

**Untersuchung und
Charakterisierung der
Interaktion des Hepatitis C
viralen Proteins NS5A mit der
humanen Tyrosinkinase c-SRC**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Stefan KLINKER
aus Düren

Düsseldorf, Januar 2018

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

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Dieter Willbold
2. Prof. Dr. Johannes Georg Bode

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2018

HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Zusammenfassung

Untersuchung und Charakterisierung der Interaktion des Hepatitis C viralen Proteins NS5A mit der humanen Tyrosinkinase c-SRC

von Stefan KLINKER

Vorhergehende Studien mit Hepatozyten Zelllinien mit stabil inkorporiertem Hepatitis C Virus-Replikongenom (Huh 9-13) zeigten, dass die humane Tyrosinkinase c-SRC durch die viralen Proteine NS5A und NS5B in den viralen Replikationskomplex rekrutiert wird. Die Ausbildung des Komplexes ist essentiell für die virale Replikation. Im Komplex mit den viralen Proteinen steht c-SRC nicht für die physiologischen Funktionen zur Verfügung, zu denen unter anderem die Beteiligung an Signalwegen für die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellüberleben gehören.

Ausgehend von Studien zur Bindung von NS5A an c-SRC-SH2 in Hepatozyten und NS5A an FYN-SH2 in B-Zelllymphozyten, wird ein Phosphotyrosin (pY) -abhängiger Mechanismus der Bindung vermutet.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bindung zwischen NS5A und c-SRC-SH2 zu untersuchen, die entscheidende Interaktionsstelle zu identifizieren und biochemisch zu charakterisieren.

Über Pulldown-Assays mit pY-bindedefiziente Varianten von c-SRC-SH2 und FYN-SH2 konnte eine klar pY-abhängige Bindung von NS5A gezeigt werden. Um die Hypothese zu überprüfen, wurde die Bindung von synthetischen NS5A-pY-Peptiden an c-SRC-Domänen qualitativ und quantitativ untersucht. So wurden mehrere putative Bindestellen mit Dissoziationskonstanten (K_d s) im niedrigen μM -Bereich identifiziert. Drei der Epitope befanden sich in der D1-Domäne (Y93, Y129, Y161) und eins in der D3-Domäne (Y413). Über Strukturdaten zur D1-Domäne wurde die Oberflächenzugänglichkeit der Tyrosine bestätigt.

Nachfolgend wurden D1- und D2D3-Domänen von NS5A im mg-Maßstab mit pY-Modifikationen heterolog exprimiert und gereinigt. Die Expression wurde im *E. coli*-Stamm TKB-1 durchgeführt, welcher neben dem „protein of interest“ die Tyrosinkinase ELK co-exprimiert, die unspezifisch co- und posttranslational *in vivo* Tyrosinreste phosphoryliert. Durch diese unspezifische Phosphorylierung konnte nicht von homogen modifizierten Tyrosinresten ausgegangen werden. Dieser Umstand wurde im Design der weiteren Experimente berücksichtigt.

Über *in vitro*-Assays wurde die Bindung von NS5A-D1^{ELK pY} und -D2D3^{ELK pY} an c-SRC-SH2 qualitativ durch Pulldown-Assays und quantitativ durch Biolayer-Interferenz (BLI) gemessen. Dabei wurden K_d s von ~ 500 nM für NS5A-D1^{ELK pY} an c-SRC-SH2 gemessen. Kontrollexperimente, mit unphosphorylierten oder pY-bindedefiziente Analyten, zeigten eine klare pY-Abhängigkeit der Bindung. Für NS5A-D2D3^{ELK pY} konnte lediglich eine Bindungskonstante im mittleren μM -Bereich ($K_d = 18 \mu\text{M}$) für c-SRC-SH2 gemessen werden.

Um das für die Bindung entscheidende Tyrosin in NS5A-D1 einzugrenzen, wurden die drei Kandidaten Y93, Y129 und Y161 durch Phenylalanine ausgetauscht.

Diese Varianten von NS5A-D1^{ELK pY} wurden auf c-SRC-SH2-Bindung untersucht. Varianten mit Y93F-Austausch zeigten den Verlust der μM -Affinität zu c-SRC-SH2, wohingegen Y93^{ELK pY}-Varianten *Wildtyp*-ähnliche Affinitäten aufwiesen ($K_d \sim 0,5\text{-}1,5 \mu\text{M}$)

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der *in vitro*-Bindungsstudien darauf hin, dass Y93 nach Phosphorylierung Teil des c-SRC-SH2-Bindeepitops von NS5A ist.

Anschließend wurden Experimente zur biologischen Relevanz in Zellkultur-Replikonsmodellen durchgeführt. Dazu wurden Hepatozyten-Zelllinien (Huh 7) mit HCV-Replikon-Plasmiden, mit NS5A Y93F-Austausch, transfiziert. Es zeigte sich, dass die Replikationseffizienz von HCV, verglichen mit dem *wt*-HCV-Replikon-Plasmid oder stabil transfizierten Huh 9-13-Hepatozyten, reduziert wurde. Austausche für Y129 und Y161, jeweils zu F, zeigten keine statistisch signifikanten Änderungen der Replikationsraten.

HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

*Abstract***Untersuchung und Charakterisierung der Interaktion des Hepatitis C viralen Proteins NS5A mit der humanen Tyrosinkinase c-SRC**

by Stefan KLINKER

Previous results provided strong evidence that in hepatitis C virus (HCV) infected cells the cellular tyrosine kinase c-SRC is recruited into the viral replication machinery by the viral nonstructural proteins NS5A and NS5B. Thereby, c-SRC participates in the formation of a NS5A/NS5B protein complex that is a prerequisite for efficient HCV replication. This likely interferes with the physiological function of the ubiquitously expressed c-SRC that governs a variety of important cellular processes e.g. with cellular proliferation, differentiation or cell survival.

Recently, it has been shown for HCV infected hepatocytes that NS5A binds to c-SRC-SH2 and in HCV infected B-cell lymphocytes NS5A binds FYN-SH2, leading to the assumption that NS5A interacts with SH2 domains via phosphotyrosine (pY) modification.

The aim of this work to investigate the binding of NS5A and c-SRC-SH2, identify and characterize biochemically the important interaction site.

Pull-down assays with different SH2 domains and non-pY binding variants of SH2 domains were performed and showed a pY dependent binding of NS5A for SH2 domains.

Tyrosine phosphorylated peptides covering NS5A sequence and mg-scale of recombinant purified c-SRC-SH2 domains were used for different methods of screening putative binding motives of NS5A and c-SRC. ELISA, fluorescence polarization measurements and biolayer interferometry (BLI) were used to measure binding qualitatively and quantitatively. The result suggested several candidate binding sites for c-SRC-SH2 with low μM binding affinities, three in D1 (Y93, Y129, Y161) and one in D3 (Y413). Structural information of NS5A-D1 suggested that all of the three D1 candidates were exposed to the protein surface.

Based on these peptide screenings, different boundaries of NS5A were purified in milligram scale in various post-translational modified pY states. This modification of protein was achieved by using *E. coli* TKB-1 strain which co-expresses ELK-kinase for unspecific phosphorylation of protein of interested *in vivo* during biosynthesis. Previous studies showed some inhomogeneity of pY modification pattern, therefore following experiments were designed considering this.

In vitro binding assays with recombinant components were performed and measuring qualitatively (pull-down assays) and quantitatively (BLI). Dissociation constants (K_{ds}) of $\sim 500\text{ nM}$ were observed for c-SRC-SH2 and NS5A-D1^{ELK pY wt}. Control experiments without phosphorylation modification of NS5A as well as experiments with non-pY binding variants of SH2 showed clear pY-dependence for binding. For NS5A-D2D3^{ELK pY} (with pY413) a K_d of $18\ \mu\text{M}$ for c-SRC-SH2 was observed, therefore nearly factor 40 less affine.

Based on NS5A-D1 domain different Y to F mutants (Y93F, Y129F, Y161F) were designed to inhibit phosphorylation whereas protein structure stayed unharmed.

Single, double and triple Y to F mutants were tested for c-SRC-SH2 binding capabilities. NS5A-D1^{ELK pY} Y93F variants showed lost of affinity for c-SRC-SH2. The affinity changed from $K_d \sim 1\ \mu\text{M}$ when Y93^{ELK pY} was present to $\gg 30\ \mu\text{M}$ in D1 Y93F^{ELK pY} variants, showing that pY93 is a high affinity docking side for c-SRC-SH2.

Knowledge of the interaction side is the first step for clarification of the structural basis of the c-SRC NS5A complex. First *in vivo* studies were performed using Huh 7 hepatocytes transfected with HCV replicon plasmids with D1 Y93F exchange. Cells showed reduced replication rate compared with Huh 7 with *wt* plasmid or Huh 9-13 stable replicon cells. D1 positions Y129F and Y161F leading to no statistical significant change in replication.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Abstract	v
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xiii
Abkürzungsverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
1.1 Das Hepatitis C Virus (HCV)	1
1.1.1 Epidemiologie von Hepatitis C	1
1.1.2 HCV-Genotypisierung und Systematik	2
1.1.3 Molekularer Aufbau von HCV	3
1.1.4 Infektions- und Replikationsmechanismus von HCV	6
1.2 Humane Tyrosinkinasen der Src-Familie	8
1.2.1 c-SRC: Zelluläre Funktion, struktureller Aufbau und Li- gandenbindung	9
1.3 Kanonische SH2-Bindung als möglicher Interaktionsmodus der c-SRC-HCV-Interaktion	11
1.4 NS5A-Phosphorylierung	12
1.4.1 Phosphorylierungen an Serin und Threoninen	12
1.4.2 Phosphorylierungen an Tyrosinen	14
1.5 HCV-Therapie	15
1.6 Kenntnisse zur c-SRC - NS5A und c-SRC - NS5B-Interaktion	18
1.7 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material	21
2.1 Chemikalien	21
2.2 Verwendete Geräte	21
2.3 Antikörper	22
2.4 Enzyme für die Molekularbiologie	22
2.5 Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	22
2.5.1 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen	23
2.6 Nukleinsäuren	24
2.6.1 Verwendete Gene und Plasmide	24
2.6.2 Sequenzen von Oligonukleotiden	25
2.7 Material zur Reinigung von Nukleinsäuren	25
2.8 Materialien zur Reinigung von Proteindomänen	25

2.9	Puffer zur Lyse von Zellen, Reinigung von Proteindomänen, Durchführung von Pulldown-Assays	26
2.10	Puffer zur Durchführung biochemischer und biophysikalischer Messungen	28
2.11	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen	29
2.12	Sequenzen von synthetischen Peptiden aus NS5A	30
3	Methoden	31
3.1	DNA-Klonierungen	31
3.2	<i>E. coli</i> -Zellkulturen	32
3.3	Chromatographietechniken zur Reinigung von Proteindomänen als Fusionsproteine	33
3.3.1	Reinigung von GST-Fusionsproteinen	33
3.3.2	Reinigung von His ₆ -Fusionsproteinen	33
3.3.3	Durchführung von Größenausschlusschromatographie (SEC)	33
3.4	Nachweis der Reinheit und Identität von Proteinen und Proteindomänen	34
3.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	34
3.6	Zellbiologische Methoden	35
3.6.1	Kultivierung von transfizierten Hepatozyten Zelllinien und Präparation für Pulldown-Assays	35
3.6.2	Pulldown-Assays	35
3.7	Biochemische und -physikalische Methoden	36
3.7.1	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	36
3.7.2	Fluoreszenz-Polarisationsmessungen	36
3.7.3	Zirkulardichroismus (CD)-Messungen	37
3.7.4	Biolayer-Interferometrie (BLI) -Messungen	38
3.8	MS-Untersuchung von NS5A aus Huh 9-13	39
4	Ergebnisse	41
4.1	Bindung von NS5A an Src-Kinasen untersucht durch Pulldown-Assays	41
4.1.1	Reinigung von c-SRC-Domänen	41
4.1.2	Reinigung von Domänen aus FYN-SH2 und FYN-SH2 R176K	43
4.1.3	Etablierung des Pulldown-Assays mit c-SRC- Δ SH1	44
4.1.4	Untersuchung der Bindung von NS5A an verschiedene SH2-Domänen von Src-Kinasen	48
4.1.5	Massenspektrometrischer Ansatz zum Nachweis von NS5A aus Huh 9-13-Replikonlysat nach c-SRC-Pulldown	49
4.2	Peptidmapping zum <i>in vitro</i> -Nachweis möglicher c-SRC-SH2-bindender pY in NS5A	51
4.2.1	Qualitative Analyse der c-SRC-SH2 Bindung der Peptide mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	51
4.2.2	Quantitative Analyse der c-SRC-SH2-Bindung der Peptide durch Fluoreszenzpolarisation	54

4.2.3	Biolayer Interferometrie (BLI) von NS5A-Peptiden mit c-SRC- Δ SH1	55
4.3	Bindungsuntersuchungen mit Proteindomänen von NS5A und c-SRC	58
4.3.1	Reinigung von Domänen aus NS5A	58
	Reinigung von NS5A-D1 und Y-Substitutionsvarianten unter Koexpression von ELK-Tyrosinkinase	58
	Reinigung von NS5A-D2D3-Domänen	61
4.3.2	Bindung von NS5A-D2D3-Domänen an c-SRC- Δ SH1	63
4.3.3	Bindung von NS5A-D1-Domänen an c-SRC- Δ SH1	64
	Bindung von NS5A-D1 an c-SRC- Δ SH1: Pulldown-Experimente	64
	Bindung von NS5A-D1 ^{ELK pY} an c-SRC- Δ SH1: CD-Spektroskopie	65
	Bindung von NS5A-D1 an c-SRC- Δ SH1: BLI-Untersuchungen	66
4.3.4	Bindung von NS5A-D1-Varianten an c-SRC- Δ SH1: Identifikation des entscheidenden Tyrosinrests in NS5A	68
4.4	Untersuchung von NS5A Y93 im Hepatozyten-Zellkulturmodell	72
4.4.1	NS5A Y93 ist für die effiziente virale Replikation entscheidend	72
4.4.2	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Bedeutung von NS5A Y93 für die Bindung an c-SRC-SH2	73
5	Diskussion	77
5.1	Reinigung von Proteindomänen	77
5.2	Massenspektrometrische Untersuchungen: NS5A und NS5A als c-SRC- Δ SH1-Interaktionspartner identifiziert	79
5.3	Peptidsequenzen aus NS5A liefern vier mögliche Bindestellen für c-SRC-SH2	80
5.4	In NS5A-D1 liegt die entscheidende Bindestelle für c-SRC-SH2	83
5.5	NS5A pY93 ist für die Bindung an c-SRC-SH2 entscheidend	85
5.6	NS5A Y93 ist über viele HCV-Genotypen konserviert	86
5.7	NS5A Y93F reduziert im Replikon- <i>in vivo</i> -System die HCV-Replikationseffizienz	87
5.8	Daclatasvir zeigt keinen Einfluss auf die NS5A-D1 ^{ELK pY} -Bindung an c-SRC- Δ SH1	88
	Literaturverzeichnis	88
	A DNA-Sequenzen	107
	Anhang	106
	B Proteinsequenzen	111
	C Massenspektrometrische Ergebnisse	113
	D Publikationen	115

Danksagung	119
Eidesstattliche Erklärung	121

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des HCV-Polyproteins	3
1.2	Darstellung des HCV Polyproteins an der ER-Membran	4
1.3	Infektions- und Replikationsmechanismus von HCV	7
1.4	Schematische Darstellung von c-SRC-Strukturdomänen und Src-Regulation	9
1.5	pY in der Bindetasche der SH2-Domäne	11
1.6	Schematische Darstellung von Phosphorylierungs- und Interaktionsstellen in NS5A	13
1.7	Modell des NS5A-NS5B-c-SRC-Replikationskomplex	18
4.1	Reinigung verschiedener c-SRC-Proteindomänen	42
4.2	Gereinigte FYN-SH2 als GST-Fusionsprotein	43
4.3	Schema zur Vorbehandlung der stationären Phase vor Pulldown-Experimenten	44
4.4	Assay-Entwicklung für den c-SRC- Δ SH1 - NS5A-Pulldown	45
4.5	Western-Blot Untersuchung der c-SRC-NS5A-Pulldown-Entwicklung	46
4.6	Pulldown-Assay mit verschiedenen SH2-Domänen	48
4.7	Massenspektrometrie eines c-SRC-Pulldown	50
4.8	Übersicht der verwendeten NS5A-Peptide	51
4.9	ELISA von NS5A-Peptiden mit GST-c-SRC-SH2 und SH3-SH2-Domänen	52
4.10	FP-Messungen von NS5A-Peptiden mit c-SRC- Δ SH1	53
4.11	Übersicht der K_{ds} von verschiedenen Phosphopeptiden an c-SRC- Δ SH1 mit FP gemessen	55
4.12	BLI-Ergebnisse einzelner pY-Peptide mit c-SRC- Δ SH1	56
4.13	Zusammenfassung der BLI-Messungen mit NS5A-Peptiden	57
4.14	Reinigung von NS5A-D1	59
4.15	NS5A-D1-Varianten mit einem Phenylalanin-Austausch	60
4.16	NS5A-D1-Varianten mit zwei oder drei Phenylalanin-Austauschen	61
4.17	Reinigung von NS5A-D2D3	62
4.18	BLI-Sensogramme und Auswertung von NS5A-D2D3 ^{ELK pY} -Bindung an c-SRC- Δ SH1	63
4.19	Pulldown-Assay mit gereinigten Proteindomänen von c-SRC- Δ SH1 und NS5A-D1 ^{ELK pY}	65
4.20	CD-Untersuchung der NS5A-D1 ^{ELK pY} - c-SRC- Δ SH1-Interaktion	66
4.21	BLI Sensogramme und Auswertung von NS5A-D1 ^{ELK pY} und NS5A-D1-Bindung an c-SRC- Δ SH1 und c-SRC- Δ SH1 R173K	67

4.22	BLI-Sensogramme und Auswertung von NS5A-D1 ^{ELK pY} Y93/129/161F-Bindung an c-SCR-ΔSH1	68
4.23	BLI-Sensogramme und Auswertung der Bindung von NS5A-D1 ^{ELK pY} -Varianten mit einem Phenylalanin-Austausch an c-SCR-ΔSH1	69
4.24	BLI-Sensogramme und Auswertung der Bindung von NS5A-D1-Varianten mit zwei Phenylalanin-Substitutionen an c-SCR-ΔSH1	70
4.25	RT-qPCR von transient transfizierten Hepatozyten mit HCV-Replikon-Plasmiden	73
4.26	Pulldown-Experimente mit transient transfizierten Huh 7-Hepatozyten	74
5.1	Oberflächen-Mapping von Tyrosinen in der NS5A-D1-Domäne	81
5.2	WebLogos der HCV Genotypen 1-7 der NS5A-Positionen 86-100	86

Tabellenverzeichnis

1.1	Zusammenstellung ausgewählter NS3/4A-Protease-Inhibitoren der ersten Generation.	15
1.2	Zusammenstellung ausgewählter NS5B-Polymerase-Inhibitoren und NS5A-Inhibitoren.	16
2.1	Verwendete Geräte und Apparaturen	21
2.2	Verwendete Antikörper (AK)	22
2.3	Verwendete Enzyme für molekularbiologische Methoden	22
2.4	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	22
2.5	Verwendete Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen	23
2.6	Verwendete Gene und Plasmide	24
2.7	Verwendete Oligonukleotide	25
2.8	Verwendete Materialien zur Reinigung von Nukleinsäuren	25
2.9	Stationäre Chromatographie-Phasen für die Reinigung von Proteinen und Proteindomänen	25
2.10	Puffer zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen	26
2.11	Puffer zur Reinigung von His ₆ -Fusionsproteinen	27
2.12	Puffer zur Lyse von humanen Hepatozyten-Zelllinien und Durchführung von Pulldown-Assays	27
3.1	Molekularbiologisch hergestellte DNA-Vektoren	32
4.1	Vergleich der Affinitäten von NS5A-pY-Peptiden zu c-SRC- Δ SH1	58
4.2	Dissoziationskonsten der Bindung von c-SRC- Δ SH1-Varianten an NS5A-D1-Varianten	68
4.3	Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten der Bindung von NS5A-D1-Varianten an c-SRC- Δ SH1	72

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AH	amphipatische Helix
APS	Ammoniumperoxisulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CD	Zirkulardichroismus Spektroskopie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FDA	Food and Drug Administration, amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FP	Fluoreszenz-Polarisation
FPLC	Fast protein liquid chromatography
ΔG^0	freie Standardenthalpie
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase
IDP	intrinsisch ungeordnetes Protein
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LCS	low-complexity sequences
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
NaP _i	Natriumphosphatpuffer
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NLP	nucleocapsid-like particles
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NTA	Nitrilotriessigsäure
ORF	open reading frame
PDVF	Polyvinylidenfluorid

PMT	Photomultiplier
pTyr	Phosphotyrosin
RdRp	RNA-abhängige-RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie
SH	Src Homology
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
Tween 20	Polysorbat 20
ü.N.	über Nacht
WB	Western-Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Hepatitis C Virus (HCV)

1.1.1 Epidemiologie von Hepatitis C

Das Hepatitis C Virus (HCV) wurde erstmals Mitte der 1970er Jahre in der Literatur erwähnt (1). Mit Aufkommen der ersten Diagnosen für Hepatitis A und B wurden weitere Virusinfektionen entdeckt, die jedoch keiner der beiden Infektionen zugeordnet werden konnten. Erst Ende der 1980er Jahre konnte das bis dahin als „non-A, non-B hepatitis“-Partikel bezeichnete Virus genauer charakterisiert werden und das virale Genom über Klonierungen als 10.000 Basenpaar langes, positives Ribonukleinsäure (RNA) -Molekül identifiziert werden (2). Das Hepatitis C Virus löst eine in bis zu 80 % der Fälle chronische verlaufende Infektionskrankheit aus. Sie geht einher mit erhöhtem Risiko für Leberzirrhose und hepatozelluläre Karzinome. Die HCV-Infektion ist nur in wenigen Fällen die kausale Todesursache des Infizierten, vielmehr sind es häufig Sekundärinfektionen, die zum Tod führen (3).

Chronische Hepatitis C-Infektionen sind der häufigste Grund für Lebertransplantationen, wenngleich die transplantierten Organe häufig neu infiziert werden. Ein Fünftel aller Patienten sterben zeitnah nach der Transplantation oder brauchen innerhalb der ersten fünf Jahre eine weitere Transplantation (4).

Die Infektion erfolgt über den Kontakt mit infiziertem Blut, mit infiziertem Blut verunreinigten medizinischen Geräte oder infizierten Spenderorganen (5).

Durch die Möglichkeit der Diagnose von Hepatitis C sank die Anzahl von Neuinfektionen von Mitte der 1980er Jahre bis Mitte der 1990er Jahre um den Faktor sechs. Aufgrund des eher chronischen Verlaufs der HCV-Infektion wurde 2000 noch mit einem Anstieg von Todesopfern bis in die 2010er Jahre gerechnet (6). Aktuell gibt die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Anzahl weltweit infizierter Personen mit 130-150 Millionen an (7). Diese befinden sich vornehmlich im mittleren Osten, Asien, Südamerika und Nordafrika (8). Jährlich sterben rund 500.000 Menschen an akuter Hepatitis C-Infektion oder deren chronischen Folgen (9).

Bis Anfang 2010 bestand die Therapie für HCV-infizierte Personen primär aus Kombinationstherapien mit Interferon α und dem Virostatikum Ribavirin. Je nach Genotyp des Virus war in ungefähr der Hälfte der Fälle eine Therapie erfolgreich, wenngleich damit oft schwere Nebenwirkungen einhergingen (10). Anfang der 2010er Jahre wurden neue Therapeutika für Hepatitis C erstmalig

publiziert. Diese zielen auf den molekularen Wirkungs- und Replikationsmechanismus des Virus, nicht zuletzt aufgrund neuer Erkenntnisse über Identität, Struktur und Mechanismen einzelner viraler Proteine. Ein wichtiger Angriffspunkt der Therapeutika sind die viralen Proteine NS5A und NS5B.

Global weist HCV eine relativ hohe Anzahl infizierter Personen bei gleichzeitig relativ moderater jährlicher Sterberate auf. Chronische Effekte der Infektion treten in der Regel erst 20 oder mehr Jahre nach Infektion auf. Diese Umstände deuten darauf hin, dass das Virus Mechanismen evolutionär entwickelt haben muss, um zelluläre Prozesse des Wirts auszunutzen, mit seinem Immunsystem interagieren kann, aber gleichzeitig die Überlebensfähigkeit und Fitness des Wirts nur mäßig einschränkt (3, 11).

1.1.2 HCV-Genotypisierung und Systematik

Das Hepatitis C Virus gehört zur Familie der *Flaviviridae* und wird zur Gruppe der Hepaciviren gezählt. Während der Replikation unterliegt das 9,6 Kilobasen große RNA-Genom einer Fehlerrate von 10^{-5} bis 10^{-4} . Bereits bei den ersten Sequenzierungen des HCV-Genoms wurde eine substantielle genetische Variabilität in verschiedenen Patienten-Isolaten festgestellt.

Zur Klassifizierung verschiedener HCV-Isolate wurden formale Regeln aufgestellt, die sowohl Kriterien für die Qualität der Sequenzierung als auch Abgrenzungskriterien zwischen einzelnen Genotypen berücksichtigten (12). Diese Regeln führten zu sechs verschiedenen Genotyp-Gruppen mit insgesamt 18 Subtypen. Weitere dutzende Subtypen konnten aufgrund unzureichender Genomsequenzierungs-Ergebnisse nur provisorisch diesen Gruppen zugeordnet werden (13). Die Ergebnisse dieser validen und vorläufigen Klassifizierungen wurden publiziert, u.a. in der Los Alamos HCV Database (14) und der euHCVdb (15).

Keine dieser Datenbanken wurde jedoch seit 2014 bis heute (Stand Februar 2016) aktiv gepflegt, sodass die Nomenklatur neu gefundener HCV-Isolate den individuellen Wissenschaftlern überlassen wurden. Die vormals eingeführten Regeln wurden zunehmend obsolet. Die Zahl identischer Isolate unter verschiedenen Nomenklaturen stieg (13).

Zusätzlich zur fehlenden Pflege der Nomenklatur durch die wissenschaftliche Gemeinschaft, steigt die Anzahl und Qualität an vollständigen individuellen Genom-Sequenzierungen, u. a. auch durch neue Sequenzierungstechniken, von 238 in 2005 auf über 1300 in 2012 an, gleichzeitig stiegen die Inkonsistenzen in Nomenklatur und Zuordnung (13, 16, 17). Im Jahr 2014 waren mehr als 225.000 HCV-Sequenzen in der Gendatenbank GenBank hinterlegt, mit einem jährlichen Zuwachs von ca. 30.000 Sequenzen (13).

Auf Grundlage dieser Information führte Smith *et al.* 2014 die momentan (Stand 2016) aktuellste Nomenklatur für HCV ein. Sequenzen mit weniger als 13 % Abweichungen wurden als Mitglieder eines Genotyps mit verschiedenen Subtypen klassifiziert, wohingegen mehr als 15 % Sequenzunterschiede als neuer Genotyp definiert wurde. Aus dieser Aufteilung resultierten sieben Genotypen mit insgesamt 67 Subtypen (13).

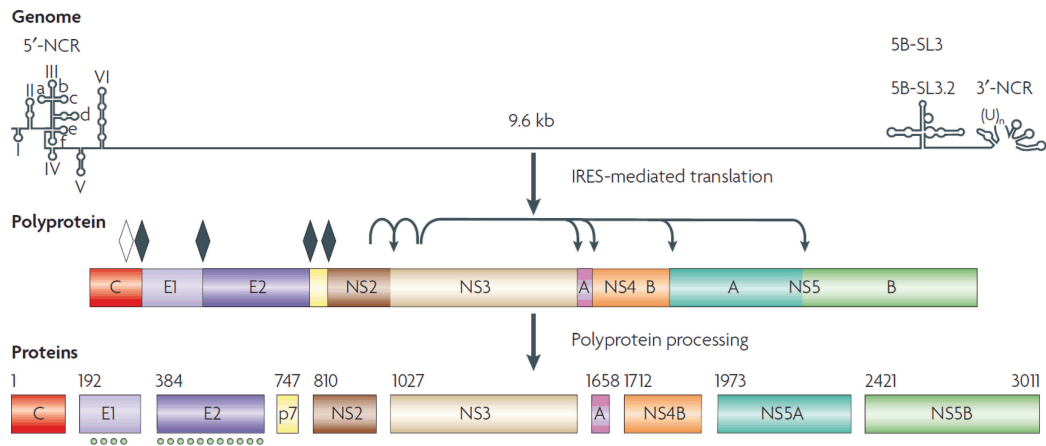


ABBILDUNG 1.1: Schematische Darstellung der genetischen Organisation, des HCV-Polyproteins und dessen Prozessierung des Hepatitis C Virus. Die 9,6 Kilobasen große +ss RNA besitzt sowohl am 5' als auch am 3' ausgeprägte Sekundärstrukturen in den nicht-kodierenden Regionen. Die konservierten und hoch geordneten Loops I bis VI im nicht-kodierenden 5'-Bereich (5'-NCR) sind für die Replikation oder die Ausbildung der IRES wichtig. Am 3'-Ende befinden sich der „stem loop“ von NS5B (5B-SL), und die 3' nicht kodierende Region (3'-NCR), welcher die Replikation beeinflusst. Die RNA wird in ein Polyprotein translatiert. Dieses wird dann von zellulären und viralen Proteasen in die einzelnen viralen Proteine gespalten. Die Veröffentlichung der modifizierten Abbildung wurde genehmigt von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology, Moradpour *et al.* copyright 2007 (19).

Die individuelle HCV-Infektion ist ein sehr dynamischer Prozess. Die durchschnittliche Halbwertszeit eines Viruspartikels im Wirtsorganismus beträgt wenige Stunden bei ca. 10^{12} Virionen pro Tag in einem Wirt (18). Daher kommt es bereits innerhalb eines infizierten Individuums zu Quasispezies des Virus, die unter Selektionsdruck des Wirts und der anderen Viruspartikel stehen.

1.1.3 Molekularer Aufbau von HCV

Das Hepatitis C Viruspartikel ist von einer Lipidmembran umhüllt und besitzt eine Größe von etwa 60 nm. Die 9,6 Kilobasen große, einzelsträngige RNA besitzt eine positive Polarität und wird von einer ikosaedrischen Proteinhülle umgeben. Zwei virale Glykoproteine (E1 und E2) sind in der Doppel-Schicht-Lipidhülle des Virus lokalisiert.

Das einzelsträngige RNA-Genom besitzt eine 5' nicht-kodierende Region mit einer innenliegenden ribosomalen Einstiegsstelle (IRES, „internal ribosomal entry site“), einen einzigen „open reading frame“ (ORF) welcher für strukturelle und nicht-strukturelle Proteine (NS für non-structural) als ein Polyprotein kodiert und einen nicht-kodierenden 3'-Bereich (19). Dieses Polyprotein wird nach Translation von Wirtszell- und viralen Proteasen in die einzelnen Proteine gespalten.

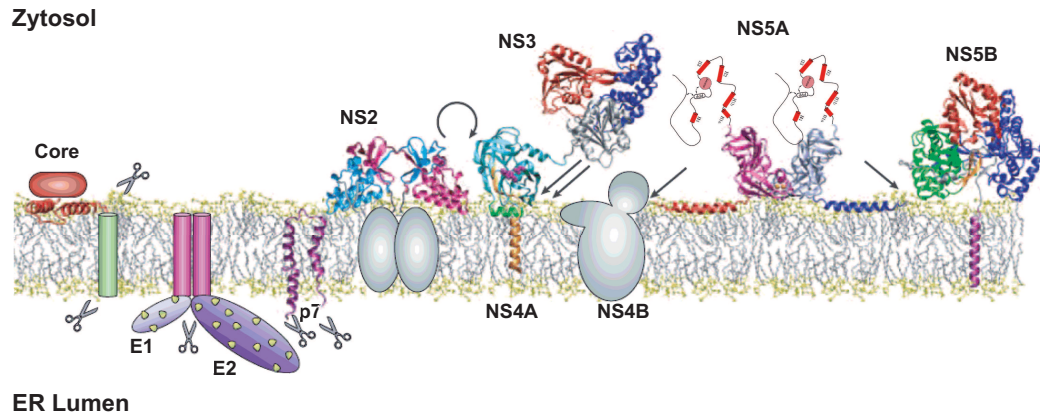


ABBILDUNG 1.2: Darstellung des HCV Polyproteins mit Strukturinformationen der Einzelproteine (soweit bekannt, Stand 2007 mit Projektrelevanten Ergänzungen aus 2015) und Darstellung der einzelnen Protease-Spaltstellen. Das Scheren-Symbol zeigt proteolytische Spaltungen durch Peptidasen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), mit Ausnahme der Spaltung des Core-Proteins, das durch eine Signal-Peptid-Peptidase vom Polyprotein gespalten wird. Der kreisförmige Pfeil symbolisiert die Spaltstelle der NS2-3-Protease. Die schwarzen Pfeile zeigen Spaltstellen der NS3-4-Protease. Soweit Strukturinformationen der einzelnen Proteine bekannt sind, sind sie in dieser Abbildung dargestellt. Proteine mit unbekannter Struktur sind als farbige Ellipsen oder Zylinder dargestellt. Für das NS5A-Protein konnte in jüngster Vergangenheit gezeigt werden, dass die C-terminalen Domänen D2 und D3, trotz ihrer Einordnung als intrinsisch ungeordnetes Protein (IDP), mehrere α -helikale und β -Faltblatt-Strukturen enthalten (20). Die ER-Membran ist dargestellt mit hellgelber polarer Kopfregion und hellgrauen hydrophoben Aliphatenketten. Die Veröffentlichung der modifizierten Abbildung wurde genehmigt von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology, Moradpour *et al.* copyright 2007 (19). Genauere Strukturinformationen von NS5A von Solyom *et al.* 2015 wurden ergänzt.

Ähnlich der Nomenklatur vieler anderer Viren, werden strukturelle Proteine von HCV als solche bezeichnet, die dem Viruspartikel als Hüllproteine dienen. Als nicht-strukturelle Proteine werden Proteine bezeichnet, die während des Replikationszyklus von HCV funktional agieren.

Zu den Strukturproteinen werden das Core-Protein und die beiden Hüll-Glykoproteine E1 und E2 gezählt. Zur Gruppe der Nichtstrukturproteinen gehören das Ionenkanal-Protein P7, die Protease NS2, die Serinprotease und Helikase NS3, der Proteasen-Co-Faktor NS4A, das Membran-organisierende Protein NS4B, das Wirtszell-kontrollierende Protein NS5A und die RNA-abhängige-RNA-Polymerase NS5B.

Das Core-Protein ist ein basisches, RNA-bindendes, 21 kDa großes Protein, welches das virale Kapsid bildet (21). Es sind weitere Varianten des Proteins in den Größen 17-23 kDa bekannt, wobei die 21 kDa Form (P21) die dominierende Variante scheint. Das Core-Protein existiert in dimerer und multimerer Form, heterolog exprimiert neigt es zur Selbstassemblierung in „nucleocapsid-

like particles“ (NLP) (21). Neben der strukturellen Funktion, interagiert das Core-Protein positiv wie negativ mit zellulären Apoptose-Faktoren, stimuliert in Zellkultur das Wachstum von Hepatozyten, beeinflusst die Translation verschiedener zellulärer und viraler Gene und spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Lipidvesikeln, die für die virale Replikation wichtig sind (22, 23, 24, 25).

Die Hüll-Glykoproteine E1 und E2 sind essenzielle Bestandteile der viralen Membranhülle und essentiell für die virale Infektion, Wirtszellmembran-Penetration und die Fusion mit dieser (21, 26). Sie haben Molekularmassen von 33-35 bzw. 70-72 kDa, bilden nicht-kovalente Homodimere und zählen zu den Typ I Transmembran-Glykoproteinen (21). Die fünf, respektive elf Glykosylierungsstellen sind über alle HCV-Genotypen hoch konserviert. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Glykosylierungen eine wichtige Rolle im viralen Infektions- und Lebenszyklus spielen (27).

Das 63 Aminosäurereste große Polypeptide P7 besitzt zwei α -helikale Transmembrandomänen und ist für die Infektiosität von HCV entscheidend (21, 28).

NS2 ist ein 21-23 kDa großes, nicht-glykosyliertes Transmembranprotein, welches über zwei Signalsequenzen am ER assoziiert ist. (29). Es ist beteiligt an Apoptose-Inhibition und beeinflusst die Transkriptionsaktivität der Wirtszelle. Zusammen mit dem N-terminalen Teil von NS3 nimmt der Zink-bindende NS2-3-Komplex eine Chymotrypsin-ähnliche, doppelte β -Faltblattstruktur ein und spaltet in *cis* das NS2-3-Polypeptid in die Einzelproteine NS2 und NS3 (30). Mit Spaltung von NS3 verliert die NS2-3-Protease ihre proteolytische Aktivität. Zelluläres NS2 kann von der Caseinkinase 2 (CK2) phosphoryliert werden und wird anschließend vom Proteasom abgebaut (21, 31).

Neben dem NS2-3-Komplex, besitzt der C-Terminus von NS2 eine Helikase/Nukleinsäure Triphosphat Hydrolase (NTPase)-Domäne der Helikase-Superfamilie 2. Die Helikase/NTPase ist bei der RNA-Bindung und RNA-Sekundärstruktur Modifikation, u. a. auch durch NTP-Hydrolyse beteiligt. Reguliert wird diese Aktivität durch die Protease-Domäne in *cis* und der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase NS5B (21, 32, 33). Weiterhin interagiert NS3 im Komplex mit NS4 mit Wirtszell-Signalwegen und ist essentiell für den HCV Replikationszyklus und die Pathogenese (21). Weiterhin wirkt der NS3-4-Komplex als Protease für die Spaltung der Vorläufer-Polypeptide NS3/NS4A (in *cis*), NS4A/NS4B, NS4B/NS5A und NS5A/NS5B. Damit ist NS3-4 eine der zentralen Proteasen von HCV und daher ein vielfach erwähntes Ziel für mögliche antivirale Therapeutika-Ansätze (21, 34).

Das 261 Aminosäurereste große Membranprotein NS4B ist in der Membran des ER lokalisiert und wirkt unter anderem als Membran-Anker für den Replikationskomplex von HCV (35), Adenylat-Kinase- und Nukleotid-Hydrolase-Aktivitäten (36) und wirkt als Inhibitor für zelluläre Biosyntheseprozesse (21, 37).

NS5A ist ein 56 kDa großes, RNA und Zink-bindendes Protein, welches während des Infektionszyklus von HCV eine große Dynamik im Phosphorylierungsmuster aufweist. NS5A ist entscheidend an der viralen Replikation beteiligt und reguliert und moduliert viele zelluläre Signalwege (38, 39, 40, 41). Am N-Terminus ist eine 30 Aminosäurereste große, amphipatische α -Helix, welche

NS5A an die Zellmembranen lokalisiert. Die sich anschließende Domäne D1 koordiniert über alle Genotypen von HCV konserviert, über vier Cysteine ein zentrales Zink-Ion (siehe Abbildung 1.6). Diese Metallbindung ist von essenzieller Bedeutung für die RNA-Bindung von NS5A und die Replikations-Funktion von HCV (42). Von N-terminal verkürzten Varianten der D1-Domäne sind mehrere Kristallstrukturen bekannt, die eine dimere oder multimere Anordnung zeigen (43, 44). Die zentral und C-terminal liegenden Domänen D2 und D3 sind intrinsisch ungeordnet und werden mit der viralen RNA-Replikation und Viruspartikel-Assemblierung in Zusammenhang gebracht (45, 46). Obwohl D2 und D3 zu den intrinsisch ungeordneten Proteinen bzw. Protein-Fragmenten gezählt werden, konnten Sekundärstrukturelemente durch Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy) und Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD, circular dichroism spectroscopy) nachgewiesen werden (20, 47, 48, 49, 50, 51). Weiterhin wurde durch NMR für die prolinreiche Region zwischen der D2- und D3-Domäne eine niedrig μM affine, PXXP-SH3-Interaktionsstelle identifiziert (20, 49). Die einzelnen Domänen sind durch kurze „low-complexity sequences“ (LCS) getrennt (42).

NS5A zeigt ein ausgeprägtes und über den Replikationszyklus von HCV sehr dynamisches Phosphorylierungsmuster für Serine und Threonine. (52). Es ist in einer basal phosphorylierten und einer hyperphosphorylierten Form bekannt, die bei 56 bzw. 58 kDa in einer SDS-PAGE migrieren. Einen genaueren Einblick in die Phosphorylierungsstellen und -Muster ist in Kapitel 1.4 beschrieben.

NS5A formt zusammen mit der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (RdRp) NS5B und der humanen Tyrosin-Kinase c-SRC und möglicherweise weiteren zellulären und viralen Partnern den RNA-Replikationskomplex (53).

Die 530 Aminosäurereste große RdRp NS5B ist über eine C-terminale α -helikale Transmembranhelix an der zytosolischen Seite des ERs lokalisiert (21). Die Funktion von NS5B und der gebildeten Komplexe ist für die virale Replikation essentiell (45). Neben NS5A ist auch NS5B ein prädestiniertes Ziel für antivirale Ansätze (34).

1.1.4 Infektions- und Replikationsmechanismus von HCV

Als Wirte für HCV sind nur Menschen und Schimpansen bekannt, was die Untersuchung im Tiermodell erschwert. Primär werden Hepatozyten von HCV infiziert, jedoch sind auch Fälle von infizierten B-Zellen und dendritischen Zellen bekannt (19). Als virale Rezeptoren sind aus der Literatur CD81, der LDL Rezeptor, Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1 und Claudin-1 bekannt (19, 55).

Das HCV-Partikel fusioniert über Clathrin vermittelte Endozytose mit der Wirtszellmembran (56). Dabei bilden sich endosomale Kompartimente, in denen eine durch niedrigen pH-induzierte Membranfusion eintritt und so das Virus-Kapsid in das Cytoplasma entlassen wird. Ähnliche Mechanismen sind bereits für anderen Mitglieder der *Flaviviridae*-Familie bekannt (57).

Nachdem die virale RNA aus dem Kapsid entlassen wurde, bindet die im 5' UTR lokalisierte IRES an die ribosomale 40S-Untereinheit. Zusammen mit dem Eukaryotischen Initiation Faktor (eIF) 2, GTP und der initialen tRNA

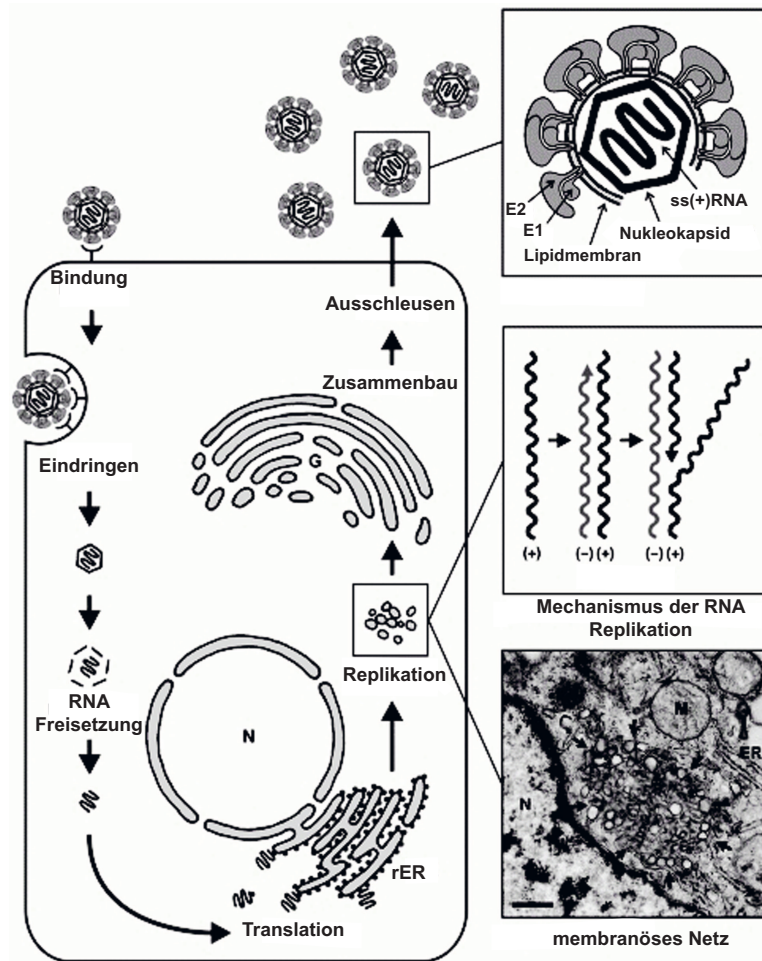


ABBILDUNG 1.3: Schematische Darstellung des Infektions- und Replikationsmechanismus von HCV. HCV-Partikel binden über die Hüll-Glykoproteine an Rezeptoren (CD81, LDL-Rezeptor, Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1, Claudin-1) an die Wirtszelle. Das Partikel gelangt über Endozytose in die Wirtszelle und setzt über eine pH-induzierte Membranfusion das Kapsid ins Cytosol frei. Dieses setzt daraufhin die virale RNA frei, von welcher die Translation viraler Proteine an den Ribosomen des rauen ER erfolgt. Die neu synthetisierten viralen Proteine, insbesondere NS4B reorganisieren die intrazellulären Membranstrukturen (35). An diesem neu formierten membranösen Netz findet die Replikation der viralen RNA über die membranverankerten Replikationskomplexe rund um die RdRp NS5B statt. Anschließend werden die viralen Partikel aus der Zellmembran freigesetzt. Die Abbildung wurde entnommen aus „Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence“, Adv. Virus Res. 63:71-180, Barten-schlager *et al.* 2004, mit Genehmigung von Elsevier (54).

entsteht so der 48S-Partikel. Durch GTP-Hydrolyse wird über mehrere Zwischenschritte die ribosomale 60S-Untereinheit an den Komplex gebunden und so der 80S-Translationskomplex initiiert. (19, 58, 59, 60).

Das am rauen ER translatierte Polyprotein wird durch humane und virale Proteasen in die einzelnen funktionalen Proteine gespalten (Kapitel 1.1.3).

Neben der Veränderung der Proteinkomposition innerhalb der Wirtszelle, organisiert HCV ebenfalls das intrazelluläre Membransystem, im speziellen das ER, grundlegend neu (54). Diese ist eine entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Replikation des Virus (21). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass NS4B diese Reorganisation entscheidend, möglicherweise im Komplex mit anderen humanen Faktoren, durchführt (35). Das Membransystem besteht aus vielen kleinen Vesikeln, welche in Mikroskopie-Aufnahmen als membranöses Netz sichtbar sind. In und an den Membranen assoziiert ordnen sich alle Nichtstrukturproteine von HCV an. Ebenfalls finden sich dort die für die Replikation wichtigen Multiprotein-Komplexe.

Die Replikation von HCV selbst läuft über ein Minusstrang-Intermediat, welches komplementär zur positiv orientierten, einzelsträngigen viralen RNA ist. Dieses dient im Folgenden als Vorlage für die Synthese eines neuen, wieder positiv orientierten RNA-Strangs. Beide Prozesse werden von der RdRp NS5B durchgeführt, wobei der Prozess der positiv-Strang-Synthese im fünf- bis zehnfachen Überschuss stattfindet (21). Die neu synthetisierte, positiv orientierte RNA wird in neuen Translations- und Replikationsprozessen verwendet, oder in virale Kapsid-Proteine verpackt und als Bestandteil der neuen Viruspartikel aus der Zelle geschleust (54). Der genaue Mechanismus der Viruspartikel-Assemblierung und Ausschleusen aus der Wirtszelle ist nicht endgültig geklärt. Die Tendenz zur Multimerisierung der Struktur- und Nukleokapsid-Proteine scheint eine wichtige Rolle zu spielen (61).

1.2 Humane Tyrosinkinasen der Src-Familie

Erstmals Ende der 1970er Jahre wurde ein Src-Protein im Zusammenhang mit dem onkogenen Rous Sarcoma Virus gefunden und wenig später als Tyrosinkinase identifiziert.

Zur Familie der Src nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen zählen mindestens acht Mitglieder: c-SRC, FYN, YES, FGR (zur Subfamilie der Src zählend), LYN, HCK, LCK und BLK (zur LYN-Familie zählend) sowie die Subfamilie der FRK mit FRK/RAK und IYK/BSK (62). FYN, c-SRC und YES werden in vielen Zelltypen und Organen exprimiert, wohingegen die anderen Kinasen in vornehmlich hämatopoetischen Zellen vorkommen (62).

Die zur Src-Subfamilie zählenden Kinasen haben ein breites Spektrum an zellulären und Membran gebundenen Interaktionspartnern, z.B. oftmals Rezeptoren, die an der Zelloberfläche exponiert sind (z.B. Rezeptor-Kinasen, Integrine, G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Hormonrezeptoren) (63). Sie interagieren direkt oder indirekt über ein breites Spektrum an Mechanismen. Oftmals werden Src-Kinasen durch die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor aktiviert, ferner können Src-Kinasen ebenfalls die Aktivität des Rezeptors beeinflussen (62). Sie stehen vorgeschaltet von wichtigen zellulären Prozessen die Zellproliferation, Zellwachstum oder Immunantwort kontrollieren oder auslösen.

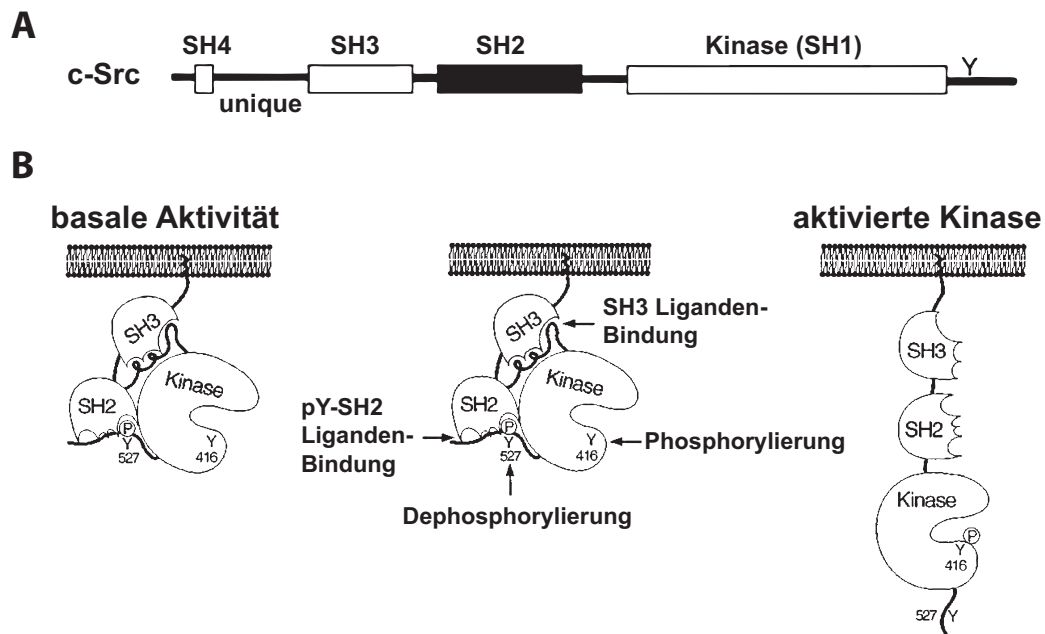


ABBILDUNG 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-SRC und des Regulationsmechanismus von Src-Kinasen am Beispiel der c-SRC. Die Src-Kinasen ist über einen N-terminalen Myristyl-Anker in der Membran lokalisiert. Daran schließt sich von N- nach C-terminal eine SH4-, eine SH3-, eine SH2- und die Kinase-Domäne an. Zwischen SH2- und Kinase-Domäne befindet sich ein flexibler Linker. Über die Phosphorylierung von Tyrosinrest 527 durch die nicht-Rezeptortyrosinkinase Csk (c-terminaler Teil von c-SRC-Kinasen) wird die Kinase-Region an die SH2-Domäne gebunden. Ein intramolekulares PXXP-Motiv in der Region zwischen SH2- und Kinase-Domäne bindet an die SH3-Domäne und sichert so die kompakte Struktur der c-SRC. Durch Dephosphorylierung an Tyrosin 527 geht die c-SRC in die gestreckte Konformation und wird durch Phosphorylierung an Tyrosin 416 aktiviert. Die modifizierte Abbildung ist entnommen und genehmigt von Thomas *et al.* 1997.

1.2.1 c-SRC: Zelluläre Funktion, struktureller Aufbau und Ligandenbindung

c-SRC ist ein ca. 60 kDa großes Protein und wird endogen an der N-terminalen Src Homology (SH) 4-Domäne mit einer Myristoyl-Gruppe modifiziert. Der SH4-Gruppe folgt eine Unique-Domäne, eine SH3-Domäne, eine SH2-Domäne, dem SH2-Kinasen-Linker und einer Kinase-Domäne, welche auch als SH1 bezeichnet wird, sowie einem kurzen C-terminalen Regulationselement (62).

Die SH4-Region umfasst bei c-SRC 15 Aminosäurereste, wobei an Position zwei die Myristoylierung stattfindet, wodurch c-SRC an die Zellmembran rekrutiert werden kann (62). C-terminal schließt sich die Unique-Domäne an, die sich zwischen den unterschiedlichen Mitgliedern der Src-Familie stark unterscheidet. Sie ist wichtig für die Bindung an jeweils spezifische Interaktionspartner. In der

Unique-Domäne finden sich mögliche Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen, die möglicherweise Protein-Protein-Interaktionen modulieren oder die katalytische Aktivität der Kinase beeinflussen können (62).

Die SH3-Domäne besteht aus ca. 50 Aminosäureresten und reguliert intramolekular die Aktivität der Kinasedomäne, deren Lokalisierung und Substratbindung. SH3-Domänen binden kanonisch ein Prolin-X-X-Prolin Motiv, wobei Positionen mit X von jeder anderen Aminosäure besetzt werden können, präferiert werden an einigen Positionen jedoch hydrophobe Aminosäurereste (64). Obwohl dieses Motiv für die Bindung an SH3-Domänen hinreichend ist, können weitere Aminosäuren in direkter Umgebung die Affinität steigern (65). Diese PXXP Motive werden nach ihrer Orientierung unterteilt in Klasse 1, mit der positiven Ladung N-terminal zum Motiv (+XXPXXP), oder Klasse 2, mit der positiven Ladung C-terminal vom Motiv (PXXPX+). Die Bindetasche der SH3-Domäne besitzt zwei hydrophobe Bindestellen für die beiden Proline sowie eine weitere Bindestelle mit negativer Ladung für die positive Ladung des Bindemotivs, durch die die Ligandenspezifität erreicht wird (62). Die Affinität einer isolierten SH3-PXXP-Bindung liegt im mikromolaren-Bereich. Durch weitere Wechselwirkungen der Interaktionspartner oder weitere an der Bindung beteiligte Komponenten, werden *in vivo* deutlich affinere Bindungskonstanten für die Gesamtkomplexe erreicht (62).

Neben der SH3-Domäne reguliert die SH2-Domäne ebenfalls die Aktivität der Kinase. SH2-Domänen weisen eine hohe Spezifität für die Bindung an phosphorylierte Tyrosine auf, welches in einer der beiden Bindetaschen gebunden wird (66, 67, 68). In der zweiten Bindetasche wird der dritte Aminosäurerest C-terminal vom Tyrosin gebunden. Src-Kinasen weisen eine Spezifität für Leucine und Isoleucine an dieser Position auf (66, 69).

SH3- und SH2-Domäne regulieren beide die Aktivität der Kinase-Domäne. Die flexible Linker-Region zwischen SH2- und Kinase-Domäne erlaubt es der Kinase-Domäne sich der SH3- und SH2-Domäne anzunähern. Über Kristallstrukturen konnte dieser inaktivierte Zustand nachgewiesen werden (70). Biophysikalisch wird dieser Zustand über einen Prolinrest im Linker und ein Phosphotyrosin C-terminal der Kinase-Region stabilisiert. Durch diesen einzelnen Prolinrest entsteht ein Klasse II PXXP-Motiv-Derivat, welches an die SH3-Domäne bindet. Gleichzeitig bindet die SH2-Domäne am phosphorylierten Tyrosinrest pY 527 C-terminal zur Kinase-Region. Dieser kann durch die zytoplasmatische Tyrosinkinase CSK modifiziert werden (62, 71). Die Dephosphorylierung an Tyrosin 527 führt zum Aufklappen der Kinase aus der kompakten, in die ausgestreckte Konformation. Durch Autophosphorylierung von Tyrosin 416 wird die Kinase vollständig aktiviert.

Wird der Tyrosinrest 527 gegen Phenylalanin getauscht, resultiert dies in einer konstitutiv aktiven Variante von Src. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Phenylalanin-Austausch an Position 416 in stark reduzierter Aktivität resultiert. Phosphorylierung an Tyrosin 527 und Dephosphorylierung an Tyrosin 416 sind die entscheidenden Modifikationen für die Src-Aktivität (72). In der onkogenen Variante v-SRC fehlt dieses regulatorische Tyrosin 527, sodass v-SRC konstitutiv aktiv vorliegt (73).

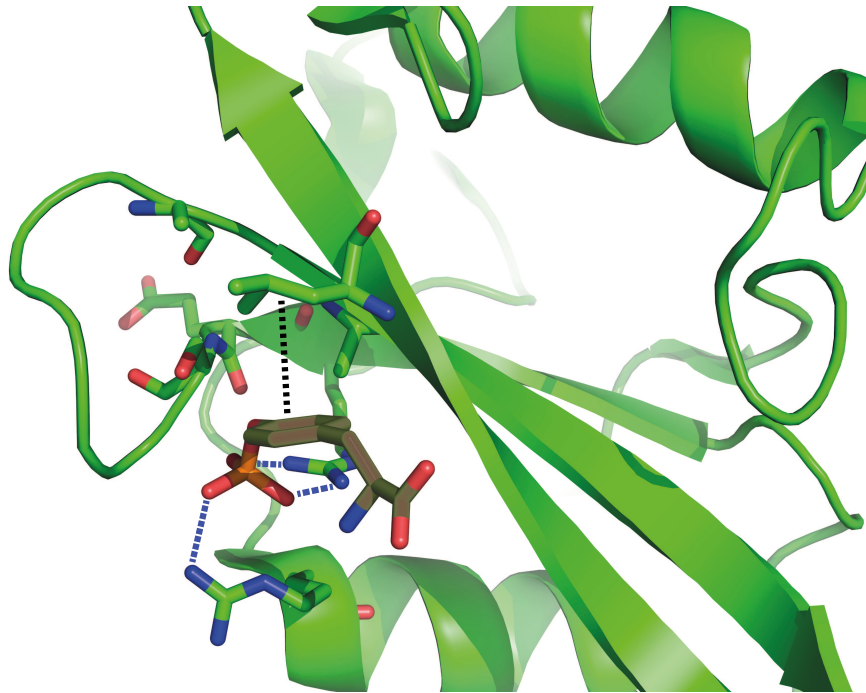


ABBILDUNG 1.5: **Strukturmodell einer pY-Bindung an eine SH2-Domäne.** Die Phosphatgruppe (zentral links in Bänderstruktur gezeigt) wird von zwei Argininen über Wasserstoffbrückenbindungen (blaue gestrichelte Linie) in der Bindetasche der SH2-Domäne (als Cartoon Modell stilisiert) stabilisiert, während der der hydrophobe Ring über Wechselwirkungen (schwarze gestrichelte Linie) mit hydrophoben Resten, hier ein Valin, stabilisiert wird. Das Modell wurde erstellt auf Grundlage des RCSB PDB (74) -Eintrags 4F5B mit dem Programm PyMOL 1.6 (75).

1.3 Kanonische SH2-Bindung als möglicher Interaktionsmodus der c-SRC-HCV-Interaktion

SH2-Domänen finden sich im humanen Proteom in über 100 Proteinen (76). Ihr Mechanismus zur Ligandenbindung beruht auf einem posttranslational modifizierten Phosphotyrosin (pY). Über eine konservierte pY-Bindetasche können alle pY-Motive geringer Affinität gebunden werden. Die Spezifität und Affinität der Bindung wird über die Bindung der Aminosäurereste C-terminal des pYs (insbesondere die Position +3) in einer weiteren Bindetasche in der SH2-Domäne erhöht (77, 78). Die Bindung eines pY an die SH2-Domäne weist ein ΔG^0 von ca. 33-42 kJ/mol auf und wird hauptsächlich durch exotherme Enthalpie getrieben. Der entropische Teil ist eher gering (79). In der Bindetasche wird der Phosphatrest durch mehrere Arginine über Wasserstoffbrücken koordiniert, während der hydrophobe Ring des Tyrosins durch Kontakte zu hydrophoben Resten in der SH2-Bindetasche stabilisiert wird (80) (vgl. Abbildung 1.5).

Die typische SH2-pY-Bindung wird in der Literatur mit Dissoziationskonstanten im Bereich zwischen 0,1 und 10 μM angegeben (79, 81). Diese Art von Bindungen ist damit zwei bis vier Zehnerpotenzen weniger affin als typische

Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen. Diese eher moderater Affinität könnte jedoch entscheidend sein für transiente oder stark dynamische Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle. Durch Modifikation der Bindetasche an bis zu drei Positionen konnte die Dissoziationskonstante einer SH2-Domäne für pY um den Faktor 100 auf einen K_d von 1 nM gesenkt werden (80).

In den natürlich vorkommenden SH2-Domänen sind diese Modifikationen nicht zu finden, sodass scheinbar *in vivo* die Selektion in Richtung dieser moderat affinen Bindungen geht. Es scheint eine ausgewogene Balance zwischen Spezifität und Affinität zu sein, die bei der Evolution von SH2-Domänen eine entscheidende Rolle spielt (80). Dieser Aspekt gilt auch für die kanonische SH3-Bindung.

Untersuchungen in Mäusen zeigten außerdem, dass Funktionen einzelner Src-Kinasen im Falle einer induzierten Deletionsmutante durch andere Src-Kinasen aus der gleichen Subfamilie übernommen werden könnten (82). Dies deutet möglicherweise auf einen Mechanismus zur geplanten Redundanz in der Funktion verschiedener Src-Kinasen hin, bei der eine hohe Affinität auf Kosten von höherer Spezifität kontraproduktiv wäre.

1.4 NS5A-Phosphorylierung

NS5A liegt über den Replikationszyklus von HCV in verschiedenen Phosphorylierungsstadien vor; eine basal phosphorylierte Form mit einem apparenten Molekulargewicht von 56 kDa und eine hyperphosphorylierte Form mit 58 kDa Molekulargewicht.

Die Phosphorylierung von NS5A wird als möglicher molekularer Schalter für verschiedene Funktionen vermutet (87, 88). Die Kinasen für die NS5A Phosphorylierungen sind weitestgehend noch unbekannt (52).

In einem dynamischen Prozess der Virus-Infektion ist die Identifikation möglicher Phosphorylierungsstellen ein schwieriger Prozess. Infizierten Wirtszellen divergieren stark im Stadium des viralen Zyklus, sodass die ganze Komplexität der viralen Regulation durch einen Modellorganismus oder ein *in vitro*-Modell nicht abgebildet werden kann. Ferner sollte reine *in vitro*-Studien ohne biochemischen Nachweis mit Vorsicht behandelt werden (52).

1.4.1 Phosphorylierungen an Serin und Threoninen

Über Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Serinrest 146 die Hyperphosphorylierung von NS5A negativ reguliert (52). Ein Hotspot für Phosphorylierungen liegt in der Serin-reichen LCS I-Region (52, 89, 90). Serin 222 gilt als eine der Hauptphosphorylierungsstellen (91). Die Abwesenheit dieser Phosphorylierung zeigte jedoch weder einen inhibitorischen Effekt auf die RNA-Replikation noch auf die Replikationseffizienz (52). Die Abwesenheit der Phosphorylierung an Serin 225 zeigte einen Rückgang der Replikationseffizienz auf 10 % verglichen mit dem Wildtyp. In Kombination mit fehlender Phosphorylierung an Serin 222 verlor das Virus seine Replikationskompetenz vollständig (52). Die vier Serine S229, S230, S232 und S235 in der LCS I-Domäne zeigten besondere Wichtigkeit bei der Replikationsaktivität. Austausch

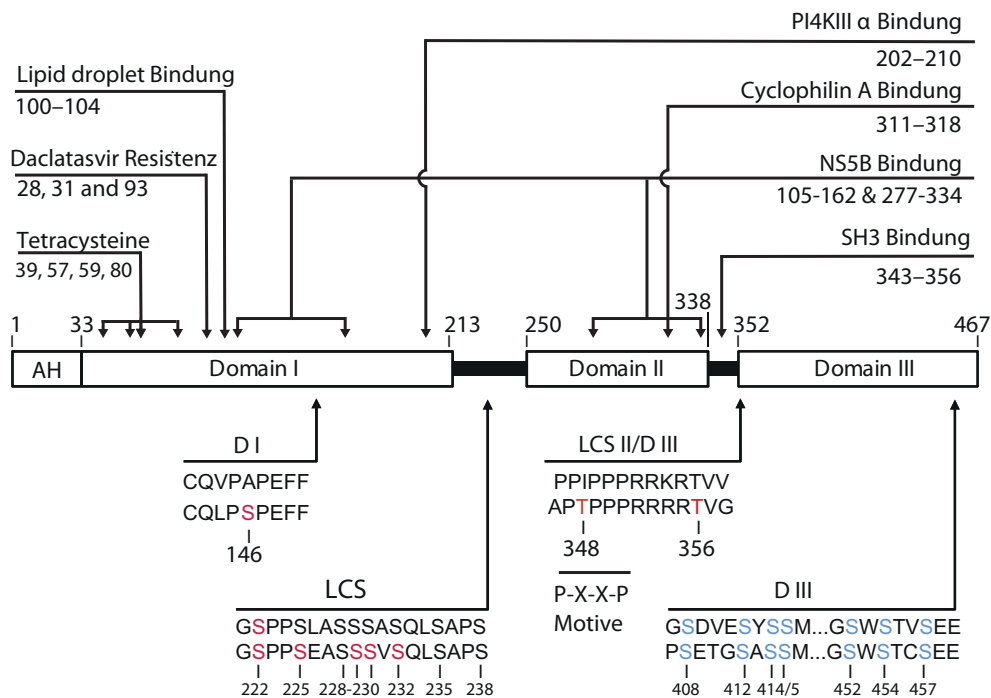


ABBILDUNG 1.6: Schematische Darstellung der Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen und einiger bekannter Binde- und Interaktionsstellen von NS5A. Dargestellt sind die amphipatische Helix (AH), das Zink-koordinierende Tetracystein-Motiv (43), bekannte Daclatasvir-Resistenz-Mutationen (83), das Lipidvesikel-Bindungsmotiv (40), das PI4KIIIa-Bindemotiv (84), die Cyclophilin A-Bindestelle (48), NS5B-Bindestellen (85) und die SH3-Bindestelle (86). Weiterhin sind die durch Massenspektrometrie bekannten Phosphorylierungsstellen in rot gekennzeichnet. Stellen an denen eine Mutationsanalyse eine Phosphorylierung nahelegt, es jedoch keine biochemischen Daten zu gibt, sind in blau gekennzeichnet. Die Sequenz des Genotyps 1b ist in der oberen Zeilen und die Sequenz des Genotyps 2a in der unteren Zeile dargestellt. Die Abbildung ist modifiziert von Ross-Thriepand und Harris 2015 und der Nachdruck genehmigt durch die „Microbiology Society“.

gegen Alanine führten dazu, dass die Replikationskompetenz z. T. vollkommen verloren wurde (52). Ross *et al.* 2014 konnte ebenfalls zeigen, dass dieses Defizit durch wieder einführen der negativen Ladung über einen Austausch zu Glutamat ausgeglichen werden konnte und teilweise wieder wildtypisches Verhalten beobachtet werden konnte.

Bei *in vitro*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine hierarchische Phosphorylierungs-Kaskade in NS5A wahrscheinlich scheint, an deren Anfang Serinrest 229 liegen könnte (92).

In der LCS III-Region konnte Serinrest 457 als potenzielle Phosphorylierungsstelle mit Relevanz für den Viruspartikel-Zusammenbau identifiziert werden (91, 93, 94).

Vergleichende Studien mit verschiedenen Genotypen zeigten jedoch, dass die beobachteten Effekte nicht konsistent sind. Ergebnisse welche mit einem 1b-

Genotypen beobachtet werden konnten, konnten teilweise nicht im 2a-Genotyp reproduziert werden (95).

Im SH3-Bindemotiv (PT³⁴⁸XP) in der LCS II-Domäne im HCV-Genotyp 2a konnte ein Threonin (T348) identifiziert werden, welches phosphoryliert vorliegt. Über Mutationsanalysen konnte hier jedoch weder Phänotyp noch Funktion identifiziert werden. In den Genotypen 1 ist diese Position vornehmlich ein Valin- oder Isoleucinrest. Die Phosphorylierung findet in Genotyp 1a an einem Serin N-terminal zum PXXP Motiv statt (52).

Threonin T356, ebenfalls in der LCS II und am Beginn der Domäne D3 konnte ebenfalls in phosphorylierter Form nachgewiesen werden. Zellkultur-Untersuchungen zeigten, dass Substitution gegen Alanin mit einer Reduktion des viralen RNA-Niveaus um den Faktor 10 (in Genotyp 1b) oder unterhalb der Nachweisgrenze der viralen RNA (in Genotyp 2a) einhergingen. Ein Austausch von Alanin gegen Glutamat als Phosphomimikry zeigten virale Replikationsraten auf Wildtyp-Niveau. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten eine veränderte Struktur des Polyprolin-Motives (96).

Die Phosphorylierungen in HCV sind ein Beispiel für Einführung von Variabilität im Proteom vor dem Hintergrund eines kompakten Genoms. Eine mögliche Veränderung der SH3-Domänen-Bindung durch Phosphorylierung konnte nicht abschließend geklärt werden (95, 96).

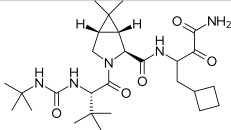
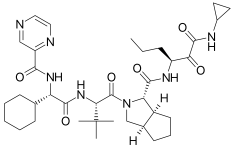
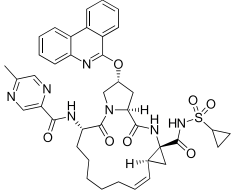
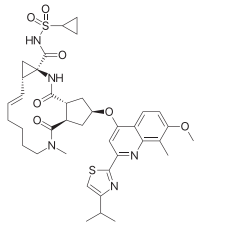
Im C-Terminus von NS5A werden weitere Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen vermutet. Die Identifikation erweist sich mit der momentan gebräuchlichen Kombination aus proteolytischer Spaltung und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung als ungeeignet, aufgrund fehlender basischer Aminosäurereste im C-Terminus, an denen proteolytisch gespalten werden könnte (95).

Für die Serin-Modifikationen konnten bislang noch keine Kinasen mit großer Sicherheit identifiziert werden. Als möglicher Kandidat gilt die Caseinkinase I (CKI), die in *in vitro*-Untersuchungen phosphorylierte NS5A-Peptide mit weiteren Phosphomodifikation versehen konnte (97). Als weitere mögliche Kandidaten gelten die Polo-like Kinase I (Plk I) und die „testis specific serine kinase 2“ (TSSK2) (92, 98).

1.4.2 Phosphorylierungen an Tyrosinen

Die neuere Literatur gibt ebenfalls erste Hinweise auf Phosphotyrosine. Die Position Y334 konnte von Yamachi *et al.* 2015 in der p58-Form mit Phosphomodifikation nachgewiesen werden. Ferner wurde die c-ABL als mögliche Kinase identifiziert (99). Die Gruppe von Ralf Bartenschlager zeigte, dass die LCS II zwischen den Domänen D2 und D3, wo dieses Tyrosin lokalisiert ist, offenbar kaum Einfluss auf die Replikationskompetenz besitzt (46) und damit pY334 als mögliche c-SRC-SH2-Interaktionsstelle unwahrscheinlich erscheinen lässt. Die Hypothese einer kanonischen SH2-Bindung für die Interaktion von NS5A mit der SH2-Domäne von c-SRC hat jedoch weiterhin Bestand. Womöglich liegt die entscheidende Phosphorylierungsstelle nicht in der D3-Domäne. Die Untersuchungen von Romero-Brey *et al.* 2015 zeigen, dass Deletion der D1 und der

TABELLE 1.1: Zusammenstellung ausgewählter NS3/4A-Protease-Inhibitoren der ersten Generation.

Name	klinische Phase	Hersteller	Struktur
Boceprevir	zugelassen	Merck	
Telaprevir	zugelassen	Janssen/Vertex	
Paritaprevir (ABT-450)	zugelassen	Abbott/AbbVie	
Simeprevir (TMC435)	zugelassen	Janssen/Medivir	

N-terminalen D2-Domäne mit Replikationsdefiziten einher gehen. Daher ist das entscheidende Phosphotyrosin womöglich dort zu suchen.

Trotz umfangreicher Experimente und Untersuchungen zur Phosphorylierung in NS5A, zeigen die erlangten Erkenntnisse lediglich ein Bruchteil der Komplexität der posttranslationalen Modifikationen in NS5A. Um den vollständigen Mechanismus zu verstehen sind weitere Experimente notwendig (95).

1.5 HCV-Therapie

In der HCV-Medikamentenentwicklung wurden verschiedene Angriffspunkte im viralen Infektionszyklus verfolgt. Jedoch, im Gegensatz zu Therapien anderer viraler Infektionen, existieren keine Substanzen, die die Penetration von HCV in die Wirtszelle erfolgreich inhibieren. Vielmehr wurden die enzymatisch aktiven Proteine und die Nichtstrukturproteine von HCV als Ziele für die Medikamentenentwicklung gewählt.

HCV nutzt molekulare Mechanismen, z.B. bei der proteolytischen Spaltung des Polyproteins, die im Wirtsorganismus auf diese Weise nicht vorkommen.

Gegen die NS3/4-Protease sind bereits Medikamente (Telaprevir, Boceprevir, beides lineare Verbindungen) durch die FDA zugelassen und zeigen alleine und in Kombination mit Interferon/Ribavirin gegen HCV-Genotyp 1 eine gute Wirksamkeit (100). Nach vier bis 12-wöchiger Applikation konnte in den Patienten keine HCV-RNA mehr nachgewiesen werden (101). Trotz umfangreicher

TABELLE 1.2: Zusammenstellung ausgewählter NS5B-Polymerase-Inhibitoren und NS5A-Inhibitoren.

Name	klinische Phase	Hersteller	Struktur
Nucleosid NS5B Polymerase Inhibitoren			
Sofosbuvir (GS-7977, PSI-7977)	zugelassen	Gilead	
Nicht-Nucleosid NS5B Polymerase Inhibitoren			
Dasabuvir (ABT-333)	zugelassen	Abbott/AbbVie	
NS5A Inhibitoren			
Daclatasvir (BMS-790052)	zugelassen	Bristol-Myers Squibb	
Ledipasvir (GS-5885)	zugelassen	Gilead	
Ombitasvir (ABT-267)	zugelassen	Abbott/AbbVie	

Strukturdaten der HCV-Proteine, gibt es bislang noch keine potenziellen Inhibitoren in der klinischen Phase für die NS2/3-Protease (Stand 2013) (102).

Ein Nachteil von Protease-Inhibitoren liegt in sich ausbildenden Resistenzen. Mit Behandlungsbeginn ist meist ein starker, initialer Abfall des Virustiters zu beobachten, jedoch auch das langsame Aufkommen von resistenten Spezies. Sowohl für die linearen als auch die zyklischen Protease-Inhibitoren sind resistente Virusvarianten bekannt (103). Für NS3/4A ist ein Arginin zu Lysin Austausch an Position 155 bekannt, der zu Telavir- und Boceprevir-Resistenz führt und nur mit geringen Fitness-Einbußen gegenüber dem Wildtyp - im Hintergrund ohne Medikamenten-Selektionsdruck - einhergeht (104). Eine Vielzahl weiterer Protease-Inhibitoren sind bereits zugelassen und werden zu den Inhibitoren der zweiten Generation gezählt. Diese weisen effizientere pharmakokinetische Profile auf und adressieren ebenfalls Resistenzmutationen der ersten Generation der Protease-Inhibitoren. Das Anwendungsprofil schließt alle HCV-Genotypen ein (102). In ihrem Review spekulieren Manns und von Hahn 2013 bereits darüber, dass möglicherweise mehr Protease-Inhibitoren auf den Markt drängen werden, als tatsächlich gebraucht würden. In den Jahren 2013 bis 2015 wurden in der Tat eine Vielzahl erste und zweite Generation-Inhibitoren zugelassen, die sich in der Anwendung als sehr erfolgreich erwiesen. In der Folge traten erste Verdrängungseffekte auf, sodass Entwicklungen von Protease-Inhibitoren, die bereits

in den klinischen Phasen weit fortgeschritten waren, abgebrochen wurden. Ein Beispiel hier für ist Faldaprevir (BI 201335) von Boehringer Ingelheim, welches in der Phase III aus wirtschaftlichen Gründen eingestellt wurde.

Ein weiterer, in Säugerzellen nicht originärer Mechanismus ist die RNA-abhängige-RNA-Replikation, wie sie in HCV von NS5B durchgeführt wird. Hier sind zwei verschiedene Klassen von Medikamente in klinischen Studien oder bereits zugelassen. Zum Einen Nukleosid-Analoga, die in der enzymatisch aktiven Stelle der Polymerase binden, zum Anderen allosterische bindende nicht-Nukleosid-Verbindungen (100). Die RNA-abhängige-RNA-Replikation ist über alle HCV-Genotypen stark konserviert, daher schrieben Manns und von Hahn 2013 beiden Arten von Medikamenten eine hohes Potential gegen ein breites Genotypenspektrum und gleichzeitig eine hohe Barriere für Resistenzen zu. Diese Vermutungen sollte sich nach Abschluss der klinischen Studien zu Sofosbuvir und Dasabuvir bestätigen, beide Medikamente reduzieren den viralen Titer (105). Ähnlich wie bei den NS3/4A-Protease-Inhibitoren, wurden nach Erscheinen dieser Wirkstoffe die klinischen Erprobungen weiterer vielversprechender Wirkstoffe aus wirtschaftlichen Gründen abgebrochen.

Ein weiterer Ansatzpunkt liegt in der Bindung und Interaktion mit NS5A, auch wenn die Funktion von NS5A in der Zelle und ein möglicher Mechanismus der Inhibierung noch nicht aufgeklärt ist (102). Der Wirkstoff Daclatasvir zeigte einen Rückgang der im Blut nachweisbaren viralen RNA gegenüber eine Kontrollgruppe zwischen 80-100% (102). Besonders effektiv war die Therapie bei den Patienten, die mit Genotypen 1b, 2 und 3 infiziert waren. Beim Genotyp 1a zeigte sich eine geringe Barriere für die Ausbildung von Resistenzen (102, 106). Biochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass Daclatasvir mit niedrig nanomolarer Dissoziationskonstante (K_d) an NS5A bindet. Eine Mutation des Tyrosin 93 zu Histidin führte zum Verlust der Affinität des Therapeutikums für NS5A.

Auf Grundlage des von Love *et al.* 2009 publizierten NS5A-D1-Dimers wurde *in silico* die Bindestelle von Daclatasvir auf dem NS5A-Dimer-Interface bei Y93 modelliert (107).

Ähnlich wie Daclatasvir bindet Ledipasvir ebenfalls an NS5A. *In vitro*-Studien weisen darauf hin, dass Ledipasvir ähnlich wie Daclatasvir mit niedrig-nanomolarer Affinität an die NS5A-D1-Dimer-Oberfläche bindet (108). Neben der Interaktion mit NS5A wird Ledipasvir im Körper zu einem aktiven Uridin-Triphosphat-Analog umgesetzt, welches als Terminator der RNA-Replikation von HCV wirkt. Ähnlich wie bei Daclatasvir weist Ledipasvir eine stark reduzierte Affinität zum Tyrosin 93 zu Histidin Austausch auf.

Ein weiteres Ziel der HCV-Medikamentation ist die RdRp NS5B. Als erster Vertreter dieser Medikamente wirkt Sofosbuvir als Nukleotid-Analog für NS5B. Im Gegensatz zu früheren Nukleosid-Analogen-Entwicklungen besitzt Sofosbuvir bereits eine Phosphatgruppe, sodass die erste, langsame Phosphorylierungs-Reaktion vom Nukleosid zum Nukleotid nicht *in vivo* ablaufen muss (109), wie es noch bei den vorher eingeführten Nukleotid-Analogen wie Ribavirin (Guanosin-Analogen) notwendig war. Ende 2014 wurde es als Einzelpräparat von der FDA zugelassen.

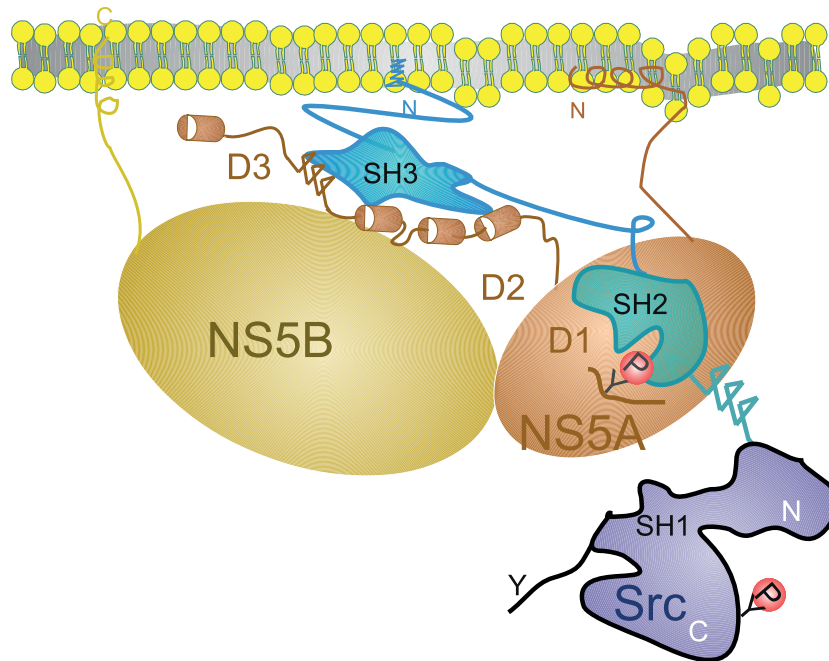


ABBILDUNG 1.7: **Modell des NS5A-NS5B-c-SRC-Replikationskomplex stand Januar 2016.** c-SRC, durch den N-terminalen Myristyl-Anker in der Zellmembran verankert, bildet mit NS5A und NS5B, beiden ebenfalls N-, bzw. C-terminal in der Membran verankert, den ternären Replikationskomplex aus. Die Publikationen von Pfannkuche *et al.* 2011 wiesen auf die NS5A-SH2-Interaktion hin. Als Bindemotiv wird eine kanonische SH2-Bindung über ein Phosphotyrosin vermutet. Die Publikationen von Schwarten *et al.* 2013 und Solyom *et al.* 2015 zeigten die Interaktion von NS5A und c-SRC-SH3 über PXXP-Motive im C-terminalen Bereich von NS5A. Die Interaktion von NS5A und NS5B wurde von Shirota *et al.* 2002 untersucht.

Aufgrund des Fortschritts im Verständnis des Mechanismus der Infektion von Hepatitis C, vornehmlich durch den Einsatz von Replikon-Zellkultur-Modellen, in Kombination mit hoch aufgelösten Strukturdaten vieler wichtiger viraler und zellulärer Proteine und Proteinkomplexe konnten in den letzten Jahren sehr effektive Medikamente gegen HCV entwickelt werden.

1.6 Kenntnisse zur c-SRC - NS5A und c-SRC - NS5B-Interaktion

Die Interaktion der Hepatitis C viralen Proteinen NS5A und NS5B mit verschiedenen humanen Wirtsfaktoren wurde bereits in Vorarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen untersucht. Besondere Bedeutung liegt hier auf den humanen Proteinen Cyclophilin A, Hitzeschock-Protein 90 (HSP 90), VAP A und B (vesicle associated membrane protein a bzw. b) und der Proteinkinase AKT. Gegenüber der wildtypischen Situation veränderte Genexpression dieser Wirtsfaktoren führte zur Reduktion der HCV-Replikationsrate in Zellkultur-Modellen

(11). Darüber hinaus ist bekannt, dass HCV ebenfalls mit den humanen nicht-Rezeptorkinasen der Src-Familie interagieren kann und dass diese Interaktion eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung viraler Replikationskomplexe ist (38).

Durch Pulldown-Assays mit rekombinanten Proteinen und durch Copräzipitation in Zellkultur konnte eine direkte Interaktion von NS5A mit NS5B nachgewiesen werden (110).

In umfangreichen Pulldown-Assays wurde die Interaktion zwischen NS5A und verschiedenen Src-Kinasen untersucht. NS5A ist zwischen den Domänen II und III (aa 343-361) prolinreich mit mehreren putativen PXXP-Motiven (Abbildung 1.6), daher wurden hier kanonische SH3-Bindungsstellen vermutet.

In Zellkulturstudien von Pfannkuche *et al.* 2011 zeigte sich, dass die Src-Kinase c-SRC für die virale Replikation in Hepatozyten-Zellkulturen entscheidend ist. Die Kinasen FYN und YES, obwohl sie auch zu den Src-Kinasen gehören, können ein Fehlen der c-SRC nicht kompensieren (53). Pulldown-Assays deuteten darauf hin, dass der molekulare Mechanismus der Interaktion zwischen c-SRC und NS5B durch die Strukturdomänen SH3 vermittelt wird.

Durch gezielt konstruierte Deletionsvarianten von NS5B konnte eine putative Bindestelle für c-SRC auf das prolinreiche Motiv von 382-402 eingegrenzt werden (53). Weiter konnte durch Pulldown-Assays mit Deletionsvarianten von c-SRC gezeigt werden, dass NS5A an die SH2-Domäne von c-SRC bindet.

Bei späteren *in vitro*-Untersuchungen zur Bindung von heterolog exprimierten und gereinigten NS5B und c-SRC-SH3-Proteinen bzw. Proteindomänen konnten jedoch keine Ausbildung eines binären c-SRC-SH3-NS5B-Komplex durch Pulldown-Assays und isothermale Kalorimetrie (ITC) nachweisen (111).

Untersuchungen mit sensitiveren Methoden, wie NMR, konnten zeigen, dass die prolinreichen Regionen von NS5A mit der SH3-Domäne von c-SRC wechselwirkt (20, 112), wenngleich die Interaktionen mit einem K_d im hohen μM -Bereich deutlich weniger affin waren, als die Wechselwirkungen mit von NS5A mit der SH3-Domäne von BIN1 (Bridging integrator Protein 1), deren K_d mit 0,1 μM bestimmt wurde (49, 113). Die Struktur der c-SRC-SH3-NS5A-Bindung konnte durch Kristallographie von Bacarizo *et al.* 2015 aufgeklärt werden (114).

Untersuchungen von NS5A alleine zeigten keine intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den globalen und IDP-Regionen (20).

Die Interaktion zwischen der SH2-Domäne der c-SRC mit NS5A ist bislang noch nicht genauer charakterisiert. Die NS5A-NS5B-Interaktion, wie von Shirota *et al.* 2002 gezeigt, reichte nicht aus, um das Fehlen der SH2-Domäne auszugleichen, sodass in Pulldown-Assays keine Komplexbildung von NS5A, NS5B und c-SRC- ΔSH2 nachgewiesen werden konnte (53).

Untersuchungen in B-Lymphozyten zwischen NS5A und FYN-SH2 konnten eine Phosphotyrosin-abhängige Bindung nachweisen (115). Im Hauptinfektionssystem für HCV, den Hepatozyten, ist die molekulare Basis der Interaktion von NS5A und c-SRC noch nicht geklärt.

Zu Beginn der Arbeit konnte auf Grundlage der vorliegenden Daten ein Modell für den Replikationskomplex aus c-SRC-NS5A-NS5B erstellt werden

(Abbildung 1.7). Die neueren Erkenntnisse zur Interaktion zeigen, dass die Interaktionen von NS5A mit der SH2- und der SH3-Domäne von c-SRC für die Ausbildung des Replikationskomplex entscheidend sind.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die durchgeführten Arbeiten sollen einen Einblick in die molekularen Mechanismen, welche der Interaktion von NS5A und c-SRC zu Grunde liegen, liefern. Über die Vorarbeiten und das Literaturwissen hinausgehend, lag der Fokus auf der strukturellen Aufklärung der Interaktion und nötigen Vorarbeiten um diesen Komplex *in vitro* zu konstituieren.

Zu Beginn der Arbeiten (2013) stand die Zulassung der mittlerweile (Stand 2016) erhältlichen und sehr effizienten wirkenden Hepatitis-C-Medikamente noch aus. Im Nebeneffekt hätten hier neue Ziele für die Medikamenten-Entwicklung aufgedeckt werden können.

Zunächst galt es zu klären, ob NS5A über den von Nakashima *et al.* 2012 in B-Zelllymphozyten postulierten Mechanismus auch in Hepatozyten an c-SRC bindet. Dazu war es nötig die beteiligten Proteine und Proteindomänen in ausreichender Menge, Reinheit und möglicherweise posttranslationaler Modifikation zur Verfügung zu haben. Die entsprechenden Protokolle zur Herstellung und Reinigung mussten dazu etabliert werden.

Anhand von in der Größe reduzierten Minimalkomplexen sollte die Interaktion von c-SRC mit NS5A untersucht werden. Beginnend mit Peptid-Protein-Komplexen zur Bestimmung möglicher Interaktionsstellen des Komplexes über größere Proteinfragmente und -Domänen soll die Interaktion beider Proteine biochemisch und biophysikalisch *in vitro* charakterisiert werden. Während der Untersuchungen wurde die Suche nach dem für die Interaktion von NS5A mit c-SRC entscheidenden Aminosäurerest in NS5A in den Mittelpunkt gestellt und in dieser Arbeit beschrieben.

Kapitel 2

Material

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen mindestens der Reinheit *p. a.* und wurden von den Firmen Carl Roth, Sigma-Aldrich oder Applichem bezogen.

2.2 Verwendete Geräte

TABELLE 2.1: Verwendete Geräte und Apparaturen

Methoden/Gerät	Modell	Hersteller
Biolayer Interferometrie	OctetRed96	Forté-Bio (Pall)
Circulardichroismus (CD)	J-815	Jasco
Fluorometer	LS-55	Perkin-Elmer
FPLC	Äkta Prime/Pure	General Electric (GE)
Gel-Dokumentations-Anlage	ChemiDoc MP	Bio-Rad
PCR Cycler		Eppendorf
Plattenlese Gerät für ELISA	M1000 Pro/ M200Pro	Tecan
Protein Konzentratoren	Vivaspin	Sartorius
SDS-PAGE Gel-System	Mini-Gel	Bio-Rad
Spektralphotometer	NanoDrop 1000	Peqlab
Spektralphotometer	V650	Jasco
Surface Plasmon Resonance	Biacore T200	GE
Ultraschall		Bandelin
Waagen		Sartorius
Western-Blot	Transblot Turbo Semi Dry	Bio-Rad
Zellkultur Aufschluss	Benchtop	Constant Systems
Zellkultur Inkubatoren		Infors
Zentrifugen	J-20, J-26XP	Beckman Coulter
Zentrifugen	5415R, 5702R	Eppendorf

2.3 Antikörper

TABELLE 2.2: Verwendete Antikörper (AK)

Name	Hersteller	No.	Organismus
primäre AK			
Anti-His	Cell signalling	27E8	Maus
Anti-NS5A	Abcam	ab13833	Maus
Anti-GST	Cell signalling	26H1	Maus
Anti-Phosphotyrosin	Millipore	4G10	Maus
sekundäre AK			
Anti-Maus HRP	Jackson ImmunoResearch	115-035-003	Ziege

2.4 Enzyme für die Molekularbiologie

TABELLE 2.3: Verwendete Enzyme für molekularbiologische Methoden

Name	Hersteller	Bezeichnung
PCR-Polymerase	Clontech	High Fidelity 2x Premix
Rekombinase	Clontech	In-Fusion HD 5x Premix
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs	DpnI

2.5 Verwendete *E. coli*-Stämme

TABELLE 2.4: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>].
BL21 DE3	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHIo ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>
Stellar	<i>F⁻, endA1, supE44, thi1, recA1, relA1, gyrA96, phoA,</i> <i>φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA - argF) U169, Δ(mrr -</i> <i>hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ-</i>
TKB-1	<i>B F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ (DE3)</i> [pTK Tet ^r]

2.5.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*-Kulturen

TABELLE 2.5: Verwendete Medien zur Anzucht von *E. coli*-Kulturen

Lysogeny broth (LB) Medium nach Miller	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,4.
Terrific broth (TB) Medium	24 g/l Hefeextrakt, 12 g/l Trypton, 4 ml/l Glycerin, 0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4 , pH 7,4.
M9 Medium	46,6 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 8,6 mM NaCl, 2 g/l NH_4Cl , 3 g/l Glukose, 0,3 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 10 ml/l Spurenelementlösung, 50 mg/l Ammoniumeisen(III)Citrat, 1 mg/l Biotin, 1 mg/l Thiamin, pH 7,4.
Spurenelementlösung	0,1 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/l H_3BO_3 , 0,2 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/l $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/l $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$.

2.6 Nukleinsäuren

Die verwendeten Gene stammten entweder aus Bibliotheken des Instituts für Physikalische Biologie (IPB), Institut of Complex Systems 6 bzw. dem Institut für experimentelle Hepatologie oder wurden aus ihnen generiert. Einige Gene wurden synthetisch bei der Firma Gene Art (Regensburg, Deutschland) als lange Oligonukleotide hergestellt (vgl. Kapitel 3.1)

2.6.1 Verwendete Gene und Plasmide

TABELLE 2.6: Verwendete Gene und Plasmide

Nr.	Plasmid / Gen	Organismus
1	pGEX 6P <i>c-SRC-ΔSH1</i> 1-247	human
2	pGEX 6P <i>FYN-SH2</i> Isoform 2 140-257	human
3	pET28a <i>NS5A-D2D3</i> 191-447	HCV
4	pGEX6P <i>c-SRC-SH3-SH2</i> 80-249	human
5	pGEX6P <i>c-SRC-SH2</i> 143-249	human
6	pGEX 6P <i>FYN-SH2</i> Isoform 2 140-257 R176K	human
7	pGEX 6P <i>c-SRC-ΔSH1</i> 1-247 R173K	human
8	pET302 <i>NS5A-D1</i> 33-202	HCV
9	pET302 <i>NS5A-D1</i> 33-202 Y93F	HCV
10	pET302 <i>NS5A-D1</i> 33-202 Y129F	HCV
11	pET302 <i>NS5A-D1</i> 33-202 Y161F	HCV
12	pET302 <i>NS5A-D1</i> 33-202 Y93F Y129F	HCV
13	pET302 <i>NS5A-D1</i> 33-202 Y93F Y161F	HCV
14	pET302 <i>NS5A-D1</i> 33-202 Y129F Y161F	HCV
15	pET302 <i>NS5A-D1</i> 33-202 Y93F Y129F Y161F	HCV
16	pGEX 6P	
17	pET 302 N-His ₆	

Die DNA- und Proteinsequenzen der verwendeten Gene bzw. Proteine sind im Anhang A bzw. B aufgeführt.

2.6.2 Sequenzen von Oligonukleotiden

TABELLE 2.7: Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Sequenz 5' -> 3'
1	pET302 Primer1	GTGATGATGATGATGATGCATATG
2	pET302 Primer 2	AATCGGATCCGGCTGCTAACAAAG
3	pGEX Primer 1	AGAATTCCGGGGATCCCAGGGG
4	pGEX Primer 2	GGCTCGAGCGGCCGC
5	FYN Primer1	AAAGAAAGCGAAACCACCAAAGGTGC
6	FYN Primer 2	TCGCTTTCTTTAATCAGAAAGGTGCCACG
7	SRC Primer 1	AAAGAAAGTGAGACCACGAAAGGTGCC
8	SRC Primer 2	TGGTCTCACTTTCTTTCACGAGG
11	NS5A Primer 3 (93)	TAATGCATTTACCACAGGTCCGTGTACCC
12	NS5A Primer 4 (93)	ACCTGTGGTAAATGCATTAATCGGAAAGG
13	NS5A Primer 5 (129)	TTTTCATTTTTGTGACCGGTATGACCACCG
14	NS5A Primer 6 (129)	GGTCACAAAATGAAAATCACCAACACGGG
15	NS5A Primer 7 (161)	GCATCGTTTTGCACCGGCATGTAAACCGC
16	NS5A Primer 8 (161)	GCCGGTGAAAACGATGCAGACGAACACC

2.7 Material zur Reinigung von Nukleinsäuren

TABELLE 2.8: Verwendete Materialien zur Reinigung von Nukleinsäuren

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Reinigung von Plasmid DNA	NucleoBond PC 20	Macherey-Nagel
Reinigung von PCR amplifizierten DNA Fragmenten	NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel

2.8 Materialien zur Reinigung von Proteindomänen

TABELLE 2.9: Stationäre Chromatographie-Phasen für die Reinigung von Proteinen und Proteindomänen

Chromatographie-Medium	Hersteller	Bezeichnung
Ni ²⁺ -Affinitäts-Medium	Macherey-Nagel	Protino NiNTA
GSH-Affinitäts-Medium	Macherey-Nagel	Protino GSH
Gelfiltrationsmedien	GE	Superdex 75 + 200, pg & gl

2.9 Puffer zur Lyse von Zellen, Reinigung von Proteindomänen, Durchführung von Pull-down-Assays

TABELLE 2.10: Puffer zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Laufpuffer ^{GST1} :	50 mM Hepes-NaOH, 100 mM Na ₂ SO ₄ , 300 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 8,0.
Laufpuffer ^{GST2} :	50 mM NaP _i , 100 mM Na ₂ SO ₄ , pH 7,0
Lysepuffer ^{GST1} :	Laufpuffer ^{GST1} + Protease-Inhibitor „Complete“ (Roche), + 0,5 % Triton X-100, + DNase.
Lysepuffer ^{GST2} :	Laufpuffer ^{GST2} + Protease-Inhibitor „Complete“ (Roche), + 0,5 % Triton X-100, + DNase.
Elutionspuffer ^{GST1} :	Laufpuffer ^{GST1} + 20 mM Glutathion(red.), pH 8,0.
Elutionspuffer ^{GST2} :	Laufpuffer ^{GST2} + 20 mM Glutathion(red.), pH 7,0.
SEC-Laufpuffer ^{GST2} :	50 mM NaP _i , 100 mM Na ₂ SO ₄ , 2 mM DTT, pH 7,0.

TABELLE 2.11: Puffer zur Reinigung von His₆-Fusionsproteinen

Laufpuffer ^{His₆1} :	100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8,0.
Laufpuffer ^{His₆2} :	100 mM NaP _i , 10 mM Tris-HCl, 6 M Guanidin-HCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0.
Lysepuffer ^{His₆1} :	Laufpuffer ^{His₆1} , jedoch mit nur 100 mM NaCl, zusätzlich mit Protease-Inhibitor „Complete“, ohne EDTA (Roche), 1 mM Natrium Orthovanadat (OV) (bei pY-Proben), 1 % Triton X-100 und DNase.
Lysepuffer ^{His₆2} :	Laufpuffer ^{His₆2} + Protease-Inhibitor „Complete“, ohne EDTA (Roche) + 1 mM Orthovanadat (bei pY-Proben).
Elutionspuffer ^{His₆1} :	Laufpuffer ^{His₆1} + 495 mM Imidazol, + 2 mM DTT, pH 8,0.
Elutionspuffer ^{His₆2} :	Laufpuffer ^{His₆2} + 490 mM Imidazol.
SEC-Laufpuffer ^{His₆1} :	25 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 10 % Glycerol, 2 mM DTT, pH 8,0.
SEC-Laufpuffer ^{His₆2} :	50 mM KP _i , 200 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0.

TABELLE 2.12: Puffer zur Lyse von humanen Hepatozyten-Zelllinien und
Durchführung von Pulldown-Assays

Waschpuffer ^{Huh} :	PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , 0,1 mM Orthovanadat.
Lysepuffer ^{Huh} :	20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 50 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Orthovanadat (OV), 1 Tablette Protease Inhibitor „Complete“ (Roche) pro 50 ml, 0,2 % SDS, 10 % Glycerol, 20 mM Natriumpyrophosphat pH 7,4.

2.10 Puffer zur Durchführung biochemischer und biophysikalischer Messungen

Puffer zur Durchführung von Fluoreszenz Polarisations Messungen	HSB ^{FP}	10 mM Hepes-NaOH, 150 mM NaCl, pH 8,0.
Puffer zur Durchführung von enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (ELISA)	HSB ^{ELISA}	10 mM Hepes-NaOH, 150 mM NaCl, pH 8,0.
Puffer zur Messung von Zirkulardichroismus (CD)	PBS ^{CD}	10 mM NaP _i , 200 mM NaF, pH 7,4.
Puffer zur Durchführung von Biolayer Interferometrie (BLI) Messungen	HSB ^{BLI}	10 mM Hepes-NaOH, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 8,0. Bei unspezifischer Interaktion zusätzlich 0,5 % BSA.

2.11 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen

SDS-PAGE Sammelgel 15 % (pro Gel)	1,2 ml H ₂ O 2,5 ml 30% Arcylamid/Bis-Arcylamid (37,5:1) 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,05 ml 10 % SDS 25 µl 10 % APS, 2,5 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED).
SDS-PAGE Trenngel 15 % (pro Gel)	1,2 ml H ₂ O 2,5 ml 30% Arcylamid/Bis-Arcylamid (37,5:1) 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,05 ml 10 % SDS 25 µl 10 % APS, 5 µl TEMED.
SDS-PAGE Laufpuffer	2,5 mM Tris-HCl, 19,2 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3.
SDS-PAGE Coomassie Brilliant Blau (CBB) Färbelösung	0,02 % CBB-G250 5 % Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat 10 % Ethanol (96 %) 2 % ortho-Phosphorsäure (100 %).
Western-Blot Membransystem	Amersham - Hybond P 0.2 PVDF.
Western-Blot Puffersystem	2,5 mM Tris-HCl, 19,2 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3.
Western-Blot: Chemilumineszenz-Substrat 1x Lämmli Puffer	Thermo Fisher - SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate. 62,5 mM Tris-HCl 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,004 % Bromphenolblau, pH 6,8.
Proteingrößenstandards	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermofisher Scientific #26619 PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermofisher Scientific #26619.

2.12 Sequenzen von synthetischen Peptiden aus NS5A

Nr.	Name	Genotyp	Position in NS5A (Polyprotein)	Sequenz
1	Y43 ^{ref1b}	ref 1b	36-50 (2013-2027)	FISCQRGYKGVWRGD
2	pY43 ^{ref1b}			FISCQRG _y KGVWRGD
3	Y43 ^{con1b}	con 1b		FFSCQRGYKGVWRGD
4	pY43 ^{con1b}			FFSCQRG _y KGVWRGD
5	Y93	ref 1b + con 1b	86-100 (2063-2077)	GTFPINAYTTGPCTP
6	pY93			GTFPIN _{Ay} TTGPCTP
7	Y106	ref 1b + con 1b	99-113 (2076-2090)	TPSPAPNYSRALWRV
8	pY106			TPSPAPN _y SRALWRV
9	Y118	ref 1b + con 1b	111-125 (2088-2102)	WRVAAEEYVEVTRVG
10	pY118			WRVAAEE _y VEVTRVG
11	Y129	ref 1b + con 1b	122-136 (2099-2113)	TRVGDFHYVTGM _T TD
12	pY129			TRVGDFH _y VTGM _T TD
13	Y161	ref 1b + con 1b	154-168 (2131-2145)	DG _V RLHRYAPACKPL
14	pY161			DG _V RLHR _y APACKPL
15	Y181 ^{ref1b}	ref 1b	174-188 (2151-2165)	FQVGLNQ _y LVGSQ _L LP
16	pY181 ^{ref1b}			FQVGLNQ _y LVGSQ _L LP
17	Y181 ^{con1b}	con 1b		FLVGLNQ _y LVGSQ _L LP
18	pY181 ^{con1b}			FLVGLNQ _y LVGSQ _L LP
19	Y321	ref 1b + con 1b	314-328 (2291-2305)	PIWARPDYNP _L LES
20	pY321			PIWARPD _y NP _L LES
21	Y334	ref 1b + con 1b	327-341 (2304-2318)	ESWKDPDYVPPV _V HG
22	pY334			ESWKDPD _y VPPV _V HG
23	Y413 ^{ref1b}	ref 1b	406-420 (2383-2397)	KGSDVESYSSM _P P _L E
24	pY413 ^{ref1b}			KGSDVES _y SSM _P P _L E
25	Y413 ^{con1b}	con 1b		AGSDVESYSSM _P P _L E
26	pY413 ^{con1b}			AGSDVES _y SSM _P P _L E
27	Y93Y106	ref 1b + con 1b	86-113 (2063-2090)	GTFPINAYTTGPCTPSPAPNYSRALWRV
28	pY93Y106			GTFPIN _{Ay} TTGPCTPSPAPNYSRALWRV
29	Y93pY106			GTFPINAYTTGPCTPSPAPN _y SRALWRV
30	pY93pY106			GTFPIN _{Ay} TTGPCTPSPAPN _y SRALWRV

Die Peptide 1-26 wurden mit N-terminaler Biotinylierung von JPT (Berlin, Deutschland) mit einer Reinheit von $\geq 70\%$ (Herstellerangabe) synthetisiert. Der Tyrosinrest wurde mit und ohne Phosphorylierungsmodifikation geordert, sodass insgesamt 26 Peptide geordert wurden.

Nach einer ersten Selektionsrunde wurden die Peptide 6, 8, 12, 14, 26 und 27-30 mit pY Modifikation von der Firma Caslo (Kongens Lyngby, Dänemark) bestellt. Die Peptide wurden mit drei verschiedenen Modifikationen bestellt: N-terminaler Biotinylierung oder N-terminaler FITC-Kopplung über einen Aminohexan-Linker. Alle Peptide hatten eine N-terminale Acetylierung und wiesen eine Reinheit von $\geq 95\%$ (Herstellerangabe, Hersteller-Dokumentation) auf.

Die Peptide von JPT wurden in ELISA-Assays und BLI verwendet. Die Peptide von Caslo fanden Anwendung in der Fluoreszenz Polarisation und im BLI.

Kapitel 3

Methoden

3.1 DNA-Klonierungen

Die Insertion von DNA-Fragmenten in die entsprechenden Klonierungsvektoren sowie der Austausch einzelner Nukleotide zur Generierung verschiedener Proteinvarianten wurden mit Enzymen der Firma Clontech Takara (Kusatsu, Japan) vom Typ In-Fusion HD Cloning entsprechend der Versuchsvorschrift durchgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem 2x PCR High Fidelity Premix durchgeführt. Um Ausgangs-DNA aus den Reaktionsansätzen zu entfernen, wurden die Proben nach der PCR mit 1 μ l pro 15 μ l Probenansatz DpnI für 30 min inkubiert und anschließend über ein Nukleinsäure-Affinitätsmaterial für PCR-Produkte gereinigt (vgl. Kapitel 2.7). Im Anschluss folgte ein Rekombinationsereignis mit der In-Fusion HD cloning premix Reaktionsmischung.

Auf diese Weise wurden die Konstrukte 2 und 6-15 aus Kapitel 2.6.1 mit den Oligonukleotiden aus Kapitel 2.6.2 wie in Tabelle 3.1 zusammen gefasst hergestellt.

TABELLE 3.1: Molekularbiologisch hergestellte DNA-Vektoren

Konstrukt Nr. (vgl. Kapitel 2.6.1)	generiert aus Konstrukt Nr. (vgl. Kapitel 2.6.1)	mit Oligonucleotiden (vgl. Kapitel 2.6.2)	Template für das Produkt / Insert
2	16 (Vektor)	3+4	+ synthetisch Insert („Fyn“)
6	2	5+6	-
7	1	7+8	-
8	17 (Vektor)	1+2	+ synthetisches Insert („NS5A“)
9	8	11+12	-
10	8	13+14	-
11	8	15+16	-
12	9	13+14	-
13	9	15+16	-
14	10	15+16	-
15	12	15+16	-

3.2 *E. coli*-Zellkulturen

Zur Vermehrung von DNA-Klonierungsvektoren (vgl. Tabelle 2.6) wurden die *E. coli*-Stämme XL1 Blue und sowie Stellar verwendet (vgl. Kapitel 2.5). Die Proteinexpressionen wurden in den Stämmen *E. coli*-BL21 DE3 und TKB-1 durchgeführt.

Zur Transfektion der DNA in die Zelle wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme als chemisch kompetent gemachte Zellen verwendet. Diese wurden entweder kommerziell erworben oder aus den Beständen des IPB verwendet.

Die Zellen wurden 30 min mit dem jeweiligen DNA-Vektor auf Eis inkubiert, anschließend für 45 s auf 42 °C erwärmt und dann 1-2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 500 µl Komplexmedium (LB oder TB) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine entsprechende Selektionsmedium-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C 12-16 h inkubiert. Die Kolonien wurden vereinzelt, die Vektor-DNA durch DNA-Sequenzierung überprüft und richtige Klone zur Vermehrung in Komplexmedium mit entsprechenden Antibiotika 12 h schüttelnd inkubiert. Die Kulturen wurden mit Glycerol-Lösung (finale Konzentration 25 %) versetzt und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die jeweilige Expressionskultur wurden in TB- oder M9-Medium (siehe Kapitel 2.5.1) angesetzt. Dazu wurde das frische Medium mit einem Volumenanteil zwischen 1 : 50 und 1 : 100 aus einer über Nacht (ü.N.) in TB- oder LB-Medium gewachsenen Vorkultur inokuliert. Nach 3-5 h wurde in der Regel eine OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 erreicht und die Kultur mit IPTG-Konzentrationen zwischen 0,2 und 1 mM induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 37 °C für 4 h (i. d. R. mit 0,5-1 mM IPTG) oder bei 16 °C ü.N. (i. d. R. mit 0,2 mM IPTG). Die Zellen wurden im Anschluss bei 3500 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet bis zu Verwendung bei -20 °C gefroren gelagert.

Zur Proteinextraktion wurden die *E. coli*-Zellkulturen mit einem kontinuierlichen Aufschlussgerät „Cell Disruptor“ (vgl. Tabelle 2.2) bei 2 kbar bei 4 °C, im entsprechenden Puffer gelöst, aufgeschlossen.

3.3 Chromatographietechniken zur Reinigung von Proteindomänen als Fusionsproteine

3.3.1 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Proteine und Proteindomänen mit N-terminalen Proteinanhang bestehend der der ca. 27 kDa großen Glutathion-S-Transferase (GST) wurden über Affinitätsmaterial mit immobilisiertem, reduzierten Glutathion (GSH) gereinigt (vgl. Kapitel 2.9). Die entsprechend vorbehandelten Zellysate (Kapitel 3.2) wurden im Lysepuffer auf die in Laufpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug dabei 1 ml/min bei einer 26/20 Säule. Das anschließende Waschen und die Elution wurden bei 4 ml/min durchgeführt. Das Protein wurde mit Elutionspuffer isokratisch eluiert.

Die mobile Phase eines jeden Chromatographieschritts wurden in Fraktionen getrennt voneinander gesammelt.

3.3.2 Reinigung von His₆-Fusionsproteinen

Proteine und Proteindomänen mit N-terminalen Proteinanhang bestehend aus sechs Histidin-Aminosäureresten wurden über Nickel-Affinitätsmaterial (vgl. Kapitel 2.9) gereinigt. Die entsprechend vorbehandelten Zellysate (Kapitel 3.2) wurden im Lysepuffer auf die im Laufpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug dabei 180 cm/h. Das anschließende Waschen und die Elution wurden bei 300 cm/h durchgeführt. Die Elution wurde durch ansteigende Beimischung von Elutionspuffer zum Laufpuffer durchgeführt. Solche Gradienten wurden mit einem vielfachen des Volumens des Chromatographiemediums (i. d. R. zehn- bis 15-fach mehr) durchgeführt.

Die mobile Phase eines jeden Chromatographieschritts wurden in Fraktionen getrennt voneinander gesammelt.

3.3.3 Durchführung von Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie wurde durchgeführt mit Medien beschrieben in Tabelle 2.9 auf GE Äkta Pure FPLC-Geräten (vgl. Kapitel 2.2). Die verwendeten Formate der stationären Phase waren 10-300 mm, 16-600 mm und 26-600 mm Säulen (Durchmesser - Länge), befüllt mit Superdex 75, 200, pg oder gl-Material. Die Materialien wurden entsprechend der Hersteller spezifischen Vorschriften gewaschen und in den entsprechenden Chromatographiepuffern betrieben (vgl. Kapitel 2.8).

Während der Chromatographie wurde das Flussmittel zu festen Zeiten in getrennten Fraktionen gesammelt.

3.4 Nachweis der Reinheit und Identität von Proteinen und Proteindomänen

Die Reinheit und Identität der gereinigten Proteine wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Puffer sind in Kapitel 2.11 zusammengestellt. Für die einzelnen Systeme wurden jeweils die Protokolle und Versuchsdurchführungen der Hersteller der Apparaturen, d.h. BioRad und Amershell verwendet. Die SDS-PAGE wurde bei 35 mA betrieben, bis die Markierung des Bromphenolblaus das Gel verlassen hatte.

Die Färbung der SDS-PAGE wurde mit Coomassie Brilliant Blau G250-Lösung durchgeführt. Das anschließende Entfärben erfolgte mit Wasser. Die SDS-PAGE wurde zur Dokumentation fotografiert.

Western-Blot-Analysen wurden im Sandwich-Semi-Dry Verfahren durchgeführt. Dazu wurde das ungefärbte Gel kurz in dH_2O gewaschen und in Western-Blot-Puffer 5 min inkubiert. Die PVDF-Membran wurde mit Ethanol aktiviert und ebenfalls 5 min in Western-Blot-Puffer inkubiert. Anschließend wurden jeweils drei in Western-Blot-Puffer getränkte Whatman Papiere auf Anoden- und Kathodenseite über bzw. unter das Gel mit der aktivierten Membran gelegt und eine Spannung von 25 V bei maximal 1 A für 29 min angelegt.

Nach Auftrag der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese mit 5% Milchpulver (in TBS-T-Puffer) 1 h blockiert. Die anschließenden Präparations-schritte wurden nach Vorgabe der Hersteller der Primär- und Sekundärantikörper durchgeführt (aufgelistet in Kapitel 2.3).

3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Nach Bestimmung der Reinheit und Identität der gereinigten Proteine und Proteindomänen wurde die Konzentration über Absorption bei 280 nm im Spektralphotometer bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient wurde über das ExPASy ProtParam (116) Online-Tool bestimmt und die molare Konzentration über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt.

3.6 Zellbiologische Methoden

3.6.1 Kultivierung von transfizierten Hepatozyten Zelllinien und Präparation für Pulldown-Assays

Für zellbiologische Assays wurden kultivierte Huh 7 und Huh 9-13 Zellen verwendet (117). Die Kultivierung wurde im Institut für experimentelle Hepatologie durchgeführt und von Sabine Stindt betreut.

Nachdem die Zellen auf der Oberfläche der 10 cm Kultivierungsschale eine Konfluenz von 80 % erreichten, wurden die Zellen lysiert.

Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen und mit ca. 20 ml gekühltem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 μ l Lysepuffer pro 10 cm Schale aufgenommen und von der Oberfläche geschabt (Puffer und Lösungen in Kapitel 2.12). Die Zellen wurden bei 16.000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand mit einem Bradford-Assay (RotiQuant, Roth) mit Kalziumsulfat-Fällung nach Roth-Protokoll bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug typischerweise 1-2 mg/ml. Zur weiteren Verwendung wurden die Überstände aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.6.2 Pulldown-Assays

Die Pulldown-Assays wurden mit GSH-Agarose-Beads (GE) oder N-Hydroxysuccinimid / 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (NHS/EDC)-aktivierten Agarose-Beads als stationäre Phase durchgeführt. Die Beads wurden entsprechend der Anleitung vorbehandelt und anschließend mit einer definierten Menge c-SRC-Protein für 4-5 h bei 8 °C inkubiert. Die GSH-Beads waren daraufhin für die weitere Verwendung einsatzbereit. Als Kontrolle wurden hier mit Tris-HCl, pH 8,0 inaktivierte Beads als auch mit GST-Protein-beladene Beads verwendet.

Zur Inaktivierung freier Bindeplätze wurden die mit Protein kovalent gekoppelten NHS-EDC-Beads mit 200 mM Tris-HCl, pH 8,0 für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und mehrfach mit gekühltem Lysepuffer (vgl. Kapitel 3.6.1) gewaschen.

Zu Beginn des Assays wurde bei beiden Bead-Typen der Überstand abgenommen und eine definierte Menge Zelllysate (i.d.R. zwischen 0,2 und 1 mg Gesamtprotein) hinzugefügt und ü.N. unter Drehbewegung (ca. 50 rpm) inkubiert.

Nach ca. 12-16 h wurde der Ansatz bei 100 x g zentrifugiert und mehrfach mit Lysepuffer gewaschen. Die Überstände wurden jeweils verworfen.

Das Pellet wurde, nach entsprechender Anzahl von Waschvorgängen, in 30 μ l 1 x Lämmli Puffer bei 95 °C für 5 min gekocht und anschließend 20 μ l auf eine SDS-PAGE (Tris/Glycin, vgl. Kapitel 2.11) aufgetragen.

3.7 Biochemische und -physikalische Methoden

3.7.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA wurde als qualitative Methode zur Untersuchung der Bindung kurzer Peptide an gereinigte c-SRC-Domänen verwendet.

Dazu wurden kurze biotinylierte Peptide aus NS5A, die alle zehn Tyrosinreste in NS5A sowie deren direkte Umgebung von jeweils sieben Aminosäuren vor und nach der Position abdecken, verwendet (vgl. Kapitel 2.12).

Die Peptide wiesen eine N-terminale Biotinylierung auf. Die Peptide wurden in dH₂O gelöst und auf Streptavidin beschichtete 96-well Platten (Streptawell, Roche) gegeben. Die vom Hersteller angegebene maximale Beladungsmenge von 30 pmol wurde um den Faktor drei überschritten um ungleichmäßige Beladung durch ungenaue Konzentrationsbestimmungen zwischen den unterschiedlichen Reaktionsgefäßen zu minimieren.

Die Wells wurden dreimal mit ddH₂O gewaschen und anschließend mit GST-c-SRC-Proteinen in Laufpuffer^{GST1} versetzt. Diese wurden bei RT für 3 h inkubiert und anschließend erneut dreimal mit HBS^{ELISA}-Puffer gewaschen.

Die Wells wurden im Anschluss mit 1:5.000 in HBS^{ELISA} verdünntem Anti-GST-Antikörper ü.N. bei 8 °C inkubiert.

Nach weiteren drei Waschschritten mit HBS^{ELISA} wurde 1:10.000 (ebenfalls in HBS^{ELISA}) verdünnter Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter Anti-Maus-Antikörper zugegeben (vgl. Tabelle 2.2 aufgelistet).

Nach weiteren drei Waschschritten wurde das Substrat ABTS zugegeben und entsprechend der Versuchsvorschrift inkubiert. Der Substratumsatz wurde anschließend in einem Plattenlesegerät (Tecan M1000pro, M200pro) über die Absorptionmessung bei 405 nm verfolgt. Vor Ende der linearen Zunahme des Absorptionssignals wurden die Werte aufgezeichnet und auf das höchste Signal normiert.

3.7.2 Fluoreszenz-Polarisationsmessungen

Für die FP (Fluoreszenz-Polarisation) -Messungen wurden die gleichen Peptidsequenzen wie im ELISA verwendet. Entgegen der Biotinylierung am N-Terminus wurde ein Aminohexan-Linker angebracht an den der Fluorophor Fluoresceinisothiocyanate (FITC) gekoppelt wurde. Die Peptide wurden in einer Reinheit von mindestens 95 % bei der Firma Caslo (Kongens Lyngby, Dänemark) bestellt.

Die FP-Messungen wurden auf einem Perkin-Elmer LS 55 durchgeführt. Der Excitations (Ex)- Monochromator wurde auf 490 nm mit Bandweiten zwischen 3 und 5 nm, und der Emissions (Em)-Monochromator wurde auf 520 nm mit einer Bandweite von 5 oder 10 nm eingestellt. Die Spannung des Photomultiplier (PMT) wurde auf Werte zwischen 600 und 800 V eingestellt.

Die Parameter von Bandweite und Spannung wurden jeweils so optimiert, dass Emissionssignale zwischen 800 und 900 mV erreicht wurden.

Die Temperatur während der Messung betrug RT (22- 23 °C), kontrolliert über ein Raumluftthermometer. Die FP-Messungen wurden jeweils in HBS^{FP}-Puffer durchführt.

Die Fluoreszenzpolarisation (FP) wurde mit Formel 3.1 ausgewertet. I_{\parallel} und I_{\perp} sind jeweils die Fluoreszenz-Intensitäten parallel bzw. rechtwinklig zur Polarisierung der einstrahlenden Lichtquelle.

$$FP = \frac{I_{\parallel} - G * I_{\perp}}{I_{\parallel} + G * I_{\perp}} \quad (3.1)$$

Der Gewichtungsfaktor G korrigiert das Messgerät auf abweichende Empfindlichkeiten des PMT für Licht verschiedener Polarisierungen.

Die Fluoreszenz markierten Peptide wurden jeweils in einer Konzentration um 50 nM eingesetzt und die unmarkierten c-SRC-Proteindomänen wurden während der Messung in die Küvette titriert. Nach Mischung- und Ruhezeit von 1 min wurde für jede Mischung 2 min gemessen.

Die Auswertung erfolgte nach der Langmuirschen Adsorptionsisotherme mit Annahme einer Reaktion pseudo-erster-Ordnung, d.h. die Anfangs- und Gleichgewichtskonzentration des titrierten c-SRC-Proteins wurden gleichgesetzt.

Das FP-Signal wurde gegen die entsprechende c-SRC-Konzentration aufgetragen und die Halbsättigung der Kurve bestimmt, welcher als Dissoziationskonstante K_d angegeben wird.

3.7.3 Zirkulardichroismus (CD)-Messungen

Für die CD Messungen wurden die Proteine über eine Gelfiltration (meist mit Superdex 75 gl Material in einer 10-300 mm Säule) in den CD-Puffer überführt (vgl. Kapitel 2.10).

Die Probe wurde mit Zentrifugalkonzentratoren konzentriert und in eine 1 mm CD-Küvette eingefüllt.

Das CD-Spektrometer Jasco J-815 wurde entsprechend der Betriebsanleitung in Betrieb genommen und während der Messung mit 20 l/min Stickstoff in der optischen Bank gespült. Es wurden Spektren im Bereich von 260 bis 185 nm aufgenommen mit Datenpunkten alle 0,5 nm und einer Integrationszeit von 1 s. Die Messzelle wurde während der Messung auf 20 °C temperiert. Es wurden fünf bis zehn Messungen für das finale Spektrum akkumuliert.

Nach der Messung wurde von der Probe ein Referenzspektrum des reinen Puffers abgezogen.

3.7.4 Biolayer-Interferometrie (BLI) -Messungen

Die BLI-Messungen wurden an einem Octet Red96-Gerät durchgeführt.

Die Messungen wurden in HBS^{BLI}-Puffer durchgeführt (vgl. Kapitel 2.10). Bei starker unspezifischer Interaktion wurden 0,005 % Tween 20 und 0,5 % BSA zugegeben.

Für die Immobilisierung von Proteindomänen wurden Sensoren-Spitzen mit Anti-GST-Antikörpern verwendet. Als Referenz dazu wurden jeweils die proteolytisch gespaltenen Affinitäts-Tags an die Spitzen immobilisiert und die Bindung an den Analyten untersucht.

Für die Immobilisierung von biotinylierten Peptiden wurden Streptavidin Sensoren-Spitzen verwendet und gegen nicht beladene Spitzen referenziert.

Bei Proteinen ohne Affinitätstag wurde über einen N-Hydroxysuccinimid/1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (NHS/EDC)-Ester an entsprechende Sensoren-Spitzen immobilisiert und gegen mit 1 M Ethanolamin passivierte Spitzen referenziert.

Die Beladung der Spitzen mit Liganden wurde so durchgeführt, dass eine geringe Schichtdicke auf die Sensoren aufgetragen wurde. Das Augenmerk lag hier in der Minimierung von Bindeereignis während der Dissoziationsphase des Analyten („rebinding-Effekte“). Die typische Schichtdicke, die beim Beladen aufgetragen wurde, betrug zwischen 0,2 nm bei Peptiden bis zu ca. 1 nm Signal bei Proteindomänen.

Nach Beladung der Sensoren wurden die Assoziations- und Dissoziationszeiten entsprechend der untersuchten Bindung angepasst. Sie betrug typischerweise zwischen 300-400 s bei Untersuchungen zu Bindung von Peptiden an Proteindomänen bis zu 1400 s bei Bindung zwischen zwei Proteindomänen. Die Temperatur während der Messung wurde auf 26 °C eingestellt.

Die Messdaten wurden entsprechend des experimentellen Designs referenziert und anschließend mit ein bis zwei Exponentialfunktionen (Formel 3.2) gefittet.

$$y = A1 * e^{(-\frac{x}{t1})} + A2 * e^{(-\frac{x}{t2})} + y_{inf} \quad (3.2)$$

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d , wurde in den BLI- und den Polarationsmessungen der Parameter y_{inf} (als Wert des thermodynamischen Gleichgewichts) gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen und mit einer Sättigungsfunktion gefittet (Formel 3.3). Der Halbsättigungspunkt der erhaltenen Kurve wurde ermittelt, die der Dissoziationskonstante K_d entspricht.

$$y_{inf} = y_{end} * \frac{x^n}{(K_d^n + x^n)} \quad (3.3)$$

3.8 Massenspektrometrische Untersuchungen von NS5A aus Huh 9-13-Zellen

Für die Massenspektrometrische Untersuchung von Pulldown-Proben aus Huh 9-13 Zellen zur Auffindung möglicher posttranslationaler Modifikationen wurde der Messservice des Biomedizinischen Forschungszentrums Düsseldorf, Arbeitsgruppe „molecular proteomics“ in Anspruch genommen.

Die über eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine des Pulldown-Assays mit immobilisierter c-SRC- Δ SH1 und Huh 9-13 Zellen wurden in der erwarteten Größe von NS5A ausgeschnitten und dem Service übergeben. Dieser extrahierte die Proteine aus den SDS-PAGE Stücken, führte einen proteolytischen Abbau mit Trypsin durch und führte anschließend eine HPLC-MS/MS Messung durch. Die so erhaltenen Proteinmassenfragmente wurden gegen die Datenbank HCV-Proteom mit der Option auf posttranslationale Modifikationen geplottet.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Bindung von NS5A an Src-Kinasen untersucht durch Pulldown-Assays

Die Bindung von NS5A an c-SRC wurde in der Arbeit von Pfannkuche *et al.* 2011 gezeigt und die SH2-Domäne von c-SRC als wichtige Binderegion für NS5A identifiziert.

Um Folgeexperimente durchzuführen zu können, wurden zunächst Reinigungsprotokolle für verschiedene c-SRC-Proteindomänen etabliert. In Hinblick auf weitergehende Experimente zur Untersuchung einer SH2-Abhängigkeit der Bindung und eines möglichen kanonischen SH2-Bindemotivs (vgl. Kapitel 1.3), wurde ebenfalls eine Phosphotyrosin-bindedefiziente Variante der SH2-Domänen von c-SRC mit Arginin-zu-Lysin-Austausch in der pY-Bindetasche hergestellt und gereinigt.

In Nakashima *et al.* 2012 wurde die Bindung von NS5A aus Phosphatasen-inhibierten B-Zelllymphozyten-Zelllysaten an die FYN-SH2-Domäne gezeigt. Um die Bindung von NS5A aus Heptazyten an FYN-SH2 untersuchen zu können, wurde diese Proteindomäne ebenfalls gereinigt.

4.1.1 Reinigung von c-SRC-Domänen

c-SRC wurde in den Varianten c-SRC- Δ SH1 (1-247), c-SRC- Δ SH1 (1-247) R173K, c-SRC-SH3-SH2, und c-SRC-SH2 heterolog als GST-Fusionsprotein im *E. coli*-Stamm BL21 DE3 exprimiert und gereinigt (entsprechende Vektoren in Tabelle 2.6: 1, 4, 5 und 7).

Die Reinigungen wurden mit den in Tabelle 2.9 aufgeführten Chromatographiemedien durchgeführt. Die Proteinexpression erfolgte wie in Kapitel 3.2 beschrieben mit Vektor 1 aus Tabelle 2.6. Die Expressionskultur der *E. coli*-Zellen wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 mit 0,25 mM IPTG versetzt und für weitere 20 h bei 16 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in Lysepuffer^{GST1} aufgenommen (vgl. Tabelle 2.10) und anschließend aufgeschlossen (vgl. Kapitel 3.2). Die GST-Affinitätschromatographie wurde mit Laufpuffer^{GST1} und Elutionspuffer^{GST1} (vgl. Tabelle 2.10) wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde eine SEC mit Superdex 75 pg Material durchgeführt wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben mit Laufpuffer^{GST1}. Nach SEC wies das Protein die in Abbildung 4.1

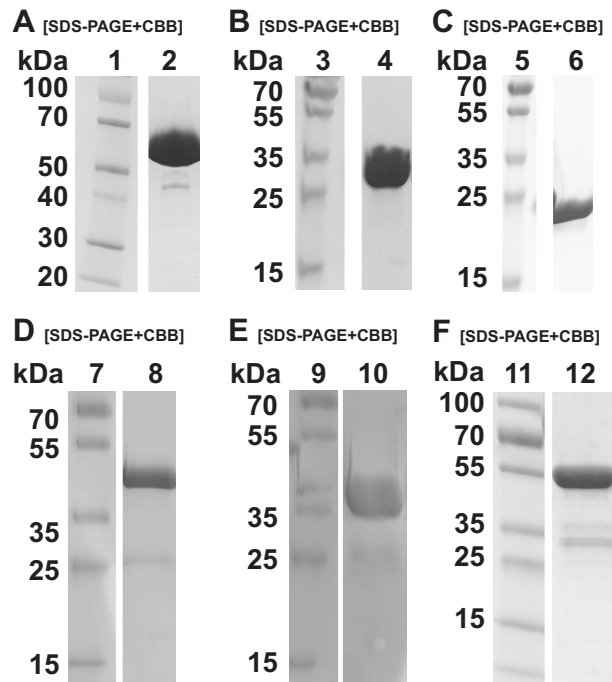


ABBILDUNG 4.1: **Reinigung verschiedener c-SRC-Proteindomänen.**

[1, 3, 5, 7, 9, 11] zeigen jeweils Proteingrößenstandards. [2] zeigt GST-c-SRC- Δ SH1-Fusionsprotein nach SEC (ca. 54 kDa). [4] zeigt c-SRC- Δ SH1 (ca. 27,6 kDa), hergestellt aus GST-c-SRC- Δ SH1 (aus [A]) nach Rhinovirus 3C Protease („PreScission“) Behandlung und anschließender Reinigung. [6] zeigt das abgespaltenen GST-Protein (ca. 26 kDa). In [D]: [8] zeigt gereinigtes GST-c-SRC-SH3-SH2 (ca. 46 kDa), [E] [10] gereinigtes GST-c-SRC-SH2 (ca. 40 kDa) und [F] [12] gereinigtes GST-c-SRC- Δ SH1 R173K (ca. 54 kDa).

A gezeigte Reinheit auf. Die Ausbeute von GST-c-SRC- Δ SH1 lag bei ca. 400 mg pro Liter *E. coli*-Zellkultur.

Der GST-Fusionsprotein-Affinitätstag konnte proteolytisch durch die Rhinovirus 3C Protease („PreScission“) abgespalten werden. Nach Spaltung wurde das Src-Protein noch durch zwei Chromatographieschritte (GST-Affinitätschromatographie und SEC mit Superdex 75 pg Material jeweils mit Laufpuffer^{GST1}) zur finalen Reinheit ($\geq 95\%$ bestimmt per SDS-PAGE mit CBB-Färbung und Intensitäts-Integral) gebracht (Abbildung 4.1 [A] und [B]).

Das gereinigte GST-Protein ([C]) in Laufpuffer^{GST1} wurde für weitere Experimente als Referenzprobe für verschiedene Untersuchungen verwendet.

GST-c-SRC- Δ SH1 R173K, GST-c-SRC-SH3-SH2 und GST-c-SRC-SH2 wurden auf die gleiche Weise als GST-Fusionsproteine gereinigt. Die Ausbeuten betragen ca. 50 mg/l *E. coli*-Kultur für GST-c-SRC- Δ SH1 R173K, und jeweils ca. 100 mg/l *E. coli*-Kultur für GST-c-SRC-SH3-SH2 und GST-c-SRC-SH2. Die Reinheit dieser Proteine betrug jeweils mindestens 90%, bestimmt über das Intensitätsintegral der CBB-Färbung aus Abbildung 4.1.

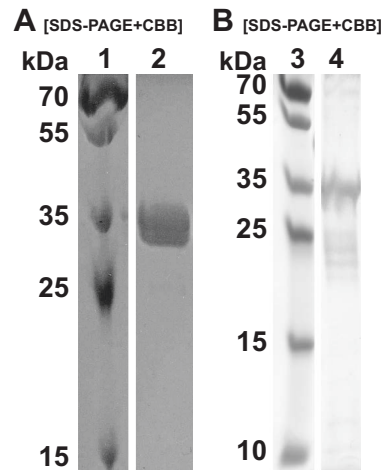


ABBILDUNG 4.2: **Gereinigte FYN-SH2 als GST-Fusionsprotein.** [A] zeigt eine CBB-gefärbte SDS-PAGE von der final aufbereiteten Proteinprobe von GST-FYN-SH2-Fusionsprotein [2] und GST-FYN-SH2 R176K [4] (beide 39 kDa). [1, 3] zeigen den Proteingrößenstandard. Die R176K-Variante von FYN-SH2 zeigte leichte Verunreinigungen durch GST-Protein (ca. 26 kDa).

4.1.2 Reinigung von Domänen aus FYN-SH2 und FYN-SH2 R176K

Die Tyrosinkinase FYN gehört zur Familie der Src-Kinasen. In dieser Arbeit wurden die SH2-Domäne in der Isoform 2 und in wildtypischer und in einer Phosphotyrosin-bindungsdefiziten Form mit Arginin-zu-Lysin-Austausch R176K gereinigt.

Beide Proteine wurden als GST-Fusionsproteine heterolog im *E. coli*-Stamm BL21 DE3 (Kapitel 2.5) exprimiert.

Die *E. coli*-BL21 DE3 Zellen (Kapitel 2.5) mit den Vektoren 2 bzw. 6 (Tabelle 2.6) wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben kultiviert. Bei einer OD_{600} zwischen 0,6 und 0,8 wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Zellernte durch Zentrifugation, wurden die Zellen in Lysepuffer^{GST2} (Tabelle 2.10) resuspendiert und wie in Kapitel 3.2 beschrieben aufgeschlossen. Die GST-Affinitätsreinigung erfolgte wie im Kapitel 3.3.1 beschrieben über GSH-Affinitätsmedium (Kapitel 2.8) mit Laufpuffer^{GST2} und Elutionspuffer^{GST2} (Tabelle 2.10). Anschließend folgte eine SEC (Kapitel 3.3.3) mit Superdex 75 pg Material (Kapitel 2.8) in SEC-Puffer^{GST2} (Tabelle 2.10).

Die finale Reinheit der Proteine ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Ausbeute der Proteine betrug jeweils ca. 20 mg/l *E. coli*-Zellkultur.

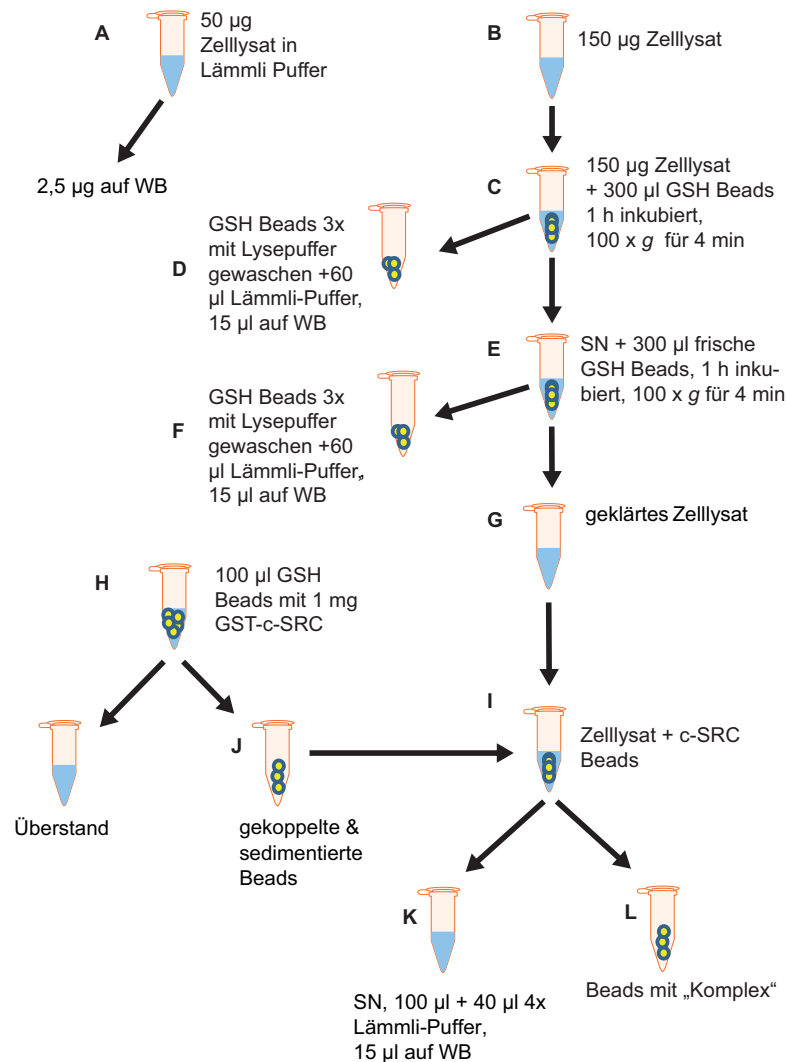


ABBILDUNG 4.3: Schema zur Behandlung des der stationären Phase und des Zelllysats der Huh 9-13-Zellen vor dem Pull-down-Assay. 50 µg Zelllysats wurden für Western-Blot-Analysen vorbereitet [A] und weitere 150 µg in den Assay eingesetzt [B]. Das Zelllysats wurde mit frischen GSH-Beads gewaschen [C, E]. Der Überstand wird als „geklärtes Zelllysats“ bezeichnet [G]. Die Beads der Inkubation [D, F] wurden auf NS5A-Bindung untersucht. Das geklärte Zelllysats wurde anschließend mit GST-c-SRC- Δ SH1 gekoppelten GSH-Beads [J] für 12-16 h bei 8 °C inkubiert. Der Überstand [K] der Beads [L] wurde abgenommen und untersucht (vgl. Abbildung 4.4 und 4.5).

4.1.3 Etablierung des Pull-down-Assays mit c-SRC- Δ SH1

Zunächst wurden Experimente mit rekombinantem c-SRC-Protein durchgeführt, um die Stabilität des Komplexes zu untersuchen.

Das Experiment wurde entsprechend der Abbildung 4.3 vorbereitet. Im ersten Schritt wurde GST-c-SRC- Δ SH1 an GSH-Agarose-Beads gekoppelt [H]. Als Kontrollen wurden frische GSH-Beads sowie Beads mit gebundenem GST-Protein verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden 200 µg Gesamtprotein des Huh 9-13 Zelllysats verwendet. Davon wurden 50 µg als Input-Kontrolle für

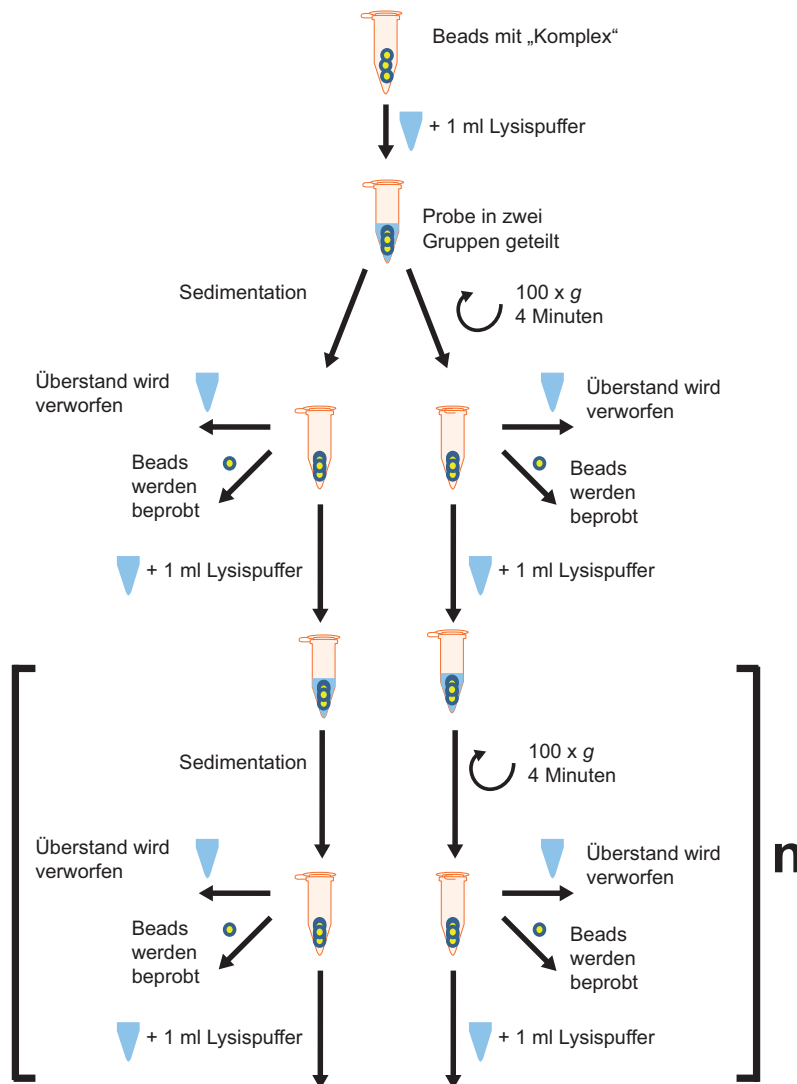


ABBILDUNG 4.4: Schematische Darstellung der verwendeten Pull-down-Protokolle des c-SRC- Δ SH1- NS5A-Pull-down-Assays. Die gekoppelten und mit Huh 9-13 inkubierten Beads (vgl. Abbildung 4.3) wurden gewaschen und in zwei Gruppen geteilt. Die Erste (linke Seite) sedimentierte zwischen den Waschschriften nur durch Schwerkraft, die Zweite (rechte Seite) wurde 4 min bei 100 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Die Beads des Pellets wurden beprobt und durch Western-Blot untersucht (vgl. Abbildung 4.5). Der Waschprozess wurde bis zu n=3 wiederholt.

einen Western-Blot (WB) aufbereitet [A] (Abbildung 4.5 [2]). Die restlichen 150 μ g Gesamtprotein des Zelllysats [B] wurden mit frischen GSH-Beads inkubiert [C], der Überstand abgenommen und erneut mit neuen frischen GSH-Beads inkubiert [E]. Der Überstand wurde abgenommen und, angelehnt an Pfannkuche *et al.* 2011, als „geklärtes Zelllysat“ [G] bezeichnet. Die Beads aus diesem Prozess, wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und mit einen Western-Blot untersucht (Abbildung 4.5 [3, 4]). Es konnte keine Bindung von NS5A an GSH-Beads nachgewiesen werden.

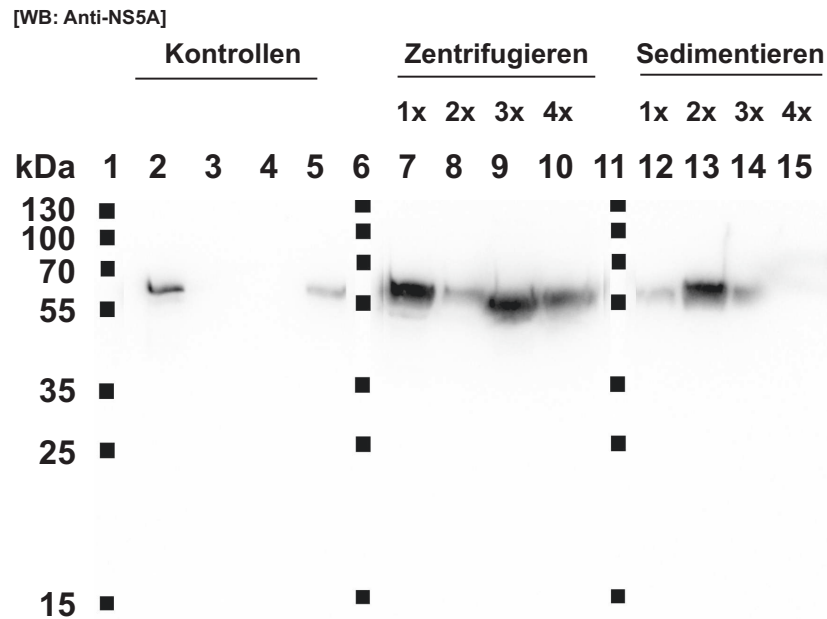


ABBILDUNG 4.5: **Bindung von NS5A^{Huh9-13} an c-SRC-ΔSH1 - Auswertung verschiedener Pulldown-Assay-Bedingungen.** Gezeigt ist ein Western-Blot mit Anti-NS5A-Antikörper. [1, 6, 11] zeigen den Proteingrößenstandard. [2] zeigt 2,5 µg Gesamtprotein der Huh 9-13-Zellen. [3, 4] zeigen mit Huh 9-13-Zellysate inkubierte GSH-Agarose-Beads (vgl. Abbildung 4.3 [D, F]). NS5A zeigte keine nachweisbare Interaktion mit GSH-Beads. [5] zeigt den löslichen Überstand der Inkubation von immobilisiertem GST-c-SRC-ΔSH1 mit dem Huh 9-13-Zellysate nach 16 h Inkubation, korrespondierend zu Abbildung 4.3 [K]. [7-10] zeigen die Beads, die nach dem Waschen jeweils 4 min bei 100 x g zentrifugiert wurden (vgl. Abbildung 4.4, rechte Seite). Die Zahl der Waschschritten nimmt von [7] (einer) nach [10] (vier) zu. Die NS5A-Bindung ist auch nach viermaligem Waschen nachweisbar [10]. [12-15] zeigen die Beads, die nur durch Schwerkraft sedimentierten (vgl. Abbildung 4.4 linke Seite), mit einmal [12] bis viermal [15] Waschen. Die NS5A-Bindung konnte bis zum dritten Waschen nachgewiesen werden [14].

Das „geklärte Zellysate“ wurde anschließend mit den GST-c-SRC-ΔSH1 GST-Beads [J] für 16 h bei 8 °C inkubiert [I]. Anschließend wurde der Überstand [K] von den Beads [L] abgenommen und durch Western-Blot untersucht. Es konnte NS5A-Protein im Überstand nachgewiesen werden (Abbildung 4.5 [5]). Die Beads mit dem Komplex aus c-SRC-ΔSH1 und NS5A wurden weiter untersucht.

Der so vorbehandelte Komplex wurde anschließend in zwei Gruppen geteilt und unter unterschiedlichen Waschbedingungen die Komplexstabilität untersucht (vgl. Abbildung 4.4).

Die erste Gruppe wurde nach dem Waschen durch Schwerkraft sedimentiert (Abbildung 4.4 linke Seite), die andere Gruppe nach dem Waschen für 4 min bei 100 x g zentrifugiert (Abbildung 4.4 rechter Zweig). Die Zahl der Waschschritten wurde bei beiden Gruppen zwischen einem und vier variiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen Huh-Lysepuffer resuspendiert, ein Äquivalentvolumen der Suspension

entnommen, in Lämmli-Puffer gekocht und auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Anschließend wurde ein Western-Blot mit einem Anti-NS5A-Antikörper (Tabelle 2.2) durchgeführt (Abbildung 4.5).

Unter der Annahme, nach jedem Waschschrift wäre ca. 10 μ l des Waschpuffers in der Probe verblieben, würde der Hintergrund von ungebundenem Protein zwischen 1:100 (bei einem Waschschrift) bis 1:100.000.000 (nach vier Waschschriften) liegen.

Es zeigte sich, dass die 2,5 μ g Zelllysate eine nachweisbare Menge an NS5A Protein enthielt (Abbildung 4.5 [2]). Es konnte keine Bindung von NS5A an ungekoppelte GSH-Beads festgestellt werden (Abbildung 4.5 [3] und [4]), sodass diese Vorinkubationsschritte (vgl. Abbildung 4.3 [C, E]) in den weiteren Experimenten nicht mehr durchgeführt wurden.

Nach Inkubation von c-SRC- Δ SH1 mit dem Zelllysate konnte NS5A im Überstand nachgewiesen werden (Abbildung 4.5 [5]). In der Gruppe der zentrifugierten Proben, war NS5A nach allen vier Waschrunden nachweisbar (Abbildung 4.5 [7-10]). Die schwankende Signalstärke im Western-Blot lässt aufgrund des experimentellen Designs keine Aussage zur Quantität der Bindung zu.

Die Gruppe der nur sedimentierten Proben zeigt weniger Signal als die zentrifugierten Proben (Abbildung 4.5 [12-15]). Bis zu drei Waschschriften könnten hier durchgeführt werden mit nachweisbar gebundenem NS5A. Im vierten Waschschrift war nur noch ein sehr schwaches Signal detektierbar (Abbildung 4.5 [15]). Durch den Sedimentationsprozess konnte keine so dichte Packung an Agarose-Beads erreicht werden, sodass, im Vergleich zur Zentrifugation, während der Waschschriften eine größere Menge Beads mit dem Überstand aus der Probe entfernt wurden.

Die Abnahme von exakten Äquivalenzvolumen stellte sich durch die Handhabung des Prozesses als schwierig dar. Daher sind die hier gezeigten Ergebnisse als Tendenz zu bewerten.

Für die darauffolgenden Assays wurden, auf Grundlage dieser Untersuchung, mit drei Waschschriften mit anschließender Zentrifugation durchgeführt (korrespondierend zu Abbildung 4.5 [9]).

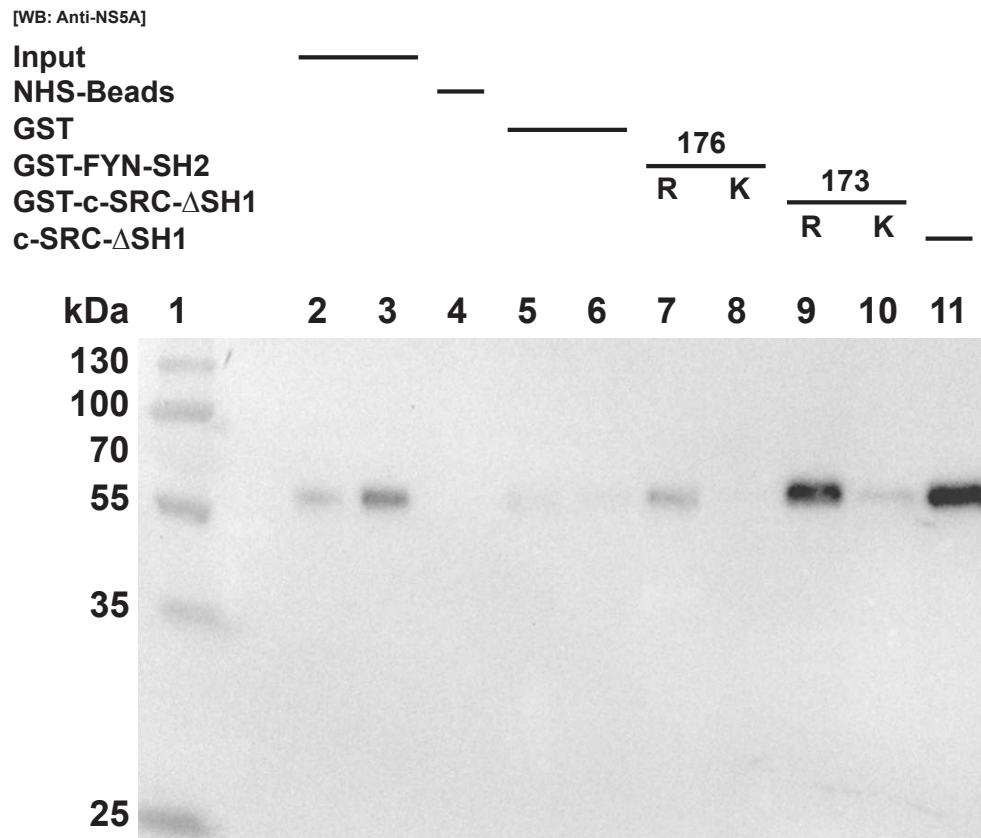


ABBILDUNG 4.6: **Western-Blot-Analyse der Pulldown-Assays von verschiedenen SH2-Domänen mit Huh 9-13-Zellysaten.** [1] zeigt einen Proteingrößenstandard. [2, 3] sind 1 bzw. 2,5 µg Gesamtprotein aus Huh 9-13-Zellysate. [4-6] sind jeweils Negativkontrollen für die Bindung von NS5A an inaktivierte NHS/EDC-Beads [4] oder 5 nmol gekoppeltes GST [5, 6]. [7] zeigt die NS5A-Bindung an 5 nmol GST-FYN-SH2 und [8] an 5 nmol GST-FYN-SH2 R176K. Es zeigt sich eine Selektivität von NS5A für den GST-FYN-SH2. Das Signal für die GST-FYN-SH2 R176K-Variante lag auf Hintergrund-Niveau. [9] zeigt die NS5A-Bindung an 5 nmol GST-c-SRC- Δ SH1 und [10] an 5 nmol GST-c-SRC- Δ SH1 R173K. Die c-SRC- Δ SH1 R173K-Bindung war leicht über dem Hintergrundsignal der GST-Bindung ([5, 6]). Es lässt sich klar zwischen bindekompetenter c-SRC- Δ SH1 und nicht-bindekompetenter c-SRC- Δ SH1 (173K) unterscheiden. [11] zeigt die NS5A-Bindung an 5 nmol c-SRC- Δ SH1. Der Vergleich von wildtypischer- und Phosphotyrosin-bindeinkompetenter SH2-Domänen zeigt eine klare Selektivität von NS5A für das intakte Phosphotyrosin-Bindemotiv in der SH2-Domänen.

4.1.4 Untersuchung der Bindung von NS5A an verschiedene SH2-Domänen von Src-Kinasen

Nachdem Bedingungen für die Bindung und Präparation der Bindung von c-SRC- Δ SH1 an zelluläres NS5A gefunden wurden waren, sollte die Spezifität der Bindung an die c-SRC-Kinase untersucht werden. Weiter sollte untersucht werden, ob die Bindung dem kanonischen Bindemotiv einer SH2-Domäne entspricht und über pY vermittelt wird (vgl. Abbildung 1.3).

Um die Bindung an Proteine mit und ohne Affinität-Tags gleichermaßen untersuchen zu können, wurden im Folgenden statt GSH-Agarose-Beads, wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, NHS/EDC-Agarose-Beads verwendet.

Der Pulldown-Assay wurde durchgeführt wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, jedoch ohne die Schritte zum geklärten Zellysate. Um dennoch eine mögliche unspezifische Bindung von NS5A an die Agarose-Beads auszuschließen wurden entsprechende Kontrollen mitgeführt.

Die einzelnen Ansätze wurden jeweils dreimal gewaschen und dazwischen zentrifugiert. Von jedem der Src-Proteine wurden jeweils 5 nmol gekoppelt und in den Assay eingesetzt.

In den Input Kontrollen [2, 3] mit 1 und 2,5 µg Gesamtprotein konnte NS5A über den Anti-NS5A-Western-Blot nachgewiesen werden (Abbildung 4.6). Die inaktivierten NHS/EDC-Agarose-Beads ([4]) sowie die Beads mit GST gekoppelt [5, 6] zeigten kein nachweisbares oder nur sehr wenig gebundenes NS5A. Die jeweils 5 nmol gekoppelten FYN-SH2-Varianten *wt* [7] und R176K-Variante [8] zeigten im Pulldown-Assay ein deutliches NS5A-Signal für den Wildtypen und Signal auf Niveau des Hintergrunds für die R176K-Variante. Die Variation von Arginin zu Lysin in der Phosphotyrosin-Bindetasche führt für die FYN-SH2-Domäne zu einem deutlichen Abfall der Bindekompetenz für NS5A.

Der Pulldown-Assay mit 5 nmol GST-c-SRC-ΔSH1 zeigt ein starkes NS5A-Signal ([9]), hingegen die Arginin-zu-Lysin-Variante ein Signal welches nur wenig über dem des reinen GST-Hintergrunds liegt ([10]). Zwischen der bindekompetenten c-SRC und der in der Bindetasche veränderten Variante kann klar im NS5A-Signal unterschieden werden.

In [11] ist das NS5A-Signal eines c-SRC-Pulldowns gezeigt. Im Gegensatz zu [9] wurde hier die gereinigte Proteindomäne ohne GST-Fusion verwendet. Hier zeigt sich ein ähnlich intensives Bindesignal von NS5A wie in [9].

4.1.5 Massenspektrometrischer Ansatz zum Nachweis von NS5A aus Huh 9-13-Replikonlysate nach c-SRC-Pulldown

In den vorangehenden Untersuchungen in Abschnitt 4.1.3 und 4.1.4 wurde die Etablierung der Pulldown-Assays gezeigt. Der Nachweis der Interaktion mit dem viralen NS5A-Protein wurde dabei jeweils durch Western-Blot-Analysen mit Anti-NS5A-Antikörper erbracht. Der Nachweis von NS5B oder pY durch Western-Blot gelang nicht (Daten nicht gezeigt).

Als alternative Methode wurde die massenspektrometrische Untersuchung des Eluates aus dem c-SRC-ΔSH1-Pulldown-Assay durchgeführt. Deswegen wurde ein Pulldown-Assay nach etabliertem Protokoll um den Faktor fünf hoch skaliert durchgeführt. Neben der SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 4.7 [A]) wurde ebenfalls ein Western-Blot-Nachweis durchgeführt.

Auf Grundlage der erwarteten Proteingröße und der Banden aus Western-Blot-Analysen (Abbildung 4.6) wurden vier Banden zwischen 55 und 70 kDa einzeln ausgeschnitten (Banden I bis IV), durch das Enzym Trypsin gespalten und anschließend mit HPLC-MS/MS analysiert (Abbildung 4.7, Kapitel 3.8).

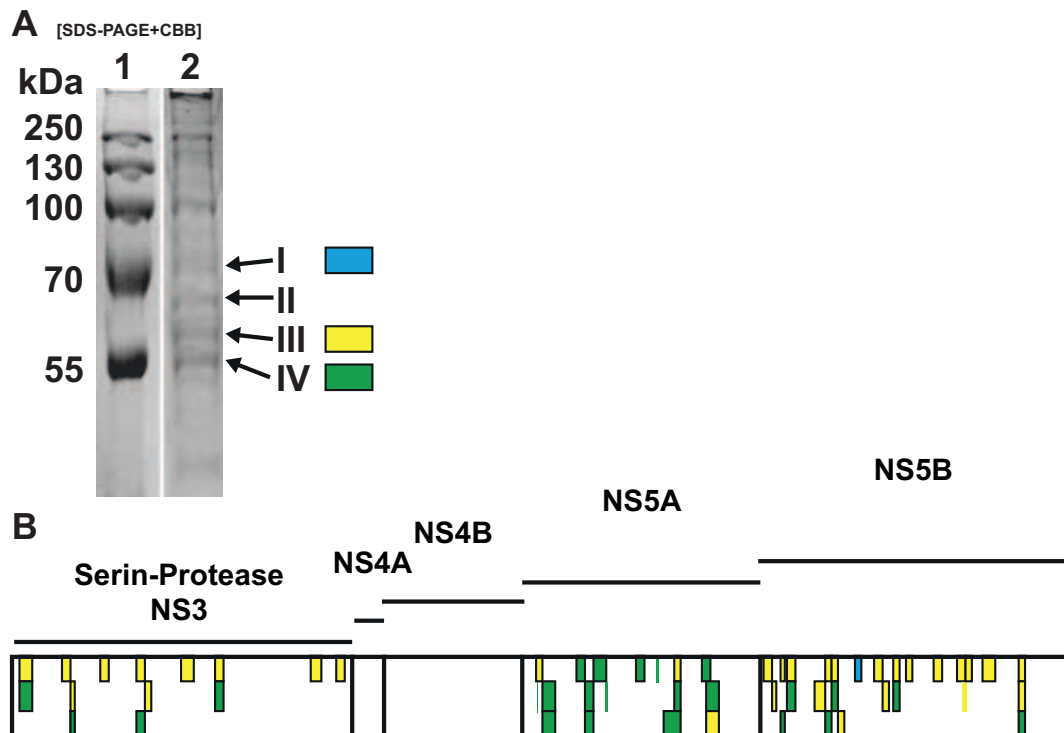


ABBILDUNG 4.7: Massenspektrometrische Untersuchung des c-SRC- Δ SH1-Pulldowns. [A]: SDS-PAGE des NS5A-c-SRC- Δ SH1-Pulldowns. [1] zeigt den Proteingrößenstandard, [2] die Elution des Pulldowns. Die markierten Banden I, II, III und IV wurden aus der SDS-PAGE ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Die gefundenen Proteinfragmente der entsprechenden Banden wurden farbkodiert gegen das HCV-Polyprotein geplottet [B]. Die horizontale Ausdehnung zeigt die Aminosäureposition des Polyproteins. Die vertikale Dimension zeigt die Überlappung der mehrfach gefundenen Fragmente der Proteine. In den Banden III und IV wurden viele Fragmente aus NS5B und NS5A nachgewiesen. Weiterhin konnte in beiden Banden die Serinprotease NS3 nachgewiesen werden. In der Bande II konnte kein HCV-Proteinfragment nachgewiesen werden.

Die Analyse wurde von Dr. Anja Stefanski im Molecular Proteomics Laboratory, BMFZ Düsseldorf, durchgeführt.

Die detektierten Proteinfragmente wurden gegen die Proteinsequenz des HCV-Polyprotein geplottet (Abbildung 4.7 [B]).

Es zeigte sich, dass in Bande III viele Fragmente aus NS5B nachgewiesen werden konnten. In Bande IV wurden viele Fragmente aus NS5A gefunden. In beiden Banden wurden jeweils Fragmente der Serin-Protease NS3 gefunden, die im Komplex mit den beiden viralen und dem humanen Protein eluiert wurden.

Die Banden I und II wiesen kaum messbare Fragmente aus dem HCV-Polyprotein auf. In keiner Bande konnte Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden.

Eine vollständige Liste der gefundenen HCV-Peptidfragmente ist in Anhang C aufgeführt.

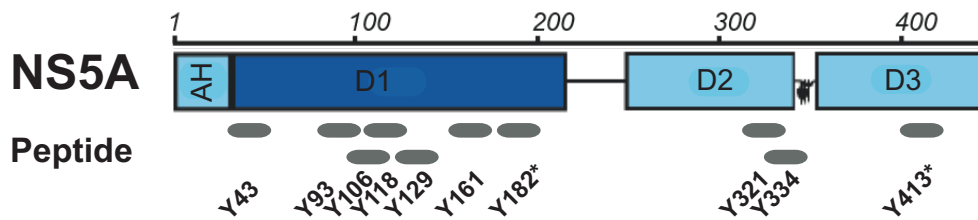


ABBILDUNG 4.8: Übersicht der verwendeten NS5A-Peptide. Die Peptide sind jeweils 15 Aminosäuren lang mit dem Tyrosinrest in der Mitte. Die Peptide der Genotypen ref 1b und con 1b wiesen in der Sequenz um das Tyrosin Unterschiede auf (vgl. Kapitel 2.12), sodass für diese Peptide beide Isoformen bestellt wurden. Die Positionen mit verschiedenen Isoformen sind mit einem * markiert. Die vollständige Aminosäuresequenz der Peptide sowie die Genotypenbezeichnung ist in Kapitel 2.12 aufgeführt.

4.2 Peptidmapping zum *in vitro*-Nachweis möglicher c-SRC-SH2-bindender pY in NS5A

Parallel zu den Pulldown-Ansätzen mit Huh 9-13-Zelllysaten sollte die Bindestelle von NS5A für c-SRC durch den Einsatz kurzer Peptide untersucht werden.

Die von der NS5A-Sequenz abgeleiteten Peptide sind jeweils 15 Aminosäurereste groß und tragen jeweils an Position 8 das zu untersuchende Tyrosin. In den Proteinsequenzen der HCV-Genotypen ref 1b und con 1b zeigen sich in den direkten Umgebungen einiger Tyrosine Sequenzunterschiede. Um die Bindung für beide Genotypen zu untersuchen, wurden Peptide für beide Genotypen bestellt. Eine Übersicht der Position der verwendeten Peptide bezogen auf das Volllänge NS5A-Protein findet sich in Abbildung 4.8, die Sequenz der Peptide ist in Kapitel 2.12 aufgeführt.

4.2.1 Qualitative Analyse der c-SRC-SH2 Bindung der Peptide mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zu ersten qualitativen Untersuchung der Bindung der verschiedenen Tyrosin-Peptide an c-SRC-SH2 wurde ein ELISA durchgeführt.

Die Phospho- und nicht-Phosphopeptide wurden über die N-terminale Biotinylierung an Streptavidin-Oberflächen gebunden und mit GST-c-SRC-SH3-SH2 bzw. GST-c-SRC-SH2 Proteindomänen inkubiert (die Reinigungsmethode für c-SRC-Proteine ist exemplarisch in Kapitel 4.1.1 dargestellt mit Abbildung 4.1). Diese Varianten der c-SRC wurden gewählt, um Bindungen im Bereich der SH4- oder der Kinase-Region auszuschließen.

Die Detektion wurde mit Anti-GST-Antikörpern durchgeführt, an den ein zweiter, HRP-gekoppelter Antikörper gebunden wurden. Der durch HRP vermittelte katalytische Umsatz des Substrats ABTS wurde quantifiziert (Kapitel 3.7.1). Die Signale der einzelnen Peptide wurden auf das stärkste Bindesignal der entsprechenden c-SRC-Proteindomäne normiert (Abbildung 4.9).

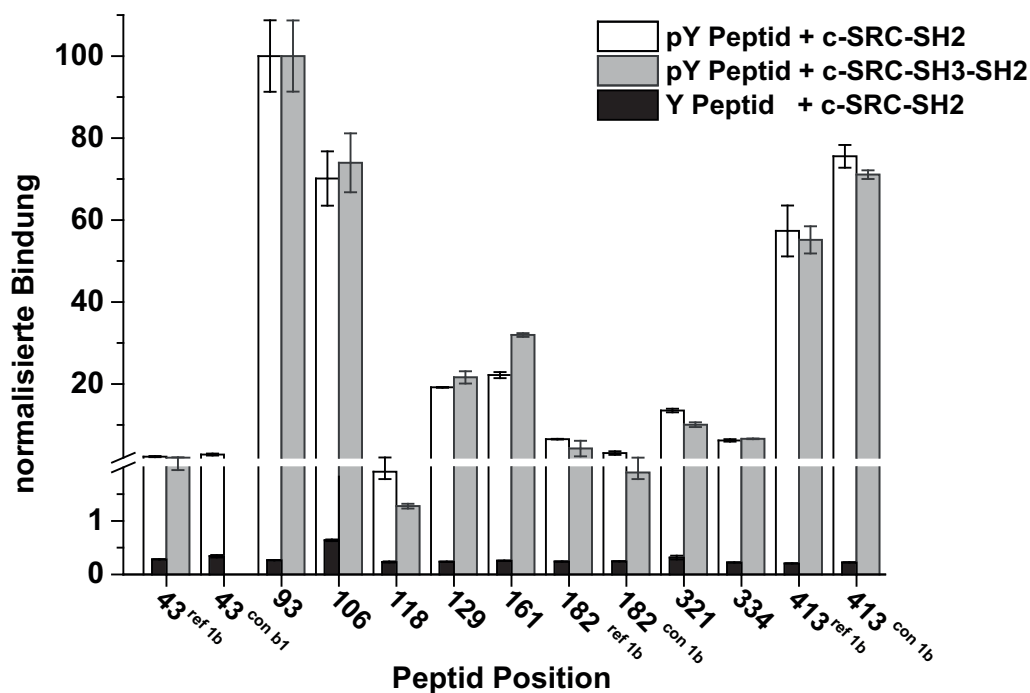


ABBILDUNG 4.9: ELISA von NS5A-Peptiden mit GST-c-SRC-SH2- und GST-c-SRC-SH3-SH2-Domänen. Die Bindung der einzelnen Peptide wurde normiert. Alle nicht-phosphorylierten Peptide zeigten eine geringe Bindeaffinität für c-SRC-SH2. Bei den Phosphopeptiden wurden deutliche Unterschiede festgestellt. Die affinste Bindung wurde bei Peptid pY93 für beide c-SRC-Proteine gemessen, gefolgt von pY106, pY413 (beide Isoformen), pY129 und pY161, mit Signalen von 70 % bis 20 %. Die Peptide pY43, pY118, pY182 (beiden Isoformen), pY334 und pY321 zeigten weniger als 10 % Bindesignal zu beiden c-SRC-Proteinen. Gemessen wurde im Triplikate, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Sowohl für GST-c-SRC-SH2 als auch GST-c-SRC-SH3-SH2 zeigte sich, dass die Phosphopeptide deutlich höhere Bindeaffinität als die nicht-Phosphopeptide aufwiesen. Die Bindung der nicht-Phosphopeptide lag, mit Ausnahme von Y106, im Bereich von weniger als 0,1 % Bindesignal normalisiert auf pY93. Im Vergleich der einzelnen Phosphopeptide zeigten sich unterschiedlich starke Affinitäten zu GST-c-SRC. Das Peptid pY93 zeigte die höchste Bindeaffinität, sowohl für das SH2- als auch für das SH3-SH2-Protein. Bindesignale in absteigender Hierarchie wiesen die Peptide pY106, pY413 (beide Isoformen), pY161, pY129, pY321 auf. Auch hier zeigte sich die gleiche Tendenz für die SH2- und die SH3-SH2-Proteindomäne. Die restlichen Peptide zeigten ein Bindesignal mindestens 90 % unter dem stärksten Binder pY93 (Abbildung 4.9).

Die Peptidsequenzen der affinsten Binder wurden miteinander verglichen. Es konnte keine Konsensus-Sequenz aus den Peptidsequenzen gebildet werden (Daten nicht gezeigt).

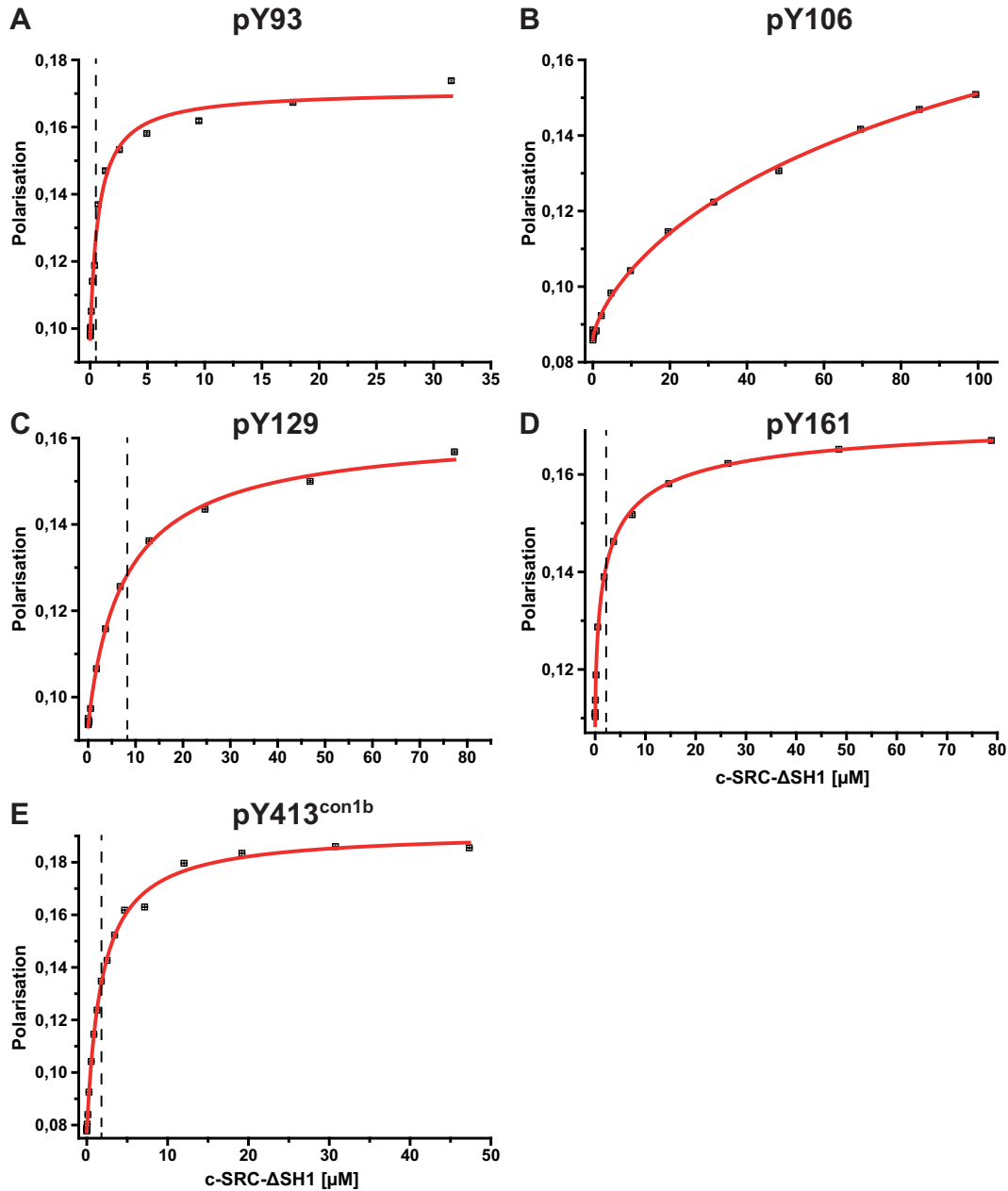


ABBILDUNG 4.10: Fluoreszenzpolarisations-Messungen von Phosphotyrosin-Peptiden mit c-SRC-ΔSH1-Proteindomänen. Fluoreszenzmarkierte Peptide aus NS5A wurden mit c-SRC-ΔSH1 titriert. Die gemessene Polarisation ist gegen die Konzentration von c-SRC-ΔSH1 aufgetragen und mit Formel 3.3 gefittet. [A]: Peptid pY93 $K_d = 0,7 \mu\text{M}$, [B]: pY106, [C]: pY129 $K_d = 8 \mu\text{M}$, [D]: pY161 $K_d = 2 \mu\text{M}$, [E]: pY413^{con1b} $K_d = 2 \mu\text{M}$. Der K_d ist als gestrichelte Linie im Plot dargestellt. Für das pY106 konnte durch die Titration keine Sättigung erreicht werden.

4.2.2 Quantitative Analyse der c-SRC-SH2-Bindung der Peptide durch Fluoreszenzpolarisation

Zur ersten Quantifizierung der Bindung der NS5A-Peptide an c-SRC-Proteindomänen wurden Fluoreszenzpolarisations-Messungen (Kapitel 3.7.2) mit den affinsten Peptiden des ELISAs (Kapitel 4.2.1) durchgeführt.

Die fluoreszenzmarkierten Peptide wurden jeweils in die Messküvette mit einer Konzentration von ca. 50 nM, und damit deutlich unterhalb eines erwarteten K_{ds} , vorgelegt und mit c-SRC- Δ SH1 titriert. Das Polarisationssignal wurde über die Formel 3.1 errechnet und gegen die Konzentration von c-SRC geplottet. Die Sättigungsfunktion (Formel 3.3) lieferte den Halbsättigungspunkt als K_d (Abbildung 4.10).

Im Gegensatz zu den ELISA-Messungen (Kapitel 4.2.1) wurde hier c-SRC- Δ SH1 verwendet um alle Kandidaten-Peptide zu untersuchen. Vorangehende vergleichende Untersuchungen mit Peptid pY93 und c-SRC-SH2 zeigten, dass die Bindekonstanten ebenfalls im niedrigen μ M-Bereich lagen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der besseren Ausbeute in der Reinigung von GST-c-SRC- Δ SH1 gegenüber den kürzeren Varianten und des hohen Bedarfs an gereinigten Proteinen, wurde c-SRC- Δ SH1 verwendet.

Gegenüber der ELISA-Messungen wurden in den quantitativen Untersuchungen Peptide der Firma Caslo verwendet, welche eine höhere Reinheit verglichen mit den JPT-Peptiden aus dem ELISA aufweisen (Kapitel 2.12).

Das Phosphopeptid pY93 zeigte mit $K_d = 0,7 \mu\text{M}$ die höchste Affinität, pY161 und pY413 lagen bei $K_d \sim 2 \mu\text{M}$, pY129 bei $K_d = 8 \mu\text{M}$. Für das Peptid pY106, welches im ELISA das zweithöchste Signal zeigte, konnte bis $100 \mu\text{M}$ c-SRC- Δ SH1 in der Titration keine Sättigung erreicht werden. Die angelegte Fit-Funktion lieferte einen Halbsättigungspunkt im Bereich von $150 \mu\text{M}$.

Zusätzlich wurden längere Peptide, die Y93 und Y106 in einem Molekül enthielten (Sequenz wie Peptid 14 in Kapitel 2.12), in der Fluoreszenzpolarisation gemessen (Abbildung nicht gezeigt). Hintergrund war hier eine prolinreiche Sequenz zwischen den Tyrosinen 93 und 106, die möglicherweise eine Bindeaffinität zur c-SRC-SH3-Domäne aufweist (vgl. Peptidsequenzen in Kapitel 2.12).

Das Ergebnis der längeren Peptide (Kapitel 2.12 Nr. 14) mit phosphorylierter Y106 Position entsprach dem Ergebnis des kürzeren Peptids. Ein Peptid ohne Phosphorylierung zeigte ebenfalls keine Sättigung bis $100 \mu\text{M}$ (Experiment nicht gezeigt). Die längeren Peptide mit phosphorylierter Y93 Position zeigten einen K_d von ca. $4 \mu\text{M}$.

Eine Übersicht der K_{ds} der Peptide ist in Abbildung 4.11 zusammengefasst.

In Übereinstimmung zu den ELISA-Daten (Kapitel 4.2.1) konnten die Kandidaten, mit Ausnahme von pY106, mit einer Bindungsaffinität im niedrigen μ M-Bereich bestätigt werden. pY106 zeigte im ELISA möglicherweise einen anderen Bindungseffekt, der mit dem experimentellen Verfahren oder dem verwendeten Peptid zusammenhängt.

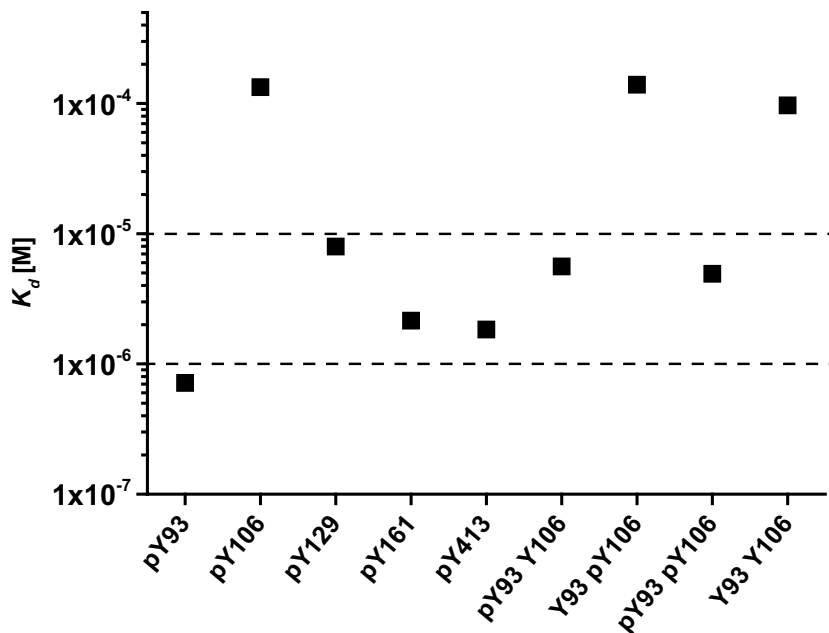


ABBILDUNG 4.11: Übersicht der K_d s verschiedener Phosphopeptide für c-SRC- Δ SH1, gemessen mit Fluoreszenzpolarisation. pY93: $K_d = 0,7 \mu\text{M}$, pY129: $K_d = 8 \mu\text{M}$, pY161 $K_d = 2 \mu\text{M}$, pY413: $K_d = 2 \mu\text{M}$ wurden bestimmt. Für die längeren Peptide pY93Y106 bzw. pY93pY106 wurde ein $K_d \sim 5 \mu\text{M}$ bestimmt. Der errechnete K_d des Peptids pY106 lag mit $150 \mu\text{M}$, oberhalb der eingesetzten Konzentration von c-SRC. Die Peptide Y93 pY106 und Y93 Y106 verhielten sich ähnlich zu pY106 mit einem errechneten $K_d \sim 200 \mu\text{M}$.

4.2.3 Biolayer Interferometrie (BLI) von NS5A-Peptiden mit c-SRC- Δ SH1

Als komplementäre Methode zur Quantifizierung der Bindung der Phosphopeptide an c-SRC- Δ SH1 und zur Etablierung des Systems für Messungen mit größeren Proteindomänen wurde Biolayer-Interferometrie (BLI) verwendet.

Die biotinylierten Peptide (2.12) wurden an Streptavidin-Sensoren gebunden und anschließend mit einer Konzentrationsreihe c-SRC- Δ SH1 gemessen. Die so erhaltenen Sensogramme wurden mit Formel 3.2 gefittet und der y_{inf} -Wert gegen die Konzentration von c-SRC- Δ SH1 geplottet und mit Formel 3.3 gefittet (Abbildung 4.12).

Die K_d s für die einzelnen Peptide betragen $1,5 \mu\text{M}$ für pY93 [A, B], $3,2 \mu\text{M}$ für das Peptid pY129 [C, D] und $0,6 \mu\text{M}$ für das Peptid pY161 [E, F] ausgewertet in Abbildung 4.12 und in der Übersicht dargestellt in Abbildung 4.13. Für die Peptide pY106, pY413, pY321 und pY334 wurden ebenfalls Messungen durchgeführt, diese konnten jedoch nicht ausgewertet werden. Es zeigten sich z.T. starke unspezifische Bindungen oder Aggregation an der funktionalisierten Sensoroberfläche (ohne Abbildung).

Eine Übersicht der gemessenen Dissoziationskonstanten ist in Abbildung 4.13 gezeigt.

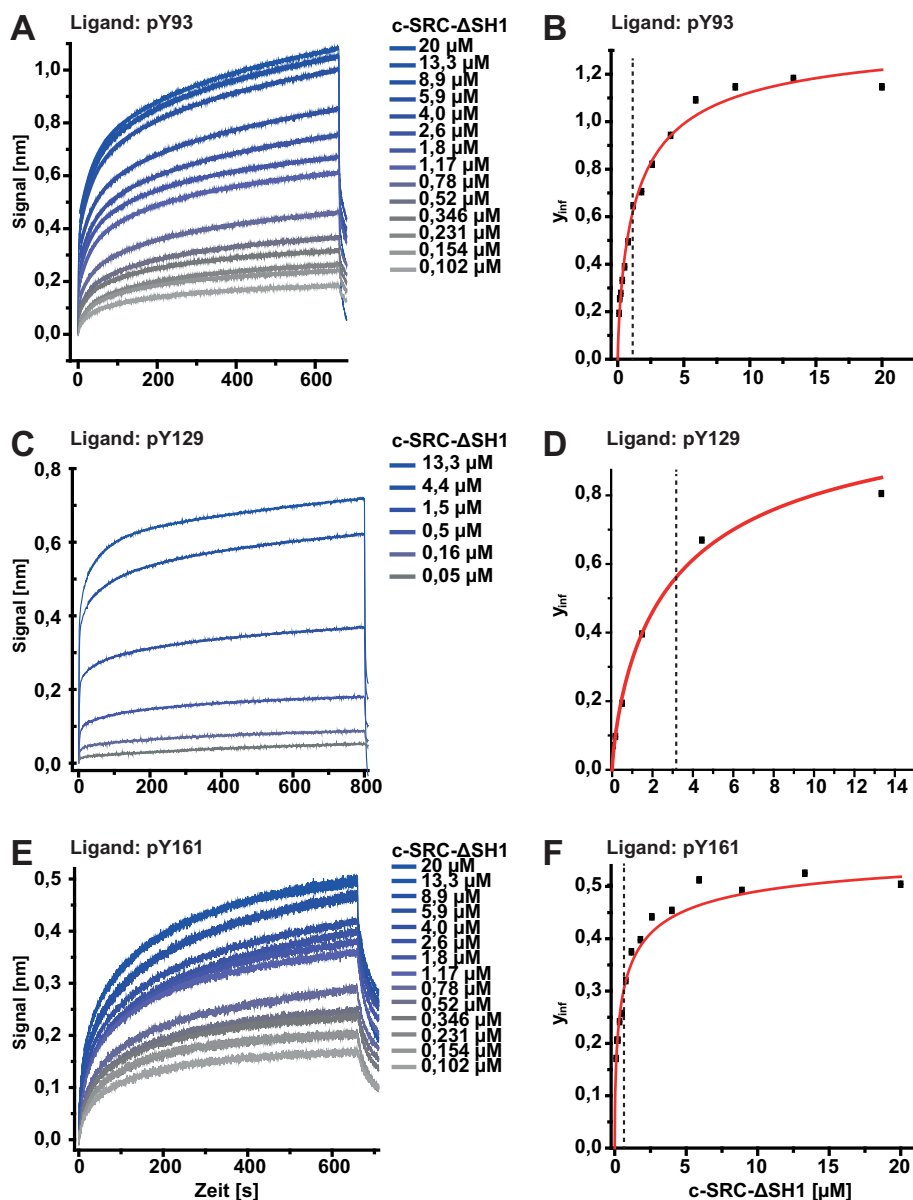


ABBILDUNG 4.12: Sensogramme und Gleichgewichtsauswertungen verschiedener NS5A Phosphotyrosin-Peptide mit c-SRC- Δ SH1. [A, C, E] zeigen die Sensogramme der Peptide pY93, pY129 und pY161 mit Konzentrationsreihen von c-SRC- Δ SH1. Die Sensogramme wurden mit Formel 3.2 gefittet und der Gleichgewichtswert y_{inf} in [B, D, F] gegen die Konzentration des Analyten c-SRC- Δ SH1 aufgetragen. Die Daten wurden Formel 3.3 gefittet und der Halbsättigungspunkt als K_d bestimmt. Dieser Betrag $1,5 \mu\text{M}$ für das Peptid pY93 [A, B], $3,2 \mu\text{M}$ für das Peptid pY129 [C, D] und $0,6 \mu\text{M}$ für das Peptid pY161 [E, F], jeweils als gestrichelte Linie im Diagrammen dargestellt.

In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Methoden zusammengestellt. Es zeigte sich, dass, abgesehen von Peptid pY106, die Tendenzen aus der ELISA-Untersuchung in den quantitativen Untersuchungen mit K_d s im niedrigen μM -Bereich bestätigt werden konnten. Die Bindung der

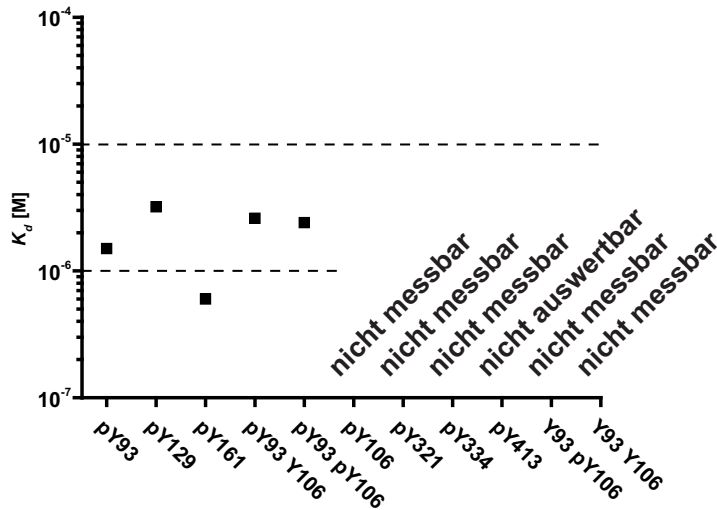


ABBILDUNG 4.13: Übersicht der K_d s der mit BLI gemessenen Bindung von Peptiden an c-SRC- Δ SH1. Für die Peptide pY93, pY129, pY161 konnten Dissoziationskonstanten von ca. 1,5 μ M, 3,5 μ M und 0,5 μ M bestimmt werden. Für die längeren Peptide mit pY93 und Y106 bzw. pY106 konnte ein K_d von jeweils ca. 3 μ M bestimmt werden. Für die Peptide pY106, pY321, pY334, Y93 pY106 und Y93 Y106 konnte durch die verwendeten Konzentrationen von c-SRC- Δ SH1 (maximal ca. 30 μ M) kein K_d ermittelt werden. Das Peptide pY413 zeigte starke unspezifische Bindungen und Aggregationseffekte an die Sensoren, sodass auch hier kein K_d durch BLI bestimmt werden konnte.

Peptide ist nur durch die SH2-Domäne vermittelt und wird durch zusätzliche Domänen der c-SRC nicht negativ beeinflusst.

TABELLE 4.1: Vergleich der durchgeführten qualitativen und quantitativen Methoden zur Messung der Affinität von NS5A-Peptiden an c-SRC- Δ SH1, GST-c-SRC-SH3-SH2 und GST-c-SRC-SH2. Die ELISA-Daten wurden wie folgt dargestellt (Symbol / normierte Signalstärke): + $\hat{=}$ 100-60, \pm $\hat{=}$ 59-20, - $\hat{=}$ 19-0, normiert auf das höchste Signal (vgl. Abbildung 4.9). o $\hat{=}$ nicht gemessen

Peptid	ELISA mit GST-c-SRC-SH3-SH2	ELISA mit GST-c-SRC-SH2	FP mit c-SRC- Δ SH1, gemessener K_d [μ M]	BLI mit c-SRC- Δ SH1, gemessener K_d [μ M]
pY43 ^{1b}	-	-	o	nicht gemessen
pY43 ^{con1}	-	o	o	o
pY93	+	+	0,7	1,5
pY106	+	+	\gg 100	\gg 50
pY118	-	-	o	o
pY129	\pm	\pm	8	3,5
pY161	\pm	\pm	2	0,5
pY181 ^{1b}	-	-	o	o
pY181 ^{con1b}	-	-	o	o
pY321	-	-	o	\gg 50
pY334	-	-	o	\gg 50
pY413 ^{1b}	+	+	o	o
pY413 ^{con1b}	+	+	2	nicht auswertbar

4.3 Bindungsuntersuchungen mit Proteindomänen von NS5A und c-SRC

Aus den vorangehenden Bindungsuntersuchungen mit Peptidfragmenten aus NS5A ergaben sich drei mögliche Bindestellen für c-SRC-SH2 in der gefalteten Domäne D1 und mindestens eine weitere putative Bindestelle im ungefalteten Teil der Domänen D2 und D3. Um die so identifizierten putativen SH2-Bindungs epitope im Kontext der zugehörigen NS5A-Domäne untersuchen zu können, wurden diese Domänen in *E. coli*-TKB-1 heterolog und Phosphotyrosinangereichert exprimiert und gereinigt.

4.3.1 Reinigung von Domänen aus NS5A

Reinigung von NS5A-D1 und Y-Substitutionsvarianten unter Koexpression von ELK-Tyrosinkinase

Für die Untersuchungen der Bindung von NS5A-D1 an c-SRC-SH2 wurden die Aminosäurereste 33-202 von NS5A Genotyp con1b, angelehnt an Love *et al.* 2009, gewählt. Dort wurde ein Expressions- und Reinigungsprozess mit Ausbeuten im Bereich von mg/l BL21-*E. coli*-Zellkultur für dieses Proteinfragment beschrieben. Um die Bindung von NS5A an die SH2-Domäne zu untersuchen, musste darüber hinaus eine Tyrosinphosphorylierung eingeführt werden. Dies

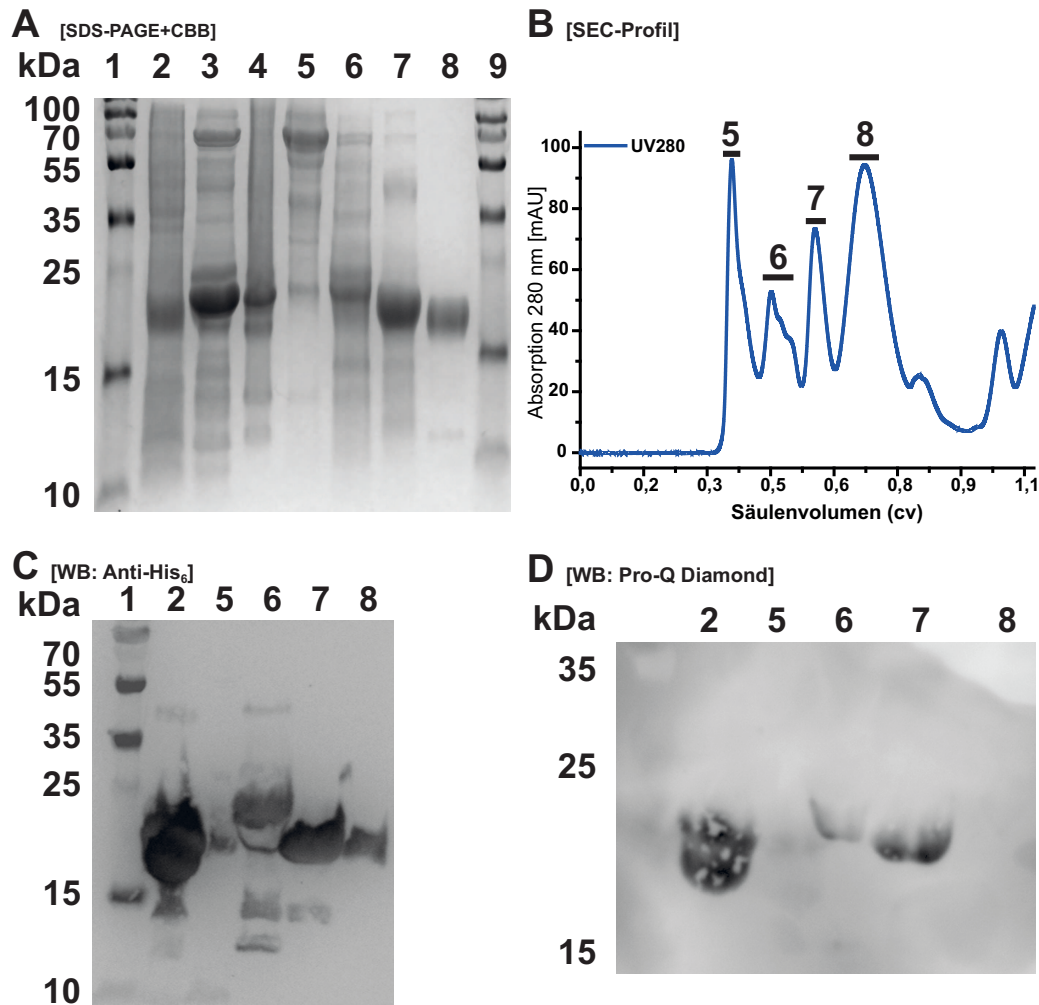


ABBILDUNG 4.14: **Reinigung von NS5A-D1.** [1, 9] zeigen Proteingrößenstandards, [2] zeigt 0,1 OD₆₀₀ induzierte *E. coli*-TKB-1 Zellen als Ausgangsprodukt der Reinigung. [3] zeigt das lösliche und [4] das präzipitierte Eluat der Nickel-Affinitätschromatographie. [5-8] zeigen SEC-Elutionen entsprechender Retentionszeiten. [A] zeigt eine CBB gefärbte SDS-PAGE. [B] zeigt ein SEC-Protein-Elutionsprofil, injiziert wurde die Probe aus [3]. [C] zeigt einen Western-Blot mit Anti-His₆-Tag-Antikörper. [D] zeigt eine Pro-Q Diamond-Färbung des Blots aus [C], zum Nachweis von Phosphorylierung in den Eluaten.

wurde etabliert durch eine Co-Expression mit der ELK-Tyrosinkinase im TKB-1-*E. coli*-Stamm.

Die Zellen wurden transformiert und kultiviert in Komplexmedium wie in Kapitel 3.2 beschrieben mit den Plasmiden 8-15 (Tabelle 2.6) in BL21 DE3- und TKB-1-*E. coli*-Stämme (Kapitel 2.5). Nach Induktion mit 0,25 mM IPTG bei OD₆₀₀ 0,6-0,8 wurden die Zellen für 12 h bei 16 °C kultiviert.

Anschließend wurde die Temperatur auf 30 °C erhöht und die Kultur mit 10 mg/l Indolacrylsäure, 1 g/l Casein-Hydrolysat und 2 g/l Glukose versetzt, 2 h inkubiert und anschließend durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

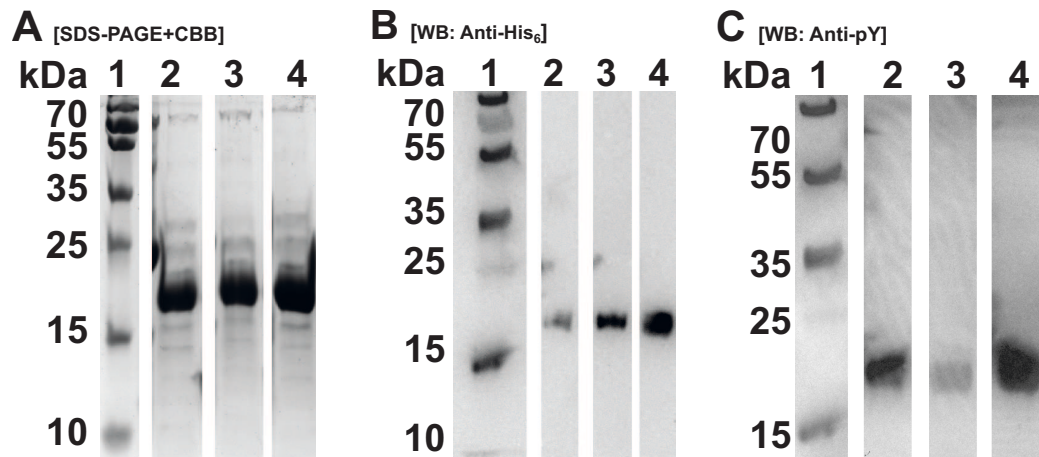


ABBILDUNG 4.15: Darstellung der Proteinelutionen der verwendeten NS5A-D1-Varianten mit einem Phenylalanin-Austausch. [1] zeigt einen Proteingrößenstandard. [2] zeigt NS5A-D1 Y93F, [3] Y129F, [4] Y161F. [A] zeigt eine CBB-gefärbte SDS-PAGE, [B] einen Anti-His₆-Tag-Western-Blot und [C] einen Anti-Phosphotyrosin-Western-Blot.

Die Zellen wurden in Lysepuffer^{His₆1} resuspendiert und aufgeschlossen, wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Anschließend wurde die Reinigung als His₆-Fusionsprotein durchgeführt, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, mit Laufpuffer^{His₆1} und Elutionspuffer^{His₆1} (Tabelle 2.11). Anschließend wurde eine SEC (Kapitel 3.3.3) mit Superdex 75 pg-Material (Tabelle 2.9) mit SEC-Laufpuffer^{His₆1} durchgeführt.

In Abbildung 4.14 sind Auszüge des Reinigungsprozesses von NS5A-D1^{ELK pY} gezeigt. [A] zeigt den Prozess vom Ausgangsprodukt, einer heterologen Expression im TKB-1 *E. coli*-Stamm ([2]) über den ersten Reinigungsschritt, einer Nickel-Affinitätschromatographie ([3]) bis hin zu einzelnen SEC-Fraktionen ([5-8]).

Es zeigt sich, dass sich die Proteine [6-8] in der denaturierenden SDS-PAGE ein ähnliches Laufverhalten zeigten und einem ähnlichen Molekulargewicht zugeordnet werden konnten.

In der nativen SEC ([B]) wiesen diese Proteine jedoch unterschiedliche Retentionszeiten auf ([6-8]). In den weiteren Untersuchungen wurde über den Anti-His₆-Tag-Western-Blot [C] nachgewiesen, dass das NS5A-D1-Protein in den SEC-Elutionen [6-8] vorhanden war.

In der Untersuchung der Phosphorylierung durch den Farbstoff Pro-Q Diamond [D] konnte gezeigt werden, dass besonders [7] ein stärkeres Phosphorylierungssignal aufwies, als die anderen Elutionen.

Um den für die Bindung von NS5A an die c-SRC-SH2-Domäne entscheidenden Tyrosinrest zu identifizieren, wurden Varianten von NS5A-D1 hergestellt, die einzelne oder mehrere Tyrosine gegen Phenylalanine-Austausche aufwiesen. Die Expression und Reinigung wurden durchgeführt wie für die wildtypische Variante von NS5A-D1 beschrieben, als His₆-Fusionsprotein mit den gleichen Puffer- und Mediensystemen.

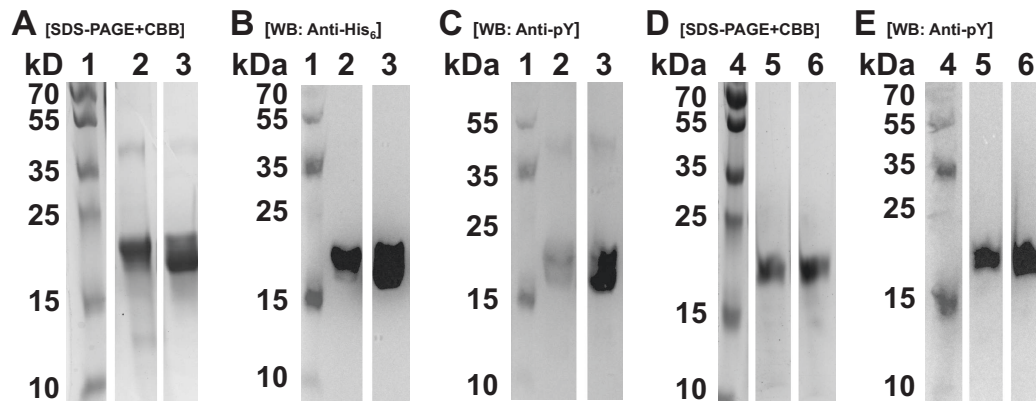


ABBILDUNG 4.16: Darstellung der Proteinelutionen der NS5A-D1-Mutanten mit zwei oder drei Phenylalanin-Austauschen. [1, 4] zeigen einen Proteingrößenstandard. [2] zeigt die Variante Y93/129/161F, [3] die Variante Y129/161F, [5] die Variante Y93/161F und [6] die Variante Y93/129F. [A, D] zeigen CBB-gefärbte SDS-PAGEs, die die Reinheit der Proteinelutionen zeigen. [B] zeigt einen Western-Blot mit Anti-His₆-Tag-Antikörper, der die Identität der His₆-getaggten Fusionsproteine zeigt. [C, E] zeigen Western-Blots mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper zum Nachweis der Phosphorylierung der Proteineultionen.

In Abbildung 4.15 sind die finalen Produkte der Reinigung von NS5A-D1-Domänen mit einem Phenylalanin-Austausch gezeigt (Y93F, Y129F und Y161F). Die Abbildung zeigt die Reinheit durch SDS-PAGE ([A]), die Identität des Proteins wird in [B] durch den Western-Blot gegen den N-terminalen His₆-Tag nachgewiesen. In [C] wird gezeigt, dass alle drei D1-Varianten ein Signal im Anti-Phosphotyrosin-Antikörper-Western-Blot zeigten.

Analog zu Abbildung [4.15] zeigt Abbildung [4.16] die Reinheit und Identität der NS5A-D1-Varianten mit zwei oder drei Phenylalanin-Austauschen. [A, D] zeigen in einer SDS-PAGE die Reinheit des Proteins. [B, C, D] zeigen jeweils die Identität des Proteins durch Anti-His₆-Tag-Western-Blot sowie die Tyrosin-Phosphorylierung des Proteins durch Anti-Phosphotyrosin-Western-Blot. Die Reinigungsprozess waren die Gleichen wie für NS5A-D1^{ELK pY} (Abbildung 4.14).

Reinigung von NS5A-D2D3-Domänen

Zur Untersuchung einer Bindung von Motiven in der D2D3 Region von NS5A wurden diese Domänen gereinigt.

Für die Expression wurden Zellen vom Typ *E. coli* BL21 DE3- und für die phosphorylierte Variante NS5A-D2D3^{ELK pY} TKB-1-*E. coli*-Zellen (Kapitel 2.5). Die Transformation und Kultivierung wurde durchgeführt wie in Kapitel 3.2 beschrieben mit Vektor 3 (Tabelle 2.6) als His₆-Fusionsprotein (Tabelle 2.6). Die Zellen wurden jeweils bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 37 °C kultiviert, mit 1 mM IPTG (BL21 DE3) bzw. 0,25 mM IPTG (TKB-1) induziert und für 4 h (BL21 DE3) bei 25 °C bzw. 12-16 h (TKB-1) bei 16 °C schüttelnd inkubiert (wie in Kapitel 3.2) beschrieben. Die TKB-1-Varianten wurden danach auf 30 °C

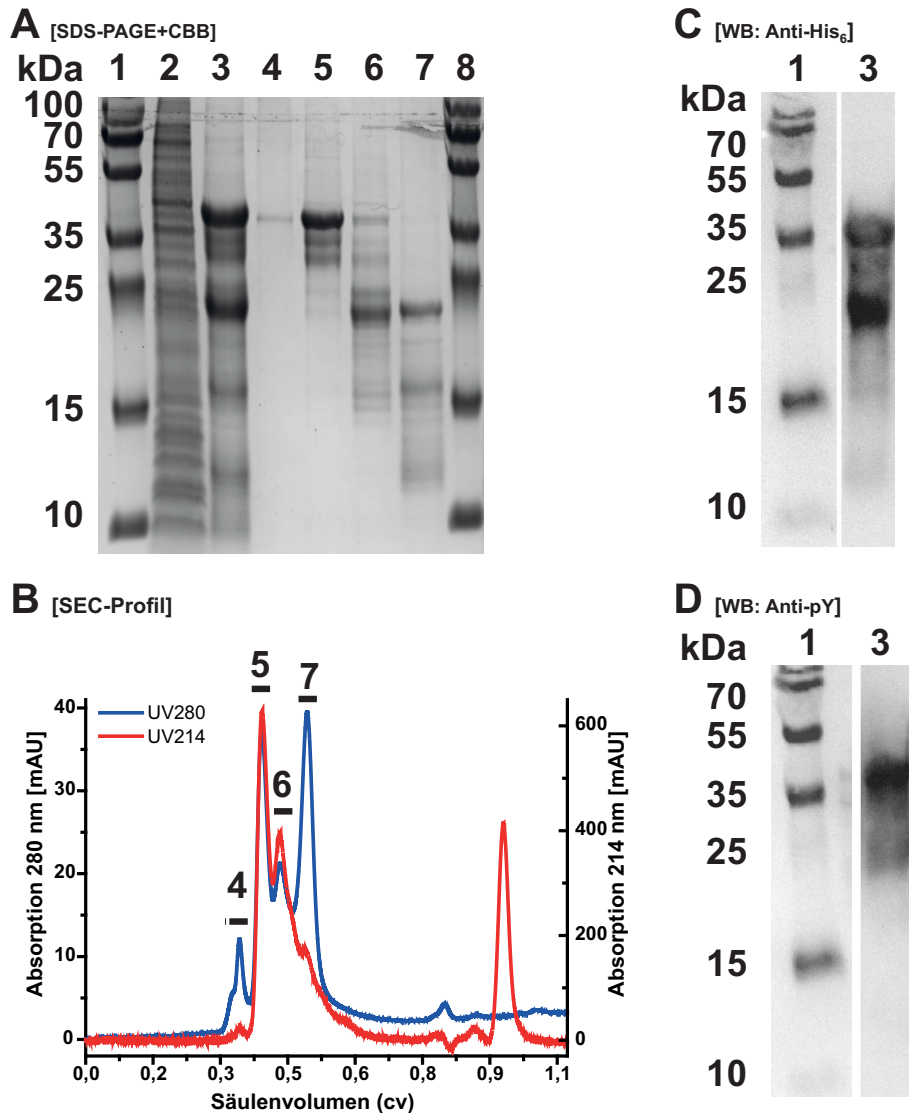


ABBILDUNG 4.17: **Reinigung vom NS5A-D2D3.** [1, 8] zeigen einen Proteingrößenstandard, [2] 0,15 OD₆₀₀ induzierte *E. coli*-TKB-1-Zellen als Start der Proteinreinigung. [3] zeigt das Eluat der Nickel-Affinitätschromatographie. [4-7] zeigen SEC-Elutionen. [A] zeigt eine CBB-gefärbte SDS-PAGE. [B] zeigt ein SEC-Profil mit Retentionszeiten, injiziert wurde die Probe aus [3]. [C] zeigt einen Western-Blot mit Anti-His₆-Tag-Antikörper. [D] zeigt einen Western-Blot mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper.

erwärmt, mit 10 mg/l Indolacrylsäure, 1 g/l Casein-Hydrolysat und 2 g/l Glukose versetzt und 2 h inkubiert (ähnlich wie bei NS5A-D1 33-202^{ELK pY} 4.3.1). Beide Zelltypen wurden nach der Kultivierung wie in 3.2 beschrieben gerntet und bei -20 °C gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte in Lysepuffer^{His₆2} wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Die anschließende Nickel-Affinitätschromatographie (beschrieben in Kapitel 3.3.2) wurde durchgeführt mit Laufpuffer^{His₆2} und Elutionspuffer^{His₆2} (Tabelle 2.11). Anschließend erfolgte eine Dialyse in SEC-Laufpuffer^{His₆2}, gefolgt von einer SEC (beschrieben in Kapitel 3.3.3) mit SEC-Laufpuffer^{His₆2} (Tabelle 2.11) mit Superdex 75 pg Material (Tabelle 2.9). Die Reinheit und Identität

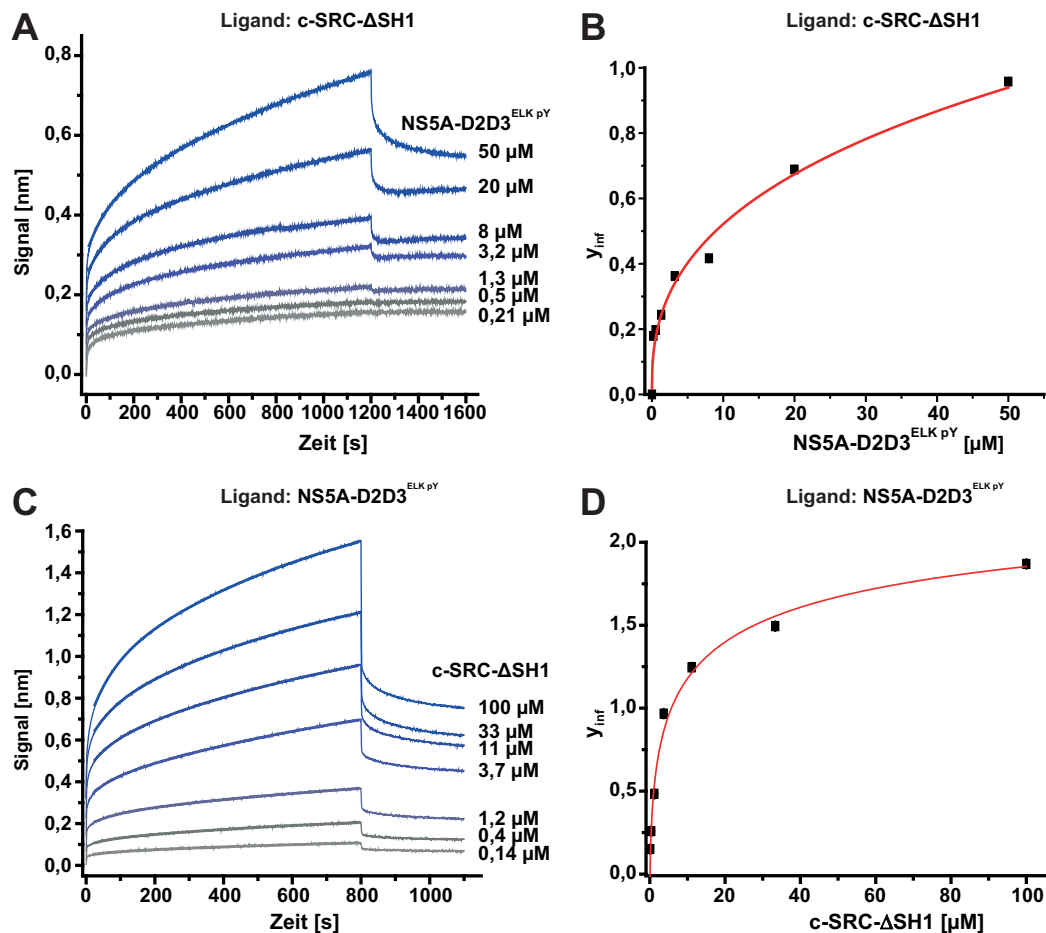


ABBILDUNG 4.18: BLI Sensogramme und Auswertung der Bindung von NS5A-D2D3^{ELK pY} an c-SRC-ΔSH1. Die Liganden (in [A] c-SRC-ΔSH1, in C NS5A-D2D3^{ELK pY}) wurden mit einer Konzentrationsreihe NS5A-D2D3^{ELK pY} [A] bzw. c-SRC-ΔSH1 [C] inkubiert. In der Orientierung mit NS5A-D2D3^{ELK pY} als Analyt [A, B] konnte bis zu einer Konzentration von 50 μM kein K_d bestimmt werden. In umgekehrter Orientierung [C, D], mit immobilisiertem NS5A-D2D3^{ELK pY} und c-SRC-ΔSH1 als Analyt, wurde ein K_d von $18 \pm 4 \mu\text{M}$ bestimmt.

des Proteins wurden über SDS-PAGE und Anti-His₆-Western-Blot überprüft (durchgeführt wie in Kapitel 2.11 und 3.4) und ist in Abbildung 4.17 gezeigt. [A, 2] zeigt 0,15 OD₆₀₀ induzierte *E. coli*-Zellen als Ausgangsprodukt, [5] das Endprodukt in der finalen Reinheit. In [C, D] wird gezeigt, dass auf entsprechender Lauffront im Zwischenprodukt nach der Affinitätschromatographie sowohl ein His₆-Tag-Signal als auch eine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte.

4.3.2 Bindung von NS5A-D2D3-Domänen an c-SRC-ΔSH1

Trotz des Nachweises der Phosphorylierung im Western-Blot (Abbildung 4.17 [D]) konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Probe heterogen phosphoryliert ist. Eine mögliche bindekompetente pY-Spezies könnte nur sehr gering

popularisiert vorliegen. Aus diesem Grund wurde der Assay doppelt durchgeführt - mit beiden Bindepartnern alternierend als immobilisiertem Ligand und mobilem Analyt.

Die BLI-Untersuchungen wurden durchgeführt wie in Kapitel 3.7.4 beschrieben. Die Liganden wurden mit einer Konzentrationsreihe Analyt bis 50 bzw. 100 μM Analyt inkubiert und gemessen (Abbildung 4.18).

Über Formel 3.2 wurde das Signal im thermodynamischen Gleichgewicht (y_{inf}) bestimmt ($[A]$) und gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen ($[B]$). Die angelegte Sättigungsfunktion (Formel 3.3) erreichte für NS5A-D2D3^{ELK pY} als Analyt im eingesetzten Konzentrationsbereich jedoch nicht den Halbsättigungspunkt. Daher konnte der K_d dieser Interaktion nicht bestimmt werden und muss höher als 50 μM liegen (Abbildung 4.18 [B]).

Das Experiment mit immobilisiertem NS5A-D2D3^{ELK pY} und c-SRC- ΔSH1 -Analyt (Abbildung 4.18 [C], [D]) ergab eine Dissoziationskonstante von $18 \pm 4 \mu\text{M}$. Dies deutet darauf hin, dass die unspezifische Phosphorylierungsreaktion der in *E. coli* co-translationell exprimierten Kinase für NS5A-D2D3 unvollständig ablaufen könnte. Durch die Orientierung von NS5A-D2D3 als Analyt führte dies zur einer systembedingten Fehlinterpretation der Daten.

Die gemessene Affinität von 18 μM liegt im Bereich von biologisch relevanten SH2-Wechselwirkungen (81).

4.3.3 Bindung von NS5A-D1-Domänen an c-SRC- ΔSH1

Nachdem für die unstrukturierten Bereiche von NS5A, die D2- und D3-Domäne, eine Bindung im mittleren μM -Bereich an c-SRC- ΔSH1 nachgewiesen werden konnte, wurde die strukturierte D1-Domäne auf Bindung zu c-SRC- ΔSH1 untersucht.

Bindung von NS5A-D1 an c-SRC- ΔSH1 : Pulldown-Experimente

Die Vorexperimente mit kurzen Peptiden (Kapitel 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3) deuteten auf drei mögliche Bindemotive in D1 für die SH2-Domäne hin.

In einem ersten Experiment sollte eine mögliche Komplexbildung durch einen Pulldown-Assay qualitativ untersucht werden. Dazu wurde c-SRC- ΔSH1 und das GST-Protein als Negativkontrolle jeweils an NHS/EDC-Agarose-Beads immobilisiert und mit gereinigtem NS5A-D1^{ELK pY} ü.N. inkubiert. Analog zu den Experimenten mit den Huh 9-13-Zelllysaten (Kapitel 4.1.4), wurden die Beads gewaschen und eluiert (Kapitel 4.1.3). Der Nachweis der Interaktion ist in Abbildung 4.19 gezeigt und wurde durch eine SDS-PAGE [A], einen Anti-His₆-Tag Western-Blot [B] und einen Anti-GST-Western-Blot [C] gezeigt.

Sowohl der Pulldown-Assay der immobilisierten c-SRC- ΔSH1 , als auch die GST-Kontrolle zeigten in der SDS-PAGE Banden im Bereich der erwarteten Proteingröße von NS5A-D1 von 20 kDa. Der Anti-His₆-Western-Blot [B] zeigte für beide Spuren Signale, wobei das Signal bei c-SRC- ΔSH1 ([2]) intensiver war. Das Integral der Signalintensität der SDS-PAGE und des Western-Blots zeigen, dass die Bindung von NS5A-D1 an c-SRC- ΔSH1 [2] deutlich affiner ist, als die Bindung an die Negativkontrolle [3].

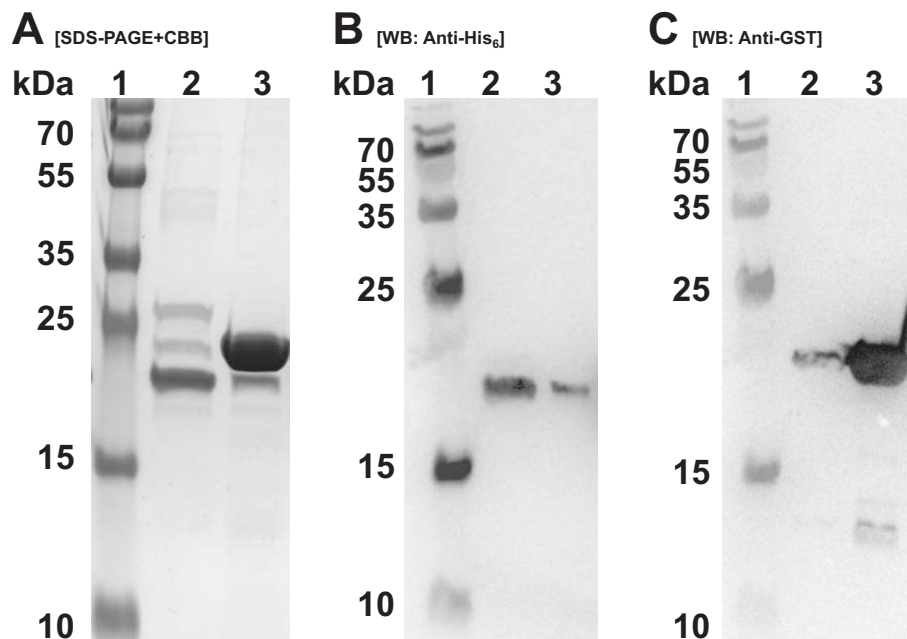


ABBILDUNG 4.19: **Pulldown-Assay mit gereinigten Proteindomänen von c-SRC- Δ SH1 und NS5A-D1^{ELK pY}.** Immobilisiertes c-SRC- Δ SH1 wurde mit rekombinantem NS5A-D1^{ELK pY} (ca. 20 kDa) inkubiert und analog zu den Pulldown-Assays mit Huh 9-13-Zellen behandelt. Die Elution wurde auf mit SDS-PAGE [A] und Western-Blot [B: Anti-His₆, C: Anti-GST] untersucht. [1] zeigt einen Proteingrößenstandard, [2] die Elution des Pulldown-Assays, [3] die Elution des Pulldown-Assays mit rekombinantem GST als Negativkontrolle. [A] zeigt eine CBB-gefärbte SDS-PAGE der Eluate. Die Bande bei ca. 20 kDa wird in [B] als NS5A identifiziert. Das Signal in [2] ist deutlich intensiver als in der Kontrolle [3]. [C] identifiziert die Bande bei ca. 22 kDa als GST-Protein.

In [A] ist in [3] eine sehr intensive Bande unterhalb des 25 kDa Proteinstandards zu erkennen. Im Anti-GST-Western-Blot [C] wird diese Bande als GST-Protein identifiziert, welches während der Elution von den Beads gelöst wird. Dies ist möglicherweise auf die GST-Dimerisierung (118) zurückzuführen, die während der Elution aufgelöst wird.

Durch dieses Experiment wurde erstmalig eine *in vitro*-Interaktion von rekombinant hergestellten Proteinen c-SRC- Δ SH1 und NS5A-D1^{ELK pY} gezeigt, wenngleich NS5A-D1^{ELK pY} ebenfalls eine geringe Bindung an die Negativkontrolle zeigte.

Bindung von NS5A-D1^{ELK pY} an c-SRC- Δ SH1: CD-Spektroskopie

In einem weiteren Experiment sollte eine mögliche Änderung der Sekundärstruktur der beiden Proteine c-SRC- Δ SH1 und NS5A-D1^{ELK pY} bei der Bindung durch Circular dichroismus (CD) untersucht werden. Dazu wurden zunächst die Einzelspektren von 4,6 μ M Proteinlösungen von c-SRC- Δ SH1 und NS5A-D1^{ELK pY} aufgenommen (Abbildung 4.20 A). NS5A-D1 zeigte hier den klar erwarteten großen α -helikalen Anteil am Spektrum, wie es von Love *et*

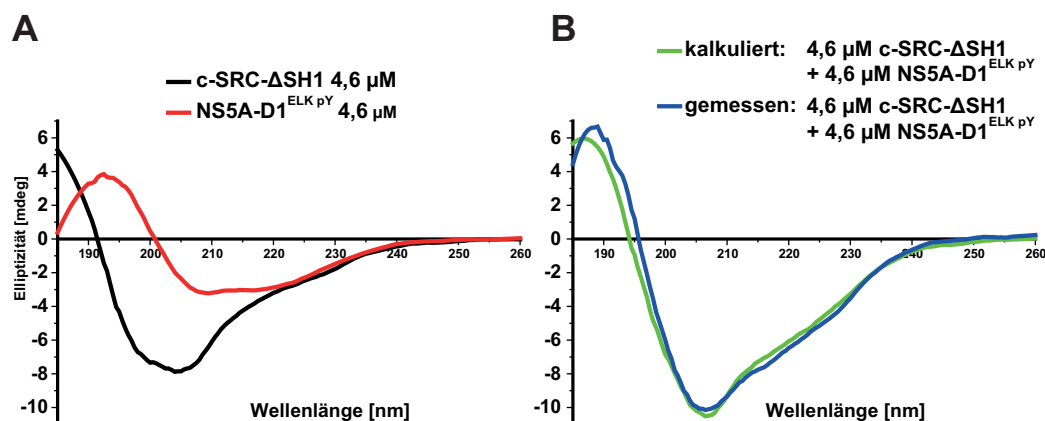


ABBILDUNG 4.20: **Circulardichroismus (CD)-Untersuchung der NS5A-D1^{ELK pY} - c-SRC-ΔSH1-Interaktion.** [A] zeigt die gemessene Elliptizität von 4,6 μM c-SRC-ΔSH1 und 4,6 μM NS5A-D1^{ELK pY} in einer 1 mm Küvette. [B] zeigt die kalkulierte und gemessene Summe beider Proteine in der 1 mm Küvette. Die Differenz aus kalkulierte und gemessenem Spektrum ist sehr gering. Bei der Interaktion von c-SRC-ΔSH1 und NS5A-D1^{ELK pY} findet somit wenig Veränderung in der Sekundärstruktur der Proteine statt.

al. 2009 in der Kristallstruktur beschrieben wurde (44). Das Spektrum von c-SRC-ΔSH1 weist große Anteile von Random-coil-Strukturen und β-Strukturen auf. Zurückzuführen auf die teilweise unstrukturierte Unique-Region und die unstrukturierten Bereiche zwischen den SH-Domänen, sowie β-Strukturen in den SH-Domänen, wie in der Kristallstruktur von Witucki *et al.* 2002 gezeigt (119).

Anschließend wurde die Summe beider Signale kalkuliert sowie experimentell die 1:1 Proteinmischung untersucht ([B]). Dabei zeigte sich eine geringe Abweichung zwischen kalkulierter Summe und tatsächlichem Spektrum. Dies deutet darauf hin, dass trotz Komplexbildung keine großen strukturellen Änderungen stattfinden, so wie es bei einer pY-Abhängigen-Bindung zu erwarten ist. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass es neben der pY-abhängigen Bindung im gewählten Konzentrationsbereich keine weiteren Bindeeffekte zwischen den Proteinen gibt.

CD-Spektroskopie ist damit keine geeignete Methode zur weiteren Charakterisierung und Quantifizierung des Komplexes.

Bindung von NS5A-D1 an c-SRC-ΔSH1: BLI-Untersuchungen

Für die Untersuchungen der Interaktion von c-SRC-ΔSH1 mit NS5A-D1^{ELK pY} wurden Biolayer-Interferometrie (BLI)-Messungen durchgeführt.

Im ersten Ansatz wurde NS5A-D1^{ELK pY} in einer Konzentrationsreihe als Analyt mit immobilisiertem c-SRC-ΔSH1 (als Ligand) untersucht. Der Konzentrationsbereich von NS5A-D1^{ELK pY} wurde zunächst von 38 μM bis 0,6 μM gewählt. Die Konzentration wurde von Sensor zu Sensor jeweils halbiert. Es zeigte sich eine niedrige μM-Dissoziationskonstante. Um die Messpunktdichte im Bereich des K_{ds} zu erhöhen, wurde die höchste Konzentration auf 15 μM Analyt reduziert und die Faktor zwei Verdünnung beibehalten (Abbildung 4.21). Die Sensogramme wurden jeweils in der Assoziationsphase mit Formel 3.2 gefittet.

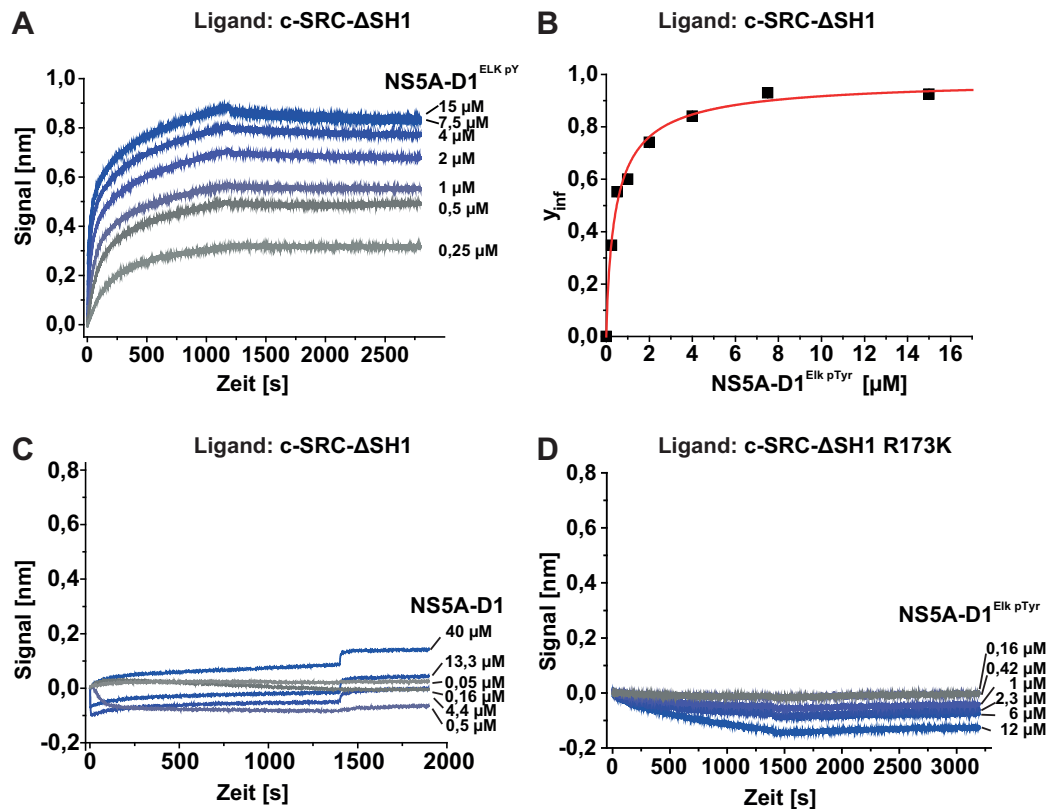


ABBILDUNG 4.21: **BLI-Sensogramme und Auswertung von NS5A-D1^{ELK pY}- und NS5A-D1-Bindung an c-SRC-ΔSH1 und c-SRC-ΔSH1 R173K.** In [A]: Die Sensogramme der NS5A-D1^{ELK pY}-c-SRC-ΔSH1-Bindung wurden mit Formel 3.2 gefittet und in [B] der Wert des thermodynamischen Gleichgewichts (y_{inf}) gegen die Konzentration des Analyts aufgetragen. Diese wurden anschließend mit Formel 3.3 gefittet und der K_d mit 470 nM bestimmt. In [C]: Sensogramme von NS5A-D1-Bindung (Analyt) an c-SRC-ΔSH1 (Ligand), Konzentrationsreihe bis 40 μM Analyt. In [D]: NS5A-D1^{ELK pY} (Analyt) - c-SRC-ΔSH1 R173K (Ligand)-Sensogramme, Konzentrationsreihe bis 12,5 μM Analyt. In [C] und [D]: Es konnte keine Bindungskonstante für die eingesetzten Konzentrationen ermittelt werden.

Das extrapolierte Signal des thermodynamischen Gleichgewichts y_{inf} wurde in [B] gegen die Analyt-Konzentration aufgetragen. Der Halbsättigungspunkt der Sättigungskurve (Formel 3.3) wurde als K_d bestimmt und betrug für die von Interaktion NS5A-D1^{ELK pY} mit c-SRC-ΔSH1 ca. 470 nM und war damit Faktor 40 affiner als die Interaktion von NS5A-D2D3^{ELK pY} mit c-SRC-ΔSH1 (Kapitel 4.3.2, Abbildung 4.18).

Es wurden weitere Messungen durchgeführt, um das Modell einer Phosphotyrosin-Bindung zu überprüfen: c-SRC-ΔSH1 als Ligand mit NS5A-D1 ohne Tyrosin-Modifikation (hergestellt und gereinigt wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, jedoch aus einem BL21 DE3-*E. coli*-Stamm) mit einer Konzentrationsreihe bis 40 μM inkubiert (Abbildung 4.21 [C]). Nach Abzug der Referenzmessungen zeigte das verbliebene Signal nicht den für Bindungsreaktionen typischen Verlauf. Ein K_d muss deutlich oberhalb von 40 μM liegen.

TABELLE 4.2: Dissoziationskonsten der Bindung von c-SRC- Δ SH1-Varianten an NS5A-D1-Varianten

	c-SRC- Δ SH1	c-SRC- Δ SH1 R173K
NS5A-D1 ^{ELK pY}	$K_d = 0,47 \mu\text{M}$	$K_d \gg 12,5 \mu\text{M}$
NS5A-D1	$K_d \gg 40 \mu\text{M}$	nicht gemessen

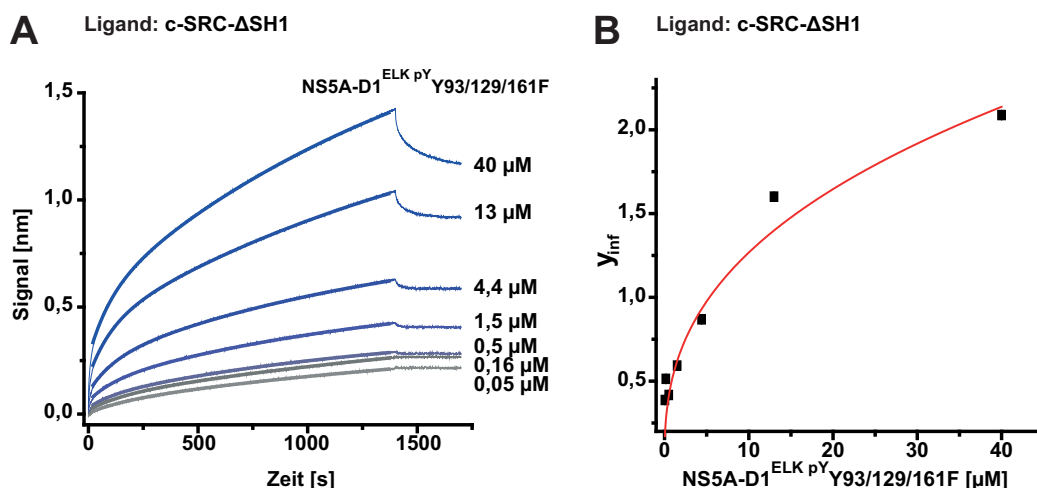


ABBILDUNG 4.22: BLI-Sensogramme und Auswertung von NS5A-D1^{ELK pY} Y93/129/161F-Bindung an c-SRC- Δ SH1. [A]: Sensogramme von c-SRC- Δ SH1 als Ligand mit NS5A-D1^{ELK pY} Y93/129/161F als Analyt, inkubiert bis zu einer Konzentration von 40 μM . Das Bindesignal wurde mit Formel 3.2 gefittet und y_{inf} gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen [B]. Durch die Datenpunkte wurde Formel 3.3 gefittet und der K_d deutlich oberhalb der höchsten Analyten-Konzentration (40 μM) berechnet.

Beim Experiment mit immobilisiertem c-SRC- Δ SH1 R173K als Ligand zeigte sich ein ähnliches Bild (Abbildung 4.21 [D]). Hier wurden die Phosphotyrosinbindungsdefiziten Variante der SH2-Domäne mit NS5A-D1^{ELK pY} inkubiert. Es wurden ebenfalls keine typischen Bindungskurven erreicht. Dies lässt darauf schließen, dass die Dissoziationskonstante für diese beiden Proteine deutlich höher als 12 μM liegen muss.

4.3.4 Bindung von NS5A-D1-Varianten an c-SRC- Δ SH1: Identifikation des entscheidenden Tyrosinrests in NS5A

Nachdem die Bindung von NS5A-D1^{ELK pY} an c-SRC- Δ SH1 quantifiziert war, lag der Fokus auf der Identifikation des für die Bindung verantwortlichen Tyrosinrests. Dazu wurden nacheinander die möglichen Binde-Tyrosine gegen Phenylalanine ausgetauscht. Jeder Austausch wurde in einem separat gentechnologisch hergestellten *E. coli*-TKB-1 Organismus unabhängig von einander hergestellt (mit Vektoren 9-15 in Tabelle 2.6) und die Proteine gereinigt (wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben).

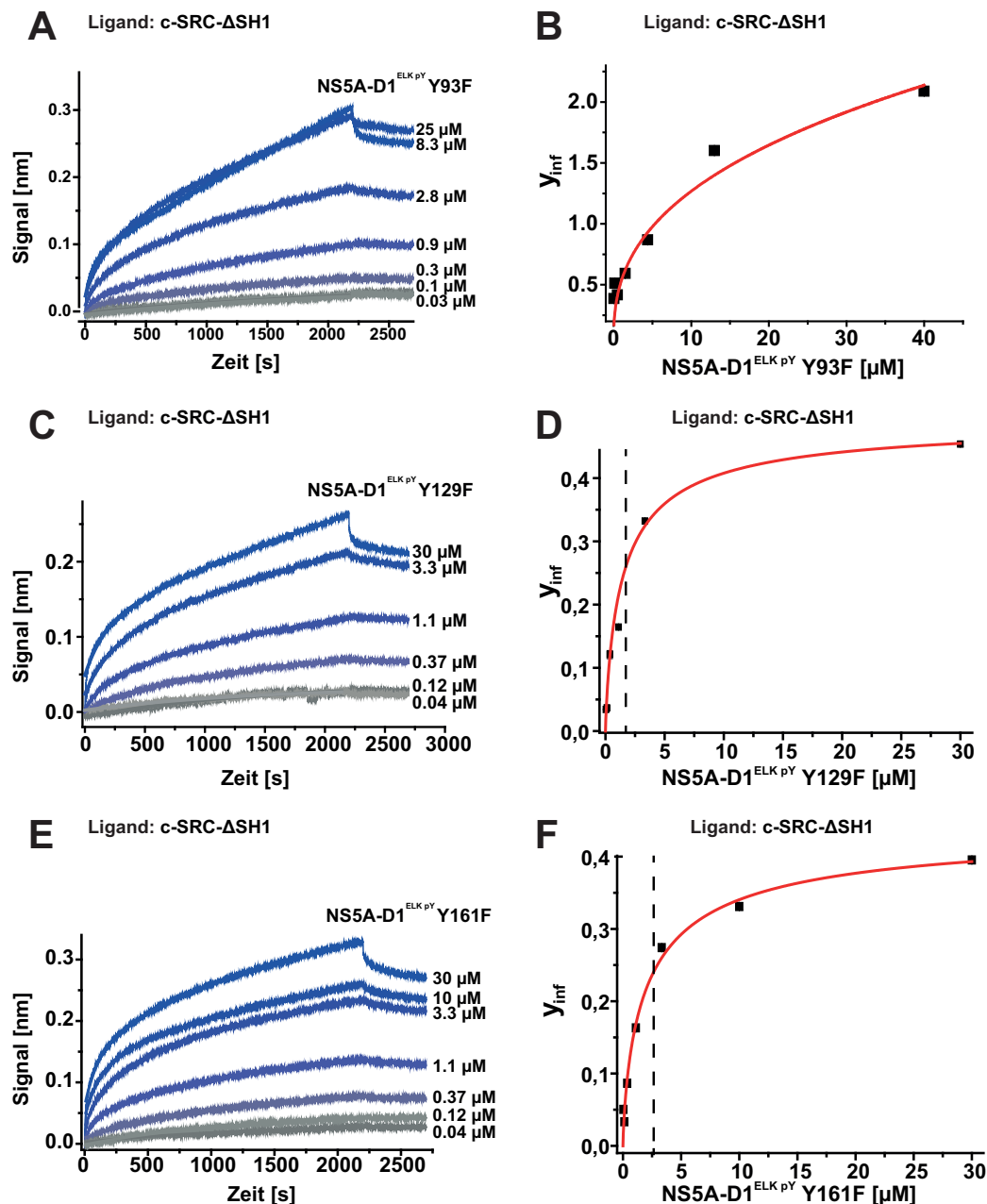


ABBILDUNG 4.23: BLI-Sensogramme und Auswertung der Bindung von verschiedenen NS5A-D1-Varianten mit einem Phenylalanin-Austausch an c-SRC-ΔSH1. c-SRC-ΔSH1 (als Ligand) wurde mit NS5A-D1^{ELK pY} Y93F [A], NS5A-D1^{ELK pY} Y129F [C] und NS5A-D1^{ELK pY} Y161F [E] jeweils als Analyt inkubiert. Die Bindekurven wurden Formel 3.2 gefittet und y_{inf} gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen [B, D, F]. Die Datenpunkte wurden Formel 3.3 gefittet. Die Dissoziationskonstante, K_d , der Interaktion c-SRC-ΔSH1 mit NS5A-D1^{ELK pY} Y93F lag deutlich über der größten eingesetzten Konzentration von 25 μM [B], für c-SRC-ΔSH1 mit NS5A-D1^{ELK pY} Y129F bei 1,5 μM [D] und für c-SRC-ΔSH1 mit NS5A-D1^{ELK pY} Y161F bei 2 μM [F].

Um auszuschließen, dass ein weiteres Tyrosin (außer 93, 129, 161) maßgeblich für die beobachtete Bindung an c-SRC-ΔSH1 verantwortlich ist, wurde dies

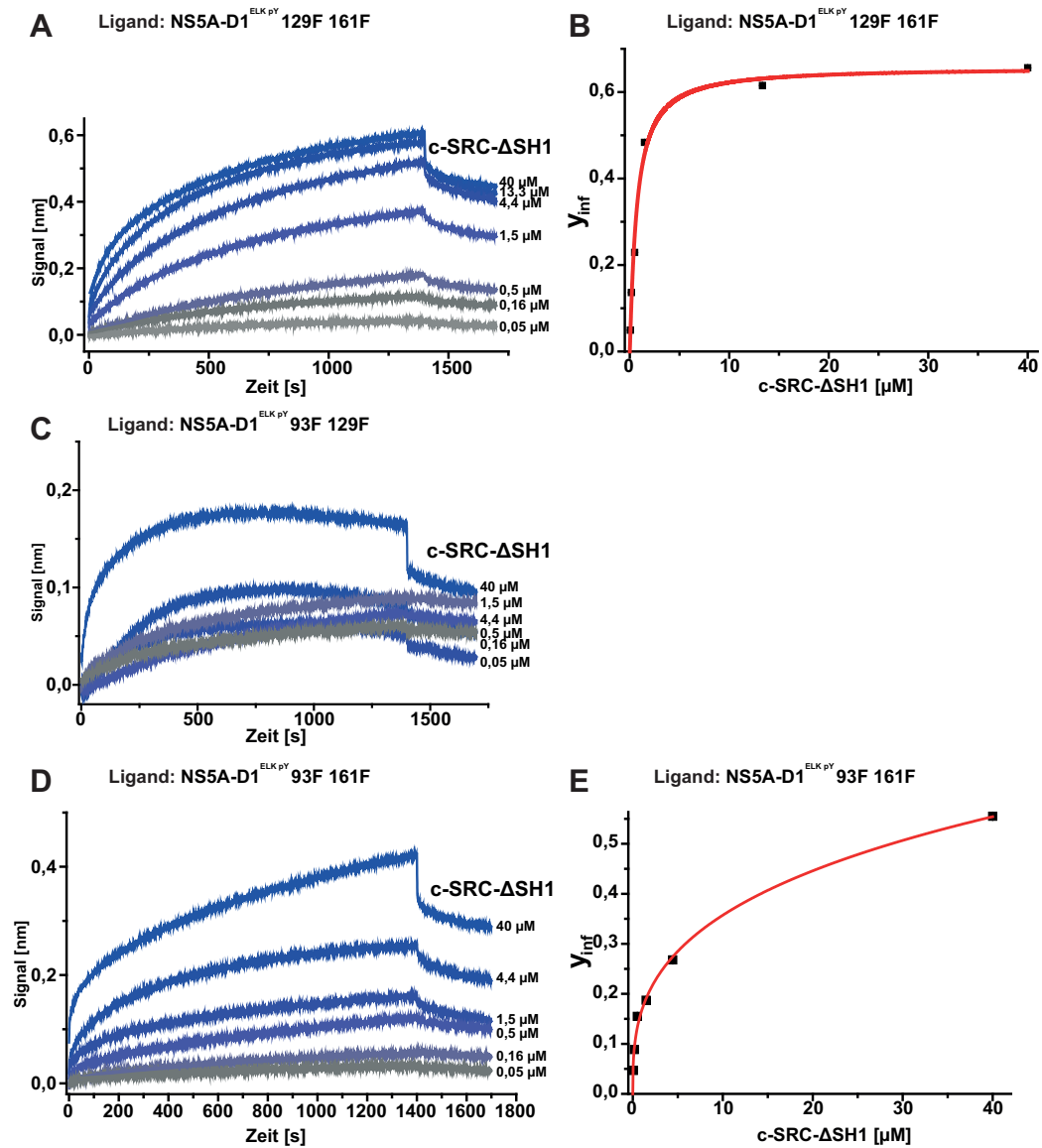


ABBILDUNG 4.24: BLI-Sensogramme und Auswertung der Bindung von verschiedenen NS5A-D1-Varianten mit zwei Phenylalanin-Substitutionen an c-SRC- Δ SH1. Die NS5A-Varianten wurden als Ligand immobilisiert: in [A] NS5A-D1^{ELK pY} Y129/161F, in [C] NS5A-D1^{ELK pY} Y93/161F, in [D] NS5A-D1^{ELK pY} Y93/161F und mit einer Konzentrationsreihe c-SRC- Δ SH1 (als Analyt) inkubiert. Für die NS5A-D1^{ELK pY} Y129/161F-Variante mit Tyrosin 93^{ELK} konnte $K_d = 0,7 \mu\text{M}$ bestimmt werden [B]. Für die beiden anderen NS5A-D1-Varianten konnte kein K_d bestimmt werden.

durch eine Variante von NS5A-D1 untersucht, in der alle drei Positionen gegen Phenylalanine getauscht wurden.

c-SRC- Δ SH1 wurde als Ligand immobilisiert und mit NS5A-D1^{ELK pY} Y93/129/161F als Analyt bis zu einer Konzentration von 40 μ M inkubiert (Abbildung 4.22 [A]). Die Sensogramme wurden mit Formel 3.2 ausgewertet und die Konzentration des Analyts gegen den ermittelten y_{inf} -Wert aufgetragen ([B]). Formel 3.3 ergab einen Halbsättigungspunkt deutlich größer als die höchste Konzentration des Analyten, d.h. die Dissoziationskonstante für diese Wechselwirkung liegt deutlich über 40 μ M.

Dieses Experiment bestätigt, dass es keine weiteren pY-Bindekandidaten für c-SRC- Δ SH1 in NS5A-D1 gibt und sich das entscheidende Tyrosin unter den drei vorher selektierten Kandidaten (Y93, Y129, Y161) befinden muss.

Im Weiteren wurden einzelne Tyrosine gegen Phenylalanine getauscht. Die Variante NS5A-D1^{ELK pY} Y93F (Abbildung 4.23) zeigte den Verlust der Affinität für c-SRC- Δ SH1. Bis zu einer Konzentration von 25 μ M der NS5A-Variante als Analyt konnte im BLI-Experiment keine Sättigung für das Signal des thermodynamischen Gleichgewichts erreicht werden. Damit liegt die Dissoziationskonstante für diese Variante zu c-SRC- Δ SH1 deutlich über 25 μ M und damit mindestens Faktor 50 über dem des *wt*-NS5A-D1^{ELK pY}.

Für die Varianten D1^{ELK pY} Y129F und D1^{ELK pY} Y161F wurden ebenfalls BLI-Experimente durchgeführt. Beide wurden jeweils als Analyt in den BLI-Experimenten verwendet und zu immobilisiertem c-SRC- Δ SH1 titriert.

Für D1^{ELK pY} Y129F konnte eine Dissoziationskonstante von 1,5 μ M (Abbildung 4.23 [C, D]) und für D1^{ELK pY} Y161F eine Dissoziationskonstante von ca. 2 μ M (Abbildung 4.23 [E, F]) bestimmt werden. Beide Varianten zeigen damit eine ähnliche Affinität wie das unveränderte NS5A-D1^{ELK pY} mit allen sieben Tyrosinen (Abbildung 4.21).

Diese Experimente legen nahe, dass Y93 phosphoryliert vorliegen muss, um eine Bindung von NS5A an c-SRC zu initiieren.

Um diese Annahme zu überprüfen wurde das experimentelle Design geändert. Anstelle von einer einzelnen Mutationen, die dann die Affinität zu c-SRC- Δ SH1 verringern, wurde im folgenden Ansatz zwei Kandidaten gegen Phenylalanine getauscht, sodass jeweils ein Kandidat direkt auf Bindung überprüft werden konnte. Des Weiteren wurde die Orientierung im BLI-Assay getauscht. Die NS5A-D1^{ELK pY}-Domäne wurde als Ligand an die Sensorspitze gekoppelt und mit c-SRC- Δ SH1 titriert. Dies sollte dafür sorgen, dass mögliche Ungleichmäßigkeiten in der Phosphorylierung von NS5A über die geringe und nicht in die Daten-Fit einfließende Konzentration des Liganden eliminiert werden.

Die Variante NS5A-D1^{ELK pY} Y129/161F sollte den Einfluss von Y93 auf die Bindung untersuchen. Bei der Messung mit c-SRC- Δ SH1 als Analyt zeigten sich Bindekurven (Abbildung 4.24 [A]) ähnlich des unveränderten Proteins (Abbildung 4.21). Die Auswertung des Bindesignals im thermodynamischen Gleichgewichts zeigte eine Dissoziationskonstante K_d von 0,7 μ M (Abbildung 4.24 [B]) und damit ist D1^{ELK pY} Y129/Y161F in der Größenordnung des *wt*-Proteins mit allen Tyrosinen.

TABELLE 4.3: Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten der Bindung von NS5A-D1-Varianten an c-SRC- Δ SH1

NS5A-D1			K_d für c-SRC- Δ SH1	Verweis
93	129	161		
pY	pY	pY	0,5 μ M	Abbildung 4.21 A/B
Y	Y	Y	\gg 40 μ M	Abbildung 4.21 C
F	F	F	\gg 40 μ M	Abbildung 4.22 A/B
F	pY	pY	\gg 25 μ M	Abbildung 4.23 A/B
pY	F	pY	1,5 μ M	Abbildung 4.23 C/D
pY	pY	F	2 μ M	Abbildung 4.23 E/F
pY	F	F	0,6 μ M	Abbildung 4.24 A/B
F	pY	F	\gg 40 μ M	Abbildung 4.24 C
F	F	pY	\gg 40 μ M	Abbildung 4.24 D/E

Die Varianten NS5A-D1^{ELK pY} Y93/161F (mit Y129^{ELK pY}) und -D1^{ELK pY} Y93/129F (mit Y161^{ELK pY}) zeigten im BLI, inkubiert mit c-SRC- Δ SH1-Analyt, keine Dissoziationskonstante im Bereich der größte eingesetzten Analyt-Konzentration (Abbildung 4.24 [C, D, E]).

Einzig für die NS5A-D1^{ELK pY} Variante mit Y93^{ELK pY} konnte die Dissoziationskonstante für c-SRC- Δ SH1 gemessen werden. War Position 93 gegen ein Phenylalanin ausgetauscht, lag die Dissoziationskonstante in beiden Fällen deutlich über dem für die unveränderten Varianten gemessenen nM bis μ M-Bereich.

4.4 Untersuchung von NS5A Y93 im Hepatozyten-Zellkulturmodell

4.4.1 NS5A Y93 ist für die effiziente virale Replikation entscheidend

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen zeigten den Einfluss von Y93 für die Bindung von NS5A an c-SRC. Da NS5A zusammen mit c-SRC entscheidend für die Replikation von HCV verantwortlich ist (53), sollte die Replikationseffizienz vom HCV-Replikonsystemen mit an Position Y93 verändertem NS5A untersucht werden. Dazu wurden Hepatozyten-Zelllinien Huh 7 mit HCV-Replikon-Plasmiden (Originalsequenz in Anhang A) transient transfiziert. Um die Bedeutung von Y93 zu untersuchen, wurde diese Position gegen ein Phenylalanin ausgetauscht, analog zu den *in vitro*-Experimenten. Der hydrophobe Charakter der Aminosäureposition wurde beibehalten, die Möglichkeit der Phosphorylierung bestand durch die Änderung nicht mehr.

Die Replikationseffizienz des HCV-Replikon-Genoms wurde durch RT-qPCR untersucht und die HCV-RNA-Menge normiert auf die mRNA des ubiquitär exprimierten *SDHA*-Gens (Succinate Dehydrogenase Komplex, Untereinheit A) (120). Es zeigte sich eine statisch signifikante Verringerung ($p = 0,037$) der Replikationsrate im Fall des NS5A Y93F Plasmids (Abbildung 4.25). Änderungen

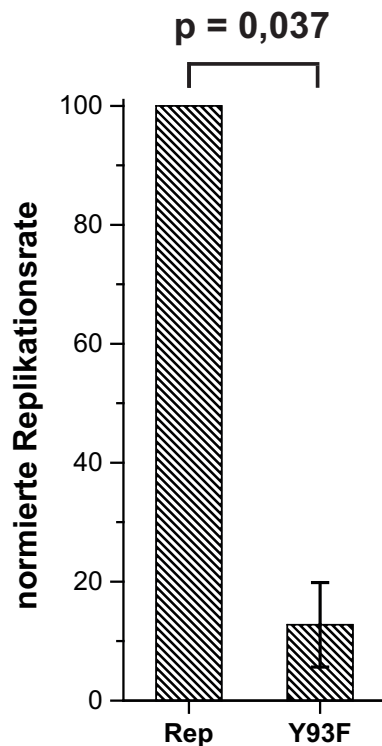


ABBILDUNG 4.25: **Quantitative realtime PCR (RT-qPCR) von transient transfizierten Hepatozyten mit HCV-Replikon-Plasmiden.** Huh 7-Hepatozyten wurden mit HCV-Replikon-Plasmiden transfiziert und die Replikationsrate durch RT-qPCR gemessen. Die Ergebnisse wurden auf die Replikationsrate des unmodifizierten HCV-Replikon-Plasmids in Huh 7-Zellen (Rep) normiert. Es zeigte sich, dass der Phenylalanin-Austausch an NS5A-Position 93 (Y93F) zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Replikationsrate von HCV um 90 % führte. Eine Veränderung an anderen NS5A-Positionen wie Y129 oder Y161 führten zu keinen statistisch signifikanten Änderungen der Replikationsrate (ohne Abbildung). Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Messungen ($n = 3$) und die Standardabweichung. Die Experimente wurden durchgeführt von Dr. Sabine Stindt in der Abteilung für Experimentelle Hepatologie, Universitätsklinik Düsseldorf.

an den Positionen 129 und 161 von NS5A zeigten keine statistisch Signifikanten Änderungen der viralen Replikationsraten.

Die molekularbiologischen Arbeiten zur Änderung der Gensequenz, Transfektion und die Messungen der viralen Replikationsrate wurden von Dr. Sabine Stindt in der Abteilung Experimentelle Hepatologie, Universitätsklinik Düsseldorf, durchgeführt und ausgewertet .

4.4.2 Untersuchung der *in vivo*-Bedeutung von NS5A Y93 für die Bindung an c-SRC-SH2

Nachdem in Abschnitt 4.4 eine entscheidende Bedeutung von NS5A Y93 für die Replikation des HCV-Genoms festgestellt werden konnte, sollte anschließend die Bedeutung von NS5A Y93 für die c-SRC-SH2-Bindung untersucht werden. Dazu

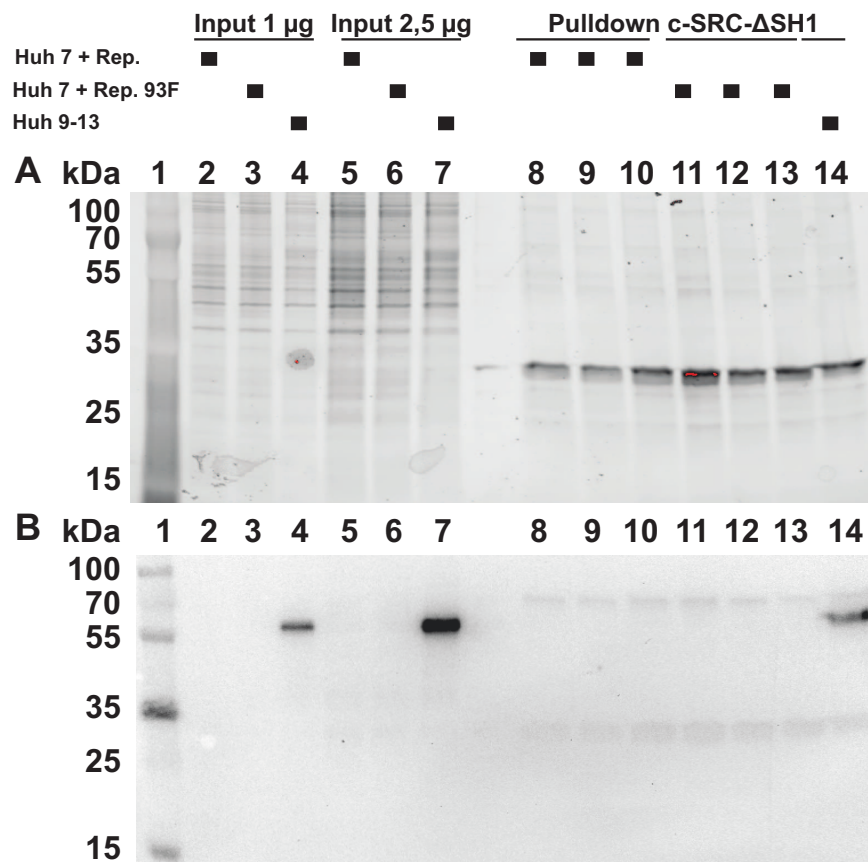


ABBILDUNG 4.26: **Pull-down-Experimente mit transient mit HCV-Replikon transfizierten Huh 7-Hepatozyten.** [A] zeigt das Fluoreszenzsignal einer BioRad Stainfree SDS-PAGE. Diese wurde anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und in einem Anti-NS5A-Western-Blot ([B]) untersucht. [1] zeigt einen Proteingrößenstandard, [2, 5]: 1 bzw. 2,5 µg Gesamtzelllysate Huh 7 mit *wt*-HCV-Replikon-Plasmid. [3, 6] zeigen 1 bzw. 2,5 µg Gesamtzelllysate Huh 7 mit Y93F modifiziertem HCV-Replikon-Plasmid. [4, 7] zeigen 1 bzw. 2,5 µg Gesamtzelllysate Huh 9-13 mit stabil transfiziertem *wt* HCV-Replikon, analog zu Experimenten in Kapiteln 4.1.3 und 4.1.4. [8-10] zeigen drei unabhängige Pull-down-Experimente mit Zelllysaten von Huh 7 mit HCV-Replikon-Plasmid. [11-13] zeigen drei unabhängige Pull-down-Experimente mit dem NS5A Y93F modifizierten HCV-Replikon-Plasmid in Huh 7-Zellen. [14] zeigt ein Pull-down-Experiment mit Huh 9-13-Zellen, ähnlich der Experimente in Kapiteln 4.1.3 und 4.1.4. Es zeigte sich, dass sowohl in den Input-Proben, als auch in den Pull-down-Proben der Huh 7-Zellen keine Bande auf der erwarteten NS5A-Höhe (ca. 58 kDa, wie in [4, 7, 14] der Huh 9-13-Zellen, Expositionszeit 16,5 min) nachgewiesen werden konnte. Auf ca. 30 und 70 kDa konnten in [8-14] schwache Banden detektiert werden, die wahrscheinlich einer unspezifischen Antikörperreaktion zuzuschreiben sind und so zuvor in den anderen Pull-down-Experimenten mit Hepatozyten noch nicht beobachtet werden konnten.

wurde das Pulldown-Setup verwendet, welches für die Huh 9-13-Hepatozyten etabliert wurde (vgl. Kapitel 4.1.3).

Die in Kapiteln 4.3.3 und 4.3.4 identifizierte und quantifizierte *in vitro*-Bindung von NS5A-D1^{ELK pY} an c-SRC- Δ SH1 sollte im Folgenden mit dem in Hepatozyten-Zellen vorliegenden Phosphorylierungsmuster von NS5A bestätigt werden. Wenn Y93 von NS5A auch *in vivo* phosphoryliert vorliegt und die für die c-SRC-SH2-Bindung entscheidende Position ist, sollten in Pulldown-Experimente ohne Y93 reduzierte NS5A-Mengen im Eluat gefunden werden.

Im Vorhinein war davon auszugehen, dass das vorher verwendete Setup für die stabilen Zelllinien Huh 9-13 nicht ohne Anpassungen auf eine transient mit HCV-Replikon-Plasmid transfizierte Zellkultur übertragbar sein würde. Zum Einen war mit einem Einfluss der Transfektionseffizienz auf die Proteinmenge zu rechnen, zum Anderen zeigten die RT-qPCR-Experimente bereits, dass durch Änderung der Y93-Position in NS5A die virale RNA-Menge abnahm (Kapitel 4.4) und damit auch mit weniger viralen Proteinen zu rechnen sein würde.

Es zeigte sich, dass sich bereits bei den Input-Kontrollen die NS5A-Menge zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen unterschied. Während in den Huh 9-13-Zellen für beide Gesamtprotein-Auftragsmengen ein NS5A-Signal nachgewiesen werden konnte, konnte in den beiden Huh 7-Gruppen (1 und 2,5 μ g Gesamtprotein) kein NS5A-Signal detektiert werden (Abbildung 4.26). Die Ladekontrolle, durchgeführt durch eine BioRad Stainfree-Färbung, zeigte nur geringe Varianz zwischen den Beladungsmengen an Gesamtprotein der einzelnen Spuren. Es zeigte sich, dass in den transfizierten Huh 7-Zellen deutlich weniger NS5A nachweisbar war, als in der Huh 9-13-Zelllinie.

Bei dem Pulldown-Experiment mit immobilisiertem c-SRC- Δ SH1 konnte in keiner der beiden mit HCV-Replikon-Plasmid transfizierten Huh 7-Gruppen eine Bindung im Anti-NS5A-Western-Blot nachgewiesen werden. Die parallel dazu untersuchten Huh 9-13-Zellen zeigten jedoch das aus den Vorexperimenten (Kapitel 4.1.4) bekannte Bindesignal zu c-SRC- Δ SH1, also die Bande bei ca. 58 kDa (Abbildung 4.26).

In der Analyse des Pulldown-Experiments wurden weitere Banden bei ca. 30 und 70 kDa detektiert. Diese traten bei der Untersuchung erstmalig auf und wurden in den anderen Pulldown-Experimenten mit Huh 9-13-Zellen nicht beobachtet (vgl. Kapitel 4.1.3 und 4.1.4). Hierbei handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit c-Src- Δ SH1 (bei ca. 30 kDa, vgl. BioRad Stainfree-Färbung in [A]) und einem weiteren, unbekanntem Protein bei ca. 70 kDa.

Das Experiment zeigt, dass die gefundenen Bedingungen für Huh 9-13-Zellen für einen NS5A-c-SRC- Δ SH1-Pulldown-Experiment für transient transfizierte Zelllinien angepasst werden müssen. Die NS5A-Menge in transient transfizierten Zelllinien reicht nicht aus um ein Signal im Anti-NS5A-Western-Blot zu erzeugen.

Die initiale Fragestellung konnte durch dieses Experiment nicht beantwortet werden.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Reinigung von Proteindomänen

In dieser Arbeit wurden diverse Proteine und Proteindomänen aus *E. coli*-Zellkulturen gereinigt. Die Ausbeute variierte von einigen μg (bei der Reinigung von NS5A-Domänen) hin zu hohen zwei- bis dreistelligen mg Mengen (bei der Reinigung von GST-fusionierten Proteinen) pro Liter Zellkultur.

Die mit Glutathion-S-Transferase fusionierten Src-Kinasen FYN (SH2-Varianten) und c-SRC (durchweg alle verwendeten Varianten) zeigten eine gute Löslichkeit im Zellysate und konnten unter nativen Bedingungen in großer Menge isoliert werden. Die Ausbeuten lagen bei ca. 20 mg/l für GST-FYN-SH2 (alle Varianten, Kapitel 4.1.2), ca. 50 mg/l für c-SRC- Δ SH1 R173K, ca. 100 mg/l für GST-c-SRC-SH2 und GST-c-SRC-SH3-SH2 und für GST-c-SRC- Δ SH1 ca. 400 mg/l (Kapitel 4.1.1). Die finale Reinheit aller dieser Proteine lag im Bereich von mindestens 90 %, bestimmt durch SDS-PAGE (vgl. Kapitel 4.1.1, 4.1.2).

Da NS5A sowohl gefaltete Domänen als auch große ungefaltete Proteinbereiche besitzt, wurden diese beiden Bereiche getrennt hergestellt. Die Herstellung als Vollängenprotein erwies sich in der Vergangenheit im Institut als große Herausforderung mit nur geringen Ausbeuten und sehr geringer thermodynamischer Stabilität des Proteins. Diese Beobachtungen wurden durch die Literatur bestätigt (51).

Für die NS5A-D1-Domäne sind Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Aminosäurereste-Grenzen in der Protein Data Bank (pdb.org) (74) hinterlegt. Sowohl die Tellinghuisen *et al.* 2005 als auch die Love *et al.* 2009 -Varianten zeigen, auf Grundlage der SEC-Retentionszeiten, eine dimere Struktur der NS5A-D1-Domäne.

Im Vergleich der Expression und Reinigung der beiden Varianten in *E. coli*-TKB-1 zeigte sich, dass die Tellinghuisen-Variante, Aminosäurereste 26-202, bei Expression und Reinigung eine geringere Ausbeute erzielte als die Love-Variante, aa 33-202 (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden von Ascher *et al.* 2014 für den *E. coli*-Stamm BL21 DE3 bestätigt (107). In den Untersuchungen von Ascher *et al.* 2014 konnten darüber hinaus keine statistisch signifikanten Unterschiede in der RNA-Bindung der Love- und Tellinghuisen-Varianten nachgewiesen werden. Die Bindung von bekannten NS5A-bindenden Komponenten wie Dacaltasvir zeigte für beide NS5A-D1-Konstrukte Bindekonstanten in der gleichen Größenordnung (107).

Vor dem Hintergrund eines hohen Bedarfs an gereinigten Proteinen für die Untersuchungen, wurde daher die „Love-Variante“ aa 33-202 verwendet.

Die verschiedenen NS5A-Varianten wurden alle als His₆-fusionierte Proteine heterolog exprimiert aus *E. coli*-TKB-1 oder BL21 DE3-Zellkulturen gereinigt (Kapitel 4.3.1).

Die NS5A-D1-Varianten (NS5A-D1 33-202, -D1 93F, -D1 129F, -D1 161F, -D1 Y93/129F, -D1 Y129/161F, -D1 Y93/161F, -D1 Y93/129/161F) wurden alle unter nativen Bedingungen, angelehnt an (44), gereinigt (Kapitel 4.3.1), wobei die erzielte Ausbeute mit dreistelligen µg-Mengen pro Liter *E. coli*-TKB-1-Kultur bzw. einstellige mg-Mengen pro Liter in *E. coli*-BL21 DE3-Kulturen nicht an die publizierten Werte von über 10 mg/l in *E. coli*-BL21 DE3 (44) reichten.

NS5A-D2D3 wurde heterolog in *E. coli*-TKB-1 exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Die Ausbeute lag im dreistelligen µg-Bereich pro Liter Zellkultur.

Neben der Expression ohne posttranslational modifizierende Bedingungen (in *E. coli*-BL21 DE3) wurden für alle NS5A Konstrukte ebenfalls Expressions- und Reinigungsbedingungen für den Phosphotyrosin-modifizierenden *E. coli*-Stamm TKB-1 etabliert. Dabei wurden die Expressionsbedingungen zuvor etablierter Reinigungsbedingungen im *E. coli*-BL21 DE3-Stamm gegen die Reinigungsprotokolle des Herstellers (Agilent) des *E. coli*-TKB-1-Stamms getestet.

Während für NS5A-D1 eine Expression ü.N. bei 16 °C für die NS5A-D1-Domäne die besten Ergebnisse erzielte, wurden im Agilent-Protokoll Expressionsbedingungen von 37 °C und 2 h nach Induktion bis zur Ernte der Zellen durch Zentrifugation vorgeschrieben. Nach der Bakterien-Ernte war im Agilent-Protokoll eine neu-Inokulation in frisches Kulturmedium mit anschließender Induktion der *ELK*-Kinase vorgesehen. Nach weiteren 2 h bei 37 °C sollte die *E. coli*-Kultur geerntet werden.

Aufgrund der technischen Ausstattung im Institut für Physikalische Biologie konnte dies jedoch nicht so durchgeführt werden, sodass die Expression der tyrosinmodifizierenden Kinase in einem Fed-Batch-ähnlichen Verfahren im Schüttelkolben durchgeführt wurde.

Die Expressionsbedingungen (vgl. Kapitel 4.3.1) wurden hinsichtlich Ausbeute und Proteinqualität miteinander verglichen. Es zeigte sich in den Reinigungen immer verschiedene Proteindispersitäten, die durch Western-Blot als NS5A-D1 identifiziert werden konnten (Kapitel 4.3.1, Abbildung 4.14). In den Western-Blot-Untersuchungen und Bindungsstudien an c-SRC- Δ SH1 zeigte sich, dass die mit [7] markierte Fraktion den höchsten Phosphorylierungsgrad und die höchste Bindeaktivität zu c-SRC- Δ SH1 aufwies. Unter den von Agilent beschriebenen Expressionsbedingungen, verschob sich die Verteilung der Proteinspezies von NS5A in Richtung Elution [6] in größere Proteineinheiten, womöglich die in der Literatur erwähnten Tetra- und Multimeren (121). Dies galt für *E. coli*-TKB-1 als auch *E. coli*-BL21 DE3 gereinigtes NS5A-D1.

Daher wurde NS5A-D1, entgegen des Protokolls von Agilent, angelehnt an Love *et al.* 2009, exprimiert und nur für die Induktion der *ELK*-Kinase vor Zellernte die Temperatur für 2 h auf 30 °C erhöht (vollständiges Protokoll in Kapitel 4.3.1). In Western-Blot-Untersuchungen wurde festgestellt, dass bereits

vor Induktion der *ELK*-Kinase eine Phosphorylierung im Zellysate nachweisbar war, möglicherweise durch eine basale Expression des Gens (Daten nicht gezeigt). Dies führte dazu, dass bakterielle Proteine phosphoryliert und somit das Wachstumsverhalten der TKB-1-Zellen stark negativ beeinflusst wurde. In Folge wurde, verglichen mit einem *E. coli*-BL21 DE3-Stamm, weniger Zellmasse gebildet und die Proteinausbeute pro Liter Kultur war stark reduziert (Daten nicht gezeigt). Um genug Protein für die weiteren Untersuchungen zu bekommen, wurde das Volumen der Zellkultur auf bis zu 16 l pro Reinigungsansatz erhöht. Dies galt sowohl für die *wt*-Sequenz als auch für die verschiedenen eingesetzten NS5A-D1-Austauschvarianten.

Weiter fällt auf, dass sich durch Gelfiltrationschromatographie Proteinfraktionen mit unterschiedlicher starkem Phosphorylierungsgrad getrennt werden konnten (vgl. Abbildung 4.14 [7, 8]). In BLI-Experimenten konnte die höchste Affinität für *wt* [7] gemessen werden (K_d 0,5 μ M, vgl. Abbildung 4.21). NS5A-D1^{ELKpY} [8] wies im BLI-Experiment als Analyt mit ca. 3 μ M eine leicht geringere Affinität zu c-SRC- Δ SH1 auf (Abbildung nicht gezeigt).

Für die Expression von NS5A-D2D3 in *E. coli*-TKB-1 wurden die Expressionsbedingungen von NS5A-D1 gewählt (siehe Kapitel 4.3.2). Im Gegensatz zur D1-Domäne wurde D2D3 unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Eine Hitzedenaturierung nach der Reinigung, wie sie in (112) beschrieben wurde, zeigte in der SDS-PAGE-Analyse keinen Unterschied in der Reinheit des Proteins (ohne Abbildung).

Für beide Varianten der Proteinpräparation wurde jeweils als Analyt die Affinität für c-SRC- Δ SH1 durch BLI bestimmt. Eine Affinität zu c-SRC- Δ SH1 konnte bis in den μ M-Bereich nicht nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.3.2, Abbildung für bei 95 °C erhitzte Probe nicht gezeigt).

Durch Tausch von Ligand/Analyt-Anordnung, konnte eine Affinität von 18 μ M für die Bindung von NS5A-D2D3^{ELKpY} an c-SRC- Δ SH1 nachgewiesen werden, Faktor 40 weniger affin, als die D1-c-SRC-Bindung. Des Weiteren deutete dies auf eine nicht vollständig ablaufende Phosphorylierungsreaktion im TKB-1-Stamm hin.

5.2 Massenspektrometrische Untersuchungen identifizieren NS5A und NS5B als c-SRC- Δ SH1-Interaktionspartner

Ausgehend von Methoden und Ergebnisse von Pfannkuche *et al.* 2011 wurde der Pulldown-Assay mit Heptatozyten Huh 9-13-Zellysaten entwickelt.

Die Huh 9-13-Zellysate wurden wie in Pfannkuche *et al.* 2011 beschrieben präpariert. Die gewonnenen Zellysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C über einen Zeitraum von maximal einem halben Jahr gelagert. Bei dieser Art der Lagerung war die Qualität der Pulldown-Assays über den Zeitraum eines halben Jahres gleichbleibend hoch.

Vor Start des Assays wurde das Zellysate über einen mehrstufigen Prozess gereinigt, wie in Pfannkuche *et al.* 2011 beschrieben, um Bindungsinteraktionen

mit der inaktiven stationären Phase auszuschließen (vgl. Kapitel 4.1.3, Abbildung 4.3). Diese Interaktion war jedoch nicht nachweisbar (vgl. Abbildung 4.5). Über verschiedene Sedimentationsverfahren und steigende Anzahl von Waschschrritten wurde der Nachweis der Interaktion mit c-SRC untersucht und festgestellt, dass der Komplex stabil und langlebig genug war, um den Assay reproduzierbar und verlässlich durchführen zu können (Kapitel 4.1.3).

Durch die nicht kovalenten Interaktion des GST mit der GSH-Agarose wurde GST-c-SRC- Δ SH1 bei der Elution des Pulldown-Assays ebenfalls eluiert. Da GST-c-SRC- Δ SH1 ein ähnliches Molekulargewicht wie NS5A aufweist (rund 50 kDa), zeigen beide Proteine in einer SDS-PAGE ein ähnliches Laufverhalten. Durch die große Proteinmengen von GST-c-SRC- Δ SH1 kam es so zu Überlagerungen von NS5A durch GST-c-SRC- Δ SH1, was in Hinblick auf einen massenspektrometrischen Analyse ungünstig war.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde der Pulldown-Assay von GST-Agarose- auf kovalent koppelnde NHS/EDC-Agarose-Beads umgestellt. Anstelle von GST-c-SRC- Δ SH1 wurde nun c-SRC- Δ SH1 verwendet. Die Wasch- und Elutions-Bedingungen nach Inkubation mit den Zelllysaten konnten übernommen werden. Mit dieser Änderung war es fortan möglich Eluate über SDS-PAGE aufzutrennen ohne eine Überlagerung der NS5A-Bande durch GST-c-SRC- Δ SH1 zu erhalten. Die Qualität des Pulldown-Assays und der Eluate konnte durch die Umstellung gesteigert werden (Kapitel 4.1.4), sodass putative NS5A-Banden für die Massenspektrometrie aufgearbeitet werden konnten.

Der Nachweis der Komplexbildung von c-SRC mit NS5A und NS5B wurde durch Massenspektrometrie nachgewiesen (Kapitel 4.1.5). Weiterhin weisen die massenspektrometrischen Daten drauf hin, dass NS3 an diesen Komplex assoziiert ist.

In einem weitergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass neben c-SRC-SH2 ebenfalls FYN-SH2 mit NS5A aus HCV-Replikon-Hepatozyten interagiert (Kapitel 4.1.4). Diese Interaktion war bereits von Nakashima *et al.* 2012 für Zelllysate aus B-Lymphozyten bekannt. In dieser Arbeit konnte diese Interaktion erstmals mit NS5A aus HCV-Replikon-Hepatozyten gezeigt werden.

Weiterhin konnte über Phosphotyrosin-bindedefizite Varianten von FYN-SH2 und c-SRC-SH2 nachgewiesen werden, dass die Interaktion von NS5A und Src-Kinasen in HCV-Replikon-Hepatozyten über eine kanonische SH2-Bindung abläuft (Kapitel 4.1.4). Für FYN-SH2 konnte dies ebenfalls in B-Lymphozyten gezeigt werden (115).

5.3 Peptidsequenzen aus NS5A liefern vier mögliche Bindestellen für c-SRC-SH2

Als erster *in vitro*-Ansatz zur Identifikation von möglichen NS5A-Bindemotiven für c-SRC wurden ein Peptid-Mapping durchgeführt. Die verwendeten Peptide von 15 Aminosäureresten Länge mit dem Tyrosinrest an Position acht boten ein lineares Bindeepitop für die SH2-Domäne und damit die besten Möglichkeit alle zehn Tyrosinreste in NS5A auf SH2-Bindung zu untersuchen.

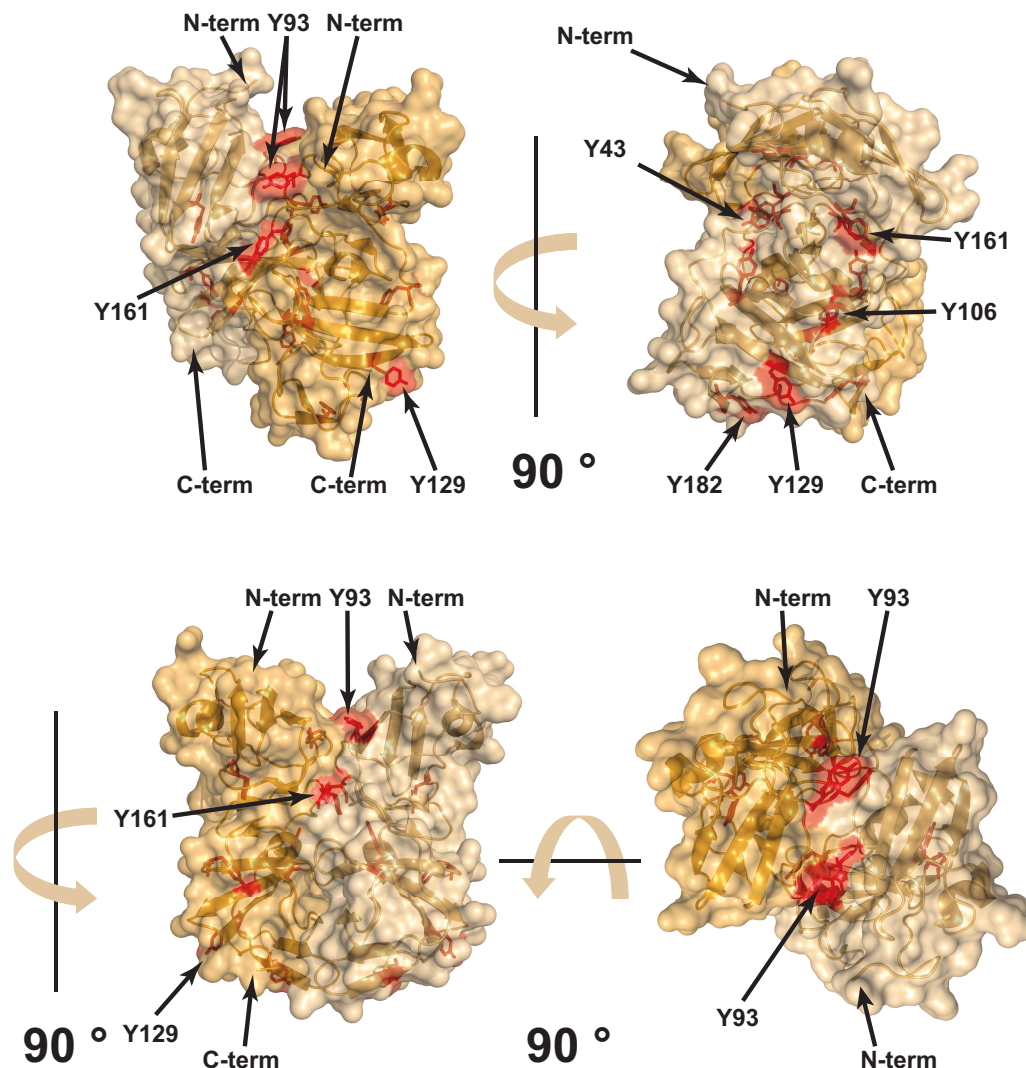


ABBILDUNG 5.1: Darstellung der dimeren Kristallstruktur 3FQM von NS5A-D1 aus der pdb aus verschiedenen Perspektiven mit Markierung oberflächen exponierter Tyrosinreste (rot). Die Tyrosinreste 93, 129, 161 und 182 befinden sich an der Oberfläche des Proteinkristalls. Die Tyrosinreste 43, 106 und 118 zeigen nach Innen und haben keine Kontaktfläche nach Außen. Für die Evaluierung der Ergebnisse aus dem Peptid-ELISAs wurde diese Kristallstruktur berücksichtigt. Unter der Annahme einer kanonischen SH2-Bindung muss ein pY an der Oberfläche zugänglich sein, ohne Änderung der Struktur der Domäne vor der Bindung.

Über einen ELISA-Assay sollte qualitativ putative Bindemotive gegen nicht-Bindemotive unterschieden werden, um die Anzahl der Kandidaten zu reduzieren. (Kapitel 4.2.1). Die Ergebnisse des ELISA-Assays führte zu einer klaren Unterscheidung zwischen Kandidaten- und nicht-Kandidatensequenzen. Es zeigten sich fünf Peptide mit hoher Bindeaffinität zu c-SRC-SH2. Davon waren vier Peptide (Y93, Y106, Y129, Y161) in der strukturierten D1-Domäne von NS5A und ein Peptid (Y413) in der nicht-strukturierten D3-Domäne von NS5A lokalisiert.

Durch die Struktur der D1-Domäne musste davon ausgegangen werden, dass nicht alle Aminosäurereste ständig auf der Oberfläche des Proteins exponiert sind. Daher wurden die Ergebnisse des ELISA mit Strukturinformationen der NS5A-D1-Domäne von Love *et al.* 2009 überprüft (Abbildung 5.1). Die drei Tyrosin-Kandidaten Y93, Y129 und Y161 waren oberflächenexponiert, eine entscheidende Voraussetzung für eine Bindung an c-SRC. Y106 zeigte keine Oberflächenposition, daher müsste vor oder mit einer Bindung an SH2 eine Konformationsänderung der D1-Domäne eintreten. Diese konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, daher verblieb Y106 für die weiteren Untersuchungen als Kandidat.

Für die Tyrosinreste in den Domänen D2 und D3 muss aufgrund der Eigenschaft als intrinsisch ungeordnetes Protein (IDP) davon ausgegangen werden, dass alle Aminosäurereste eine, zumindest temporäre, Oberflächenexposition aufweisen können. Daher muss davon ausgegangen werden, dass auch Y413, zumindest zeitweise, auf der Oberfläche des Proteins exponiert sein kann.

Weiterhin konnte mit dem ELISA festgestellt werden, dass alle Peptide ohne Tyrosinmodifikation, verglichen mit den modifizierten Peptiden, ein sehr schwaches Bindesignal zu c-SRC zeigten. Dies bestätigte die hohe Phosphotyrosinspezifität der SH2-Bindung und ein geringes Hintergrund-Bindesignal in der Messung.

Um die Kandidaten der ersten Bindestudie (Y93, Y129, Y161, Y413 und Y106) genauer zu untersuchen, wurde die Bindung zu c-SRC über Fluoreszenz-polarisation und BLI-Messungen quantifiziert (Kapitel 4.2.2 und 4.2.3). Mit Ausnahme von pY106 konnte für alle Kandidaten eine Dissoziationskonstante im niedrigen μM -Bereich gemessen werden. Diese Bindekonstanten liegen im physiologisch Bereich einer typischen SH2-Bindung (79). In Hinblick auf multi-Proteinkomplexe mit vielen Interaktionsstellen könnte die tatsächliche Stabilität des Gesamtkomplexes von c-SRC, NS5A und NS5B (wie in Abbildung 1.7 dargestellt) um Potenzen höher sein.

Durch die Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich drei Kandidaten in der NS5A-D1-Domäne (Y93, Y129, Y161) und ein weiterer Kandidat in der D3-Domäne (Y413) befinden.

Ein weiterer Kandidat aus der Literatur, Tyrosinrest Y334 (115), zwischen den Domänen D2 und D3 lokalisiert, konnte in den durchgeführten Untersuchungen nicht in den Kreis der Kandidaten aufgenommen werden. Im ELISA (Kapitel 4.2.1) wurde ein Signal ≤ 20 (normiert auf den besten Binder) erzielt und in BLI-Untersuchungen konnte kein $K_d \leq 50 \mu\text{M}$ gemessen werden (Tabelle 4.1).

Neuere Untersuchungen mit Deletionsmutanten in NS5A zeigten, dass die C-terminalen Bereiche keinen direkten Einfluss auf die Replikationseffizienz von HCV haben und daher womöglich nicht in der Komplexbildung c-SRC-NS5A/B beteiligt sind (46). Diese Studien waren zum damaligen Zeitpunkt noch nicht publiziert.

5.4 In NS5A-D1 liegt die entscheidende Bindestelle für c-SRC-SH2

Aus den durchgeführten Peptid-Bindungsstudien erwiesen sich Tyrosinreste aus dem strukturierten Teil D1, als auch aus dem unstrukturierten Teil D3 von NS5A als mögliche Bindepartner zu c-SRC. Um die Bindung der Kandidaten im Kontext einer gefalteten Proteindomäne bzw. der Epitop umgebenen Regionen zu untersuchen, wurden längere Proteinsequenzen von NS5A heterolog in tyrosinphosphorylierenden *E. coli*-Stamm TKB-1 exprimiert, gereinigt und in Bindungsuntersuchungen eingesetzt.

Diese Bindungsuntersuchungen deckten qualitative als auch quantitative Methoden ab. Zunächst wurden, angelehnt an die Assays mit Hepatozyten-Zellysaten, Pulldown-Assays mit rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt. Weitere Untersuchungen wurden mit CD, BLI und SPR durchgeführt.

Für die Bindung von c-SRC- Δ SH1 an intrinsisch ungeordnete Region D2D3, welche die Tyrosin-Positionen Y321, Y334 und Y413 beinhaltet, konnte lediglich eine Dissoziationskonstante im mittleren μ M-Bereich ($K_d = 18 \pm 4 \mu$ M) für die als *E. coli*-TKB-1-Zellen gereinigten Proteine bestimmt werden (Abbildung 4.17 [C, D]).

Nur durch Immobilierung von NS5A-D2D3^{ELK pY} und Inkubation mit einer c-SRC- Δ SH1-Konzentrationsreihe konnte diese Dissoziationskonstante bestimmt werden. Dies deutet darauf hin, dass die *in vivo* Phosphorylierung nicht vollständig abgelaufen ist und damit nicht alle NS5A-D2D3-Moleküle bindefähig waren. Auf Grundlage der ELISA und FP-Daten, wurde Y413 als mögliche Bindestelle in Betracht gezogen. Die gemessene Affinität für c-SRC-SH2 war jedoch Faktor zehn geringer als die der kurzen Peptide (Kapitel 4.3.2) und Faktor 40 weniger affin als NS5A-D1, daher lag im Weiteren das Hauptaugenmerk auf der D1-Domäne.

Für Position Y334 findet sich in der Literatur hinweise auf eine Phosphorylierung (115, 99), sowie einen Zusammenhang der Phosphorylierung mit der Assemblierung funktionaler, infektiöser Partikel (99). Bei Substitution dieser Position gegen ein Phenylalanin nahm die Anzahl funktionaler Viruspartikel ab. Die Replikation wurde dadurch nicht beeinflusst. Als phosphorylierende Kinase wurde c-ABL genannt jedoch kein Bezug zur c-SRC hergestellt. Die SH2-Domäne von c-ABL zeigte in Funktionsuntersuchungen jedoch nur wenig gemeinsame Bindungspartner mit den ubiquitär in allen Geweben vorkommenden c-SRC und FYN (122, 82). In Kombination der hier generierten *in vitro*-Daten mit den publizierten Daten ist hier von einem nicht-c-SRC-abhängigen Signalweg auszugehen.

Nachdem die Hypothese der entscheidenden SH2-Interaktion mit c-SRC- Δ SH1 in NS5A-D2D3 verworfen wurde, lag das Augenmerk auf der D1-Domäne. Dazu wurden die Proteinbereiche verwendet, die Love *et al.* 2009 als Kristallstruktur veröffentlicht hatte.

Die Herstellung erfolgte in *E. coli*-TKB-1-Zellen und das gereinigte Protein wurde auf c-SRC- Δ SH1-Bindung getestet.

Angelehnt an das mit Huh 9-13-Zelllysate etablierte Pulldown-Protokoll, konnte eine Interaktion von rekombinantem c-SRC- Δ SH1 mit rekombinant-hergestelltem NS5A-D1^{ELK pY} nachgewiesen werden (Kapitel 4.3.3).

In einer CD-Messung von c-SRC- Δ SH1 mit NS5A-D1^{ELK pY} konnte gezeigt werden, dass während der Komplexbildung (Konzentration ca. zehnfach über K_d) keine strukturellen Änderungen der Bindungspartner im Komplex stattfanden. Diese Beobachtung decken sich mit dem Modell einer kanonischen SH2-Bindung, bei dem sich die Konformation beider Bindungspartner während der Komplexbindung nur wenig ändert (Abbildung 4.20).

Die CD-Messung zeigte dennoch, dass die verwendeten Proteine eine Sekundärstruktur aufwiesen. Für NS5A-D1 wurde ein hoher Anteil an α -helikalen Strukturen gemessen, wie von Love *et al.* 2009 gezeigt, während c-SRC- Δ SH1 hohe Anteile von Random-coil und β -Faltblattstrukturen aufweist, so wie auch die Kristallstruktur von Witucki *et al.* 2002 zeigt.

Weitere Untersuchungen zur Bindung von NS5A an c-SRC wurden mit SPR und BLI durchgeführt (Kapitel 4.3.3). Für die Assoziationsphase von NS5A-D1^{ELK pY}-Analyten an immobilisiertes c-SRC- Δ SH1 an der Sensorspitze wurde im BLI eine Assoziationsphase von mehreren Minuten gewählt, bis das thermodynamische Gleichgewicht erreicht wurde. Die Messung zeigte sich sehr anfällig für unspezifische Interaktionen von NS5A-D1 mit den Oberflächen der Messsensoren. Der Zusatz von 0,005 % Tween 20 und 0,05 % BSA reduzierten diese deutlich.

Final konnte die Dissoziationskonstante (K_d) von NS5A-D1 für c-SRC- Δ SH1 durch BLI mit ca. 500 nM bestimmt werden und war damit Faktor zwei bis drei affiner als für die affinsten Peptide bestimmt (Abbildung 4.21, Tabelle 4.1).

Kontrollexperimente zur Bindung von c-SRC- Δ SH1 an nicht phosphoryliertes NS5A-D1 zeigten Assoziationskurven. Damit muss der K_d deutlich höher als 40 μ M liegen. Die Kontrolle mit nicht Phosphotyrosin-bindekompetenter c-SRC- Δ SH1 R173K titriert mit NS5A-D1^{ELK pY} zeigte einen K_d deutlich größer als 12 μ M (Abbildungen 4.21, Tabelle 4.2).

Beide Ergebnisse zeigten die Phosphotyrosinabhängigkeit der Interaktion von NS5A und c-SRC- Δ SH1, wie sie von Nakashima *et al.* 2012 für NS5A und FYN-SH2 beschrieben wurde. Die langsame Assoziationsphase bis zum thermodynamischen Gleichgewicht der Bindung von NS5A an c-SRC- Δ SH1 ließ sich durch BLI messen, da die Analyt-Lösung im Batch zur Verfügung stand. In SPR-Experimenten konnten keine geeigneten Assoziationsbedingungen gefunden werden, da die Analyt-Lösung für eine so lange Assoziationsphase nicht in ausreichender Menge bereitgestellt werden konnte. Daher konnte kein Steady-State-Gleichgewicht erreicht werden (ohne Abbildung).

In der verwendeten NS5A-D1-Variante waren sieben Tyrosine vorhanden, welche, aufgrund der heterologen Expression in *E. coli*-TKB-1-Zellen, phosphoryliert vorliegen sollten. Vorhergehende massenspektrometrische Untersuchungen an in *E. coli*-TKB-1 hergestelltem Vollängen-NS5A konnte die Tyrosinphosphorylierung an mindestens acht von zehn Tyrosinen bestätigen (111). Aufgrund einer möglichen Bindungsaktivität mehrerer Tyrosine wurde die Auswertung des thermodynamischen Gleichgewichts- bzw. Steady-State-Signals verwendet. Für diese Art der Auswertung waren die SPR-Daten jedoch ungeeignet,

da die gemessenen Daten noch zu weit vom Steady-State-Zustand entfernt waren.

Kombiniert mit den Peptid- und D2D3-Daten ließ sich die entscheidende Region für die c-SRC-SH2-Bindung auf die Tyrosine Y93, Y129 und Y161 in der D1-Domäne eingrenzen.

In der Literatur finden sich auch Hinweise für eine entscheidende Rolle der D1-Domäne während der Replikation von HCV. Die Deletion der NS5A-D1-Domäne (NS5A- Δ D1) führt zu einem Einbruch der RNA-Replikationseffizienz bis unter die Nachweisgrenze von HCV-RNA. Das Entfernen von Teilen der D2- oder der kompletten D3- Region hatte jedoch keinen Einfluss auf die RNA-Replikation (46). Eine weitere Studie zu einzelnen Positionen in der D1-Domäne wurden in der Arbeit von Romero-Brey *et al.* 2015 nicht gemacht. Weiter finden sich in der Literatur Hinweise auf eine Rolle von NS5A-D3 für die Assemblierung von infektiösen Viruspartikeln (123) als im Prozess der Replikation.

5.5 NS5A pY93 ist für die Bindung an c-SRC-SH2 entscheidend

Um die Position der Interaktionsstelle in NS5A-D1 für c-SRC- Δ SH1 zu bestimmen, wurden die drei putativen Bindemotive Y93, Y129, Y161 von NS5A-D1 gegen Phenylalanine getauscht. Um auszuschließen, dass keine weitere Tyrosin-Position in D1 entscheidend für die Bindung an c-SRC- Δ SH1 ist, wurden zunächst alle drei Tyrosine getauscht.

Die Messungen im BLI zeigte eine deutliche Abnahme der Affinität der Variante NS5A-D1^{ELK pY} Y93/129/161F gegenüber dem NS5A-D1^{ELK pY} *wt* mit allen sieben Tyrosinen. Der aus diesen Experimenten bestimmte K_d lag deutlich über der größten eingesetzten Analytkonzentration von 40 μ M (Tabelle 4.3).

Damit wurde gezeigt, dass die entscheidende Bindestelle für die c-SRC-SH2-Domäne unter den Kandidaten Y93, Y129, Y161 liegen muss (Abbildung 4.22).

Eine genauere Untersuchung mit Einzel- und Doppelmutanten aller drei Positionen wurde durchgeführt. Dabei wurde NS5A-D1 jeweils in *E. coli*-TKB-1 hergestellt, sodass alle übrigen fünf bzw. sechs Tyrosin-Positionen im Protein phosphoryliert werden konnten.

Es zeigte sich, dass in Abwesenheit von Tyrosin 93 keine Dissoziationskonstante mehr im niedrigen μ M-Bereich beobachtet werden konnte. Dies konnte für die drei NS5A-Varianten Y93F, Y93/129F und Y93/161F (jeweils aus TKB-1-*E. coli*-Stämmen) beobachtet werden (Kapitel 4.3.4).

Wenn beide anderen putativen Bindestellen 129 und 161 gegen Phenylalanine getauscht wurden, aber 93 als Tyrosin weiterhin vorhanden war, konnte eine Bindekonstante nahe der ursprünglich mit dem Wildtyp bestimmten Variante festgestellt werden ($K_d \sim 0,7 \mu$ M). Dies zeigte eindeutig, dass die Phosphorylierung von Tyrosin 93 für die Bindung an c-SRC-SH2 entscheidend ist.

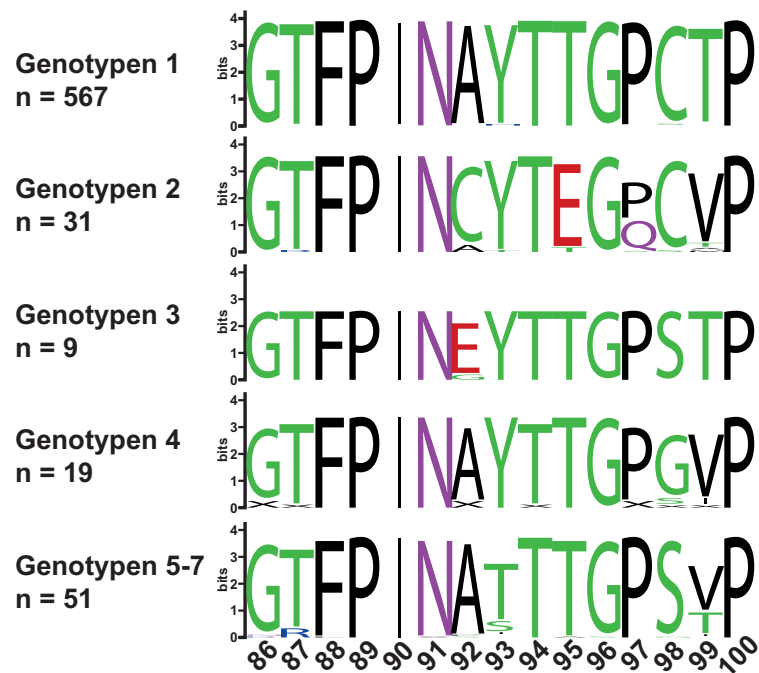


ABBILDUNG 5.2: WebLogos (124) der NS5A-Aminosäurereste 86-100 über die Genotypen 1-7 definiert von Nakano *et al.* 2012 entnommen aus der HCV sequence database (14). Bei den Genotypen 1-4 zeigt sich eine hohe Konserviertheit des Tyrosins 93. Die Genotypen 5-7 zeigen hier häufig ein Threonin.

5.6 NS5A Y93 ist über viele HCV-Genotypen konserviert

Vor dem Hintergrund der hohen Mutationsrate von 10^{-5} bis 10^{-4} im HCV-Genom, sollten die für die Replikation des Virus essentiellen Proteine in ihren Interaktionsregionen eine hohe Konserviertheit aufweisen. Studien zeigten, dass die Interaktion von c-SRC mit NS5A und NS5B für die Replikation entscheidend ist (53), daher sollten die Interaktionsstellen von NS5A mit c-SRC-SH2 eine solche Konserviertheit aufweisen.

Der Vergleich der Position 93 in NS5A zeigt für die Genotypen 1-4 von HCV eine hohe Konserviertheit des Tyrosins. In den weniger häufigen und weniger verbreiteten Genotypen 5 bis 7 zeigt die Position einen häufig auftretenden Austausch zu Threonin (Abbildung 5.2).

Die hohe Konserviertheit von Position 93 zeigt, dass die in dieser Studie gefundene Position einem hohen evolutionären Schutz unterliegt. Dies unterstützt die Annahme der Relevanz dieser Position für die Replikation von HCV.

Die Bindung von NS5A pY93 an c-SRC-SH2 könnte um die intramolekulare Bindestelle für die Kinaseregion mit pY527 konkurrieren und die autoinhibitorische Funktion von c-SRC negativ beeinflussen. c-SRC wäre damit in einer Infektionssituation konstitutiv aktiv, ähnlich wie beim onkogen v-SRC. Dies könnte zu einer gesteigerten Aktivität von c-SRC führen und weitere Phosphorylierungsreaktionen in der Zelle auslösen.

Ähnliche Mechanismen von konstitutiv aktiven Kinasen sind von anderen viralen Infektionen bekannt. So löst zum Beispiel das HIV-1-Nef-Protein, welches mit hoher Affinität an die humane hematopoietic cell kinase (HCK) bindet und diese konstitutiv aktiviert, eine Aktivierung des intrazellulären Cytokin-Signalwege aus (125).

5.7 NS5A Y93F reduziert die HCV-Replikationseffizienz im Replikon-*in vivo*-System

Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit gefundene Interaktionsstelle von c-SRC und NS5A physiologisch relevant ist, wurden von Dr. Sabine Stindt weitere Experimente an Hepatozyten-Zelllinien Huh 7 durchgeführt. Dabei wurden diese Huh 7-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches das Replikon-System von HCV enthält (126). Durch Austausch der Position Y93 von NS5A gegen ein Phenylalanin (Y93F in NS5A, Y2065F im HCV-Polyprotein) sollten Erkenntnisse über die physiologische Rolle dieser Position gewonnen werden.

Die ersten Ergebnisse zeigten, dass durch Austausch des Tyrosins die Replikationseffizienz des HCV-Plasmids deutlich reduziert wird. In der quantitativen realtime PCR (RT-qPCR) war die HCV-RNA Menge in der Y93F-Variante gegenüber dem *wt* HCV-Plasmid deutlich reduziert. Der Austausch anderer Positionen (NS5A 129 und 161 je Y zu F) zeigte in der gleichen Methode keine statistisch signifikanten Veränderungen der HCV-RNA-Menge (Kapitel 4.4.1).

Die gewonnenen Daten in Kombination mit der Literatur (insbesondere von Pfannkuche *et al.* 2011) legen die Vermutung nahe, dass die Y93-Position für den Replikationskomplex aus c-SRC, NS5A und NS5B *in vivo* entscheidend ist.

In einem Pulldown-Experiment mit HCV-Replikon-Plasmid transfizierten Huh 7-Hepatozyten sollte untersucht werden, ob die Modifikation NS5A Y93F dazu führt, dass die Bindung an rekombinantes, immobilisiertes c-SRC- Δ SH1 reduziert wird.

Es zeigte sich jedoch, dass das Expressionsniveau von NS5A-Protein in transienten Replikon Huh 7-Zellen gegenüber stabilen Huh 9-13-Zellen deutlich geringer ist. Die Pulldown-Bedingungen, wie sie für Huh 9-13-Zellen optimiert waren, funktionierten nicht für die transienten Replikonzellen (Kapitel 4.4.2). NS5A konnte in 2,5 μ g Gesamtzellprotein HCV-Replikon-Huh 7 nicht nachgewiesen werden, wohingegen 2,5 μ g Gesamtzellysate von Huh 9-13 ein deutliches NS5A-Signal gaben.

Ein Pulldown-Experiment mit diesen Huh 7-Zellen bedarf einer Optimierung der in einem Pulldown-Assay einzusetzenden Zellzahl und des Gesamtproteins. Die etablierten Mengen mit Huh 9-13 sind kein verlässliches Maß.

Experimente zu einem Phosphomimikri durch Glutamat-Substitution an der Y93-Position (NS5A Y93E) um die Replikationsdefizienz wieder zu retten, wurden noch nicht durchgeführt. Durch Einführung der negativen Ladung des Glutamats könnte es möglich sein die Phosphorylierung zu imitieren. Ähnliche Ansätze wurden bereits zur Auffindung von Serinphosphorylierungen erfolgreich durchgeführt (127), wobei die kürzere Seitenkette des Serins gegenüber dem Tyrosin die Erfolgsaussichten schmälert. In der Literatur finden sich jedoch

auch Beispiele für eine erfolgreiche Tyrosin-Phosphomimikri durch Glutamaustausch (128).

Die RT-qPCR-Untersuchungen zeigen die Wichtigkeit der Position Y93 für die Replikation. Im Kontext von Daclatasvir-Behandlungen sind Resistenzausbildungen an NS5A Position Y93H dokumentiert. Es ist nicht bekannt, in wie weit die Replikationseffizienz durch diesen Austausch reduziert wird.

Die Replikationseffizienz für die Y93F-Variante ist zwar deutlich reduziert, die Replikation kommt jedoch nicht zum vollständigen Erliegen. Wie im Modell des Replikationskomplex dargestellt (Abbildung 1.7), weist der Replikationskomplex von HCV mehrere Interaktionsstellen auf und die massenspektrometrischen Untersuchungen (Kapitel 3.8) legen nahe, dass möglicherweise weitere Interaktionspartner an den Komplex assoziieren und diesen stabilisieren könnten. Der Verlust einer Interaktionsstelle könnte zur Reduktion der Affinität der Komplexbildung führen oder die Komplexstabilität negativ beeinflussen.

Vor dem Hintergrund eines Selektionsdrucks durch Daclatasvir oder Ledipasvir ist es vorstellbar, dass die Reduktion der Affinität von NS5A zum Medikament mit einer Reduktion der Affinität des Proteins zum Gesamtkomplex einhergeht, jedoch den Gesamtkomplex vor Bindung der chemischen Verbindung schützt sowie die Proteindynamik und -Funktionen von NS5A und die Interaktion mit anderen Proteinen teilweise erhält.

Aus Studien mit NS3/4-Protease-Inhibitoren ist bereits bekannt, dass einzelne Aminosäureaustausche, die ohne Selektionsdruck einen Fitnessnachteil aufweisen, sich unter Selektionsstress gegen den wildtypischen Genotypen durchsetzen (104).

5.8 Daclatasvir zeigt keinen Einfluss auf die NS5A-D1^{ELK pY}-Bindung an c-SRC- Δ SH1

Im Kontext mit bereits zugelassenen Medikamenten gegen HCV (vgl. Kapitel 1.5) zeigt sich, dass Position 93 auch hier besonders interessant ist.

Die Medikamente Daclatasvir und Ledipasvir (beide hauptsächlich gegen die Genotypen 1-3 eingesetzt) binden an NS5A-Position 93 sowie an strukturell benachbarten Aminosäureresten mit pM-Affinität (107). Studien über einen Zusammenhang mit einer möglichen NS5A-Phosphorylierung oder Inhibition der Phosphorylierung sind bislang noch keine publiziert.

Erste Experimente zur Bindung von NS5A-D1^{ELK pY} an c-SRC- Δ SH1 in Gegenwart von fM bis hohen μ M Konzentrationen von Daclatasvir zeigten keinen Effekt auf die Bindung (Daten nicht gezeigt).

Dies legt nahe, dass die Medikamente möglicherweise eine Phosphorylierungsreaktion an Tyrosin 93 in der Wirtszelle inhibieren. Eine mögliche Kinase für die Phosphorylierung von Tyrosin 93 ist bislang (Stand 2016) nicht bekannt.

Literaturverzeichnis

- [1] S. M. Feinstone, A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter, and P. V. Holland. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*, 292(15):767–70, 1975. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). doi: 10.1056/NEJM197504102921502. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/163436>.
- [2] Q. L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902):359–62, 1989. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2523562>.
- [3] L. B. Seeff. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*, 36(5 Suppl 1):S35–46, 2002. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). doi: 10.1053/jhep.2002.36806. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407575>.
- [4] M. Charlton, E. Seaberg, R. Wiesner, J. Everhart, R. Zetterman, J. Lake, K. Detre, and J. Hoofnagle. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology*, 28(3):823–30, 1998. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). doi: 10.1002/hep.510280333. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731579>.
- [5] T. Yen, E. B. Keeffe, and A. Ahmed. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol*, 36(1):47–53, 2003. ISSN 0192-0790 (Print) 0192-0790 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488709>.
- [6] G. L. Armstrong, M. J. Alter, G. M. McQuillan, and H. S. Margolis. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology*, 31(3):777–82, 2000. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). doi: 10.1002/hep.510310332. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706572>.
- [7] World Health Organisation. Hepatitis C, Fact sheet No. 164, 2015.
- [8] A. Wasley and M. J. Alter. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*, 20(1):1–16, 2000. ISSN 0272-8087 (Print) 0272-8087 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10895428>.

- [9] R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, J. Abraham, T. Adair, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. Alvarado, H. R. Anderson, L. M. Anderson, K. G. Andrews, C. Atkinson, L. M. Baddour, S. Barker-Collo, D. H. Bartels, M. L. Bell, E. J. Benjamin, D. Bennett, K. Bhalla, B. Bikbov, A. Bin Abdulhak, G. Birbeck, F. Blyth, I. Bolliger, S. Boufous, C. Bucello, M. Burch, P. Burney, J. Carapetis, H. Chen, D. Chou, S. S. Chugh, L. E. Coffeng, S. D. Colan, S. Colquhoun, K. E. Colson, J. Condon, M. D. Connor, L. T. Cooper, M. Corriere, M. Cortinovis, K. C. de Vaccaro, W. Couser, B. C. Cowie, M. H. Criqui, M. Cross, K. C. Dabhadkar, N. Dahodwala, D. De Leo, L. Degenhardt, A. Delossantos, J. Denenberg, D. C. Des Jarlais, S. D. Dharmaratne, E. R. Dorsey, T. Driscoll, H. Duber, B. Ebel, P. J. Erwin, P. Espindola, M. Ezzati, V. Feigin, A. D. Flaxman, M. H. Forouzanfar, F. G. Fowkes, R. Franklin, M. Fransen, M. K. Freeman, S. E. Gabriel, E. Gakidou, F. Gaspari, R. F. Gillum, D. Gonzalez-Medina, Y. A. Halasa, D. Haring, J. E. Harrison, R. Havmoeller, R. J. Hay, B. Hoen, P. J. Hotez, D. Hoy, K. H. Jacobsen, S. L. James, R. Jasrasaria, S. Jayaraman, N. Johns, G. Karthikeyan, N. Kassebaum, A. Keren, J. P. Khoo, L. M. Knowlton, O. Kobusingye, A. Koranteng, R. Krishnamurthi, M. Lipnick, S. E. Lipshultz, S. L. Ohno, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859):2095–128, 2012. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). doi: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245604>.
- [10] J. G. McHutchison, S. C. Gordon, E. R. Schiff, M. L. Shiffman, W. M. Lee, V. K. Rustgi, Z. D. Goodman, M. H. Ling, S. Cort, and J. K. Albrecht. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*, 339(21):1485–92, 1998. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). doi: 10.1056/NEJM199811193392101. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819446>.
- [11] J. G. Bode, E. D. Brenndörfer, J. Karthe, and D. Häussinger. Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication. *Biol Chem*, 390(10):1013–32, 2009. ISSN 1437-4315 (Electronic) 1431-6730 (Linking). doi: 10.1515/BC.2009.118. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19642875>.
- [12] P. Simmonds, J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D. G. Murphy, H. Okamoto, J. M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I. T. Shin, L. J. Stuyver, H. J. Thiel, S. Viazov, A. J. Weiner, and A. Widell. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42(4):962–73, 2005. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). doi: 10.1002/hep.20819. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16149085>.

- [13] D. B. Smith, J. Bukh, C. Kuiken, A. S. Muerhoff, C. M. Rice, J. T. Stapleton, and P. Simmonds. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 59(1):318–27, 2014. ISSN 1527-3350 (Electronic) 0270-9139 (Linking). doi: 10.1002/hep.26744. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24115039>.
- [14] LLC Los Alamos National Security and U.S. Department of Energy’s National Nuclear Security Administration. HCV sequence database hcv.lanl.gov, 2005-2006.
- [15] C. Combet, N. Garnier, C. Charavay, D. Grando, D. Crisan, J. Lopez, A. Dehne-Garcia, C. Geourjon, E. Bettler, C. Hulo, P. Le Mercier, R. Bartenschlager, H. Diepolder, D. Moradpour, J. M. Pawlotsky, C. M. Rice, C. Trepo, F. Penin, and G. Deleage. euHCVdb: the European hepatitis C virus database. *Nucleic Acids Res*, 35(Database issue):D363–6, 2007. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). doi: 10.1093/nar/gkl970. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142229>.
- [16] T. Nakano, G. M. Lau, G. M. Lau, M. Sugiyama, and M. Mizokami. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int*, 32(2):339–45, 2012. ISSN 1478-3231 (Electronic) 1478-3223 (Linking). doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02684.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142261>.
- [17] L. Gu, W. Tong, M. Yuan, T. Lu, C. Li, and L. Lu. An increased diversity of HCV isolates were characterized among 393 patients with liver disease in China representing six genotypes, 12 subtypes, and two novel genotype 6 variants. *J Clin Virol*, 57(4):311–7, 2013. ISSN 1873-5967 (Electronic) 1386-6532 (Linking). doi: 10.1016/j.jcv.2013.04.013. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706765>.
- [18] A. U. Neumann, N. P. Lam, H. Dahari, D. R. Gretch, T. E. Wiley, T. J. Layden, and A. S. Perelson. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*, 282(5386):103–7, 1998. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9756471>.
- [19] D. Moradpour, F. Penin, and C. M. Rice. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*, 5(6):453–63, 2007. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). doi: 10.1038/nrmicro1645. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17487147>.
- [20] Z. Solyom, P. Ma, M. Schwarten, M. Bosco, A. Polidori, G. Durand, D. Willbold, and B. Brutscher. The Disordered Region of the HCV Protein NS5A: Conformational Dynamics, SH3 Binding, and Phosphorylation. *Biophys J*, 109(7):1483–96, 2015. ISSN 1542-0086 (Electronic) 0006-3495 (Linking). doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.040. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26445449>.

- [21] S. Chevaliez and J. M. Pawlotsky. *HCV Genome and Life Cycle*. Horizon Bioscience; 2006, Norfolk (UK), 2006. ISBN 1904933203 9781904933205. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250393>. Tan, Seng-Lai Chevaliez, Stephane Pawlotsky, Jean-Michel Review Book Chapter.
- [22] A. H. Chou, H. F. Tsai, Y. Y. Wu, C. Y. Hu, L. H. Hwang, P. I. Hsu, and P. N. Hsu. Hepatitis C virus core protein modulates TRAIL-mediated apoptosis by enhancing Bid cleavage and activation of mitochondria apoptosis signaling pathway. *J Immunol*, 174(4):2160–6, 2005. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699147>.
- [23] T. Fukutomi, Y. Zhou, S. Kawai, H. Eguchi, J. R. Wands, and J. Li. Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression. *Hepatology*, 41(5):1096–105, 2005. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). doi: 10.1002/hep.20668. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15841445>.
- [24] R. B. Ray, L. M. Lagging, K. Meyer, R. Steele, and R. Ray. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res*, 37(3):209–20, 1995. ISSN 0168-1702 (Print) 0168-1702 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8533458>.
- [25] G. Barba, F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsura, G. Eder, Z. Schaff, M. J. Chapman, T. Miyamura, and C. Brechot. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(4):1200–5, 1997. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9037030>.
- [26] B. Bartosch, J. Dubuisson, and F. L. Cosset. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*, 197(5):633–42, 2003. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615904>.
- [27] F. Penin, C. Combet, G. Germanidis, P. O. Frainais, G. Deleage, and J. M. Pawlotsky. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol*, 75(12):5703–10, 2001. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.75.12.5703-5710.2001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356980>.
- [28] S. Carrere-Kremer, C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin, and J. Dubuisson. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol*, 76(8):3720–30, 2002. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907211>.
- [29] E. Santolini, L. Pacini, C. Fipaldini, G. Migliaccio, and N. Monica. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol*,

- 69(12):7461–71, 1995. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7494252>.
- [30] A. Grakoui, D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22):10583–7, 1993. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8248148>.
- [31] N. Franck, J. Le Seyec, C. Guguen-Guillouzo, and L. Erdtmann. Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol*, 79(5):2700–8, 2005. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.79.5.2700-2708. 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15708989>.
- [32] C. Zhang, Z. Cai, Y. C. Kim, R. Kumar, F. Yuan, P. Y. Shi, C. Kao, and G. Luo. Stimulation of hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity by the NS3 protease domain and by HCV RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 79(14):8687–97, 2005. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.79.14.8687-8697. 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994762>.
- [33] Y. Gwack, D. W. Kim, J. H. Han, and J. Choe. DNA helicase activity of the hepatitis C virus nonstructural protein 3. *Eur J Biochem*, 250(1): 47–54, 1997. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431989>.
- [34] J. M. Pawlotsky. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1):S207–20, 2006. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). doi: 10.1002/hep.21064. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447262>.
- [35] S. N. Gretton, A. I. Taylor, and J. McLauchlan. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol*, 86(Pt 5):1415–21, 2005. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). doi: 10.1099/vir.0.80768-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831953>.
- [36] A. A. Thompson, A. Zou, J. Yan, R. Duggal, W. Hao, D. Molina, C. N. Cronin, and P. A. Wells. Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity. *Biochemistry*, 48(5):906–16, 2009. ISSN 1520-4995 (Electronic) 0006-2960 (Linking). doi: 10.1021/bi801747p. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19146391>.
- [37] R. H. Florese, M. Nagano-Fujii, Y. Iwanaga, R. Hidajat, and H. Hotta. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res*, 90(1-2):119–31, 2002. ISSN 0168-1702 (Print) 0168-1702 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12457968>.

- [38] T. Shimakami, M. Hijikata, H. Luo, Y. Y. Ma, S. Kaneko, K. Shimotohno, and S. Murakami. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol*, 78(6):2738–48, 2004. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990694>.
- [39] T. L. Tellinghuisen and C. M. Rice. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol*, 5(4):419–27, 2002. ISSN 1369-5274 (Print) 1369-5274 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160863>.
- [40] Y. Miyanari, K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*, 9(9):1089–97, 2007. ISSN 1465-7392 (Print) 1465-7392 (Linking). doi: 10.1038/ncb1631. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721513>.
- [41] D. Paul, V. Madan, and R. Bartenschlager. Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land. *Cell Host Microbe*, 16(5):569–79, 2014. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking). doi: 10.1016/j.chom.2014.10.008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25525790>.
- [42] T. L. Tellinghuisen, J. Marcotrigiano, A. E. Gorbalenya, and C. M. Rice. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem*, 279(47):48576–87, 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). doi: 10.1074/jbc.M407787200. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339921>.
- [43] T. L. Tellinghuisen, J. Marcotrigiano, and C. M. Rice. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature*, 435(7040):374–9, 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). doi: 10.1038/nature03580. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15902263>.
- [44] R. A. Love, O. Brodsky, M. J. Hickey, P. A. Wells, and C. N. Cronin. Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus. *J Virol*, 83(9):4395–403, 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.02352-08. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19244328>.
- [45] N. Appel, M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel, and R. Bartenschlager. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*, 4(3):e1000035, 2008. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). doi: 10.1371/journal.ppat.1000035. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369481>.

- [46] I. Romero-Brey, C. Berger, S. Kallis, A. Kolovou, D. Paul, V. Lohmann, and R. Bartenschlager. NS5A Domain 1 and Polyprotein Cleavage Kinetics Are Critical for Induction of Double-Membrane Vesicles Associated with Hepatitis C Virus Replication. *MBio*, 6(4):e00759, 2015. ISSN 2150-7511 (Electronic). doi: 10.1128/mBio.00759-15. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26152585>.
- [47] S. Feuerstein, Z. Solyom, A. Aladag, S. Hoffmann, D. Willbold, and B. Brutscher. ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of a 179 residue fragment of hepatitis C virus non-structural protein 5A. *Biomol NMR Assign*, 5(2):241–3, 2011. ISSN 1874-270X (Electronic) 1874-270X (Linking). doi: 10.1007/s12104-011-9309-2. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21516467>.
- [48] X. Hanouille, A. Badillo, J. M. Wieruszkeski, D. Verdegem, I. Landrieu, R. Bartenschlager, F. Penin, and G. Lippens. Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B. *J Biol Chem*, 284(20):13589–601, 2009. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). doi: 10.1074/jbc.M809244200. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19297321>.
- [49] S. Feuerstein, Z. Solyom, A. Aladag, A. Favier, M. Schwarten, S. Hoffmann, D. Willbold, and B. Brutscher. Transient structure and SH3 interaction sites in an intrinsically disordered fragment of the hepatitis C virus protein NS5A. *J Mol Biol*, 420(4-5):310–23, 2012. ISSN 1089-8638 (Electronic) 0022-2836 (Linking). doi: 10.1016/j.jmb.2012.04.023. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22543239>.
- [50] C. Rosnoblet, B. Fritzingler, D. Legrand, H. Launay, J. M. Wieruszkeski, G. Lippens, and X. Hanouille. Hepatitis C virus NS5B and host cyclophilin A share a common binding site on NS5A. *J Biol Chem*, 287(53):44249–60, 2012. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). doi: 10.1074/jbc.M112.392209. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152499>.
- [51] A. Badillo, V. Receveur-Brechot, S. Sarrazin, F. X. Cantrelle, F. Delolme, M. L. Fogeron, J. Molle, R. Montserret, A. Bockmann, R. Bartenschlager, V. Lohmann, G. Lippens, S. Ricard-Blum, X. Hanouille, and F. Penin. Overall Structural Model of NS5A Protein from Hepatitis C Virus and Modulation by Mutations Confering Resistance of Virus Replication to Cyclosporin A. *Biochemistry*, 56(24):3029–3048, 2017. ISSN 1520-4995 (Electronic) 0006-2960 (Linking). doi: 10.1021/acs.biochem.7b00212. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28535337>.
- [52] D. Ross-Thriepland and M. Harris. Insights into the complexity and functionality of hepatitis C virus NS5A phosphorylation. *J Virol*, 88(3):1421–32, 2014. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.03017-13. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24257600>.
- [53] A. Pfannkuche, K. Büther, J. Karthe, M. Poenisch, R. Bartenschlager, M. Trilling, H. Hengel, D. Willbold, D. Häussinger, and J. G. Bode. c-Src

- is required for complex formation between the hepatitis C virus-encoded proteins NS5A and NS5B: a prerequisite for replication. *Hepatology*, 53(4):1127–36, 2011. ISSN 1527-3350 (Electronic) 0270-9139 (Linking). doi: 10.1002/hep.24214. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21480319>.
- [54] R. Bartenschlager, M. Frese, and T. Pietschmann. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*, 63:71–180, 2004. ISSN 0065-3527 (Print) 0065-3527 (Linking). doi: 10.1016/S0065-3527(04)63002-8. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530561>.
- [55] M. J. Evans, T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz, and C. M. Rice. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446(7137):801–5, 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). doi: 10.1038/nature05654. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17325668>.
- [56] E. Blanchard, S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouille. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 80(14):6964–72, 2006. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.00024-06. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809302>.
- [57] D. M. Tscherne, C. T. Jones, M. J. Evans, B. D. Lindenbach, J. A. McKeating, and C. M. Rice. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol*, 80(4):1734–41, 2006. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.80.4.1734-1741.2006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439530>.
- [58] J. S. Kieft, K. Zhou, R. Jubin, and J. A. Doudna. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA*, 7(2):194–206, 2001. ISSN 1355-8382 (Print) 1355-8382 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11233977>.
- [59] H. Ji, C. S. Fraser, Y. Yu, J. Leary, and J. A. Doudna. Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(49):16990–5, 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). doi: 10.1073/pnas.0407402101. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15563596>.
- [60] G. A. Otto and J. D. Puglisi. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell*, 119(3):369–80, 2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). doi: 10.1016/j.cell.2004.09.038. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15507208>.

- [61] A. Serafino, M. B. Valli, F. Andreola, A. Crema, G. Ravagnan, L. Bertolini, and G. Carloni. Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro. *J Med Virol*, 70(1):31–41, 2003. ISSN 0146-6615 (Print) 0146-6615 (Linking). doi: 10.1002/jmv.10367. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629641>.
- [62] S. M. Thomas and J. S. Brugge. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:513–609, 1997. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706 (Linking). doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.513. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9442882>.
- [63] K. Chojnacka and D. D. Mruk. The Src non-receptor tyrosine kinase paradigm: New insights into mammalian Sertoli cell biology. *Mol Cell Endocrinol*, 415:133–42, 2015. ISSN 1872-8057 (Electronic) 0303-7207 (Linking). doi: 10.1016/j.mce.2015.08.012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26296907>.
- [64] G. B. Cohen, R. Ren, and D. Baltimore. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, 80(2):237–48, 1995. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834743>.
- [65] R. J. Rickles, M. C. Botfield, X. M. Zhou, P. A. Henry, J. S. Brugge, and M. J. Zoller. Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(24):10909–13, 1995. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479908>.
- [66] Z. Songyang, S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider, and et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 72(5):767–78, 1993. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7680959>.
- [67] T. Pawson. Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373(6515):573–80, 1995. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). doi: 10.1038/373573a0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531822>.
- [68] M. J. Wagner, M. M. Stacey, B. A. Liu, and T. Pawson. Molecular mechanisms of SH2- and PTB-domain-containing proteins in receptor tyrosine kinase signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(12):a008987, 2013. ISSN 1943-0264 (Electronic) 1943-0264 (Linking). doi: 10.1101/cshperspect.a008987. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296166>.
- [69] T. J. Boggon and M. J. Eck. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, 23(48):7918–27, 2004. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). doi: 10.1038/sj.onc.1208081. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489910>.

- [70] T. Pawson. New impressions of Src and Hck. *Nature*, 385(6617):582–3, 585, 1997. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). doi: 10.1038/385582b0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9024653>.
- [71] M. T. Brown and J. A. Cooper. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*, 1287(2-3):121–49, 1996. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8672527>.
- [72] H. Piwnica-Worms, K. B. Saunders, T. M. Roberts, A. E. Smith, and S. H. Cheng. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src. *Cell*, 49(1):75–82, 1987. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3103926>.
- [73] A. B. Reynolds, J. Vila, T. J. Lansing, W. M. Potts, M. J. Weber, and J. T. Parsons. Activation of the oncogenic potential of the avian cellular src protein by specific structural alteration of the carboxy terminus. *EMBO J*, 6(8):2359–64, 1987. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2822389>.
- [74] Z. Feng G. Gilliland T.N. Bhat H. Weissig I.N. Shindyalov P.E. Bourne H.M. Berman, J. Westbrook. The Protein Data Bank, 2000.
- [75] LLC Schrödinger. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6, 2015.
- [76] B. A. Liu, E. Shah, K. Jablonowski, A. Stergachis, B. Engelmann, and P. D. Nash. The SH2 domain-containing proteins in 21 species establish the provenance and scope of phosphotyrosine signaling in eukaryotes. *Sci Signal*, 4(202):ra83, 2011. ISSN 1937-9145 (Electronic) 1945-0877 (Linking). doi: 10.1126/scisignal.2002105. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155787>.
- [77] T. Kaneko, H. Huang, B. Zhao, L. Li, H. Liu, C. K. Voss, C. Wu, M. R. Schiller, and S. S. Li. Loops govern SH2 domain specificity by controlling access to binding pockets. *Sci Signal*, 3(120):ra34, 2010. ISSN 1937-9145 (Electronic) 1945-0877 (Linking). doi: 10.1126/scisignal.2000796. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442417>.
- [78] G. Waksman, S. E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn, and J. Kuriyan. Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell*, 72(5):779–90, 1993. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7680960>.
- [79] J. E. Ladbury, M. A. Lemmon, M. Zhou, J. Green, M. C. Botfield, and J. Schlessinger. Measurement of the binding of tyrosyl phosphopeptides to SH2 domains: a reappraisal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8):3199–203, 1995. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7536927>.

- [80] T. Kaneko, H. Huang, X. Cao, X. Li, C. Li, C. Voss, S. S. Sidhu, and S. S. Li. Superbinder SH2 domains act as antagonists of cell signaling. *Sci Signal*, 5(243):ra68, 2012. ISSN 1937-9145 (Electronic) 1945-0877 (Linking). doi: 10.1126/scisignal.2003021. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012655>.
- [81] J. E. Ladbury and S. Arold. Searching for specificity in SH domains. *Chem Biol*, 7(1):R3–8, 2000. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10662684>.
- [82] R. Reinehr, A. Sommerfeld, and D. Häussinger. The Src family kinases: distinct functions of c-Src, Yes, and Fyn in the liver, 2013. URL <http://www.degruyter.com/view/j/bmc.2013.4.issue-2/bmc-2012-0047/bmc-2012-0047.xml>[http://www.degruyter.com/dg/viewarticle.fullcontentlink:pdfeventlink/\\$002fj\\$002fbmc.2013.4.issue-2\\$002fbmc-2012-0047\\$002fbmc-2012-0047.pdf?t:ac=j\\$002fbmc.2013.4.issue-2\\$002fbmc-2012-0047\\$002fbmc-2012-0047.xml](http://www.degruyter.com/dg/viewarticle.fullcontentlink:pdfeventlink/$002fj$002fbmc.2013.4.issue-2$002fbmc-2012-0047$002fbmc-2012-0047.pdf?t:ac=j$002fbmc.2013.4.issue-2$002fbmc-2012-0047$002fbmc-2012-0047.xml).
- [83] R. A. Fridell, D. Qiu, C. Wang, L. Valera, and M. Gao. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(9):3641–50, 2010. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). doi: 10.1128/AAC.00556-10. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585111>.
- [84] S. Reiss, C. Harak, I. Romero-Brey, D. Radujkovic, R. Klein, A. Ruggieri, I. Rebhan, R. Bartenschlager, and V. Lohmann. The lipid kinase phosphatidylinositol-4 kinase III alpha regulates the phosphorylation status of hepatitis C virus NS5A. *PLoS Pathog*, 9(5):e1003359, 2013. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). doi: 10.1371/journal.ppat.1003359. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675303>.
- [85] Y. He, K. A. Staschke, and S. L. Tan. *HCV NS5A: A Multifunctional Regulator of Cellular Pathways and Virus Replication*. Horizon Bioscience Horizon Bioscience., Norfolk (UK), 2006. ISBN 1904933203 9781904933205. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250384>. Tan, Seng-Lai He, Yupeng Staschke, Kirk A Review Book Chapter.
- [86] M. Hughes, S. Griffin, and M. Harris. Domain III of NS5A contributes to both RNA replication and assembly of hepatitis C virus particles. *J Gen Virol*, 90(Pt 6):1329–34, 2009. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). doi: 10.1099/vir.0.009332-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19264615>.
- [87] N. Appel, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol*, 79(5):3187–94, 2005. ISSN 0022-538X (Print)

- 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.79.5.3187-3194.2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709040>.
- [88] M. J. Evans, C. M. Rice, and S. P. Goff. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(35):13038–43, 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). doi: 10.1073/pnas.0405152101. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15326295>.
- [89] K. L. Lemay, J. Treadaway, I. Angulo, and T. L. Tellinghuisen. A hepatitis C virus NS5A phosphorylation site that regulates RNA replication. *J Virol*, 87(2):1255–60, 2013. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.02154-12. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23115292>.
- [90] D. Ross-Thriepland, J. Mankouri, and M. Harris. Serine phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein controls the establishment of replication complexes. *J Virol*, 89(6):3123–35, 2015. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.02995-14. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25552726>.
- [91] T. L. Tellinghuisen, K. L. Foss, and J. Treadaway. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog*, 4(3):e1000032, 2008. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). doi: 10.1371/journal.ppat.1000032. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369478>.
- [92] T. Masaki, S. Matsunaga, H. Takahashi, K. Nakashima, Y. Kimura, M. Ito, M. Matsuda, A. Murayama, T. Kato, H. Hirano, Y. Endo, S. M. Lemon, T. Wakita, T. Sawasaki, and T. Suzuki. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production. *J Virol*, 88(13):7541–55, 2014. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.03170-13. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24760886>.
- [93] T. L. Tellinghuisen, K. L. Foss, J. C. Treadaway, and C. M. Rice. Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol*, 82(3):1073–83, 2008. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.00328-07. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032500>.
- [94] M. Hughes, S. Gretton, H. Shelton, D. D. Brown, C. J. McCormick, A. G. Angus, A. H. Patel, S. Griffin, and M. Harris. A conserved proline between domains II and III of hepatitis C virus NS5A influences both RNA replication and virus assembly. *J Virol*, 83(20):10788–96, 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.02406-08. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656877>.
- [95] D. Ross-Thriepland and M. Harris. Hepatitis C virus NS5A: enigmatic but still promiscuous 10 years on! *J Gen Virol*, 96(Pt 4):727–38, 2015. ISSN

- 1465-2099 (Electronic) 0022-1317 (Linking). doi: 10.1099/jgv.0.000009. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25481754>.
- [96] D. G. Cordek, T. J. Croom-Perez, J. Hwang, M. R. Hargittai, C. V. Subba-Reddy, Q. Han, M. F. Lodeiro, G. Ning, T. S. McCrory, J. J. Arnold, H. Koc, B. D. Lindenbach, S. A. Showalter, and C. E. Cameron. Expanding the proteome of an RNA virus by phosphorylation of an intrinsically disordered viral protein. *J Biol Chem*, 289(35):24397–416, 2014. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). doi: 10.1074/jbc.M114.589911. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031324>.
- [97] M. Quintavalle, S. Sambucini, V. Summa, L. Orsatti, F. Talamo, R. De Francesco, and P. Neddermann. 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*, 282(8):5536–44, 2007. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). doi: 10.1074/jbc.M610486200. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17166835>.
- [98] Y. C. Chen, W. C. Su, J. Y. Huang, T. C. Chao, K. S. Jeng, K. Machida, and M. M. Lai. Polo-like kinase 1 is involved in hepatitis C virus replication by hyperphosphorylating NS5A. *J Virol*, 84(16):7983–93, 2010. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). doi: 10.1128/JVI.00068-10. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534861>.
- [99] S. Yamauchi, K. Takeuchi, K. Chihara, X. Sun, C. Honjoh, H. Yoshiki, H. Hotta, and K. Sada. Hepatitis C Virus Particle Assembly Involves Phosphorylation of NS5A by the c-Abl Tyrosine Kinase. *J Biol Chem*, 290(36):21857–64, 2015. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). doi: 10.1074/jbc.M115.666859. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26203192>.
- [100] K. L. Macarthur, R. Smolic, M. V. Smolic, C. H. Wu, and G. Y. Wu. Update on the Development of Anti-Viral Agents Against Hepatitis C. *J Clin Transl Hepatol*, 1(1):9–21, 2013. ISSN 2225-0719 (Print) 2225-0719 (Linking). doi: 10.14218/JCTH.2013.007XX. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26357602>.
- [101] I. M. Jacobson, J. G. McHutchison, G. Dusheiko, A. M. Di Bisceglie, K. R. Reddy, N. H. Bzowej, P. Marcellin, A. J. Muir, P. Ferenci, R. Flisiak, J. George, M. Rizzetto, D. Shouval, R. Sola, R. A. Terg, E. M. Yoshida, N. Adda, L. Bengtsson, A. J. Sankoh, T. L. Kieffer, S. George, R. S. Kauffman, S. Zeuzem, and Advance Study Team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 364(25):2405–16, 2011. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). doi: 10.1056/NEJMoa1012912. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21696307>.
- [102] M. P. Manns and T. von Hahn. Novel therapies for hepatitis C - one pill fits all? *Nat Rev Drug Discov*, 12(8):595–610, 2013. ISSN 1474-1784

- (Electronic) 1474-1776 (Linking). doi: 10.1038/nrd4050. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23807378>.
- [103] C. Sarrazin and S. Zeuzem. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 138(2):447–62, 2010. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085 (Linking). doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.055. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006612>.
- [104] M. F. McCown, S. Rajyaguru, S. Kular, N. Cammack, and I. Najera. GT-1a or GT-1b subtype-specific resistance profiles for hepatitis C virus inhibitors telaprevir and HCV-796. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(5):2129–32, 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). doi: 10.1128/AAC.01598-08. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273674>.
- [105] M. Nakamura, T. Kanda, Y. Haga, R. Sasaki, S. Wu, S. Nakamoto, S. Yasui, M. Arai, F. Imazeki, and O. Yokosuka. Sofosbuvir treatment and hepatitis C virus infection. *World J Hepatol*, 8(3):183–90, 2016. ISSN 1948-5182 (Print). doi: 10.4254/wjh.v8.i3.183. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26839641>.
- [106] G. Bertino, A. Ardiri, M. Proiti, G. Rigano, E. Frazzetto, S. Demma, M. I. Ruggeri, L. Scuderi, G. Malaguarnera, N. Bertino, V. Rapisarda, I. Di Carlo, A. Toro, F. Salomone, M. Malaguarnera, E. Bertino, and M. Malaguarnera. Chronic hepatitis C: This and the new era of treatment. *World J Hepatol*, 8(2):92–106, 2016. ISSN 1948-5182 (Print). doi: 10.4254/wjh.v8.i2.92. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26807205>.
- [107] D. B. Ascher, J. Wielens, T. L. Nero, L. Doughty, C. J. Morton, and M. W. Parker. Potent hepatitis C inhibitors bind directly to NS5A and reduce its affinity for RNA. *Sci Rep*, 4:4765, 2014. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). doi: 10.1038/srep04765. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24755925>.
- [108] H. J. Kwon, W. Xing, K. Chan, A. Niedziela-Majka, K. M. Brenda, T. Kirschberg, D. Kato, J. O. Link, G. Cheng, X. Liu, and R. Sakowicz. Direct binding of ledipasvir to HCV NS5A: mechanism of resistance to an HCV antiviral agent. *PLoS One*, 10(4):e0122844, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). doi: 10.1371/journal.pone.0122844. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25856426>.
- [109] H. Ma, W. R. Jiang, N. Robledo, V. Leveque, S. Ali, T. Lara-Jaime, M. Masjedizadeh, D. B. Smith, N. Cammack, K. Klumpp, and J. Symons. Characterization of the metabolic activation of hepatitis C virus nucleoside inhibitor beta-D-2'-Deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine (PSI-6130) and identification of a novel active 5'-triphosphate species. *J Biol Chem*, 282(41):29812–20, 2007. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). doi: 10.1074/jbc.M705274200. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698842>.

- [110] Y. Shiota, H. Luo, W. Qin, S. Kaneko, T. Yamashita, K. Kobayashi, and S. Murakami. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem*, 277(13):11149–55, 2002. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). doi: 10.1074/jbc.M111392200. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801599>.
- [111] O. Valda. *Untersuchungen zur Rekonstruktion von c-Src-NS5A-NS5B sowie EDD E3-beta-Catenin - zweier krankheitsrelevanter Proteinkomplexe*. Thesis, 2014. Valda, Olga.
- [112] M. Schwarten, Z. Solyom, S. Feuerstein, A. Aladag, S. Hoffmann, D. Willbold, and B. Brutscher. Interaction of nonstructural protein 5A of the hepatitis C virus with Src homology 3 domains using noncanonical binding sites. *Biochemistry*, 52(36):6160–8, 2013. ISSN 1520-4995 (Electronic) 0006-2960 (Linking). doi: 10.1021/bi400363v. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23947833>.
- [113] A. Aladag, S. Hoffmann, M. Stoldt, C. Bosing, D. Willbold, and M. Schwarten. Hepatitis C virus NS5A is able to competitively displace c-Myc from the Bin1 SH3 domain in vitro. *J Pept Sci*, 20(5):334–40, 2014. ISSN 1099-1387 (Electronic) 1075-2617 (Linking). doi: 10.1002/psc.2618. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616074>.
- [114] J. Bacarizo, S. Martinez-Rodriguez, and A. Camara-Artigas. Structure of the c-Src-SH3 domain in complex with a proline-rich motif of NS5A protein from the hepatitis C virus. *J Struct Biol*, 189(1):67–72, 2015. ISSN 1095-8657 (Electronic) 1047-8477 (Linking). doi: 10.1016/j.jsb.2014.11.004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447263>.
- [115] K. Nakashima, K. Takeuchi, K. Chihara, T. Horiguchi, X. Sun, L. Deng, I. Shoji, H. Hotta, and K. Sada. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS One*, 7(10):e46634, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). doi: 10.1371/journal.pone.0046634. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23077515>.
- [116] M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112:531–52, 1999. ISSN 1064-3745 (Print) 1064-3745 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027275>.
- [117] H. Nakabayashi, K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 42(9):3858–63, 1982. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6286115>.

- [118] R. Fabrini, A. De Luca, L. Stella, G. Mei, B. Orioni, S. Ciccone, G. Federici, M. Lo Bello, and G. Ricci. Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: a critical re-examination. *Biochemistry*, 48(43):10473–82, 2009. ISSN 1520-4995 (Electronic) 0006-2960 (Linking). doi: 10.1021/bi901238t. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19795889>.
- [119] L. A. Witucki, X. Huang, K. Shah, Y. Liu, S. Kyin, M. J. Eck, and K. M. Shokat. Mutant tyrosine kinases with unnatural nucleotide specificity retain the structure and phospho-acceptor specificity of the wild-type enzyme. *Chem Biol*, 9(1):25–33, 2002. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841936>.
- [120] K. J. Livak and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4):402–8, 2001. ISSN 1046-2023 (Print) 1046-2023 (Linking). doi: 10.1006/meth.2001.1262. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>.
- [121] S. M. Lambert, D. R. Langley, J. A. Garnett, R. Angell, K. Hedgethorne, N. A. Meanwell, and S. J. Matthews. The crystal structure of NS5A domain 1 from genotype 1a reveals new clues to the mechanism of action for dimeric HCV inhibitors. *Protein Sci*, 23(6):723–34, 2014. ISSN 1469-896X (Electronic) 0961-8368 (Linking). doi: 10.1002/pro.2456. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639329>.
- [122] H. Schweigel. *Untersuchung der ADP-induzierten Tyrosinphosphorylierung in humanen Thrombozyten*. Thesis, 2012. Schweigel, Hardy.
- [123] M. Zayas, G. Long, V. Madan, and R. Bartenschlager. Coordination of Hepatitis C Virus Assembly by Distinct Regulatory Regions in Nonstructural Protein 5A. *PLoS Pathog*, 12(1):e1005376, 2016. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). doi: 10.1371/journal.ppat.1005376. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26727512>.
- [124] G. E. Crooks, G. Hon, J. M. Chandonia, and S. E. Brenner. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, 14(6):1188–90, 2004. ISSN 1088-9051 (Print) 1088-9051 (Linking). doi: 10.1101/gr.849004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173120>.
- [125] M. Hiyoshi, N. Takahashi-Makise, Y. Yoshidomi, N. Chutiwitoonchai, T. Chihara, M. Okada, N. Nakamura, S. Okada, and S. Suzu. HIV-1 Nef perturbs the function, structure, and signaling of the Golgi through the Src kinase Hck. *J Cell Physiol*, 227(3):1090–7, 2012. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). doi: 10.1002/jcp.22825. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21567396>.
- [126] V. Lohmann, F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285(5424):110–3, 1999. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390360>.

-
- [127] A. Konson, S. Pradeep, C. W. D'Acunto, and R. Seger. Pigment epithelium-derived factor and its phosphomimetic mutant induce JNK-dependent apoptosis and p38-mediated migration arrest. *J Biol Chem*, 286(5):3540–51, 2011. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). doi: 10.1074/jbc.M110.151548. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21059648>.
- [128] K. Nito, C. C. Wong, 3rd Yates, J. R., and J. Chory. Tyrosine phosphorylation regulates the activity of phytochrome photoreceptors. *Cell Rep*, 3(6):1970–9, 2013. ISSN 2211-1247 (Electronic). doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746445>.

Gen	DNA-Sequenz
His ₆ -NS5A-D2D3 191-447	<p>1 ATGGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGGG AAAACCTGTA TTTTCAGGGC CATATGGCTA 71 GCGGATCCCT CCGCGGGCGT GAACCTGAAC CGATGTTTAC CGTTCTGACC AGCATGCTGA CGATCCGAG 141 CCATATTACC GCAGAAAACG CAAAACGTGC TCTGGCACGT GGTAGCCCTC AAGGACGACG 211 GCAAGCCAGC TGAGCGCACG GAGCCTGAAA GCAACCTGTA CCACCCATCA TGATAGTCGG GATGCAGATC 281 TGATTGAAGC AAATCTGCTG TGGCGTCAAG AAATGGGTGG CAATATTACC GCGAATAACA 351 AGTGGTTATC CTGGATAGCT TTGAACCGCT GCATGCAGAT GGTGATGAAC GTGAAATTAG CGTTGCAGCA 421 GAAATTTCTG GTAAAAAGCG TAAATTTCCG AGCGCAGTGC CGATTTGGGC ACGTCCGGAT TATAACCCCT 491 CGCTGCTGGA AAGCTGGAAA GATCCGGATT ATGTTCCGGC TGTGTTTCAT GGTGTCGGC TGCCCGGAC 561 CAAAGCACCG CCTATTCCCG CTCGGCGCTG TAAACGTACC GTTGTCTGA CGAAGAGCAA TGTTAGCAGC 631 GCACTGGCAG AACTGGCAAC CAAAACCTTT GGTAGCAGCG GTAGCAGTGC AGTTGATAGC GGCACCGCAA 701 CCGCTCTGCC GGATCAGGCA AGTGATGATG GTGATAAAGG TAGTGATGTG GAAAGCTATA GCAGCATGCC 771 ACCGCTGGAA GGTGAACCGG GTGATCCGGA TCTGAGTGTG GGTAGCTGGT CAACCGTTAG CGAAGAGGCA 841 AGCGAAGATG TTGTTTGTGG CTA</p>
GST-c-SRC-SH3-SH2 80-249	<p>1 ATGTCCCCCTA TACTAGGTTA TTGAAAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC TOGACTTCTT TTGGAATATC 71 TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTGTATG AGCGCGATGA AGGTGATAAA TGCGGAAAAA AAAAGTTTGA 141 ATTGGGTTTG GAGTTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT GGTGATGTTA AATTAACACA GTCTATGGCC 211 ATCATACGTT ATATAGCTGA CAAGCACAAC ATGTTGGGTG GTTGTCCAAA AGAGCGTGCA GAGATTTCAA 281 TGCTTGAAGG AGCGGTTTTG GATATTAGAT ACGGTGTTTC GAGAATTGCA AATGATAAGC ACTTTGAAAC 351 TCTCAAAGTT GATTTTCTTA GCAAGCTACC TGAATGCTG AAAATGTTGC AAGATCGTTT ATGTCAATAA 421 ACATATTTAA ATGGTGATCA TGTAACCCAT CCTGACTTCA TGTGTATGA CGCTCTTATG GTGTTTAT 491 ACATGGACCC AATGTGCTGG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTAAAA AAACGTATTG AAGCTATCCC 561 ACAAAATTGAT AAGTACTTGA AATCCAGCAA GTATATAGCA TGGCCTTTGC AGGCTGTGCA AGCCACGTTT 631 GGTGGTGGCG ACCATCCTCC AAAATCGGAT CTGGAAGTTC TGTTCAGGGC GCCCTGGGA TCCGAAAAAC 701 TGTATTTTCA GGGCCCGCTG CCGGTGGAG TGACCACCTT TGTGGCCCTC TATGACTATG AGTCTAGGAC 771 GGAGACAGAC CTGTCTTCA AGAAAGCGGA GCGGCTCCAG ATTGTCAACA ACACAGAAAGG AGACTGGTGG 841 CTGGCCCACT CGCTCAGCAC AGGACAGACA GGCTACATCC CCAGCAACTA CGTGGCGCCC TCCGACTCCA 911 TCCAGGCTGA GGAGTGGTAT TTTGGCAAGA TCACCAGACG GGAGTCAGAG GGTGATAGC TGAATCGAGA 981 GAACCCGAGA GGGACCTTCC TCGTGGGAGA AAGTGAGACC ACGAAAGGTG CACTAGCTCT CTCAGTGTCT 1051 GACTTGGACA ACGCCAAGGG CCTCAACGTG AAGCACTACA AGATCCGCAA GCTGGACGAA AGTGGCTTCT 1121 ACATCACCTC CCGCACCCAG TTCAACAGCC TGCAGCAGCT GGTGGCCCTA TACTCCAAAC ACGCCGATGG 1191 CCTGTGCCAC CGCTCACC CAAGTGTGCC CTA</p>
GST-c-SRC-SH2 149-249	<p>1 ATGTCCCCCTA TACTAGGTTA TTGAAAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC TOGACTTCTT TTGGAATATC 71 TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTGTATG AGCGCGATGA AGGTGATAAA TGCGGAAAAA AAAAGTTTGA 141 ATTGGGTTTG GAGTTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT GGTGATGTTA AATTAACACA GTCTATGGCC 211 ATCATACGTT ATATAGCTGA CAAGCACAAC ATGTTGGGTG GTTGTCCAAA AGAGCGTGCA GAGATTTCAA 281 TGCTTGAAGG AGCGGTTTTG GATATTAGAT ACGGTGTTTC GAGAATTGCA AATGATAAGC ACTTTGAAAC 351 TCTCAAAGTT GATTTTCTTA GCAAGCTACC TGAATGCTG AAAATGTTGC AAGATCGTTT ATGTCAATAA 421 ACATATTTAA ATGGTGATCA TGTAACCCAT CCTGACTTCA TGTGTATGA CGCTCTTATG GTGTTTAT 491 ACATGGACCC AATGTGCTGG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTAAAA AAACGTATTG AAGCTATCCC 561 ACAAAATTGAT AAGTACTTGA AATCCAGCAA GTATATAGCA TGGCCTTTGC AGGCTGTGCA AGCCACGTTT 631 GGTGGTGGCG ACCATCCTCC AAAATCGGAT CTGGAAGTTC TGTTCAGGGC GCCCTGGGA TCCGAAAAAC 701 TGTATTTTCA GGGCCCGCTG CCGGTGGAG TGACCACCTT TGTGGCCCTC TATGACTATG AGTCTAGGAC 771 GGAGACAGAC CTGTCTTCA AGAAAGCGGA GCGGCTCCAG ATTGTCAACA ACACAGAAAGG AGACTGGTGG 841 CTGGCCCACT CGCTCAGCAC AGGACAGACA GGCTACATCC CCAGCAACTA CGTGGCGCCC TCCGACTCCA 911 TCCAGGCTGA GGAGTGGTAT TTTGGCAAGA TCACCAGACG GGAGTCAGAG GGTGATAGC TGAATCGAGA 981 GAACCCGAGA GGGACCTTCC TCGTGGGAGA AAGTGAGACC ACGAAAGGTG CACTAGCTCT CTCAGTGTCT 1051 GACTTGGACA ACGCCAAGGG CCTCAACGTG AAGCACTACA AGATCCGCAA GCTGGACGAA AGTGGCTTCT 1121 ACATCACCTC CCGCACCCAG TTCAACAGCC TGCAGCAGCT GGTGGCCCTA TACTCCAAAC ACGCCGATGG 1191 CCTGTGCCAC CGCTCACC CAAGTGTGCC CTA</p>
His ₆ NS5A-D1 33-202	<p>1 ATGCATCATC ATCATCATCA CGAAGAACCTG TATTTTCAGG GTGTTCCGTT TTTTACGCTG CAGCGTGGTT 71 ATAAAGGTGT TTGGCGTGGT GATGTTATTA TGCAGACCAC CTGTCCGCTG GGTGCACAGA TTACCGGGTCA 141 TGTTAAAAAT GGTAGCATGC GTATTGTTGG TCCGAAAAAC GTAGCAATA CTTGGCATGG CACCTTTCCG 211 ATTAATGCAT ATACCACAGG TCCGTTTACC CCGAGTCCGG CACCGAATTA TAGCCGTGCA CTGTGGCGTG 281 TTGCAGCCGA AGAATATGTT GAAGTTACCC GTGTTGGTGA TTTTCAATTA GTGACCGGTA TGACCACCGA 351 TAATGTTAAA TGTCOGTGTG AGGTTCTCTG ACCGGAATTT TTCACCGAAG TTGATGGTGT TCGTCTGCAT 421 CGTTATGCAC CCGCATGTAA ACCGCTGCTG CGTGAAGAAG TTACCTTTCA GGTGTTGCTG AATCAGTATC 491 TGGTTGGTAG CCAAGTGCAG TGTGAACCCG AACCGGATGT TGCAGTTCTG ACCAGCATGT AATAATGA</p>
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y93F	<p>1 ATGCATCATC ATCATCATCA CGAAGAACCTG TATTTTCAGG GTGTTCCGTT TTTTACGCTG CAGCGTGGTT 71 ATAAAGGTGT TTGGCGTGGT GATGTTATTA TGCAGACCAC CTGTCCGCTG GGTGCACAGA TTACCGGGTCA 141 TGTTAAAAAT GGTAGCATGC GTATTGTTGG TCCGAAAAAC GTAGCAATA CTTGGCATGG CACCTTTCCG 211 ATTAATGCAT TTACCACAGG TCCGTTTACC CCGAGTCCGG CACCGAATTA TAGCCGTGCA CTGTGGCGTG 281 TTGCAGCCGA AGAATATGTT GAAGTTACCC GTGTTGGTGA TTTTCAATTA GTGACCGGTA TGACCACCGA 351 TAATGTTAAA TGTCOGTGTG AGGTTCTCTG ACCGGAATTT TTCACCGAAG TTGATGGTGT TCGTCTGCAT 421 CGTTATGCAC CCGCATGTAA ACCGCTGCTG CGTGAAGAAG TTACCTTTCA GGTGTTGCTG AATCAGTATC 491 TGGTTGGTAG CCAAGTGCAG TGTGAACCCG AACCGGATGT TGCAGTTCTG ACCAGCATGT AATAATGA</p>
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y129F	<p>1 ATGCATCATC ATCATCATCA CGAAGAACCTG TATTTTCAGG GTGTTCCGTT TTTTACGCTG CAGCGTGGTT 71 ATAAAGGTGT TTGGCGTGGT GATGTTATTA TGCAGACCAC CTGTCCGCTG GGTGCACAGA TTACCGGGTCA 141 TGTTAAAAAT GGTAGCATGC GTATTGTTGG TCCGAAAAAC GTAGCAATA CTTGGCATGG CACCTTTCCG 211 ATTAATGCAT TTACCACAGG TCCGTTTACC CCGAGTCCGG CACCGAATTA TAGCCGTGCA CTGTGGCGTG 281 TTGCAGCCGA AGAATATGTT GAAGTTACCC GTGTTGGTGA TTTTCAATTA GTGACCGGTA TGACCACCGA 351 TAATGTTAAA TGTCOGTGTG AGGTTCTCTG ACCGGAATTT TTCACCGAAG TTGATGGTGT TCGTCTGCAT 421 CGTTATGCAC CCGCATGTAA ACCGCTGCTG CGTGAAGAAG TTACCTTTCA GGTGTTGCTG AATCAGTATC 491 TGGTTGGTAG CCAAGTGCAG TGTGAACCCG AACCGGATGT TGCAGTTCTG ACCAGCATGT AATAATGA</p>
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y161F	<p>1 ATGCATCATC ATCATCATCA CGAAGAACCTG TATTTTCAGG GTGTTCCGTT TTTTACGCTG CAGCGTGGTT 71 ATAAAGGTGT TTGGCGTGGT GATGTTATTA TGCAGACCAC CTGTCCGCTG GGTGCACAGA TTACCGGGTCA 141 TGTTAAAAAT GGTAGCATGC GTATTGTTGG TCCGAAAAAC GTAGCAATA CTTGGCATGG CACCTTTCCG 211 ATTAATGCAT TTACCACAGG TCCGTTTACC CCGAGTCCGG CACCGAATTA TAGCCGTGCA CTGTGGCGTG 281 TTGCAGCCGA AGAATATGTT GAAGTTACCC GTGTTGGTGA TTTTCAATTA GTGACCGGTA TGACCACCGA 351 TAATGTTAAA TGTCOGTGTG AGGTTCTCTG ACCGGAATTT TTCACCGAAG TTGATGGTGT TCGTCTGCAT 421 CGTTATGCAC CCGCATGTAA ACCGCTGCTG CGTGAAGAAG TTACCTTTCA GGTGTTGCTG AATCAGTATC 491 TGGTTGGTAG CCAAGTGCAG TGTGAACCCG AACCGGATGT TGCAGTTCTG ACCAGCATGT AATAATGA</p>
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y93/129F	<p>1 ATGCATCATC ATCATCATCA CGAAGAACCTG TATTTTCAGG GTGTTCCGTT TTTTACGCTG CAGCGTGGTT 71 ATAAAGGTGT TTGGCGTGGT GATGTTATTA TGCAGACCAC CTGTCCGCTG GGTGCACAGA TTACCGGGTCA 141 TGTTAAAAAT GGTAGCATGC GTATTGTTGG TCCGAAAAAC GTAGCAATA CTTGGCATGG CACCTTTCCG 211 ATTAATGCAT TTACCACAGG TCCGTTTACC CCGAGTCCGG CACCGAATTA TAGCCGTGCA CTGTGGCGTG 281 TTGCAGCCGA AGAATATGTT GAAGTTACCC GTGTTGGTGA TTTTCAATTA GTGACCGGTA TGACCACCGA 351 TAATGTTAAA TGTCOGTGTG AGGTTCTCTG ACCGGAATTT TTCACCGAAG TTGATGGTGT TCGTCTGCAT 421 CGTTATGCAC CCGCATGTAA ACCGCTGCTG CGTGAAGAAG TTACCTTTCA GGTGTTGCTG AATCAGTATC 491 TGGTTGGTAG CCAAGTGCAG TGTGAACCCG AACCGGATGT TGCAGTTCTG ACCAGCATGT AATAATGA</p>
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y93/161F	<p>1 ATGCATCATC ATCATCATCA CGAAGAACCTG TATTTTCAGG GTGTTCCGTT TTTTACGCTG CAGCGTGGTT 71 ATAAAGGTGT TTGGCGTGGT GATGTTATTA TGCAGACCAC CTGTCCGCTG GGTGCACAGA TTACCGGGTCA 141 TGTTAAAAAT GGTAGCATGC GTATTGTTGG TCCGAAAAAC GTAGCAATA CTTGGCATGG CACCTTTCCG 211 ATTAATGCAT TTACCACAGG TCCGTTTACC CCGAGTCCGG CACCGAATTA TAGCCGTGCA CTGTGGCGTG 281 TTGCAGCCGA AGAATATGTT GAAGTTACCC GTGTTGGTGA TTTTCAATTA GTGACCGGTA TGACCACCGA 351 TAATGTTAAA TGTCOGTGTG AGGTTCTCTG ACCGGAATTT TTCACCGAAG TTGATGGTGT TCGTCTGCAT 421 CGTTATGCAC CCGCATGTAA ACCGCTGCTG CGTGAAGAAG TTACCTTTCA GGTGTTGCTG AATCAGTATC 491 TGGTTGGTAG CCAAGTGCAG TGTGAACCCG AACCGGATGT TGCAGTTCTG ACCAGCATGT AATAATGA</p>

Gen	DNA-Sequenz
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y93/129/161F	<pre> 1 ATGCATCATC ATCATCATCA CGAGAACCTG TATTTTCAGG GTGTCCGTT TTTTAGCTGT CAGCGTGGT 71 ATAAAGGTGT TTGGCGTGGT GATGGTATTA TGCAGACCAC CTGTCCGTT GGTGCACAGA TTACCGGTCA 141 TGTTAAAAAT GGTAGCATGC GTATTGTTGG TCCGAAAACC TGTAGCAATA CCTGGCATGG CACCTTCCG 211 ATTAATGCAT TTACCACAGG TCCGTGTACC CCGAGTCCGG CACCGAATTA TAGCCGTGCA CTGTGGCGTG 281 TTGCAGCCGA AGAATATGTT GAAGTTACCC GTGTGGTGA TTTTCATTT GTGACCCGTA TGACCACCGA 351 TAATGTAAA TGTCCGTCTC AGGTTCCTGC ACCGGAATTT TTCACCGAAG TTGATGGTGT TCGTCTGCAT 421 CGTTTTCGAC CGGCATGIAA ACCGCTGCTG CGTGAAGAAG TTACCTTCA GGTGGTCTG AATCAGTATC 491 TGGTTGGTAG CCAGCTGCCG TGTGAACCGG AACCGGATGT TGCAGTCTG ACCAGCATGT AATAATGA </pre>

HCV-Replikon-Plasmid Genotyp 1b:

1 GCCAGCCCC GATTGGGGG GACACTCCAC CATAGATCAC TCCCTGTGA GAAACTACTG TCTTACGCA GAAAGCGTCT AGCCATGGCG TTAGTATGAG
101 TGTCGTGCGC CTTCAACGGC CCCCCTCCCC GGGAGAGCCA TAGTGGTCTG CGGAACCCGGT GAGTACACCG GAATTTGCCAG GAGCAGCCGG TCCTTTCTTG
201 GATCAACCGC GTCATCCGCT GGAGATTTGG GGGTGGCCCG GCGAGACTGC TAGCCGAGTA GTGTGGGTC GCGAAAGGCC TTGTGGTACT GCGGATAGAG
401 GTGCTTGCGA GTCCCGCGGG AGGTCTCGTA GACCGTGCAC CATGAGCAGC AATCCTAAAC CTCAAAGAAA AACCAAACGT AACCAAACGT GCGGCCACCA
401 GGACGTCAAG TTCCCGGGGG GTGGTCAGAT CGTGGGTGGA GTTTACTGTT TGGCGCGCAG GGGCCOCCAG TTGGGTGTGC GGGGCACTTC GGGGACTTCC
501 GAGCGGTGCG AACCTCGTGG AAGGGGACAA CCTATCCCCA AGGCTGGCCA GCGCGAGGGT AGGGCCTGGG CTCAGCCCGG GTACCCCTGG CCCCTCTATG
601 GCAATGAGGG TTGGGGTGG CGAGGATGGC TCTGTGTCAC CGGTGGCTCT GGGCTAGTGT GGGGCCCCAC GGACCCCGGG CGTAGTTCGG CCAATTTGGG
701 TAAGGTCACT GATACCCCTCA CTGTCGGGTT CGCCGATCTC ATGGGGTACA TTCCGCTCGT CGCGCGCCCC CTAGGGGGGG CTGCCAGGGC GCTGGCGCAT
801 GGGCTCGGG TTCTGGAGGA GCGCGTGAAC TATGCAACAG GAAATCTGCC CGGTGTCTCC TTTTCTATCT TCCTTTTGGC TTTGTCTGCC TGTGTGACCA
901 TGCCAGCTTC CGCTTATGAA GTGCGCAACG TATCCGGAGT ATCCCATGTC ACGAACGACT GCTCCAACCG AACCATTTGG TATGAGGACA CCGGACATGAT
1001 CATGCATACC CCGGGTGGG TGCCCTGGT TCGGGAGAAC AACTCCTCCC GCTGCTGGT AGCGCTCACT CCCACGGCTG CCGCCAGGAA CGGTAGGGTC
1101 CCCACTACGA CGATACGAGC CCATGTGATG TTGCTCGTTG GGGGGGTGCG TCTCTGCTCC GCTATGTACG TGGGAGATCT CTGCGGATCT GTTTTCTCTG
1201 TCGCCAGCTT GTTCACTTTC TCGCCTGGCC GGCACGAGAC AGTACAGGAC AGTACAGGAC TGCAATTGCT CAATATATCC CGGCCACGTG ACAGGTCAAC GTATGGCTTG
1301 GGATATGATG ATGAACTGGT CACTACAGCG AGCCCTAGTG GTATCGCAGT TACTCCGGAT CCCACAAGCT GTGCTGGATA TGGTGGCGGG GCGCCATTGG
1401 GGAGTCTCTAG CCGGCTTGGC CTACTATTCC ATGGTGGGGA ACTGGGCTAA GTTCTGATG GTGATGCTAC TCTTTGCCGG CGTTGACGGG GGAACCTATG
1501 TGACAGGGGG GAGCATGGCC AAAAACACCC TCGGGATTAC GTCCCTCTTT TCACCCGGGT CATCCCGAAA AATCCAGCTT GTAACACACA ACGGCAGCTG
1601 GGACATCAAC AGGACTCGCC TGAAGTCCCT AACACTGGGT TCCTTGTGCT CGTGTCTTAC GTGCAAACT TCAACTCATG TGTGTCGCCA
1701 GAGCGCATGG CCAGCTCGAG CCCCATCGAC CGGTTGCTCC AGGGTGGGG GCCCATCACT TACAATGAGT CACACAGCTC GGACAGAGG CCTTATTGTT
1801 GGCACTACGG ACCCGGGCGG TGCGGATGCG TACCCGGGGC GGAGGTGTGT GGTCCAGTGT ACTGCTTCCG CCCAAGCCCT GTGCTGGTGG GGACGAGCCA
1901 CCGGTTGGCG GTCCACTTCT TCGCCTGGCC GGCACGAGAC AGTACAGGAC AGGGAATGAG ACGGACGGGT TGCTTCTTAA CAACACGGGG CCGCCGCAAG GCAACTGGTT
2001 TGGATGAAAT GCACTGGGTT CACCAAGACG TCGGGGGGGC CCCCCTGTAA CATCGGGGGG ATCGGCAATA AACCTTGGAC CTCGCCCAAG GACTCTTCC
2101 GGAAGCACCC CGAGGCCACT TACACCAAGT GTGGTTCGGG GCTCTGGTGT ACACCCAGAT GCTTGTGTTCA CTACCCATAC AGGCTTGGC ACTACCCCTG
2201 CACTGTCAAC TTTACCATCT TCAAGTTAGG GATGTACGTG GGGGGAGTGG AGCAGAGGCT CGAAGCGGCA TGCAATTGGA CTCGAGAGA GCGTGTAAAC
2301 CTGAGGACA TGGACAGATC AGAGCTTAGC CGCTGCTGCG TGTCTACAAG GAGTGGCAG GTATTGCCCT GTTCTCTTCC ACCCTCCCTG CCTCTGTCCA
2401 CTGGTTGATG CCATCTCCAT CAGAACGTGG TGGACGTACA ATACTGTAC GGTATAGGGT CGGGGTTGTT CTCCTTTGCA ATCAAAATGG AGTATGTCTT
2501 GTTGCTCTTC CTTCCTTGGG CGGACGGGGG CGTCTGTGCC TGCTTGTGGA TGATGTGCTG GATAGCTCAA GGTGAGCGCG CCTAGAGAAA CCTGTGGTTC
2601 CTCAACGGCG CACTCGTGGC GGGGGCGCAT GGCATTCTCT CTTCTCTGTT GCTGCTGGT ACATCAAGGG CAGGCTGGTC GCTGGGGGG CCTGGGGTTC
2701 CATATGGCCCT CTACGGCGTA TGCCCGCTAC TCTGTCTCTT GCTGGCGTTA CCACCAAGAG CATAGCCCAT GGACCGGGAG ATGGACATAT CCGTGGAGG
2801 CGCGGTTTTG GTAGGTCTGA TACTTTAGC CACTATAAGC TTTTCTCGCG TAGSCTCATA TGGTGGTTAC AATATTTTCT CAGCAGGGCC
2901 GAGGCACACT TGAAGTGTG GATCCCGCCC CTCACAGTTC GGGGGGGGGC CGATGCCGTC ATCTCTCTCA CGTGGCGGAT CCACCCAGAT CTAACTTTTA
3001 CCATCACCAA AATCTTGCTC GCCATACTCG GTCCACTCAT GGTGCTCCAG GCTGGTATAA CCAAAGTGCC GTACTTCGTG CGGCGACACG GGCTCATTOG
3101 TGATGCAATG CTGGTGGGGA AGTGTGGTGG GGTTCATTAT TCTCCAAATGG TCTCATGAAA GTTGGCGGCA CTGACAGGTA GTGACAGGTA TGACCATTCT
3201 ACCCCACTCG GGCAGCTGGC CAACGGGGGG CTACGAGACC TTCCGGTGGC AGTTGAGCCC GTGCTTCTCT CTGATATGGA GACCAAGGTT ATCACTGGG
3301 GGGCAGACAC CCGCGCTGTG GGGACATCA TCTTGGGGCT CCCCCTCTCC GCGCGCAGGG GGAGGAGAGT ACATCTGGGA CCGGACAGCA GCGTGAAGG
3401 CAGGGGGTGG GCACTCTCGC CGCTATTAC GGCCTACTCC CAACAGAGCG GAGGCTACTT TGGCTGCATC ATCACTAGCC TCACAGGGCG GGACAGAACT
3501 CGAGTCAAGT GGAAGTCCA AGTGTCTCC ACCGCAACAC AATCTTTTCT TGGCGACCTG CTCATATGGG TGTGTTGGAC TGTCTATCAT GGTGCGGGC
3601 CAAAGACCTT TGCCGGCCCA AAGGCCCAA TCACCCAAAT GTACACCAAT GTGGACCAG ACCTCTGTCG CTCGCAAGCG CCCCCTGGGG CCGCTTCTT
3701 GACCAACTCG ACCTGGGGA GCTCGGAAC TTAATTTGGT ACGAGGCATG CGATGTGAT TCCGGTGGCG CCGCGGGGGC ACAGAGGGGG GAGCCTACTC
3801 TCCCCACGGC CCGTCTCTTA CTTGAAGGGC TCTCCGGGGG GTCCACTGCT GTCCACTGCT GTCCACTGCT GTCCACTGCT TGGGCACTTT TCGGGTGGC TGTGCAACC
3901 GAGGGGTTGG GAAGCGGTTG GACTTTGTAC CCGTCCAGTC TATGAAACC ACTATGCGGT CCCCCTGTTT CACGGACAAC TCGTCCCCTC CCGGCTTACC
4001 CAGACATATC CAGGTGGCGT ATCTACACGC CCCTACTGGT AGCGGCAAGA GCACTAAGGT CCGCGGTGGG TATGCAAGCC AAGGTTATAA GGGTCTGTG
4101 CTGAACCCCT CGTGGCGGCC CACCTAGTGT TCCGGGGGCT ATATGTCTAA GGCACATGGT ATGCAACCTA ACATCAGAAC CCGGGTAAAG ACCATCACCA
4201 CCGGTGGCCC CATCACGTAC TCCACTATG CCAAGTTTCT TGGCGACGCT GGTGTCTGTT GGGGCGCTCA TGACATCATA ATATGTGATG AGTGGCACTC
4301 AACTGACTCG ACCACTATCC TGGGCATCG CACAGTCTGT GACCAAGCGG AGACGGCTGG AGCGGACTC GTGCTGCTCG CCACCGCTAC GCCTCGGGGA
4401 TCGGTACCGG TGCCACATCC AAACATCGAG GAGGTGGCTC TGTCCAGCAC TGGAGAAATC CCCCCTTATG GCAAAGCCAT CCCCATAGAG ACCATCAAGG
4501 GGGGGAGGGA CTTCAATTTT TGCCATTCCA AGAAGAAATG TGATGAGCTC GCGCGGAAGC TGTCCGGGCT GCGACTCAAT GCGACTGGAT ATTACGGGGG
4601 CTTTATGATG TCGCTCATA CAACTAGCGG AGACGTCTAT TGTGTAGCAA CAGACGCTCT AATGACGGGG TTTACCGGGC ATTTGCACTC AGTATCGCAC
4701 TGCAATACAT GTGTCAACCA CAGAGTGCAC TTTACGCTGG ACCCGACTTT CACCAATTGAG AGCAGGACCC TGCCACAAGA CCGGCTGATCA CCGTGGCAAG
4801 GGGAGGCGAG GACTGTTAGG GGCAGATGG CATTATACAG GTTTGTGACT CCAGAGAAC GGGCCTCGGG CATGTTGAT TCTCTGGTTC TGTGCGAGT
4901 CTATGACGGC GGCTGTGCTT GGTACGAGCT CACGCCCCGG GAGACCTCAG TTAGGTTGGG GGCTTACCTA AACACACAG GGTTCGCCCT CTGCCAGGAC
5001 CATCTGGAGT TCTGGAGAGC CGTCTTTACA GGCCTCACCC ACATAGAGCC CCAATTTCTG TCCCAGACTA AGCAGGCGAG AGACAACTTC CCTCATCTG
5101 TAGCATAACA GGTACGGTGT TGCCCGAGGG CTCAGCTCCC ACTCCATCGG TGGGACAAA TGTGGAAGTG TCTCATAAG CTAAAGCCTA CCGTCAAGG
5201 GCGAACGGCC CTGCTGTATA GGTGGGAGC CGTTCAAAAC GAGGTTACTA CACACACACC CATAACCCAA TACATCATGG CATGATGTC GGTGCAACCT
5301 GAGGTCTGTA CAGGACCGTT GGTGCTGTTA GCGGAGTCTG TAGCAGCTCT GGGCGGATAT TGGCTGACAA CAGGCAAGCT GGTCAATTTG GCGGACATCA
5401 TCTTTGCCGG AAAGCCGGG ATCATTCCCG ACAGGGAAGT CTTTACCGG AGTGGTGAAGA AGTGGCGCTA GTGCCCTCA CACCTCTCTC ACATGAAACA
5501 GGAATGCGAG CTCGCCGAAC AATTCAAACA GAAGGCAATC GGGTGTGCTG AAACAGCCAC CAAGCAAGCG GAGGCTGCTG CTCGCCGTTG GGAATCCAAG
5601 TGCGGGACCC TGAAGCCCTT CTGGGGGAAG CATATGTGGA ATTTCAATCAG CGGGATACAA TATTTAGGAG GCTTGTCCAC TCTGCTGGCG AACCCCGGGA
5701 TGCCATCACT GTGCACTTCA ACAGCTCTTA TCACCGAGCC GCTCAACCCC TCTGTTTTAA CATCTCGGGG GATCGGTGGG CCGCCCAACT
5801 TGCTCTCCCG AGCGTCTGTT CTGCTTTGTT AGGCGCCGGC ATGCTGTGAG CCGCTGTGTT CAGCATAGCC CTTGGGAAGG TGCTTGTGGA TATTTGGGA
5901 GGTATGAGAG AGCGGGTGGC AGGCGGCTCT GTGCGCTTTA AGTTCATGAG GCGGAGATG CCCTCCAGCC AGGACTCTGT TAACTACTC CTGCTATACC
6001 TCTCCCTCGG CCGCTAGTCT GTGCGGGTGG TGTGCGCAGC GATAGTCTGT CCGCACGTTG GCCCAGGGGA GGGGGCTGTG CAGTGGATGA ACCGCTGAT
6101 AGCGTTCGCT TGCCGGGGTA ACCACTGCTC CCCCACGCAC TATGTGCTGT AGACCGACCG TGCAGCAGCT GTCACTCAGA TCTCTCTAG TCTTACCATC
6201 ACTCAGCTCG TGAAAGAGGT TCACCAGTGG ATCAACGAGG ACTGCTCCAC GCGCTGCTCC GCGCTGTTGG TAAGAGATGT TTGGGTTAGG ATAGCACCGG
6301 TGTGACTGTA TTTAAGAAAC TGCTTCCAGT CCAAGCTCCT CCGCGGATTG CCGGAGTACC CCTTCTTCTC ATGTCAACGT GGGTACAAGG GAGTCTGGG
6401 GGGGGAGCGC ACTATGCAA CCACCTGCCC ATGTGGAGCA CAGATGTGAA AAACGGGTTCC ATGAGGATG ATGAGGATG TGGGGGGGG CAGCTGTAGT
6501 AACAGTGGC ATGGAACATT CCCCATAAC GGTACACACA CCGGCCCCCT CACGCCCTCC CCGGCGCAA ATTAATCTAG GCGCTGTGG CCGGTGCTG
6601 CTGAGGAGTA CBTGGAAGTT ACGGCGGTGG GGGATTTCCA CTGATGACCA CTGACAAGCT ATGAGTCCCG AAAGTGGCCG TGTGCTGCT CCGCCCGGGA
6701 ATTTCTCACA GAAGTGTGAT GGGTGGGTT GCACAGGTAC GCTCCAGCTG GCAAAACCCCT CTAAGCGGAG GAGTGCATAT TCTGTGTCGG GCTCAATCAA
6801 TACCTGGTGG GTCACAGCT CCCATGGGAG CCGGAACCCG ACGTAGCAGT GCTCACTTCC ATGTCCACC ACCCCCTCCA CATTACGGG GAGACGGGTA
6901 AGCTAGGCTT GGCACGGGGA TCTCCCCCTC TCTGGCCGAG CTCATCAGCT AGCCAGCTGT CTGCGCCCTT CTTGAAGGCA ACATGCATA CCGTCAATGA
7001 CCCCCGGAC GCTGACCTCA TCGAGGCCAA CCTCCTGTGG CCGCAGGAGA TGGCGGGGAA CATCACCCGC GTGGAGTCCG AAAATAAGT AGTAATTTG
7101 GACTCTTTTC AGCCCTCCA AGCGGAGGAG GATGAGAGGG AAGTATCCGT TCCGGCGGAG ATCCTGCGGA GTTCCAGGAA ATTCCTCGA GCGATGCCA
7201 TATGGGCAAG CCGCGATTAC AACCTCCAC TGTAGAGTCT CTGGAAGGAC CCGGACTACG TCCCTCCAGT GGTACAGCGG TGTCCATTGC CCGCTGCCAA
7301 GCGCCCTCCG ATCAACCTTC CACGAGGAAA GAGGACGTTA ACTCTCCCTC TCTTCTGCG ATGCTGCGAG TGGCGGAGC TCGCCACAAA GACTCTGCG
7401 AGCTCCGAAT CGTGGCGGCT CGACAGCGGC ACGGCAACGG CCTCTCTGTA CAGCCCTCC GACGAGCGCG ACGGGGATC CGACGTTGAG TCGTACTCCT
7501 CCATGCCCCC CTTTGAAGGG GAGCGGGGG ATCCCGATCT CAGCGAGGG TCTTGTGCTA CCGTAAAGGA GGAGGCTAGT GAGGACGTG TCTGTGCTC
7601 GATGTCTTAC ACATGGACAG GCGCCCTGAT CACGCCATGC GCTGCGGAGG AAACCAAGCT GCCCATCAAT GCACGTGACA ACTCTTTGCT CCGTACCAC
7701 AACTTGGTCT ATGCTCAAC ATCTCGCAGC GCAAGCCTGC GGCAGAGAAA GGTCACTTTT GACAGACTGC AGGTCTGGA CGACCACTAC CCGGACGTG
7801 TCAAGGAGAT GAAGCGAAG CGTCCACAG TTAAGGCTAA ACTTCTATCC GTGGAGGAA CTTGTAAGCT GACGCCCCCA CATTGGCCA GATCTAAAT
7901 TGCTATGGG GCAAAGGAG TCCGGAACT ATCCAGGACC CCGGTTAACC ACATCGGCTC CGTGTGGAAG GACTGTCTG AAGACATGA GACACAAAT
8001 GACACCACCA TCAATGGCAA AAATGAGGTT TCTTGGCTCC AACCCAGAAA GGGGGGGCGG AAGCCAGCTC GCCTTATCGT ATTTCCAGT TTGGGGGTT
8101 GTGTTGGGGA GAAAATGGCC CTTTACGATG TGGTCTCCAC CCTCCCTCAG CCGGTGATGG GCTCTTCATA GCGATTCCAA TACTCTCGC GAGGAGGGT
8201 CGAATTCCTG TGAATGCCT GAAAAGCGAA GAAATGCCCT ATGGGCTTCG CATATGACAC CCGCTGTTTT GACTCAACGG TCACTAGAAA TGACATCGT
8301 TTTGAGGAGT CAATCTACCA ATGTTGTGAC TTGGCCCGCG AAGCCAGACA TCGCTCAGAG CCGCTCAGAG ACGCGCTTTA CATCGGGGGC CCGCTACTA
8401 ATTTCAAAGG CAGAAGCTGC GGTATCGCC GGTGCCCGCG GAGCGGTGTA CTGACGACCA GCTGCGGTAA TACCCTACA GTTACTTGA AGGCGCTG
8501 GCGCTGTGCA GCTGAGGATC TCCAGACTG CACGATGCTC GTATGCGGAG ACGACTTGTG GTTATCTGTT GAAAGCGCGG GGACCCAGG GAAAGCGGG
8601 AGCCTACGGC CTTTCCGGA GGTATGACT AGATACTCTG CCCCCTGCG GACCCCGCCC AAACAGAAAT ACGACTTGA GTTGATAACA TCACTCTCT
8701 CCAATGTGTC GTCCGCGCAC GATGCATCTG GCAAAAGGTT GATCATCTC ACCCGTGAAC CCACACCCC CTTTGGCGGG GCTGCGTGGG AGACAGCTAG
8801 ACACACTCCA ATCAATTCCT GGTAGGCAA ACTCATATG TATGGCCCCA TATGGCGGCG AAGGATGATC CTGATGACTC ATTTCTTCTC CACTTCTTA
8901 GCTCAGGAA ACCTTGA AAAAGCCCTAGT TGTGATGAT ACGGGGCTG TACTCCATG GAGCCTACTG ACCTACTCA GATCACTCAA GATCACTAG
9001 GCGTTAGGCC ATTTTCACT CATAGTACT CTCCAGGTGA GATCAATAGG GTGGCTTCA CTCCAGGAA ACTTGGGTA CCGCCCTTGC GAGTCTGGG
9101 ACATCGGGCC AGAAGTGTCC CCGCTAGGCT ACTGCCCCAG GGGGGAGGG CTGCCACTTG TGGCAAGTAC CTCTCAACT GGGGAGTAC GACCAAGCTC
9201 AAATCTACT GTCCCTGGG TGCSTCCAG TTGGATTTAT CACGCTGGTT CGTGTCTGTT TACAGCGGGG GAGACATATA TCACAGGCTG TCTGCTGCC
9301 GACCCCGCTG TTTATGTTG TGCCACTCTC TACTTTCTGT AGGGTAGGG ATCTATCTAC TCCCAACCG AGTAAACGGG AGTAAAGCTC TCCAGGCCAA
9401 TAGGCCATCC TTTTTTTTTT CTTTTTTTTT TTTTCTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
9501 TTCTTTTGGT GGCTCCATCT TAGCCCTAGT CACGGCTAGC TGTGAAAGGT CCGTGAAGCC CTTGACTCA GAGAGTCTG CTGACTGCTC CTCTCGAGAT
9601 CAAGT

Anhang B

Proteinsequenzen

Gen	Proteinsequenz
GST-c-SRC- Δ SH1 1-247	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLEPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIA WPLQGWQATFQGGGDHPPKSDLEVLVQGPLGSPNSMGSNKSQPKDASQR RRSLEPAENVHAGGGAFPAASQTSPKASADGHRGPSAAFAPAAAEPKLF GGFNSSDVTSPQRAGPLAGGVTFVALYDYESRTETDLSFKKGERLQIV NTEGDWWLAHSLSTGQTGYIPSNYVAPSDSIQAEWYFGKITRRESERL LLNAENPRGTFLVRESETTKGAYCLVSDFDNAKGLNVKHYKIRKLDSSG FYITSRTQFNSLQQLVAYYSKHADGLCHRLTTV
GST-c-SRC- Δ SH1 1-247 R173K	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLEPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIA WPLQGWQATFQGGGDHPPKSDLEVLVQGPLGSPNSMGSNKSQPKDASQR RRSLEPAENVHAGGGAFPAASQTSPKASADGHRGPSAAFAPAAAEPKLF GGFNSSDVTSPQRAGPLAGGVTFVALYDYESRTETDLSFKKGERLQIV NTEGDWWLAHSLSTGQTGYIPSNYVAPSDSIQAEWYFGKITRRESERL LLNAENPRGTFLVRESETTKGAYCLVSDFDNAKGLNVKHYKIRKLDSSG FYITSRTQFNSLQQLVAYYSKHADGLCHRLTTV
GST-FYN-SH2 Isoform 2 140-257	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLEPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIA WPLQGWQATFQGGGDHPPKSDLEVLVQGPLGSPNSWYFGKLRKDAERQ LLSFGNPRGTFLIRESETTKGAYSLIRDWDDMKGDHVKHYKIRKLDNNG YYITTRAQFETLQQLVQHYSEKADGLCFNLTVIASSCTPQTSGLA
GST-Fyn-SH2 Isoform 2 140-257 R173K	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLEPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIA WPLQGWQATFQGGGDHPPKSDLEVLVQGPLGSPNSWYFGKLRKDAERQ LLSFGNPRGTFLIRESETTKGAYSLIRDWDDMKGDHVKHYKIRKLDNNG YYITTRAQFETLQQLVQHYSEKADGLCFNLTVIASSCTPQTSGLA
His ₆ NS5A-D2D3 191-447	MGSSHHHHHSSGENLYFQGHMASGSLRGGEPEPDVTVLTSMLTDPHSHT AETAKRRLARGSPSLASSASQLSAPSLKATCTTHHSDPADLIEANLLW RQEMGNITRVESENKVVILDSFELHADGDEREISVAEILRKSRRKFPFSA PIWARPDYNPPLESWKDPDYVPPVVHGCPLPPTKAPPPIPPRRKRTVV TESNVSSALAEATKTFGSSGSSAVDSGTATALPDQASDDGDKGSDVESYS SMPPLEGEGDPLSDSGSWSTVSEASEDVVCC
GST-c-SRC-SH3-SH2 80-249	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLEPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIA WPLQGWQATFQGGGDHPPKSDLEVLVQGPLGSENLYFQGPLAGGVTFV ALYDYESRTETDLSFKKGERLQIVNTEGDWWLAHSLSTGQTGYIPSNYV APSDSIQAEWYFGKITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESETTKGAYCLSV SDFDNAKGLNVKHYKIRKLDSSGFYITSRTQFNSLQQLVAYYSKHADGLC HRLTTVCP
GST-c-SRC-SH2 149-249	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLEPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIA WPLQGWQATFQGGGDHPPKSDLEVLVQGPLGSENLYFQSDSIQAEWYFG KITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESETTKGAYCLVSDFDNAKGLNVK YKIRKLDSSGFYITSRTQFNSLQQLVAYYSKHADGLCHRLTTVCP
His ₆ NS5A-D1 33-202	MHHHHHHENLYFQGVFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTCPCGAQITGHV KNGSMRIVGPKTCSNTWHGTFPINAYTTGPTPSPAPNYSRALWRVAE EYVEVTRVGDHFHYVTGMTDNVKCPCQVPAPEFFTEVDGVRHLHRYAPA CKPLLRREEVTFQVGLNQYLVSQPLCEPEPDDVAVLTSM

Gen	Proteinsequenz
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y93F	MHHHHHHENLYFQGVPPFSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCPGGAQITGHV KNGSMRIVGPKTCSNTWHGTFFPINAFTTGPCTPSPAPNYSRALWRVAAE EYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKPCQVPAPEFFTEVDGVR LHRYAPA CKPLLREEVTFQVGLNQYL VGSQ L PCEPEPDVAVLTSM
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y129F	MHHHHHHENLYFQGVPPFSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCPGGAQITGHV KNGSMRIVGPKTCSNTWHGTFFPINAFTTGPCTPSPAPNYSRALWRVAAE EYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKPCQVPAPEFFTEVDGVR LHRYAPA CKPLLREEVTFQVGLNQYL VGSQ L PCEPEPDVAVLTSM
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y161F	MHHHHHHENLYFQGVPPFSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCPGGAQITGHV KNGSMRIVGPKTCSNTWHGTFFPINAFTTGPCTPSPAPNYSRALWRVAAE EYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKPCQVPAPEFFTEVDGVR LHRFAPA CKPLLREEVTFQVGLNQYL VGSQ L PCEPEPDVAVLTSM
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y93F Y129F	MHHHHHHENLYFQGVPPFSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCPGGAQITGHV KNGSMRIVGPKTCSNTWHGTFFPINAFTTGPCTPSPAPNYSRALWRVAAE EYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKPCQVPAPEFFTEVDGVR LHRYAPA CKPLLREEVTFQVGLNQYL VGSQ L PCEPEPDVAVLTSM
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y93F Y161F	MHHHHHHENLYFQGVPPFSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCPGGAQITGHV KNGSMRIVGPKTCSNTWHGTFFPINAFTTGPCTPSPAPNYSRALWRVAAE EYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKPCQVPAPEFFTEVDGVR LHRFAPA CKPLLREEVTFQVGLNQYL VGSQ L PCEPEPDVAVLTSM
His ₆ NS5A-D1 33-202 Y93F Y129F Y161F	MHHHHHHENLYFQGVPPFSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCPGGAQITGHV KNGSMRIVGPKTCSNTWHGTFFPINAFTTGPCTPSPAPNYSRALWRVAAE EYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKPCQVPAPEFFTEVDGVR LHRFAPA CKPLLREEVTFQVGLNQYL VGSQ L PCEPEPDVAVLTSM

Anhang C

Massenspektrometrische Ergebnisse

Bande	HCV-Peptidsequenzen
1	VDFLLK LTPLADADR
2	ALGLLQTATK
3	ASGVLTTScGNTLTcYLK GLLGcIITSLTGR VLVLNPSVAATLGFAYmSK cFDSTVTENDIR LSGGLGNVAVYYR LYIGGPLTNSK NEVFcVQPEK LGAVQNEVTTHPITK VLVLNPSVAATLGFAYMSK DLEDTEPIDTIMAK HHNLVYATTSR LPINALSNSLLR VEESIQccDLAPEAR LGVPPLR HADVIVR TVVLESTVSSALAEATK AFTEAMTR LIVFPDLGVR TITGAPITYSTYGK KLGVPPLR AVDFVPVEmETTmR mLmTHFFSILLAQEQLEK LQVLDDHYR QAGDNFPYLVAYQATVcAR LLSVEEAck VPAAYAAQGYK AHGIDPNIR YLFNWAVR DPTPLAR VYYLTR AAWETAR EVSVPAEILR LTPPHSAR SLTPcTcGSSDLYLVTR LVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSSTGEIPFYGK
4	TVVLESTVSSALAEATK GSPPSLASSASQLSAPSLK VAAEEYVEVTR VVILDSFEPLQAEEDEREVSVPAEILR LSGGLGNVAVYYR VLVLNPSVAATLGFAYmSK GDGI _m QTcPcGAQITGHVK NEVFcVQPEK LPGVPPFScQR cPcQVPAPPEFFTEVDGVR GLLGcIITSLTGR EVSVPAEILR HADVIVR LYIGGPLTNSK LGVPPLR VPAAYAAQGYK YAPAcKPLL VGDFHYVTGmTTDNVK GDGIMQTcPcGAQITGHVK QEMGGNITR TITGAPITYSTYGK LLSVEEAck LIVFPDLGVR VGDFHYVTGMTDNVK APPIPPR LQVLDDHYR DVRNLSSKAVNHIR

Anhang D

Publikationen

Themenbezogene Publikationen

2017	Tyrosine 93 of NS5A is essential for interaction with c-Src and for efficient hepatitis C virus replication. <u>Klinker S</u> , Stindt S, Gremer L, Bode JG, Hoffmann S, Willbold D, <i>Journal of Biological Chemistry</i> .
Status:	eingereicht
eigene Leistung:	Expression & Reinigung von Proteindomänen, Assay-Entwicklung, Protein-Protein-Interaktionsmessungen und Datenauswertung. Manuskript konzipiert, geschrieben und editiert.

Weitere Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften ohne direkten Themenbezug zur eingereichten Arbeit

2017	<p>A New Essential Role of the Autophagy related Kinase ULK1 in human snRNP Biogenesis. Schmitz K, Cox J, Voss M, Sander K, Löffler A, Hillebrand F, Erkelenz S, Schaal H, Kähne T, <u>Klinker S</u>, Willbold D, Stork B, Grimmer M, Wesselborg S, Peter C, <i>Nature Structural & Molecular Biology (NSMB)</i>.</p> <p>Status: eingereicht</p> <p>eigene Leistung: Konzeptionelle Assay-Entwicklung und Durchführung von Protein-Protein-Interaktionsstudien mit verschiedenen Methoden. Proteinreinigung. Datenauswertung, anteiliges Verfassen und editieren des Manuskripts.</p>
2017	<p>Ammonia-weighted imaging by chemical exchange saturation transfer - MRI at 3 T. Zöllner HJ, Butz M, Kircheis G, <u>Klinker S</u>, Häussinger D, Schmitt B, Schnitzler A, Wittsack HJ, <i>NMR in Biomedicine</i>.</p> <p>Status: in Revision</p> <p>eigene Leistung: Konzeptionelle Assay-Entwicklung und Durchführung von Messungen zur Proteinfaltung mit verschiedenen Methoden. Datenauswertung. Anteiliges Verfassen und editieren des Manuskripts.</p>
2016	<p>Platelets contribute to amyloid-β aggregation in cerebral vessels through integrin αIIbβ3-induced outside-in signaling and clusterin release. Donner L, Fälker K, Gremer L, <u>Klinker S</u>, Pagani G, Ljungberg LU, Lothmann K, Rizzi F, Schaller M, Gohlke H, Willbold D, Grenegard M, Elvers M, <i>Science Signaling</i>.</p> <p>Status: veröffentlicht: 9(429):ra52. DOI: 10.1126/scisignal.aaf6240 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27221710</p> <p>eigene Leistung: Proteinpräparation und Protein-Protein-Interaktionsmessungen, Datenauswertung und Mitarbeit am Manuskript.</p>
2013	<p>The off-rate of monomers dissociating from amyloid-β protofibrils. Grüning CS*, <u>Klinker S*</u>, Wolff M, Schneider M, Toksöz K, Klein AN, Nagel-Steger L, Willbold D, Hoyer W, <i>Journal of Biological Chemistry</i> *gleichberechtigte Erstautorenschaft.</p> <p>Status: veröffentlicht: 288(52):37104-11 DOI: 10.1074/jbc.M113.513432 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24247242</p> <p>eigene Leistung: Proteinexpressions und -reinigungspkollle etabliert und durchgeführt, Messapparaturen entworfen und herstellen lassen, Etablierung des Messprinzips, Herstellung und Isolation von Protofibrillen und Durchführung kinetischer Assays, Datenauswertung, an Manuskript mitgewirkt.</p>

Veröffentlichungen im Rahmen von Fachtagungen

2014 **Analysis of the Bin1 SH3 interaction with peptides derived from the hepatitis C virus protein NS5A and c-Myc reveals that NS5A can competitively displace c-Myc *in vitro*.** Aladag A, Bösing C, Gremer L, Hoffmann S, Klinker S, Schwarten M, Stoldt M, Valdau O, Willbold D. *European Journal of Medical Research*.

Status: veröffentlicht: DOI: 10.1186/2047-783X-19-S1-S10 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4118443/>

Danksagung

Allen voran gilt mein Dank Professor Dieter Willbold: Für die hervorragende Betreuung, für die große Freiheit beim Umsetzen meiner Ideen und nicht zuletzt für die Finanzierung.

Weiterhin möchte ich Professor Johannes Georg Bode für die Übernahme des Koreferats und den sehr guten Input für das Projekt danken.

Danke an Wolfgang Hoyer für die Übernahme der Mentoren-Aufgabe und für die ein oder andere Idee, die sich im Laufe der Zeit entwickelt hat.

Mein Dank gilt Silke Hoffmann und Lothar Gremer, die mich in das komplexe Thema und die umfangreichen Methoden sehr gut eingearbeitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke Sabine Stindt für die gute Zusammenarbeit und die Kultierung und Anleitung zur Präparation der humanen Zellen.

Vielen Dank an Barbara Schulten, Elke Reinartz und Astrid Wies, dass ihr euch so einsetzt und das Institut zusammenhältet.

Allen Leuten aus dem Institut für Physikalische Biologie: Danke für die schöne Zeit.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Vater. Ohne Deine Unterstützung wäre mir einiges deutlich schwerer gefallen. Danke dafür.

Liebe Stephanie, danke für Deine Unterstützung und die schöne Zeit mit Dir.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Stefan KLINKER, versichere an Eides statt, dass die Dissertation „Untersuchung und Charakterisierung der Interaktion des Hepatitis C viralen Proteins NS5A mit der humanen Tyrosinkinase c-SRC“, von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Datum:

Unterschrift:
