des mTOR/p70S6K-Signalwegs vermittelt, entscheidend zu sein⁷⁵. Im Gegensatz zum EGFR und zur PI3K ist bereits unter basalen Bedingungen die Aktivität von Akt notwendig, um eine hohe virale Replikation zu gewährleisten. Somit ist HCV auf die konstitutive Aktivität der Akt-Proteinkinase angewiesen. Diese Feststellung passt zu der bereits von Anderen beschriebenen Beobachtung, dass HCV zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges führt. Hierbei wurden jedoch als führende Ursachen für die Aktivierung die Induktion von oxidativem Stress durch HCV sowie die Interaktion von NS5A mit der p85-Untereinheit der PI3K identifiziert^{76,77}. Dies legt nahe, dass HCV die Aktivierung der PI3K/Akt-abhängigen Signalübertragung über mehrere Mechanismen induziert.

Ähnlich wie Akt übt die Phospholipase C- γ Funktionen im Rahmen des zellulären Lebenszyklus aus. Über die zahlreichen von ihr regulierten Effektormoleküle aktiviert PLC γ unter anderem die Zellproliferation, fördert die Zellzyklusprogression und reguliert den Stoffwechsel der Zelle⁶⁰. Eine erhöhte Expression der PLC γ konnte in einer großen Anzahl unterschiedlicher Neoplasien nachgewiesen werden⁷⁸. Es wäre naheliegend, für PLC γ eine ähnliche wechselseitige Beeinflussung mit dem HCV wie für Akt zu vermuten. Wie zuvor bereits erwähnt, ist bekannt, dass HCV durch die Spaltung von TC-PTP die PLC γ -Aktivierung unter EGF-Stimulation verstärkt⁶⁵. Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Beobachtung und ergänzt sie durch den Nachweis, dass EGF-Einwirkung in den Replikonzellen eine wesentlich stärkere Phosphorylierung am für die PLC γ -Aktivierung entscheidenden Tyrosin 783 zur Folge

hat, als in den Wildtypzellen. Dieser Effekt ist nach 20-minütiger Stimulation mit EGF am ausgeprägtesten, wohingegen er nach 60 Minuten wieder nachlässt. Basal weist die PLC γ in Huh 9-13 jedoch eine signifikant niedrigere Aktivität auf als in Huh7 wt (Abb. 3.6). Der molekulare Mechanismus, über den HCV diese Senkung der basalen Aktivität von PLC γ erreicht, ist unbekannt.

Mithilfe des spezifischen PLC γ -Inhibitors U-73122 sollte die Frage beantwortet werden, ob, ähnlich wie es für Akt der Fall ist, die Aktivierung von PLC γ bedeutsam für die HCV-Replikation ist. Entgegen den Erwartungen steigert die chemische Hemmung der PLC γ jedoch die Vervielfältigung des HCV-Genoms und auch auf Proteinebene ist bereits nach 12-stündiger PLC γ -Hemmung eine zwar nicht signifikante, aber reproduzierbare Erhöhung der HCV-Replikation nachweisbar (Abb. 3.7). Eine denkbare Erklärung hierfür wäre ein proliferativer Effekt bzw. die Selektion einer das Virus stark replizierenden Zellpopulation durch U-73122. Dagegen spricht allerdings, dass im Proliferations-Assay nach 12stündiger Hemmung der PLC γ mit U-72133 keine signifikanten Veränderungen des Wachstums der Replikonzellen festzustellen sind. Zwar zeigt sich nach 48 Stunden eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate von Huh 9-13-Zellen (Abb. 3.8), die erhöhte HCV-Proteinexpression ist jedoch bereits deutlich früher zu beobachten. Aus diesen Erwägungen ist zu folgern, dass die enzymatische Aktivität der PLC γ die Replikation des Hepatitis C Virus zumindest geringfügig reduziert. Dies ist möglicherweise auch der Grund dafür, dass HCV, über bislang ungeklärte Mechanismen, die basale Phosphorylierung von PLC γ am aktivierenden Tyrosinrest 783 hemmt, und somit die basale PLC γ -Aktivität reduziert. Hierdurch und durch die erhöhte konstitutive Akt-Aktivierung könnte das Hepatitis C Virus seine Replikation bei fehlender Einwirkung von Wachstumsfaktoren auf die Wirtszelle auf einem konstant hohen Niveau halten.

Der hemmende Effekt, den PLC γ auf die virale Replikation zu haben scheint, ist eher gering (Abb. 3.7). Dennoch stellt sich die Frage, ob sich für HCV ein Vorteil aus der Verstärkung der EGF-induzierten Aktivierung von PLC γ ergibt oder, ob es sich um einen für HCV eher ungünstigen "Nebeneffekt" der durch die Spaltung von TC-PTP (Brenndörfer et al., 2009) verstärkten Liganden-induzierten Aktivierung des EGFR handelt. Ein Aspekt könnte hier sein, dass die Aktivierung von PLC γ , neben der Aktivierung von Akt und weiteren an der Signalübertragung von Wachstumsfaktoren beteiligten Proteinen, auch antiapoptotische Effekte hat. Im Rahmen der Induktion

der Apoptose werden einige dieser antiapoptotischen Proteine Caspase-abhängig gespalten, um die von ihnen generierten Überlebenssignale in der Zelle auszuschalten. Die Wachstumsfaktor-induzierte Phosphorylierung von Akt und PLC γ scheint hierbei unter Anderem eine Möglichkeit darzustellen, dieser Spaltung zu entgehen^{79,80}. Hierzu passt auch die im Proliferationsassay beobachtete längerfristig signifikant reduzierte Proliferationsrate der Wildtyp- und Replikonzelllinie unter Hemmung der PLC γ -Aktivität durch U-73122 (Abb. 3.8). Denkbar wäre somit, dass HCV durch die Induktion einer verstärkten Phosphorylierung von Akt und PLC γ sowie eventueller weiterer Komponenten der EGF-induzierten Signalwege einen Schutz der Wirtszelle vor der durch die Virusinfektion getriggerten Aktivierung proapoptotischer Signalwege erzielt.

Pathophysiologisch könnte dies unter Umständen eine erhöhte Proliferationsrate der Hepatozyten und der Zellen des hepatischen Stromas bei chronischer HCV-Infektion zur Folge haben und bei der Entwicklung einer hepatischen Steatose und Fibrose mit den Endpunkten der Leberzirrhose und des Hepatozellulären Karzinoms eine Rolle spielen. In früheren Arbeiten wurde Akt als ein wesentlicher Faktor identifiziert, der für die Lebersteatose und auch das Karzinomrisiko verantwortlich ist; seine verstärkte Aktivierung stellt einen negativen prognostischen Faktor bei Leberzellkarzinomen dar^{81,82}. Dementsprechend wäre zu diskutieren, ob eine Hemmung bzw. Reduktion der Aktivierung von Akt möglicherweise eine zusätzliche Therapieoption darstellen könnte, über die einerseits die Virusreplikation unterdrückt und andererseits die Entwicklung von Steatose und HCC günstig beeinflusst würde. Zumindest bei einer chronischen Infektion mit dem besonders häufig zum HCC führenden Genotyp 1b könnte Triciribine auch der Tumorphylaxe dienen⁸³. Erste Erfahrungen aus klinischen Phase I- und II-Studien zum Einsatz von Triciribine in der Behandlung diverser Tumore mit verstärkter Akt-Aktivierung liegen bereits vor und sollten bei einer eventuellen Anwendung von Triciribine in der Hepatitis C-Therapie berücksichtigt werden^{84,85}.

Zahlreiche weitere Einflüsse des HCV auf die Wachstumsfaktor-vermittelten Signale sind beschrieben. Ein in dieser Diskussion essentieller Aspekt ist der kürzlich erfolgte Beleg, dass der EGFR und seine Virus-induzierte Aktivierung sowie die hierdurch induzierte Ausbildung eines Proteinkomplexes aus CD81 und Claudin1 für den Viruseintritt in die Wirtszelle wichtige Kofaktoren sind²⁴. Teilweise werden die vom EGFR ausgehenden Signalkaskaden durch das Virus jedoch auch negativ reguliert.

Es konnte beispielsweise wiederholt gezeigt werden, dass NS5A den MAPK-Signalweg wahrscheinlich über eine Interaktion mit Grb2 hemmt⁸⁶. Auch eine reduzierte Autophosphorylierung des EGFR als Antwort auf einen EGF-Stimulus wurde in HCV-Replikon-exprimierenden Hepatozyten nachgewiesen⁸⁷. Dies könnte mitursächlich dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit die auf RNA-Ebene beobachtete Steigerung der HCV-Replikation infolge der Stimulation mit EGF nicht auf Proteinebene bestätigt werden konnte. Unter EGF-Einfluss resultierte sogar eher eine supprimierte Expression der nichtstrukturellen HCV-Proteine NS3, 5A und 5B (Abb. 3.4 B-D). Diese Effekte waren allerdings nicht in allen Experimenten reproduzierbar und signifikant, insgesamt war keine eindeutig positive oder negative EGF-induzierte Wirkung auf HCV auf Proteinebene zu beobachten. Hierdurch wird die Frage aufgeworfen, inwiefern durch EGF die Expression und Stabilität der HCV-Proteine in unterschiedlichen Richtungen beeinflusst werden. Zukünftige weiterführende Untersuchungen müssen darüber hinaus die Frage nach den längerfristigen Effekten einer EGF-Stimulation auf die HCV-Replikation klären.

Ein Punkt, der für einen positiven Effekt von EGF auf die virale Replikation spricht, ist die Beobachtung, dass die durch Behandlung mit Triciribine erreichte Senkung der HCV-Proteintranslation unter EGF-Einwirkung geringfügiger ausfällt als bei Fehlen von EGF (Abb. 3.4). Gleichzeitig zeigten klinische Untersuchungen erhöhte Serumkonzentrationen für die Wachstumsfaktoren HGF und EGF bei chronisch HCV-Infizierten. Die Konzentrationssteigerungen korrelierten mit der inflammatorischen Aktivität und dem Fibrosegrad im Lebergewebe der Patienten. Im Rahmen einer erfolgreichen Interferon-Therapie sanken die Serumkonzentrationen für HGF, EGF und PDGF, was eine Stabilisierung der Fibrose reflektierte, während die Wachstumsfaktorkonzentrationen bei Therapieversagern erhöht blieben⁸⁸. Für die MAP-Kinasen MEK, ERK1 und ERK2 wiederum ist neben der zuvor erwähnten hemmenden Wirkung von HCV auch bereits mehrfach eine gesteigerte und prolongierte Aktivierung durch HCV-Core beschrieben⁸⁹. Ebenso wird durch das Core-Protein vor allem des Genotyps 3a die Akt-Phosphorylierung hochreguliert⁹⁰.

Die Wechselwirkungen zwischen dem Virus und den einzelnen Komponenten der zellulären durch Wachstumsfaktoren regulierten Signalkaskaden sind also weder als eindeutig positive, noch als negative Einflüsse zu klassifizieren und variieren sicherlich je nach dem aktuellen Zustand der Wirtszelle und ihrer Umgebung. Es ist davon auszugehen, dass hier im Laufe der Ko-Evolution mit dem Wirtsorganismus

durch die HCV-Infektion Mechanismen in Gang gesetzt wurden, die ein Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Zellzyklus-, -proliferations- und -stoffwechsel-regulierenden Signalwegen herstellen, um einerseits optimale Bedingungen für eine nachhaltige Replikation und andererseits das Überleben seiner Wirtszelle trotz anhaltender Virusreplikation zu ermöglichen. Hierzu übt das Virus sowohl aktivierende als auch hemmende Einflüsse aus. Basierend auf den beobachteten Effekten der Aktivierung von Akt und PLC γ auf die Replikation des HCV ist ein denkbare Ziel künftiger Experimente, diese Ergebnisse zu bestätigen und durch Betrachtung der Akt nachgeschalteten Signalwege zu präzisieren. Weitere spezifische Inhibitoren, etwa der mTOR-Inhibitor Everolimus⁹¹ oder der duale Akt-, mTORC1 und 2-Inhibitor NVP-BEZ235⁹², könnten auf ihren Einfluss auf die HCV-Replikation hin untersucht werden und in Zukunft möglicherweise in Einzelfällen in der Therapie der Hepatitis C Verwendung finden. So wurden bereits mehrere nicht direkt antiviral wirksame, sondern auf Zielmoleküle des Wirts gerichtete Substanzen, wie etwa Cyclophilin-Inhibitoren, mit Erfolg auf ihren therapeutischen Effekt gegen HCV untersucht⁴³. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse in Szenarien der Virusinfektion im Zellkulturmodell unter Einsatz von Virusisolaten, die auch im Zellkulturmodell zur Etablierung von Infektionszyklen führen, überprüft werden.

Auch die Bedeutung der PLC γ -Aktivität für das Hepatitis C Virus ist noch nicht abschließend zu beurteilen und ein möglicher Gegenstand künftiger Forschung. Weiterhin ist die Bedeutung anderer Wachstumsfaktoren wie PDGF, HGF oder TGF- β für die HCV-Replikation zu klären. Zahlreiche Aspekte der Interaktionen zwischen dem Hepatitis C Virus und den Wachstumsfaktor-abhängigen Signalwegen werden noch näher untersucht werden müssen, um diese in ihrer Komplexität umfassender zu verstehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Auch über 20 Jahre nach seiner Identifikation gilt das Hepatitis C Virus mit einer geschätzten Infektionsrate von weltweit etwa 170 Millionen Menschen und einer Chronifizierungsrate von über 70 % als einer der wichtigsten Erreger chronischer Lebererkrankungen. Häufige Spätfolge einer chronischen Infektion ist die Leberzirrhose, mit einem erhöhtem Risiko ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) zu entwickeln. Erst jüngst konnte die bisherige nebenwirkungsreiche und begrenzt effektive Standardtherapie mit pegylierten Interferonen und Ribavirin durch Einführung neuer direkt antiviral wirkender Substanzen ergänzt werden, wobei die mögliche Entwicklung von Resistenzen in der Zukunft noch nicht einzuschätzen ist. Nach wie vor werden die Therapieerfolge eingeschränkt durch eine begrenzte Effektivität, niedrige Toleranz, Resistenzentwicklung und die hohen Kosten.

Als obligat intrazellulärer Parasit ist das Hepatitis C Virus in sämtlichen Schritten seines Replikationszyklus auf die Infrastruktur der Wirtszelle angewiesen. Um eine persistierende Infektion zu ermöglichen und in der Wirtszelle zu verbleiben, muss das Hepatitis C Virus eine mit dem Überleben der Wirtszelle nicht zu vereinbarende Schädigung derselben verhindern. Diverse zelluläre Signalwege, die eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus und der antiviralen Abwehr spielen, werden daher durch das Hepatitis C Virus auf komplexe Weise beeinflusst. Bereits mehrfach wurden Eingriffe von HCV in die EGFR-abhängige Signalvermittlung, die für zentrale Prozesse im Lebenszyklus epithelialer Zellen wie Proliferation und Proteinsynthese, Differenzierung und Apoptose essentiell ist, nachgewiesen. Ausgangspunkt der vorliegenden Dissertation war die Beobachtung, dass HCV durch proteolytische Spaltung von TC-PTP die Zelle gegenüber EGF-Stimuli sensitiviert und dadurch eine verstärkte EGF-induzierte Aktivierung von Akt und PLC γ sowie eine Steigerung der basalen Aktivierung von Akt erreicht.

Unter Verwendung spezifischer Inhibitoren wurde analysiert, welche Relevanz die Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs und von PLC γ für die effiziente Replikation von HCV in hoher Menge hat. Es konnte nachgewiesen werden, dass die enzymatischen Aktivitäten des EGFR und der PI3K für die Replikation von HCV nicht erforderlich sind und lediglich auf RNA-Ebene bei der EGF-induzierten Steigerung der viralen

Replikation eine Rolle spielen. Dagegen ist die Kinase-Aktivität von Akt sowohl für eine hohe Replikationsrate des viralen Genoms, als auch für die suffiziente Expression der HCV-Proteine essentiell. Inhibitoren der Akt-Aktivierung oder der Akt nachgeschalteten Signalmoleküle könnten möglicherweise in der zukünftigen Therapie der Hepatitis C eine Rolle spielen. Desweiteren wurde der Nachweis erbracht, dass die Aktivität von PLC γ für die virale Replikation nicht notwendig ist und sie eventuell sogar geringfügig senkt. Die zuvor beobachtete gesteigerte Aktivierung von PLC γ durch HCV hat also nicht das Ziel, dessen Replikationsrate zu steigern, sondern verfolgt einen anderen nicht näher bekannten Zweck. Diese Ergebnisse liefern möglicherweise einen Beitrag zu einer präziseren Einschätzung der Bedeutung der wachstumsfaktorabhängigen Signalwege für das Hepatitis C Virus.

6 ABKÜRZUNGEN

10-JÜR	10-Jahresüberlebensrate
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
ALT	Alanin-Aminotransferase
API-2	Akt/PKB Signaling Inhibitor-2
AST	Aspartat-Aminotransferase
BAD2	Bcl2-antagonist of death
CMV	Cytomegalie-Virus
DAG	Diacylglyceride
DAAD	Direct acting antiviral drug
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	EGF-Rezeptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GLUT	Glukosetransporter
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDL	High density lipoprotein
HIV	Human immunodeficiency virus
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IDU	Intravenous drug user
IFN	Interferon
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IRES	Internal ribosome entry site
LDL	Low density lipoprotein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

Abkürzungen

MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MKK	MAPK kinase kinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC	mTOR-Complex
NANBH	Non-A-non-B-Hepatitis
NFκB	Nuclear factor <i>kappa</i> -B
ORF	Open reading frame
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
Peg-IFN	Pegyliertes Interferon
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PLCγ	Phospholipase C-gamma
PRR	Pattern recognition receptor
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RdRP	RNA-dependente RNA-polymerase
RIG	Retinoic acid inducible gene
SAPK	Stress-activated protein kinase
SVR	Sustained virological response
TC-PTP	T-Zell Proteintyrosin-Phosphatase
TGF-α	Transforming growth factor- <i>alpha</i>
TLR	Toll-like receptor
UTR	Untranslated region
VLDL	Very low density lipoprotein

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV, reviewed by Zuckerman AJ. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *Rev Med Virol* 2011; 11: 3-9.
2. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
3. M. Alter. HCV Routes of Transmission: What Goes Around Comes Around. *Semin Liver Dis* 2011; 31: 340–346
4. Hatzakis A, Wait S, Bruix J, Buti M, Carballo M, Cavaleri M, Colombo M, Delarocque-Astagneau E, Dusheiko G, Esmat G, Esteban R, Goldberg D, Gore C, Lok ASF, Manns M, Marcellin P, Papatheodoridis G, Peterle A, Prati D, Piorkowsky N, Rizzetto M, Roudot-Thoraval F, Soriano V, Thomas HC, Thursz M, Valla D, van Damme P, Veldhuijzen IK, Wedemeyer H, Wiessing L, Zanetti AR, Janssen HLA. The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference. *J Viral Hepatitis* 2011; 18 Suppl. 1: 1-16
5. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, Dalgard O, Dillion JF, Flisiak R, Forns X, Frankova S, Goldis A, Goulis I, Halota W, Hunyady B, Lagging M, Largen A, Makara M, Manolakopoulos S, Marcellin P, Marinho RT, Pol S, Poynard T, Puoti M, Sagalova O, Sibbel S, Simon K, Wallace C, Young K, Yurdaydin C, Zuckerman E, Negro F, Zeuzem S. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int* 2011; Vol. 31, Issue Supplement s2: 30-60.
6. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology*; 2004, Vol. 39, No. 1: 5-19
7. Moradpour D, Blum HE. A primer on the molecular virology of hepatitis C. *Liver International* 2004; 24: 519-525.
8. Ross RS, Viazov S, Renzing-Köhler K, Roggendorf M. Changes in the Epidemiology of Hepatitis C Infection in Germany: Shift in the Predominance of Hepatitis C Subtypes. *J Med Virol*; 2000, 60: 122-125.
9. Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, Van der Merwe S, Haffar S, Gadano A, Zein N, Lai CL, Pawlotsky JM, Heathcote EJ, Dusheiko G, Marcellin P. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int* 2010; 30(3): 342-55.
10. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012 May; 142(6): 1264-1273.

11. Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clin Microbio Rev* 2000; Vol. 13, No. 2: 223-35.
12. Bode JG, Brenndorfer E, Haussinger D. Hepatitis C Virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol Chem* 2008.
13. Wölkl B, Sansonno D, Kräusslich H, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. Subcellular Localization, Stability, and trans-Cleavage Competence of the Hepatitis C Virus NS3-NS4A Complex Expressed in Tetracycline-Regulated Cell Lines. *J. Virol.* March 2000; vol. 74 no. 5 2293-2304.
14. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* 2012; 8(12): e1003056.
15. Quintavalle M, Sambucini S, Summa V, Orsatti L, Talamo F, De Francesco R, Neddermann P. Hepatitis C virus NS5A is a direct substrate of casein kinase I-alpha, a cellular kinase identified by inhibitor affinity chromatography using specific NS5A hyperphosphorylation inhibitors. *J Biol Chem.* 2007 Feb 23; 282(8): 5536-44.
16. Kim J, Lee D, Choe J. Hepatitis C virus NS5A protein is phosphorylated by casein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr 21; 257(3): 777-81.
17. Chen YC, Su WC, Huang JY, Chao TC, Jeng KS, Machida K, Lai MM. Polo-like kinase 1 is involved in hepatitis C virus replication by hyperphosphorylating NS5A. *J Virol.* 2010 Aug; 84(16): 7983-93.
18. Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol.* 2005 Mar; 79(5): 3187-94.
19. Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.* 2008 Mar 21; 4(3): e1000032.
20. Tang H, Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clinical Science* 2009; 117: 49–65.
21. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* Vol 436(7053): 933-8, August 2005.
22. Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, Mee CJ, McCaffrey K, Young S, Drummer H, Balfe P, McKeating JA. Claudin Association with CD81 Defines Hepatitis C Virus Entry. *J Biol Chem.* 2010 Jul 2; 285(27): 21092-102.
23. Barth H, Liang TJ, Baumert TF. Hepatitis C Virus Entry: Molecular Biology and Clinical Implications. *Hepatology* 2006; Vol. 44, No. 3: 527-35
24. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee

- CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoël M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med.* 2011 May;17(5): 589-95.
25. Blanchard E, Hourieux C, Brand D, Ait-Goughoulte M, Moreau A, Trassard S, Sizaret PY, Dubois F, Roingeard P. Hepatitis C Virus-Like Particle Budding: Role of the Core Protein and Importance of Its Asp111. *J Virol*, 2003; vol. 77 no. 18: 10131-38.
26. Pawlotsky JM, Chevaliez S, MCHutchinson JG. The Hepatitis C Virus Life Cycle as a Target for New Antiviral Therapies. *Gastroenterology* 2007; 132: 1979-98.
27. Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 71-99.
28. Plauzolles A, Lucas M, Gaudieri S. Hepatitis C virus adaptation to T-cell immune pressure. *Scientific World Journal.* 2013; 2013: 673240.
29. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology* 2010 Apr; 129(4): 474-81.
30. Larrubia JR, Benito-Martínez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2008 Dec 21; 14(47): 7149-59.
31. Amarapurkar D. Natural history of hepatitis C virus infection. *J Gastroentero Hepatol* 2000; Vol 15, Issue Supplement s2: 105–10.
32. Grebely J, Dore GJ. What Is Killing People with Hepatitis C Virus Infection? *Semin Liver Dis* 2011; Vol. 31, No. 4: 331-9.
33. Wong MT and Chen SLS. Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection. *Cell Mol Immunol* 2014; 1-25.
34. Bode JG, Brenndörfer ED, Häussinger D. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462:254-65.
35. Jang JY, Chung RT. Chronic Hepatitis C. *Gut and Liver* 2011; Vol. 5, No. 2: 117-32.
36. Friedman RM, Contente S. Treatment of Hepatitis C Infections with Interferon: A Historical Perspective. *Hepat Res Treat.*2010; 2010: 323926.
37. Grebely J, Matthews GV, Dore GJ. Treatment of acute HCV infection. *Nat Rev GastroenterolHepatol* 2011; 8, 265-74.
38. V. Lohmann, F. Körner, J.-O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, R. Bartenschlager. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* Vol 285: 110-3, 2 July 1999.
39. Kanda T, Yokosuka O, Omata M. Treatment of hepatitis C virus infection in the future. *Clin Transl Med.* 2013 Apr 11; 2(1): 9.
40. Catherine Stedman. Sofosbuvir, a NS5B polymerase inhibitor in the treatment of hepatitis C: a review of its clinical potential. *Ther Adv Gastroenterol* 2014,

- Vol. 7(3) 131-140.
41. Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Hassanein T, Jacobson I, Lawitz E, Lok AS, Hinestrosa F, Thuluvath PJ, Schwartz H, Nelson DR, Everson GT, Eley T, Wind-Rotolo M, Huang SP, Gao M, Hernandez D, McPhee F, Sherman D, Hindes R, Symonds W, Pasquinelli C, Grasela DM. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.* 2014, 370, 211-221.
 42. Schneider MD, Sarrazin C. Antiviral therapy of hepatitis C in 2014: Do we need resistance testing? *Antiviral Research* 105 (2014) 64-71.
 43. DeFrancesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 2005; Vol 436: 953-60.
 44. Casey LC, Lee WM. Hepatitis C virus therapy update 2013. *Curr Opin Gastroenterol* 2013, 29: 243-249.
 45. Pol S, Corouge M. Treatment of hepatitis C: current status and perspectives. *Rev Prat.* 2014 May; 64(5): 605-12.
 46. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1161-76.
 47. Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009 Oct; 6(10): 587-95.
 48. Hackel PO, Zwick E, Norbert Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 184-9.
 49. Berasain C, Perugorria MJ, Latasa MU, Castillo J, Goñi S, Santamaría M, Prieto J, Avila MA. The Epidermal Growth Factor Receptor: A Link Between Inflammation and Liver Cancer. *ExpBiol Med* 2009; 234: 713-25.
 50. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 1999; 4: 1029-40.
 51. Mattila E, Pellinen T, Nevo J, Vuoriluoto K, Arjonen A, Ivaska J. Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 78-85.
 52. Haj FG, Verveer PJ, Squire A, Neel BG, Bastiaens PI. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* 2002; 295: 1708-11.
 53. Carnero A. Novel inhibitors of the PI3K family. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18(9): 1265-77.
 54. Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 2008; 27, 6473-88.
 55. Fujiyoshi M, Ozaki M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18: 13-22.
 56. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 11;

- 1697(1-2): 3-16.
57. Matheny RW, Adamo ML. Current Perspectives on Akt Activation and Actions. *Exp Biol Med* 2009; 234:1264-70.
 58. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010; 29, 4989-5005.
 59. Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Oct; 6(10): 587-95.
 60. Kim MJ, Kim E, Ryu SH, Suh PH. The mechanism of phospholipase C- γ 1 regulation. *Exp Mol Med* 2000; Vol. 32, No. 3, 101-9.
 61. Patterson RL, Rossum DB, Nikolaidis N, Gill DL, Snyder SH. Phospholipase C-g: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends BiochemSci* 2005; Vol.30 No.12, pp.688-97.
 62. Kheifets V, Mochly-Rosen D. Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: Design of specific modulators of kinase function. *Pharmacological Research* 2007; 55: 467-76.
 63. Hirai T, Chida K. Protein Kinase C ζ (PKC ζ): Activation Mechanisms and Cellular Functions. *J Biochem* 2003; 133: 1-7.
 64. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 2001; 44(6): 659-73.
 65. Brenndörfer ED, Karthe J, Frelin L, Cebula P, Erhardt A, Schulte am Esch J, Hengel H, Bartenschlager R, Sällberg M, Häussinger D, Bode JG. Nonstructural 3/4A Protease of Hepatitis C Virus Activates Epithelial Growth Factor-Induced Signal Transduction by Cleavage of the T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase. *Hepatology* 2009; 49: 1810-20.
 66. Zhang BH, Farrell GC. Chronic Ethanol Consumption Disrupts Complexation between EGF Receptor and Phospholipase C-g1: Relevance to Impaired Hepatocyte Proliferation. *BiochemBiophys Res Comm* 1999; 257: 89-94.
 67. Kim YH, Choi KH, Park JW, Kwon TK. LY294002 inhibits LPS-induced NO production through a inhibition of NF- κ B activation: independent mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase. *Immunology Letters* 2005; 99: 45-50.
 68. Evangelisti C, Ricci F, Tazzarri P, Chiarini F, Battistelli M, Falcieri E, Ognibene A, Pagliaro P, Cocco L, McCubrey JA, Martelli AM. Preclinical Testing of the Akt Inhibitor Triciribine in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Cell Physiol* 2011; 226: 822-31.
 69. Mogami H, Lloyd Mills C, Gallacher DV. Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca²⁺, potentiates Ins(1,4,5)P₃-mediated Ca²⁺ release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J* 1997; 324: 645-5.
 70. H. Nakabayashi, K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, J. Sato. Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Research* 42: 3858-63, September 1982.
 71. S. Čikoš , A. Bukovská. Relative quantification of mRNA: comparison of

- methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology* 8: 113, 2007.
72. B. Lehner, B. Sandner, J. Marschallinger, C. Lehner, T. Furtner, S. Couillard-Despres, F.J. Rivera, G. Brockhoff, H.-C. Bauer, N. Weidner, L. Aigner. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res* 345: 313-328, 2011.
 73. Berndt N, Yang H, Trinczek B, Betzi S, Zhang Z, Wu B, Lawrence NJ, Pellecchia M, Schönbrunn E, Cheng JQ, Sebti SM. The Akt activation inhibitor TCN-P inhibits Akt phosphorylation by binding to the PH domain of Akt and blocking its recruitment to the plasma membrane. *Cell Death Differ* 2010; 17(11): 1795-804.
 74. Yang L, Dan HC, Sun M, Liu Q, Sun XM, Feldman RI, Hamilton AD, Polokoff M, Nicosia SV, Herlyn M, Sebti SM, Cheng JQ. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells over-expressing Akt. *Cancer Res* 2004; 64: 4394-9.
 75. Wang X, Proud CG. The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis. *Physiology* 2006; 21: 362-9.
 76. Mannová P, Beretta L. Activation of the N-Ras-PI3K-Akt-mTOR pathway by hepatitis C virus: control of cell survival and viral replication. *J Virol.* 2005 Jul; 79(14): 8742-9.
 77. He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, Jacobs BL, Katze MG. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol.* 2002 Sep; 76(18): 9207-17.
 78. Kim MJ, Kim E, Ryu SH, Suh PH. The mechanism of phospholipase C- γ 1 regulation. *Exp Mol Med* 2000; Vol. 32, No. 3, 101-9.
 79. Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent Cleavage of Signaling Proteins during Apoptosis. A Turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem.* 1998 Mar 20; 273(12): 7141-7.
 80. Bae SS, Perry DK, Oh YS, Choi JH, Galadari SH, Ghayur T, Ryu SH, Hannun YA, Suh PG. Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J* 2000 Jun; 14(9): 1083-92.
 81. Jackel-Cram C, Qiao L, Xiang Z, Brownlie R, Zhou Y, Babiuk L, Liu Q. Hepatitis C virus genotype-3a core protein enhances sterol regulatory element-binding protein-1 activity through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-2 pathway. *J General Virol* 2010; 91: 1388-95.
 82. Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K, Reis H, Cicinnati VR, Schmid KW, Baba HA. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2008; 48(1): 83-90.
 83. Ahmad J, Eng FJ, Branch AD. HCV and HCC: Clinical Update and a Review of HCC-Associated Viral Mutations in the Core Gene. *Semin Liver Dis* 2011; Vol. 31, No. 4: 347-55.

84. Cheng JQ, Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* 2005; 24, 7482-92.
85. Garrett CR, Coppola D, Wenham RM, Cubitt CL, Neuger AM, Frost TJ, Lush RM, Sullivan DM, Cheng JQ, Sebti SM. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of triciribine phosphate monohydrate, a small-molecule inhibitor of AKT phosphorylation, in adult subjects with solid tumors containing activated AKT. *Invest New Drugs* 2011; 29: 1381-9.
86. Mankouri J, Stephen Griffin S, Harris M. The Hepatitis C Virus Non-Structural Protein NS5A Alters the Trafficking Profile of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Traffic* 2008; 9: 1497-509.
87. Macdonald A, Ka Yu Chan J, Harris M. Perturbation of epidermal growth factor receptor complex formation and Ras signalling in cells harbouring the hepatitis C virus subgenomic replicon. *J General Virol* 2005; 86: 1027-33.
88. Panasiuk A, Flisiak R, Prokopowicz D. Effect of interferon alpha2b plus ribavirin treatment on selected growth factors in respect to inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005; 11(12): 1854-1858.
89. Sato Y, Kato J, Takimoto R, Takada K, Kawano Y, Miyanishi K, Kobune M, Sato Y, Takayama T, Matunaga T, Niitsu Y. Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor alpha expression via activation of nuclear factor-kappaB. *Gut* 2006; 55(12): 1801-8.
90. Jahan S, Khaliq S, Siddiqi MH, Ijaz B, Ahmad W, Ashfaq UA, Hassan S. Anti apoptotic effect of HCV core gene of genotype 3a in Huh-7 cell line. *Virol J* 2011; 8: 522.
91. Anandappa G, Hollingdale A, Eisen T. Everolimus - a new approach in the treatment of renal cell carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2010 Mar 9; 2: 61-70.
92. Sacco A, Roccaro A, Ghobrial IM. Role of dual PI3/Akt and mTOR inhibition in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Oncotarget* 2010; 1(7): 578-82.

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Johannes G. Bode, unter dessen Leitung und Betreuung die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, für seine kontinuierliche Unterstützung und Bereitschaft zur Diskussion der erhobenen Ergebnisse, für seine wertvollen Anregungen und seine Beratung bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

Herrn Professor Dr. med. Dieter Häussinger danke ich für die tatkräftige Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe sowie für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in den Laboratorien seiner Klinik an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchzuführen.

Herrn Dr. rer. nat. Erwin Brenndörfer danke ich für die Betreuung und die Einarbeitung in einen relevanten Teil der in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Techniken. Im Rahmen dieser Einarbeitung sind unter seiner Anleitung auch die in Abbildung 3.1, 3.2 und 3.3 dargestellten Daten im Rahmen gemeinsam durchgeführter Experimente erhoben worden.

Frau Dr. rer. Nat. Juliane Karthe danke ich für die Betreuung und Einführung in die Methode des Western Blot sowie die technische Unterstützung bei den auf diesem Verfahren basierenden Abbildungen. Darüber hinaus danke ich ihr für die Unterstützung und Beratung bei der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Experimentellen Hepatologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente, die dieser Dissertation zugrunde liegen.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie sowie an Dr. med. Ivo Görlach und Dr. med. Pierre-Jacques Pradeaux, deren Unterstützung ich mir zu jeder Zeit sicher sein konnte.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den

Tim Weitz