

AUS DER KLINIK FÜR GASTROENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE UND  
INFEKTOLOGIE

DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Tom Lüdde

DAS HEPATITIS-C-VIRUS INDUZIERT DIE EGF-ABHÄNGIGE  
EXPRESSION DES CHEMOKINS CXCL8 ÜBER EINEN MEK1-ERK1/2-  
ABHÄNGIGEN MECHANISMUS

DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Nadja Schröder, geb. Triller  
(2021)

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Johannes Bode

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Julia Reifenberger

Drittgutachterin: PD Dr. rer. nat. Heike Hermanns

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Als Manuskript

Gröppler C\*, Ruffinatscha K\*, **Schröder N\***, Stindt S, Ehlting C, Albrecht U, Bock HH, Bartenschlager R, Häussinger D, Bode JG. *HCV modifies EGF signalling and upregulates production of CXCR2 ligands involving an EGF-mediated circuit*. J Hepatol 2018, 69: 594-602. \*gleichberechtigte Erstautorenschaft

Als Posterbeitrag

Gröppler C, **Triller N**, Eisenbürger S, Seifert C, Häussinger D, Bode JG: *Hepatitis C Virus modulates TNF $\alpha$ -induced chemokine production and enables EGF to induce chemokine production in its host cell*, 30th Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver (GASL), 24.-25. Januar 2014, Tübingen, Deutschland

Gröppler C, **Triller N**, Eisenbürger S, Bartenschlager R, Häussinger D, Bode JG: *Hepatitis C Virus MEK1- and TCPTP-dependently converts epidermal growth factor (EGF) into a potent inducer of CXCR2 ligand expression*, The International Liver Congress 2014, 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 9.-13. April 2014, London, United Kingdom

Gröppler C, **Triller N**, Bartenschlager R, Häussinger D, Bode JG: *Das Hepatitis C Virus modifiziert die Chemokinproduktion in Antwort auf den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) in seiner Wirtszelle*, 51. Kongress der Südwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 17.-18. Oktober 2014, Stuttgart, Deutschland (ausgezeichnet mit einem Posterpreis)

Gröppler C, **Triller N**, Bartenschlager R, Häussinger D, Bode JG: *The interaction of the Hepatitis C Virus with intracellular signaling converts EGF into a potent inducer of the production of CXCR2-ligands by the infected host cell*, 31th Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver (GASL), 30.-31. Januar 2015, München, Deutschland

Gröppler C, **Triller N**, Bartenschlager R, Häussinger D, Bode JG: *The Hepatitis C Virus modifies CXC-chemokine expression induced by inflammatory cytokines and facilitates their production in response to epidermal growth factor*, The International Liver Congress 2015, 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 22.-26. April 2015, Wien, Österreich

Gröpper C, **Triller N**, Bartenschlager R, Häussinger D, Bode JG. *The Hepatitis C Virus (HCV) facilitates CXCR2 ligand expression in response to the Epidermal Growth Factor (EGF) and is able to induce the EGF production by an autocrine circuit in its host cell.* 15th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Juni 2015, Berlin, Deutschland

## ZUSAMMENFASSUNG

Die HCV-Infektion stellt aufgrund der weltweit hohen Inzidenz und gravierenden Langzeitfolgen, wie Leberzirrhose und hepatozellulären Karzinom, einen der wichtigsten Ursachen für chronische Lebererkrankungen dar. Trotz der Entwicklung neuer antiviraler Medikamente besteht aufgrund von Resistenzentwicklung und fehlender Impfung weiterhin Forschungsbedarf. Ziel dieser Arbeit ist es, zur weiteren Aufklärung der molekularen Mechanismen beizutragen, die es dem Virus ermöglichen, trotz aktiver Replikation und hohen Virustitern im Wirtsorganismus vergleichsweise symptomarm zu persistieren. Dies setzt voraus, dass das Virus, die Entzündungsantwort des Wirtes modifiziert und die Infrastruktur der Wirtszelle nutzt, ohne ihre Lebensfähigkeit höhergradig zu beeinträchtigen. Bei der Erstellung dieser Arbeit wurden humane Hepatomazelllinien kultiviert, die entweder ein subgenomisches HCV-Replikon oder das virale Nicht-Strukturprotein NS3/4A stabil exprimieren. Zu den verwendeten Methoden zählen unter anderem Western Blot, ELISA, die quantitative *Real-Time* PCR und die Transfektion von siRNA.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass HCV zu einer verstärkten Transkription der Chemokine CXCL1, 2, 3 und 8 sowie vermehrter CXCL8-Freisetzung in der Wirtszelle führt. Weiterhin wird hier belegt, dass dieser Effekt nach Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) signifikant gesteigert wird, während in Kontrollzellen EGF eine vergleichsweise geringere Expression dieser Chemokine induziert. Die Befunde legen nahe, dass für diesen Prozess die Virus-kodierte NS3/4A-Protease sowie die Virus-bedingte Herabregulation der *T cell protein tyrosine phosphatase* (TCPTP) von Bedeutung ist. Ferner scheint zumindest im Hinblick auf die verstärkte CXCL8-Expression die *mitogen/extracellular signal-regulated kinase 1* (MEK1) eine wichtige Rolle zu spielen.

Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur und Vorbefunden der Arbeitsgruppe lässt sich aus den hier ausgeführten Befunden schlussfolgern, dass HCV über NS3/4A die Tyrosin-Phosphatase TCPTP, einem endogenen Negativregulator des EGFR, spaltet und hierdurch in HCV-infizierten Zellen zu einer verminderten EGFR-Hemmung und konsekutiv zu einer verstärkten Aktivierung der intrazellulären EGF-Signalübertragung führt. Daraus resultiert eine verstärkte Aktivierung des MEK1-Erk1/2-Signalweges mit konsekutiv verstärkter CXCL8-Expression. Vor dem Hintergrund, dass der aktuellen Literatur zur Folge EGFR für die virale Internalisierung sowie Replikation und CXCL8 für eine gesteigerte Virusreplikation, als auch für eine Interferonresistenz relevant sind, sind die dargestellten Befunde als wichtige Mechanismen anzusehen, die Teil der viralen Strategien sind über die eine Viruspersistenz sichergestellt wird.

## SUMMARY

HCV infection is one of the most important causes of chronic liver disease due to its high incidence worldwide and serious long-term consequences such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Despite the development of new antiviral drugs, there is still a need for research due to resistance development and lack of vaccination. The aim of this work is to contribute to the further elucidation of the molecular mechanisms that enable the virus to persist with comparatively few symptoms despite active replication and high virus titers in the host organism. This requires that the virus modifies the inflammatory response of the host and uses the infrastructure of the host cell without affecting its viability to a higher degree.

In the preparation of this work, human hepatoma cell lines were cultured that stably express either a subgenomic HCV replicon or the viral non-structural protein NS3/4A. The methods used include Western Blot, ELISA, quantitative real-time PCR and transfection of siRNA.

In the course of this work it could be shown that HCV leads to an enhanced transcription of the chemokines CXCL1, 2, 3 and 8 as well as increased CXCL8 release from the host cell. Furthermore, it is shown that this effect is significantly increased after stimulation with epidermal growth factor (EGF), whereas in control cells EGF induces a comparatively low expression of these chemokines. The findings suggest that the virus-encoded NS3/4A protease as well as the virus-related downregulation of the T cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) are important for this process. Furthermore, mitogen/extracellular signal-regulated kinase 1 (MEK1) seems to play an important role at least with regard to the enhanced expression of CXCL8.

Taking into account the current literature and previous findings of the working group, it can be concluded from the findings presented here that HCV cleaves the protein tyrosine phosphatase TCPTP, an endogenous negative regulator of EGFR, via NS3/4A and thus leads to reduced EGFR inhibition in HCV-infected cells and, consequently, to increased activation of intracellular EGF signal transduction. This results in enhanced activation of the MEK1-Erk1/2 signaling pathway with consecutively enhanced CXCL8 expression.

In view of the fact that the current literature on EGFR for viral internalization and replication and CXCL8 for increased viral replication and interferon resistance are relevant, the findings presented here are to be regarded as important mechanisms that are part of viral strategies to ensure virus persistence.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Akt</b>	PKB, Proteinkinase B
<b>AP</b>	<i>activating protein</i>
<b>Apo</b>	Apolipoprotein
<b>BAD</b>	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
<b>bp</b>	Basenpaar/e
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i>
<b>C/EBP</b>	<i>CAAT/enhancer binding protein</i>
<b>CARD</b>	<i>caspase recruitment domains</i>
<b>CARDIF</b>	<i>CARD adaptor inducing IFN<math>\beta</math></i>
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>CDC</b>	<i>cell division control protein</i>
<b>CDK</b>	<i>cyclin dependent kinase</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i>
<b>CLDN</b>	Claudin
<b>CMS</b>	<i>cas ligand with multiple SH3 domains</i>
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>COX</b>	Cyklooxygenase
<b>c-Src</b>	<i>cellular sarcoma</i>
<b>Ct</b>	<i>cycle threshold</i>
<b>CXCL</b>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
<b>CXCR</b>	CXC-Chemokinrezeptor
<b>DAA</b>	<i>direct acting antiviral</i>
<b>DNA-PK</b>	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
<b>DC-SIGN</b>	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin</i>
<b>DG</b>	Diacylglycerol
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>desoxyribonucleic acid</i>
<b>ds</b>	doppelsträngig
<b>DZ</b>	dendritische Zellen
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth faktor</i>

<b>EGFR</b>	<i>epidermal growth faktor receptor</i>
<b>eIF</b>	eukaryotische Initiationsfaktoren
<b>ELISA</b>	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
<b>EMCV</b>	Encephalomyokarditis-Virus
<b>ER</b>	endoplasmatisches Retikulum
<b>ErbB</b>	<i>avian erythroblastosis oncogene B</i>
<b>Erk</b>	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
<b>FADD</b>	<i>fas-associated protein with death domain</i>
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i>
<b>Gab</b>	<i>Grb2-associated-binding protein</i>
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>Grb</b>	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
<b>GRO</b>	<i>growth-regulated protein</i>
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>GTPase</b>	Guanosintriphosphatase
<b>HCV</b>	Hepatitis-C-Virus
<b>HRas</b>	<i>Harvey-rat sarcoma</i>
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i>
<b>HSPG</b>	Heparansulfat-Proteoglykan
<b>HTA</b>	<i>host targeting antiviral</i>
<b>Huh</b>	<i>human hepatoma</i>
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFNAR</b>	<i>interferon <math>\alpha/\beta</math> receptor</i>
<b>IKK</b>	<i>inhibitor of nuclear factor <math>\kappa</math>-B kinase</i>
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IP3</b>	Inositoltriphosphat
<b>IRES</b>	<i>internal ribosome entry site</i>
<b>IRF</b>	<i>interferon regulatory faktor</i>
<b>ISG</b>	IFN $\alpha/\beta$ -stimulierende Gene
<b>ISGF</b>	<i>interferon stimulated gene faktor</i>
<b>ISRE</b>	<i>IFN-stimulated response element</i>
<b>Jak</b>	Januskinase
<b>JFH</b>	japanische fulminante Hepatitis C
<b>JNK</b>	c-Jun-N-terminale Kinase

<b>LDLR</b>	<i>low-density Lipoprotein-Rezeptoren</i>
<b>L-SIGN</b>	<i>liver/lymph node-SIGN</i>
<b>MAP3K</b>	MAPK-Kinase-Kinase
<b>MAPK</b>	<i>mitogen activated protein kinase</i>
<b>MAPK4K</b>	MAPK-Kinase-Kinase-Kinase
<b>MAPKAPK</b>	MAPK- <i>activated protein kinase</i> , auch MK oder MAPKPK
<b>MAP</b>	<i>microtubule-associated protein</i>
<b>MEK</b>	<i>mitogen/extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>MEKK</b>	MAPK-Kinase-Kinase
<b>MHC</b>	<i>major histocompatibility complex</i>
<b>MK</b>	MAPK- <i>activated protein kinase</i> , auch MAPKAPK
<b>MKK</b>	MAPK-Kinase
<b>MKNK</b>	MAP <i>kinase interacting serine/threonine kinase</i>
<b>MLK</b>	<i>mixed-lineage protein kinase</i>
<b>MNK</b>	MAPK- <i>interacting serine/threonine-protein kinase</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger ribonucleic acid</i>
<b>MSGA</b>	<i>melanoma growth stimulating activity</i>
<b>MSK</b>	<i>mitogen- and stress-activated proteinkinase</i>
<b>mTORC</b>	<i>mammalian target of rapamycin complex</i>
<b>Nck</b>	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein</i>
<b>NFκB</b>	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<b>NIK</b>	NFκB- <i>inducing kinase</i>
<b>NPC1L1</b>	Niemann-Pick C1- <i>like 1</i>
<b>NRE</b>	Negativ-regulierende Element oder NFκB- <i>repressing factor</i>
<b>NS</b>	Nicht-Struktur
<b>NTPase</b>	Ribonucleosid-5'-triphosphatase
<b>OCLN</b>	Occludin
<b>OCT</b>	Octamer
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i> ,
<b>OSA</b>	Oligoadenylat-Synthetase
<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>PAMP</b>	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>PD</b>	<i>programmed cell death protein</i>

<b>PDK</b>	<i>phosphoinositid-dependent kinase</i>
<b>PEG-IFN</b>	pegylierten Interferon
<b>PH</b>	Pleckstrin <i>homology</i>
<b>PI</b>	Phosphatidylinositol
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-kinase
<b>PI3P</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
<b>PIK</b>	Phosphatidylinositol-4-kinase
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b>PKB</b>	Proteinkinase B
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PKR</b>	Proteinkinase R
<b>PLA<sub>2</sub></b>	zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PRR</b>	<i>pattern recognition receptor</i>
<b>PTP</b>	Protein-Tyrosin-Phosphatase
<b>PTPN<sub>2</sub></b>	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2</i> (Synonym: TCPTP)
<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>Rac<sub>1</sub></b>	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
<b>Raf</b>	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
<b>Ras</b>	<i>rat sarcoma</i>
<b>RBV</b>	Ribaverin
<b>RIG</b>	<i>retinoic acid inducible gene</i>
<b>RIP</b>	<i>receptor interacting protein</i>
<b>RLRs</b>	<i>RIG1-like receptors</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>RSK</b>	ribosomale S6-Kinasen
<b>SAPK</b>	<i>stress-activated proteinkinase</i>
<b>SDHA</b>	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SH</b>	<i>src-homology</i>
<b>Shc</b>	<i>SH2-containing proto-oncogene</i>
<b>siRNA</b>	<i>short interfering RNA</i>
<b>SMA</b>	<i>smooth muscle actin</i>
<b>SNP</b>	<i>single nucleotide polymorphism</i>

<b>SOCS</b>	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
<b>SOS</b>	<i>son of sevenless</i>
<b>SR-B1</b>	<i>scavenger receptor class B type 1</i>
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
<b>STING</b>	<i>stimulator of interferon genes</i>
<b>Syk</b>	<i>spleen tyrosin kinase</i>
<b>TBK</b>	<i>TANK-binding kinase 1</i>
<b>TBS(T)</b>	<i>tris buffered saline (Tween 20)</i>
<b>TCPTP</b>	<i>T-cell protein tyrosine phosphatase (Synonym PTPN2)</i>
<b>TEMED</b>	<i>Tetramethylethyldiamin</i>
<b>TGF</b>	<i>transforming growth factor</i>
<b>TIC</b>	<i>tumor initiating cell</i>
<b>TIL</b>	<i>tumor-infiltrating lymphocyte</i>
<b>TIR</b>	<i>Toll/Interleukin-1-Rezeptor</i>
<b>TLR</b>	<i>toll-like-receptor</i>
<b>TMB</b>	<i>Tetramethylbenzidin</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumornekrosefaktor</i>
<b>TNFR</b>	<i>Tumornekrosefaktor-Rezeptor</i>
<b>TRAF</b>	<i>TNFR associated factor</i>
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN<math>\beta</math></i>
<b>Tris</b>	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
<b>Tyk</b>	<i>Tyrosinkinase</i>
<b>UTR</b>	<i>untranslatierte Region, engl. <i>untranslated region</i></i>
<b>VAMP</b>	<i>vesicle-associated membrane protein</i>

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 .... Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Hepatitis-C-Virus .....	2
1.1.1 Hepatitis-C-Virus-Aufbau .....	2
1.1.2 Viruseintritt in die Hepatozyten .....	3
1.1.3 Viraler Lebenszyklus .....	4
1.1.4 HCV-Modellsysteme .....	6
1.2 Das Hepatitis-C-Virus manipuliert die Immunantwort seines Wirtes .....	7
1.2.1 Die antivirale Immunantwort .....	7
1.2.2 Virale Mechanismen zur Hemmung der Immunantwort des Wirtes .....	11
1.3 Chemokine .....	16
1.3.1 CXC Familie .....	17
1.3.2 CXCL1, CXCL2 und CXCL3 .....	17
1.3.3 CXCL8 .....	18
1.4 Der Epidermale Wachstumsfaktor und seine Signalwege .....	21
1.4.1 Aktivierung des EGFR durch EGF .....	22
1.4.2 Die mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalwege .....	23
1.4.3 Phosphoinositid-3-kinase-Akt-Signalweg .....	27
1.4.4 Phospholipase C-Signalweg .....	28
1.5 T-Zell Protein Tyrosin Phosphatase .....	29
1.6 Ziel der Arbeit .....	30
<b>2 .... Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.1 Material, Substanzen und Lösungen .....	32
2.2 Zelllinien .....	36
2.3 Puffer .....	36
2.4 Methoden .....	37
2.4.1 Zellbiologische Methoden .....	37
2.4.2 Molekularbiologische Methoden .....	38
2.4.3 Proteinbiochemische Methoden .....	39
2.5 Statistische Auswertung .....	42
<b>3 .... Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>

3.1	Das Hepatitis-C-Virus beeinflusst in Huh-Zellen die basale Chemokinexpression sowie die EGF-induzierte Expression von CXCL1-3 und CXCL8 .....	43
3.2	NS3/4A induziert eine verstärkte, EGF-vermittelte CXCL8-mRNA-Expression..	46
3.3	HCV verstärkt die intrazelluläre Signalübertragung von EGFR.....	47
3.3.1	<i>Die Verstärkung der EGF-induzierten Chemokinexpression in Gegenwart von HCV ist EGF-Rezeptor abhängig .....</i>	<i>49</i>
3.3.2	<i>Der MEK1-Erk1/2-Signalweg ist in der Vermittlung der EGF-induzierten CXCL8-Expression beteiligt .....</i>	<i>50</i>
3.3.3	<i>Die PI3-Kinase und die p38<sup>MAPK</sup> sind nicht in die EGF-vermittelte CXCL1-, CXCL2- und CXCL8-mRNA-Expression involviert.....</i>	<i>53</i>
3.4	TCPTP ist in der EGF-abhängigen Expression des CXCL8 involviert .....	54
3.4.1	<i>Der TCPTP-Knockdown verstärkt die EGF-vermittelte CXCL8-Expression in Huh7-Zellen .....</i>	<i>54</i>
3.4.2	<i>Der TCPTP-Knockdown verstärkt die Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalwege.....</i>	<i>56</i>
<b>4</b>	<b>.... Diskussion.....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>.... Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper .....	34
Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide in der <i>real-time</i> quantitativen PCR.....	35
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien mit den entsprechenden Kultivierungsmedien.....	36

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Die antivirale Immunantwort der Hepatozyten auf das Hepatitis C Virus:.....	9
Abb. 2: Das HCV hemmt durch seine Proteine die antivirale Immunantwort in Hepatozyten .....	13
Abb. 3: Die Signalweiterleitung nach Stimulation des EGF-Rezeptor durch EGF .....	28
Abb. 4: HCV beeinflusst in Huh-Zellen die basale Chemokinexpression und befähigt EGF die Expression von CXCL1–3 und 8 zu induzieren. ....	44
Abb. 5: HCV induziert die CXCL8-Expression unter EGF-Stimulation. ....	45
Abb. 6: Die HCV-kodierte NS3/4A Protease führt zu einer Verstärkung von basaler und EGF-induzierter CXCL8-Expression. ....	46
Abb. 7: HCV verstärkt die EGF-vermittelte EGFR-Phosphorylierung mit konsekutiver Aktivierung von Akt, Erk1/2 sowie p38 <sup>MAPK</sup> .....	47
Abb. 8: Hemmung des EGF-Rezeptors führt auch in Zellen, die das subgenomische HCV-Replikon exprimieren, zu einer vollständigen Aufhebung der Induktion der mRNA-Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL8 durch EGF. ....	49
Abb. 9: Die EGF-induzierte CXCL8-Expression in Huh9-13 Replikonzellen lässt sich durch eine Hemmung von MEK1 nahezu aufheben. ....	50
Abb. 10: Einfluss der EGFR- und MEK1-Hemmung auf die EGF/EGFR-vermittelte Signaltransduktion. ....	51
Abb. 11: Weder die Hemmung der PI3K noch der p38 <sup>MAPK</sup> haben einen Einfluss auf die EGF-induzierte mRNA-Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL8 in Huh9-13 Replikonzellen. ....	53
Abb. 12: Der TCPTP- <i>Knockdown</i> verstärkt die EGF-vermittelte CXCL8-mRNA-Expression in Huh7-Zellen. ....	55
Abb. 13: Der TCPTP- <i>Knockdown</i> steigert sowohl die basale als auch die EGF-vermittelte CXCL8-Ausschüttung in Huh7-Zellen.....	56
Abb. 14: Der TCPTP- <i>Knockdown</i> verstärkt die Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalwege.....	58

Abb. 15: Das Hepatitis-C-Virus befähigt EGF die Expression des Chemokins CXCL8 MEK1/Erk1/2-abhängig zu induzieren.....	63
---	----

# 1 EINLEITUNG

Weltweit tragen über 185 Millionen Menschen Antikörper gegen das Hepatitis-C-Virus (HCV) und sind bzw. waren damit mit dem humanpathogenen Virus infiziert. Eine Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus führt zunächst zu einer akuten Leberentzündung, die in der weitaus größten Zahl der Fälle jedoch subklinisch verläuft. In den meisten Fällen kann das Hepatitis-C-Virus nicht durch das Immunsystem eliminiert werden, sodass etwa 55-85 % der Infizierten eine chronische Hepatitis C-Infektion entwickeln. Die Jahrzehnte andauernde virale Persistenz führt bei 15-35 % der chronisch Infizierten innerhalb von im Durchschnitt etwa 20 Jahren über eine Leberfibrose zu einer Leberzirrhose und in der Folge bei 2-4 % pro Jahr zu einem hepatozellulären Karzinom. [1]

Beschrieben wurde die Hepatitis C-Infektion im Jahre 1975 als eine transfusionsassoziierte Hepatitis, die weder durch das bereits bekannte Hepatitis-A-Virus noch durch das Hepatitis-B-Virus verursacht wurde [2], wobei die Identifikation des Erregers der sogenannten Non-A/Non-B-Hepatitis erst im Jahre 1989 durch Choo *et al.* gelang [3]. Erst durch die Entdeckung des parenteral übertragbaren Virus konnte die Testung von Blutprodukten auf das Hepatitis-C-Virus etabliert und Neuinfektionen durch Blutprodukte eingedämmt werden [1]. In Deutschland ist der Hauptrisikofaktor einer HCV-Übertragung heutzutage die Benutzung von unsterilem Injektionsbesteck bei i.v.-Drogenabhängigen [4].

Über viele Jahre erfolgte die Therapie der chronischen Hepatitis C durch eine Kombinationstherapie aus pegylierten Interferon  $\alpha$  (PEG-IFN $\alpha$ ) und Ribaverin (RBV). Die nebenwirkungsreiche Therapie führte jedoch nur bei 54-56 % der chronisch infizierten Patienten zu einer Viruselimination. [5] Durch die Etablierung von neuen HCV-Modellsystemen und der dadurch ermöglichten detaillierten Erforschung des Hepatitis-C-Virus konnten in den letzten Jahren ein Durchbruch in der Therapie der Hepatitis C-Infektion erreicht werden [6]. Mit den Wirkstoffen Teleprevir und Boseprevir kamen 2011 die ersten sogenannten *direct acting antivirals* (DAA) auf den Markt, welche zunächst in Kombination zum PEG-IFN $\alpha$ /RBV-Regime die Heilungschancen auf 70-80% steigerten [7, 8]. *Direkt acting antivirals* zielen auf virale Proteine, wie NS3/4A, NS5A und NS5B, ab und sind Genotyp-spezifisch wirksam [9]. Laut der aktuellen S3-Leitlinien werden seit 2020 pangentypische, Interferon-freie Therapieregime empfohlen [6], diese sind deutlich nebenwirkungsärmer und mit einer *sustained virological response* (SVR)-Rate von über 99 % deutlich effektiver als die Interferon-basierte Therapie [10, 11]. Einen weiteren

Therapieansatz stellen die *host targeting antivirals* (HTA) dar. Vorteile sind das Fehlen schneller Resistenzentwicklung. Allerdings sind noch keine HTA zugelassen [12].

## 1.1 HEPATITIS-C-VIRUS

Zur Sicherung des viralen Überlebens hat das Hepatitis-C-Virus unterschiedliche Strategien entwickelt, die antivirale Immunität des Wirtes zu unterlaufen, die Entzündungsantwort zu beeinflussen und sich die Infrastruktur der Wirtszelle zu Nutze zu machen. [13] Um die Interaktion zwischen dem Hepatitis-C-Virus und seinem Wirt und die dadurch ermöglichte virale Persistenz mit ihren Folgen zu verstehen, werden zunächst der Virusaufbau und der virale Lebenszyklus sowie die HCV-Modellsysteme, die die Voraussetzung für die Hepatitis-C-Virus-Forschung sind, erläutert.

### 1.1.1 HEPATITIS-C-VIRUS-AUFBAU

Zugeordnet wird das Hepatitis-C-Virus zur Familie der Flaviviren und zur Gattung der Hepaciviren. Das Hepatitis-C-Virus wird in sieben Genotypen und zahlreiche Subtypen klassifiziert [14, 15], die sich in ihrer geographischen Verteilung und Therapiesensitivität unterscheiden. [16] In Deutschland ist der Genotyp 1, der bei Patienten mit Posttransfusionshepatitis dominiert, am häufigsten vertreten, gefolgt vom Genotyp 3, der eher unter Patienten mit i.v.-Drogenabusus verbreitet ist [4].

Das umhüllte Hepatitis-C-Virus besitzt eine von der Wirtszelle abgeleitete Lipiddoppelmembran, welche das Nukleokapsid mit dem darin enthaltenen Genom umgibt [17]. Das HCV-Partikel ist assoziiert mit Lipoproteinen und wird als Lipoviropartikel bezeichnet, welches nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von André *et al.* einen sphärischen Aufbau aufweist [18]. Das 9,6 kb große Genom des Hepatitis-C-Virus besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit einer positiven Polarität [19]. Die lineare RNA besteht aus einem einzelnen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der von beiden Enden durch die 5'- bzw. 3'-untranslatierte Region (UTR) begrenzt wird. Im Bereich der 5' UTR liegt die interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosome entry site*, IRES). Das ORF kodiert ein Polyprotein, das co- und posttranslational in drei Strukturproteine und sieben Nicht-Strukturproteine prozessiert wird. Zu den Strukturproteinen gehören Core, welches das Nukleokapsid bildet, und die Glykoproteine E1 und E2, die als Heterodimer der viralen Lipidhülle anliegen. [20] Die Nicht-Strukturproteine bestehen aus dem Viroporin p7 und den Nicht-Strukturproteinen NS2 bis NS5B. Das Viroporin p7 ist essentiell für die späte Phase der viralen Morphogenese und die Virusausschleusung. [21] Die Proteine NS2 und NS3 sind Proteasen und bei der

Polyproteinprozession beteiligt [20]. Das NS3-Protein liegt im Komplex mit dem Kofaktor NS4A vor und ist auch für die Spaltung von bestimmten zellulären Proteinen [20], wie zum Beispiel das Protein *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS) [22], das Protein *TIR-domain-containing adaptor inducing IFN $\beta$*  (TRIF) [23] und die *T-cell protein tyrosine phosphatase* (TCPTP) [24] verantwortlich. Durch Spaltung der Proteine MAVS und TRIF werden wichtige antivirale Effektormoleküle ausgeschaltet [22, 23] und mit der TCPTP ein wichtiger endogener Negativ-Regulator des Rezeptors für den *epidermal growth factor* (EGF) und der EGF induzierten Signalübertragung [24]. Für die RNA-Replikation sind die Proteine NS4B, NS5A und die RNA-Polymerase NS5B erforderlich [20].

### 1.1.2 VIRUSEINTRITT IN DIE HEPATOZYTEN

Das obligat intrazelluläre Hepatitis-C-Virus benutzt verschiedene Moleküle und Rezeptoren der Wirtszelloberfläche, um durch einen mehrstufigen Prozess in die Zelle zu gelangen [25]. Nach der Bindung des Virus an die Zelloberfläche wird HCV über eine Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen. Im sauren pH der frühen Endosomen fusioniert die Hülle des Viruspartikels mit der endosomalen Membran. Im Zytoplasma löst sich das Viruskapsid auf und lässt die virale RNA frei. [12]

Für den viralen Zelleintritt sind die vier Wirtspoteine *scavenger receptor class B type 1* (SR-B1), Tetraspanin CD81 und zwei *Tight-Junction*-Moleküle Claudin-1 (CLDN1) und Occludin (OCLN) essentiell. Zusätzlich konnten weitere Wirtsmoleküle identifiziert werden, die mit den viralen Hüllproteinen E1 und E2 interagieren und die essentiellen Faktoren unterstützen. Dazu gehören Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), *low-density*-Lipoprotein-Rezeptoren (LDLR), *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1) *cholesterol absorptions receptor*, Transferrin-Rezeptor 1, *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin* (DC-SIGN), *liver/lymph node-SIGN* (L-SIGN), *asialoglycoprotein receptor* sowie die Rezeptor-Tyrosinkinasen *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und Ephrinrezeptor A2. Die genaue Funktion dieser Moleküle im Prozess des Zelleintritts ist bisher nicht vollständig aufgeklärt und zum Teil noch widersprüchlich beschrieben. Des Weiteren ist fraglich, ob die genannten Proteine im selben Zelleintrittsprozess interagieren oder unterschiedliche Eintrittsmechanismen bestehen. [12, 26]

Für die Bindung des Virus an die Wirtszelle sind Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) notwendig [26, 27], an die das virale Core-Protein kovalent bindet. HSPG interagieren zudem sowohl mit dem viralen E2 als auch mit dem zellulären Apolipoprotein E, die beide in der Lipidhülle des HCV verankert sind [25, 26]. Weiterhin ist das Apolipoprotein E ein

Ligand des *scavenger receptor class B type 1* (SR-B1), sodass auch dieser Rezeptor eine Rolle in der initialen Adhäsion des Virus an die Zelloberfläche spielen kann [28].

Die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR ist ein Co-Faktor für den HCV-Zelleintritt. Eine Bindung von *epidermal growth factor* (EGF) oder *transforming growth factor alpha* (TGF $\alpha$ ) führt zu einer Steigerung des viralen Zelleintritts sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. [25] Die Aktivierung des EGFR moduliert den Zelleintritt nach der initialen Bindung des Virus an die Wirtszelle, indem über den EGFR/Shc1/HRas Signalweg die GTPase HRas (*Harvey-rat sarcoma*) aktiviert wird. Diese ist mit CD81 in der Zellmembran assoziiert und führt zur Reduktion der CD81-Mobilität sowie zur gesteigerten Interaktion von CD81 mit anderen Proteinen, wie dem essentiellen Wirtseintrittsfaktor CLDN1. Das Vorhandensein des CD81-CLDN1-Komplexes scheint von einer konstitutiven EGFR-Signalweg-Aktivierung abhängig zu sein, sodass anzunehmen ist, dass das HCV den EGFR/HRas Signalweg ausnutzt, um die CD81-abhängige Virusinvasion in die Leber zu regulieren. [29]

Die Ergebnisse einer anderen Arbeit legen nahe, dass eine HCV-Partikel-Bindung zu einer EGFR-Aktivierung und gemeinsamen Internalisierung des EGFR mit CD81 in die Wirtszelle führt [30]. Die Tatsache, dass sich die Arbeiten in einigen Punkten widersprechen, legt nahe, dass noch offen ist, in wieweit es sich hierbei um zusammenhängende Beobachtungen und damit um Teilaspekte eines zusammenhängenden Prozesses handelt oder um verschiedene Situation bzw. Prozesse.

Nach der viralen Adhäsion erfolgt die Endozytose in die Wirtszelle und damit Freisetzung der viralen RNA in das Zytosol. Der genaue Mechanismus ist im Detail noch nicht aufgeklärt. [31] Bekannt ist, dass HCV in die Wirtszelle durch eine Clathrin-vermittelte Endozytose eintritt [32]. Nach Fusion des Vesikels mit einem Endosom führt der saure pH-Wert im Endosom zur Konformationsänderung der viralen Hüllproteine E1 und E2, wodurch die Freisetzung des Virus in das Zytosol bewirkt wird [33].

### 1.1.3 VIRALER LEBENSZYKLUS

Als nicht-lytisches Virus infiziert das Hepatitis-C-Virus seine Zielzelle, repliziert intrazellulär und wird in den Extrazellulärraum freigesetzt, ohne dabei die Integrität der Wirtszelle zu zerstören. Der Lebenszyklus des HCV kann in vier Abschnitte unterteilt werden, in denen das HCV auf die Infrastruktur seines Wirtes angewiesen ist. Nach dem bereits beschriebenen Zelleintritt erfolgt die Genomtranslation und die Prozessierung der Virusproteine, die für die anschließende Replikation des Genoms erforderlich sind. Mit der Morphogenese und der Freisetzung des Virus schließt sich der Lebenszyklus des HCV. [12]

Nach der viralen Adhäsion und Endozytose in die Wirtszelle kommt es zur Freisetzung der viralen RNA ins Zytosol. Dort initiiert die Bindung des HCV-IRES an das 40S Ribosom der Wirtszelle die Aggregation des Translationskomplexes mit Hilfe der eukaryontischen Initiationsfaktoren (eIF) 2, 3 und 5. Die virale RNA wird durch das zelleigene endoplasmatische Retikulum zu einem membrangebundenen Polyprotein translatiert. [34] Zahlreiche Wirtsfaktoren werden genutzt, um eine optimale Translationsaktivität zu gewähren [34], wie beispielsweise die mikro-RNA-122, welche, leberspezifisch gebildet, die Translation stimuliert und für eine effiziente virale Replikation essentiell ist [35]. Co- und posttranslational schneiden zelluläre, ER-ständige Proteasen den N-terminalen Teil des Polyproteins in die drei strukturellen Proteine sowie p7, und virale Proteasen den C-terminalen Teil in die sechs weiteren nicht-strukturellen Proteine. Das Polyprotein wird an der NS3/4 Schnittstelle durch die NS2-Protease mit Hilfe von NS3 als Kofaktor gespalten. [36] Die Prozession des restlichen Polyproteins erfolgt durch den NS3/4A-Komplex mit Serin-Protease- und NTPase/RNA-Helicase-Aktivität, bestehend aus NS3 und ihrem Kofaktor NS4A [20].

Die nicht-strukturellen Proteine, die mit der ER-Membran assoziiert sind, formen gemeinsam mit zellulären Proteinen den Replikationskomplex, der im membranösen Netz verankert ist. Virale Nicht-Strukturproteine induzieren die Ausbildung des membranösen Netzes, das aus einem Aggregat aus Membranvesikeln, vermutlich abstammend aus Teilen des ER, besteht. Das Schlüsselenzym für die Replikation ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B. Diese ist fehleranfällig und stellt damit die molekulare Basis für die hohe genetische Variabilität der HCV-RNA-Isolate und die hieraus resultierende Vielzahl an Quasiespezies dar. Für die virale Replikation wichtige Wirtspoteine sind unter anderem die Lipidkinase Phosphatidylinositol-4-kinase III alpha (PIKIII $\alpha$ ), *human VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A* und B, Cyclophilin A und B sowie die mikro-RNA-122. Die entstandene positiv strangorientierte RNA wird entweder einem neuen Translations-Replikations-Zyklus zugeführt oder in Virione verpackt. [37]

In die Morphogenese der Viruspartikel sind die viralen Proteine p7, NS2, NS3, NS4B und NS5A involviert. Zunächst kommt es zu einer Aggregation von an *lipid droplets*-assoziierten Core-Proteinen zu einem Viruskapsid, das die virale RNA enthält. Das Viruskapsid stülpt sich in das ER und erlangt dadurch eine vom Wirt abstammende Hülle, in welche E1/E2-Heterodimere eingelagert sind und durchwandert so den Golgi-Apparat. [38] Anschließend wird HCV über einen Sekretionsweg aus der Zelle ausgeschleust, der im engen Zusammenhang mit dem *very low density lipoprotein (VLDL)*-Syntheseweg steht [12]. Auch an der Morphogenese und Freisetzung der Viruspartikel sind zahlreiche Wirtsfaktoren

beteiligt, wobei die Diacylglycerol-Acyltransferase 1 und die zytosolische Phospholipase A2 für die HCV-Produktion essentiell sind. Die im Serum zirkulierenden Viruspartikel sind oft komplexiert mit Antikörpern und anderen Serumbestandteilen sowie Apolipoproteinen (Apo)AI, ApoB, ApoC1 und ApoE. [38]

Neben der viralen Ausbreitung durch Virusausschleusung in den Extrazellulärraum und Infektion weiterer Zellen wurde auch eine direkte Zell-Zell-Transmission beschrieben [39, 40]. Die Zell-Zell-Transmission ist resistent gegen zirkulierende Antikörper und stellt eine effiziente Strategie zur Umgehung der Wirtsimmunabwehr dar. Auch für die Zell-Zell-Transmission sind die Wirtsfaktoren SR-B1, sowie CD81, Claudin-1 und Occludin essentiell. [40]

#### 1.1.4 HCV-MODELLSYSTEME

Zur Erforschung des Hepatitis-C-Virus wurden im Laufe der Zeit mehrere *in vivo* und *in vitro* Modelle etabliert. Da der natürliche Wirt des Hepatitis-C-Virus nur der Schimpanse oder der Mensch ist, mussten zur *in vivo*-Forschung an Kleintiermodellen transgen veränderte Mäuse gezüchtet werden. [41] Zum einen wurden transgen veränderte Mäuse beschrieben, die einzelne HCV-Proteine oder -Polyproteine exprimieren und zum anderen auch immundefiziente Mäuse, die durch Xenotransplantation bis zu 95% humane Hepatozyten in ihrer Leber enthalten [42].

Ein entscheidender Fortschritt in der Entwicklung von *in vitro* Modellen gelang 1999 mit der Entwicklung eines Replikonsystems, welches bis heute Verwendung findet und auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde. Das Isolat Con1, ursprünglich isoliert aus der Leber eines chronisch an HCV erkrankten Patienten (Genotyp1b), wurde soweit modifiziert, dass subgenomische, selektierbare, selbstreplizierende HCV-RNA entstand. Im Einzelnen wurden die Virusproteine Core bis NS2 durch ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen, welches die Selektion von Neomycin (G418)-resistenten Klonen ermöglicht, sowie eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) ersetzt, welche die Translation ermöglicht. Das subgenomische Replikon kodiert somit die nicht-strukturellen Virusproteine NS3 bis NS5B. [43] Nach erfolgter Transfektion des Isolats in humane Hepatoma 7-Zellen (Huh7) und Selektion mittels Neomycin, überleben nur diejenigen Klone (u.a. Huh 5-5, 5-15 und 9-13) [43], welche durch adaptive Mutationen in der Virus-RNA eine ausreichend hohe Replikationsrate aufwiesen [44]. Zurzeit bestehen subgenomische Replikonsysteme für die HCV-Genotypen eins bis vier [12].

Eine Voraussetzung zur Erforschung des gesamten viralen Lebenszyklus wurde durch die Etablierung von in Zellkultur stabilen, infektiösen Viruspartikeln (*cell culture-derived* HCV,

HCVcc) geschaffen, die auch Schimpansen und Mäuse mit human chimärer Leber infizieren können. Dabei wurde das virale Genom aus dem Blut eines japanischen Patienten mit einer fulminanter Hepatitis C-Infektion (JFH1, Genotyp 2a) isoliert. Zur Untersuchung aller sieben Genotypen wurden chimäre Viren generiert, die die strukturellen Proteine der Genotypen eins bis sieben und die Nicht-Strukturproteine sowie die untranslatierten Regionen des JFH1 mit adaptiven Mutationen tragen. [12]

## 1.2 DAS HEPATITIS-C-VIRUS MANIPULIERT DIE IMMUNANTWORT SEINES WIRTES

Das Besondere des hochgradig an seinen Wirt adaptierten Hepatitis-C-Virus im Vergleich zu vielen anderen human pathogenen Viren ist, dass es außerhalb seines Wirtes kaum überdauern kann, im infizierten Wirt zu persistierenden Infektion mit hoher Viruslast führt und ein Wirtswechsel überwiegend parenteral erfolgt. Wesentlich dabei ist, dass die in der Regel über Jahrzehnte verlaufende asymptomatische Erkrankung die Übertragungswahrscheinlichkeit des Virus erhöht und so dazu beiträgt, das Fortbestehen des Virus sicher zu stellen. Um über Jahrzehnte im Wirt unter anhaltender Replikation zu persistieren, ist es essentiell, dass HCV Strategien entwickelt hat, die Mechanismen der angeborenen und adaptiven antiviralen Immunantwort des Wirtes zu unterlaufen, Entzündungsreaktionen zu modifizieren und die Infrastruktur der Wirtszelle zu nutzen ohne deren Lebensfähigkeit zu gefährden. [13] Die Details dieser komplexen Interaktion von Virus und Wirt sind in großen Teilen noch ungeklärt. Im Folgenden sollen die bislang zur Virologie von HCV und der Interaktion von Wirt und Virus bekannten Sachverhalte einleitend zusammengefasst werden.

### 1.2.1 DIE ANTIVIRALE IMMUNANTWORT

Die antivirale Immunantwort erfolgt stets durch das angeborene und erworbene Immunsystem. Um eine Immunreaktion auszulösen, muss das Virus durch den Wirt erkannt werden. Virale Bestandteile, wie doppelsträngige (ds) RNA, können als so genannte *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) mit Hilfe von *pattern recognition receptors* (PRR) sowohl durch Immunzellen als auch, in Abhängigkeit von der Rezeptorausstattung, durch viele andere Zellpopulationen wie unter anderem Hepatozyten wahrgenommen werden. [45] So erkennen Hepatozyten eine HCV-Infektion durch die zur Gruppe der RNA-Rezeptoren gehörenden PRR *retinoic acid inducible gene* (RIG1) [45], *melanoma differentiation antigen* (MDA)5 [46] und *toll-like-receptor 3* (TLR3) [47]. Vermittelt durch die RIG1- und/oder TLR3-Signalkaskade kommt es zur Aktivierung von

Zellfaktoren, welche die Expression von Interferonen, Zytokinen sowie Chemokinen induzieren [16] und damit den viralen Lebenszyklus direkt hemmen oder Immunzellen rekrutieren [5, 48].

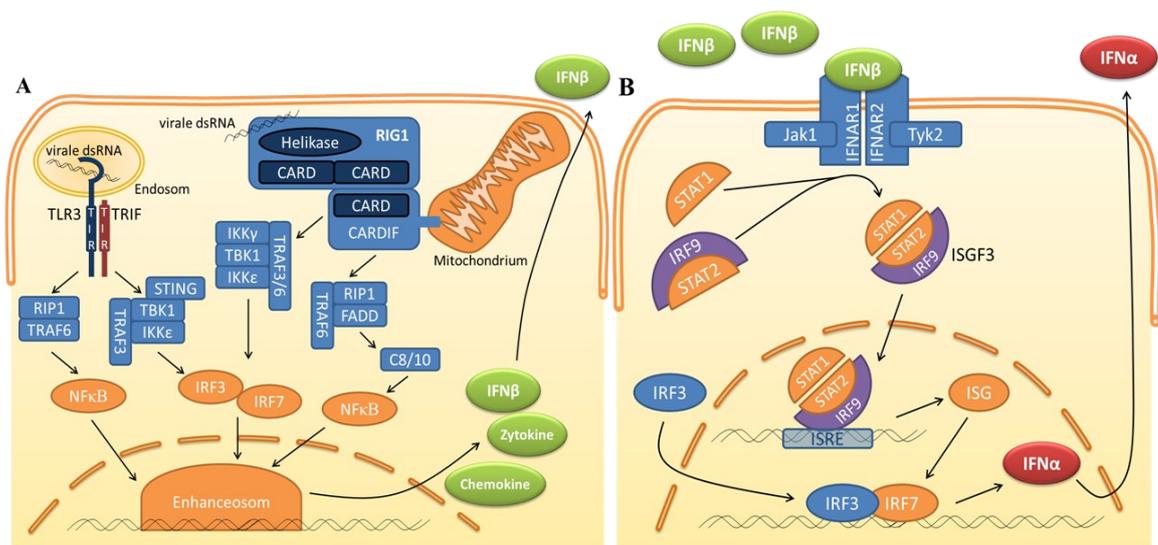
Die *pattern recognition receptors* (PRR) RIG-1 wie auch MDA5 gehören zu den DExD/H box RNA-Helikasen, sogenannten RIG1-like receptors (RLR), die durch zwei N-terminale *caspase recruitment domains* (CARD) charakterisiert sind [13, 49]. Durch Bindung viraler dsRNA im Zytosol, die als Zwischenprodukt bei der HCV-Replikation entsteht [50], wird eine Konformationsänderung dieser Rezeptoren induziert, die zu einer Oligomerisierung der jeweiligen Proteine führt [16]. CARD-vermittelt bildet RIG1 mit *CARD adaptor inducing IFN $\beta$*  (CARDIF) einen Komplex, der über Aktivierung weiterer Faktoren und Kinasen, wie *TNFR associated factor* (TRAF)3, TRAF6, *inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ -B kinase* (IKK) $\gamma$ , IKK $\epsilon$  und *TANK-binding kinase 1* (TBK) schließlich zur Aktivierung von *interferon regulatory faktor* (IRF) 3 und IRF7 führt. Weiterhin kann der RIG1/CARDIF-Komplex über *fas-associated protein with death domain* (FADD), TRAF6 und *receptor interacting protein* (RIP1) nachgeschaltet über Caspase 8 und 10-Induktion zur Aktivierung von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF $\kappa$ B) führen. NF $\kappa$ B ist einer der Zellfaktoren, welche wie oben beschrieben die Expression von Interferonen, Zytokinen und Chemokinen aktivieren. [16]

Ein weiterer *pattern recognition receptor* (PRR), mit dem die Hepatozyten virale dsRNA erkennen, ist der *toll-like-receptor 3* (TLR3). TLR3 bindet an endosomale virale dsRNA, die nach Zelllyse durch Scavenger Rezeptoren aus dem extrazellulären Milieu in Endosomen aufgenommen wurde. [50] Nach Erkennen der viralen dsRNA erfolgt die intrazelluläre Signalweiterleitung über einen zytoplasmatischen Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) durch Interaktion mit TIR-Domäne-haltigen Liganden, wie beispielsweise *TIR domain-containing adaptor inducing IFN $\beta$*  (TRIF). Durch die Rekrutierung von TRAF3 und den Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  werden wiederum IRF3 und IRF7 aktiviert. [13, 16] Auch die Aktivierung von NF $\kappa$ B kann TLR3/TRIF-vermittelt über eine Interaktion durch TRAF6 mit RIP1 erfolgen [13].

Zusammenfassend kommt es nach Erkennen viraler dsRNA vermittelt durch die RIG1-, MDA5- und/oder TLR3-Signalkaskade zur Aktivierung von IRF3, IRF6 sowie NF $\kappa$ B. Nach Homo- und Heterodimerisation von IRF3 und IRF7 bilden diese gemeinsam mit NF $\kappa$ B und AP1 (*activator protein 1*) ein Transkriptionskomplex, welcher auch Enhanceosom genannt wird. Das Enhanceosom führt schließlich im Nukleus nach Bindung an entsprechende DNA Regionen zur transkriptionellen Aktivierung des IFN $\beta$ -Gens, sowie weiterer Zielmoleküle deren Transkription über diesen Komplex mit kontrolliert wird. [16]

Interferon- $\beta$  bildet gemeinsam mit IFN $\alpha$  die Hauptvertreter der Typ-I-Interferone, zu denen auch IFN- $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\tau$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\omega$  und  $\nu$  gezählt werden [51]. Das IFN $\beta$  wirkt parakrin und autokrin über den Typ-I-Interferon-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Der Typ-I-IFN-Rezeptor ist ein Heterodimer aus den beiden Rezeptoruntereinheiten *interferon  $\alpha/\beta$  receptor* (IFNAR)1 und IFNAR2, die jeweils mit Januskinasen Jak1 und Tyrosinkinase (Tyk)2 assoziiert sind. Nach Aktivierung der Januskinasen erfolgt die Phosphorylierung und Aggregation von *signal transducer and activator of transcription* (STAT)1 und STAT2, welches mit IRF9 assoziiert ist, sodass es zur Ausbildung des transkriptionellen Proteinkomplex *interferon stimulated gene faktor* (ISGF)3 kommt. Durch Anlagerung des ISGF3-Komplexes im Nucleolus an entsprechende DNA-Bindungs-Sequenzen, die dementsprechend auch als IFN-*stimulated response element* (ISRE) bezeichnet werden, kommt es zur verstärkten Transkription von einer Gruppe von Zielgenen die auch als IFN $\alpha/\beta$ -stimulierende Gene (ISG) zusammengefasst werden. [13]

In **Abb. 1** werden die beschriebenen Mechanismen vereinfacht schematisch dargestellt.



**Abb. 1: Die antivirale Immunantwort der Hepatozyten auf das Hepatitis C Virus:**

A Die virale ds RNA wird in Hepatozyten durch RIG1 oder auch TLR3 erkannt. RIG1 beinhaltet zwei N-terminale caspase recruitment domains (CARD). Durch Bindung der viralen dsRNA und dadurch bedingter Konformationsänderung des Rezeptors kann dieser an CARDIF binden und im Komplex weitere Kinasen und Faktoren aktivieren. Einerseits kommt es durch die so aktivierten TRAF 3, TRAF6, IKK $\gamma$ , IKK $\epsilon$  und TBK1 zur Rekrutierung von IRF 3 und IRF7 andererseits durch so aktivierte FADD, TRAF6 und RIP1 zur Caspase 8 und 10-Induktion und damit zur NF $\kappa$ B-Aktivierung. STING (stimulator of interferon genes) ist ein Adaptormolekül, das an TBK1 bindet und die Phosphorylierung des IRF3 erleichtert. Weiterhin wird die virale dsRNA in Endosomen durch TLR3 erkannt. Durch Interaktion der TIR-Domänen des TLR3 und TRIF werden TRAF3, TBK1 und IKK $\epsilon$  rekrutiert, welche wiederum IRF3 und IRF7 aktiviert. Auch die Aktivierung von NF $\kappa$ B kann TLR3/TRIF-vermittelt über eine Interaktion durch TRAF6 mit RIP1 erfolgen. Durch Homo- und Heterodimerisation der aktivierten IRF3, IRF6 sowie NF $\kappa$ B, bilden diese ein Enhanceosom, das schließlich im Nucleolus nach Bindung an entsprechende DNA-Regionen zur transkriptionellen Aktivierung des IFN $\beta$  Gens, sowie weiterer für Zytokine und Chemokine codierender Gene führt. B Das IFN $\beta$  wirkt über den Typ I-Interferon-Rezeptor, einem Heterodimer aus IFNAR1 und IFNAR2, die jeweils mit Jak1 und Tyk2 assoziiert sind. Nach Aktivierung dieser erfolgt die Aggregation von STAT1 und STAT2, welches mit IRF9 assoziiert ist, wodurch sich der Proteinkomplex ISGF3 ausbildet. ISGF3 bindet im Nucleolus an ISRE, was die verstärkte Transkription von ISG-Genen und IFN $\alpha$  bewirkt.

wodurch eine verstärkte Transkription von IFN $\alpha/\beta$ -stimulierende Gene (ISG) bewirkt wird. [5, 13, 16, 45-51] Abbildung übernommen und modifiziert von Bode et al, Arch. Biochem. Biophys., vol. 462, no. 2, pp. 254–65, Jun. 2007 [13].

Das menschliche Genom kodiert über 300 ISGs, die über den Jak/STAT-Signalweg reguliert werden [50]. Zu den ISG-vermittelten Effektorproteinen zählt beispielsweise die Proteinkinase R (PKR) und die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OSA). Wobei die Proteinkinase R (PKR) die Translation in den Hepatozyten hemmt und die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OSA) vermittelt durch die Aktivierung von RNaseL die Spaltung viraler und zellulärer mRNA bewirkt. Weiterhin kommt es zur Hochregulation der PRR, sodass es zu einer erhöhten Sensitivität der Hepatozyten gegenüber viralen PAMP kommt. [13] Insgesamt führt die Freisetzung der Typ I Interferone und die ISG-Expression sowie die dadurch vermittelte Zytokin- und Chemokinfreisetzung zur Hemmung des viralen Zelleintritts, der viralen Replikation und Translation [50] sowie zur Virus-Clearance, zum Schutz der Nachbarzellen und zur Rekrutierung sowie Reifung von Immunzellen [5, 48].

Im Rahmen des angeborenen Immunsystems werden zur Abwehr gegen das Hepatitis-C-Virus natürliche Killerzellen, natürliche Killer-T-Zellen und Makrophagen rekrutiert [52]. Kupfferzellen werden im Rahmen der HCV-Infektion einerseits über Chemokine und Zytokine sowie andererseits über die Erkennung von Core und NS3 mittels des TLR2 aktiviert [16]. Zu ihren Funktionen zählen die Antigenphagozytose und Antigenpräsentation mittels *major histocompatibility complex* (MHC) II auf ihrer Zelloberfläche. Im Rahmen einer Infektion führen sie zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und zur TNF $\alpha$ -Freisetzung. Auch dendritische Zellen (DZ) gehören zu den sogenannten Antigenpräsentierenden Zellen, die in der Lage sind, in benachbarte Lymphorgane abzuwandern, um dort T- und B-Lymphozyten zu aktivieren. [52] Somit bilden Antigenpräsentierende Zellen ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität [16].

Das erworbene Immunsystem spielt eine wichtige Rolle bei der HCV-Clearance, denn eine spontane Viruseliminierung ist assoziiert mit frühen neutralisierenden Antikörpern, sowie einer HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort [53]. Für die Induktion einer HCV-spezifischen T- und B-Zell-Antwort sind die Antigenpräsentation mittels MHC-Moleküle sowie die Freisetzung stimulierender Zytokine essentiell. Während T-Helfer1-Zellen zytotoxische CD8<sup>+</sup>-Zellen aktivieren und IFN $\gamma$ , IL2 und TNF $\alpha$  sezernieren, führen die T-Helfer2-Zellen zur B-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion sowie Sekretion von IL4, IL5, IL6 und IL13. [52] Die Viruseliminierung geht dabei mit einer prädominanten T-Helfer1-Antwort einher [54].

CD8<sup>+</sup>-Zellen sind Haupteffektorzellen in der HCV-Elimination [55]. Dabei erfolgt die CD8<sup>+</sup>-Zell-vermittelte HCV-Elimination einerseits durch zytolytische Effekte an infizierten Hepatozyten durch einen direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch die Freisetzung von Perforinen [56] und andererseits durch eine nicht-lytische Freisetzung von IFN $\gamma$  und die dadurch vermittelte Hemmung der viralen Replikation [57].

Durch die Aktivierung der B-Zellen kommt es zur Ausbildung spezifischer Antikörper, welche sich sowohl gegen freie Viruspartikel als auch gegen infizierte Zellen richten. Durch Bindung der Antikörper an infizierte Zellen wird Zellyse, Hemmung der viralen Replikation oder Virusfreisetzung induziert. Die Antikörperbindung an virale Partikel führt zur Hemmung der viralen Adhäsion an die Zelloberfläche und dadurch bedingt zur Verhinderung des Zelleintritts. Antikörper im Rahmen der chronischen HCV-Infektion sind meist gegen Epitope im Bereich der hypervariablen Region des HCV-E2-Proteins gerichtet. Dies erklärt, bei hoher Mutationsrate in diesem Bereich, die Ineffektivität der Antikörper im Rahmen der chronischen Hepatitis C-Infektion. [52, 58]

Daneben ist die Apoptose ein weiterer essentieller antiviraler Effekt der infizierten Zelle. Die Apoptose kann durch einen extrinsischen Mechanismus (über Aktivierung von Todesrezeptoren wie TNF-Rezeptor 1, Fas [CD95] und TRAIL [TNF-related apoptosis-inducing ligand] -Rezeptor) oder einen intrinsischen Mechanismus (durch DNA-Schaden, metabolische Störungen, Wachstumsfaktormangel oder ROS-Produktion) ausgelöst werden. Beide Wege beeinflussen sich gegenseitig und führen über eine Aktivierung von Caspasen zum programmierten Zelltod. [13]

### 1.2.2 VIRALE MECHANISMEN ZUR HEMMUNG DER IMMUNANTWORT DES WIRTES

Evolutionsbedingt hat das Hepatitis-C-Virus verschiedene Strategien entwickelt, um die Immunantwort des Wirtes zu beeinflussen und ihr zu entgehen, sodass HCV im Wirt über Jahrzehnte persistieren kann, ohne dass es zur Viruselimination kommt [50].

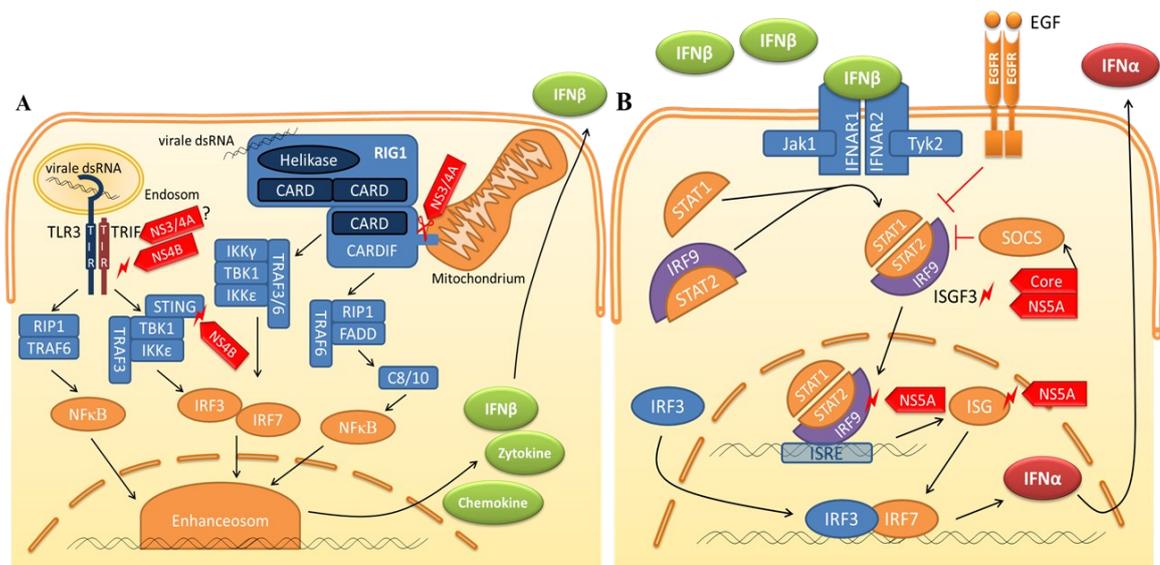
So ist das Virus in der Lage, die über PRR induzierten Signalwege und die hierdurch bedingten antiviralen Effektormechanismen zu umgehen. Die NS3/4A-Protease spaltet CARDIF, wodurch es sich von der mitochondrialen Membran löst und nicht mehr mit der Proteinkinase IKK $\epsilon$  interagieren kann. Damit unterbricht NS3/4A den RIG1- bzw. MDA5-vermittelten Signalweg und hemmt die IFN-Bildung. [59] Auch wurde eine NS3/4A-induzierte Spaltung von TRIF, die zur Blockierung des TLR3-Signalweges führen soll, beschrieben [23], konnte jedoch in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden [60]. Neuere Arbeiten wiesen allerdings einen NS4B-vermittelten Caspase 8-abhängigen Mechanismus

nach, der über einen TRIF-Proteinabbau zur Hemmung des TLR3-vermittelten Interferonsignalweges führt [61]. NS4B hemmt die RLR-vermittelte Interferonaktivierung auch durch Interaktion mit *stimulator of interferon genes* (STING), einem Adaptormolekül, welcher an TBK1 bindet und die Phosphorylierung des IRF3 erleichtert. NS4B unterbricht dabei die Proteininteraktion zwischen STING und TBK1 und verhindert damit die Aktivierung von IRF3 und konsekutiv die Interferonaktivierung. [62, 63]

Das Hepatitis-C-Virus hat weiterhin komplexe Strategien entwickelt, um auch dem nachfolgenden IFN-induzierten antiviralen Mechanismus zu entgehen [64]. So blockiert das Core-Protein den IFN $\alpha$ / $\beta$ -abhängigen Jak/STAT-Signalweg über unterschiedliche Mechanismen, wie dem vermehrten Abbau oder die Inaktivierung von STAT1, der Hemmung der Heterodimerisierung mit STAT2 und eine verminderte Bindungsaffinität von STAT1 an die DNA [13, 64]. Auch induziert das Core-Protein eine erhöhte Expression von *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)3, einem endogenen Inhibitor des Jak/STAT-Signalweges [65, 66]. Der Jak/STAT-Signalweg wird auch über die EGFR-Aktivität reguliert. So konnten Lupberger *et al.* nachweisen, dass eine EGFR-Stimulation zur Reduktion der STAT1-Dimerisierung und damit Verminderung der DNA-Bindung von STAT1 führt. Weiterhin reduziert der EGFR-Inhibitor Erlotinib unter IFN $\alpha$ -Stimulation die STAT3-Phosphorylierung und führt über eine Inbalance zwischen STAT1 und STAT3 zur verstärkten IFN $\alpha$ -induzierten antiviralen Antwort des STAT1. Diese These wird durch erhöht gemessenen EGF-Serumkonzentrationen von HCV-infizierten Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die IFN $\alpha$ -Therapie bekräftigt. [67] Jedoch korreliert die EGFR-Hemmung durch Erlotinib, welche die antivirale Wirkung des IFN $\alpha$  steigern soll, mit einer erhöhten SOCS3-Expression [67], was im Widerspruch mit der oben beschriebenen These steht, dass das Core-Protein über eine erhöhte SOCS3-Expression die antivirale IFN $\alpha$ -Antwort hemmt.

Das virale NS-Protein NS5A blockiert zahlreiche Signalwege und Effektorproteine. So wird unter anderem die Expression und Aktivierung von STAT1 und des ISGF3-Komplexes sowie die Translokation in den Nukleus und deren Bindung an die DNA gehemmt. [16] Hiervon abgesehen sind auch direkte inhibitorische Effekte von NS5A auf Interferon  $\alpha$ / $\beta$ -stimulierte Genprodukte, wie etwa die Proteinkinase R oder die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase beschrieben. Eine indirekte Verminderung der ISG-Expression durch NS5A erfolgt über die gesteigerte Produktion und Freisetzung des Chemokins CXCL8. [13] NS5A induziert die CXCL8-mRNA-Expression und CXCL8-Proteinsynthese. Eine gesteigerte CXCL8-Proteinsynthese ist wiederum assoziiert mit einer erhöhten HCV-RNA-Replikation in Replikonzellen. [68] Auch die CXCL8-Serumkonzentration bei Patienten mit chronischer

Hepatitis C ist im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht [69]. In **Abb. 2** werden die beschriebenen Mechanismen vereinfacht schematisch dargestellt.



**Abb. 2: Das HCV hemmt durch seine Proteine die antivirale Immunantwort in Hepatozyten**

Die Prozesse der antivirale Immunantwort werden bereits in Abb. 1 identisch dargestellt und beschrieben. A NS3/4A spaltet CARDIF, wodurch es sich vom Mitochondrium löst und damit nicht mehr mit der Proteinkinase IKKε interagieren kann. Damit wird der RIG1-vermittelte Signalweg gehemmt. Der TLR3-vermittelte Signalweg wird an mehreren Stellen gehemmt. Hierbei wird sowohl ein NS4B-vermittelter Caspase 8-abhängiger TRIF-Proteinabbau beschrieben, also auch eine NS3/4A-induzierte Spaltung von TRIF diskutiert. Weiterhin hemmt NS4B die Interaktion zwischen STING und TBK1, sodass die IRF3-Phosphorylierung gestört wird. Über die oben beschriebenen Mechanismen wird die Transkription des IFNβ sowie weiterer Zytokine und Chemokinen gehemmt. B Auch die Signalweiterleitung des IFNβ über die Aktivierung des Typ I-Interferon-Rezeptors wird durch virale Proteine unterbrochen. Das Coreprotein hemmt den IFNα/β-abhängigen Jak/STAT-Signalweg über eine STAT1-Inaktivierung, Hemmung der Heterodimerisierung mit STAT2 und verminderte Bindungsaffinität des Komplexes an die DNA sowie Induktion von SOCS3, einem endogenen Inhibitor des Jak/STAT-Signalweges. NS5A hemmt die Aktivierung von STAT1, des ISGF3-Komplexes sowie die Translation in den Nucleus und die DANN-Bindung. Weiterhin hat NS5A inhibitorische Effekte auf Interferon α/β-stimulierte Genprodukte. Darüber hinaus führt eine EGFR-Stimulation zur STAT1-Reduktion und verminderter STAT1-Bindung an die DNA. [13, 16, 50, 59-69] Abbildung übernommen und modifiziert von Bode et al, Arch. Biochem. Biophys., vol. 462, no. 2, pp. 254–65, Jun. 2007 [13].

Das Hepatitis-C-Virus hat ferner Strategien entwickelt, um die infizierte Zelle vor der Apoptose zu schützen, die einen essentiellen Mechanismus in der antiviralen Immunantwort des Wirts darstellt. So induziert die Expression der Proteine Core, E1, NS3/4A oder NS5A im transgenen Tiermodell protektive Effekte gegen die hepatotoxische Wirkung von TNFα/D-GalN oder LPS/D-GalN. Auch die Expression oder Aktivierung der Caspasen und Komponenten des Zellzyklus-Kontrollsystems, wie Bcl-XL, Bcl2, CDK2 (*cyclin dependent kinase*) und Zyclin D1 werden durch HCV-Proteine beeinflusst. Durch Beeinflussung von

Tumorsuppressor-Genen und Hemmung der Apoptose kommt es zu gesteigerter Zellproliferation und zum erhöhten Risiko der Zelltransformation, Tumorgenese und somit Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms (HCC). [13]

Auf zellulärer Ebene bedingt die chronische HCV-Infektion eine veränderte Anzahl, Zusammensetzung und Funktion der Effektorzellen. Durch den Einfluss von HCV-Proteinen kommt es zur vermehrten Freisetzung von Zytokinen wie IL10 und TNF $\beta$  durch Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und Lymphozyten. Dies moduliert die immunologische Wirtszellantwort zugunsten des HCV. [70, 71] Die Aktivierung von Rezeptoren und erhöhte Freisetzung von Zytokinen, die die Wirtsimmunantwort hemmen, führen zu einer reduzierten Aktivierung antigenpräsentierender Zellen und einer Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung der TH2-Antwort, was zu einer T-Zell-Erschöpfung und Chronifizierung der Infektion führt [16, 52]. Bedingt durch die ständige T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Dysfunktion sind die Zellen nicht mehr in der Lage, IL2, TNF $\alpha$  und TNF $\gamma$  zu produzieren und haben die Fähigkeit zur Degranulation verloren [72–74]. Es konnte belegt werden, dass das HCV-Coreprotein die T-Zell-Proliferation durch Interaktion mit dem Komplement-Rezeptor gC1qR hemmen kann [75]. Über die Modulation der Chemokinfreisetzung ist HCV in der Lage, die Infiltration von Immunzellen zu steuern und die Einwanderung Antigen-spezifischer Effektorzellen zu unterbrechen [76]. So kann die Überexpression von CCR4-Liganden bei chronischer Infektion zur Rekrutierung von TH2-Zellen und Tregs (regulatorische T-Zellen) führen [77]. Tregs werden im hohen Maße während der chronischen Hepatitis C aktiviert und führen zur Unterdrückung der HCV-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort [78].

Eine chronische HCV-Infektion ist zudem gekennzeichnet durch eine CD8<sup>+</sup>-Zell-Dysfunktion. Das HCV bewirkt über eine CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Erschöpfung schließlich eine CD8<sup>+</sup>-Zell-Verarmung [55]. CD8<sup>+</sup>-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche im hohen Maße den Rezeptor *programmed cell death protein 1* (PD1). Durch die Interaktion mit seinem Liganden PD-L1, welcher während der chronischen Hepatitis C-Infektion auf sinusoidalen Endothelzellen und Kupfferzellen vermehrt exprimiert wird, wird PD1 aktiviert und die T-Zell-Apoptose induziert. [79]

Kupfferzellen verlieren im Rahmen der Hepatitis C-Infektion die TLR-Toleranz [80]. Die TLR-Toleranz beschreibt, dass eine anhaltende TLR-Aktivierung durch Pathogene zu einer verminderten Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt, um eine Überstimulation des Immunsystems zu verhindern [81], was zu einer dauerhaften Aktivierung der Kupfferzellen führt [82]. Ein weiteres Beispiel, wie Kupfferzellen zur

Erschöpfung der HCV-spezifischen T-Zell-Antwort führen, stellt das Galectin 9 dar. Dieser Ligand wird auf der Zelloberfläche der Kupfferzellen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C vermehrt exprimiert. Als natürlicher Ligand der inhibitorischen T-Zell-Rezeptoren führt es zur zu einer Reduktion der HCV-spezifischen T-Zellen. [82] Weiterhin reduziert das HCV-Core-Protein die Expression der MHC-Moleküle und weiterer co-stimulierender Faktoren auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden, dendritischen Zellen [83]. Dies resultiert in einer verminderten oder unzureichenden Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen, die dadurch sowohl in ihrer Anzahl als auch in der Expression ihrer Aktivitätsmarker eingeschränkt sind. Dies führt zu einer reduzierten Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine. [83]

Das Hepatitis-C-Virus liegt in einer hohen genetischen Variabilität in seinem Wirt vor. Die Grundlage dieser sogenannten Quasispezies ist die hohe Fehlerquote der viralen RNA-Polymerase NS5A und einer enormen Replikationsrate von  $10^{12}$  Viren pro Tag. Somit ist HCV in der Lage, sich dem Selektionsdruck durch die Immunantwort des Wirtes oder der antiviralen Therapie durch beständige Mutation der eigenen Erbinformation und entsprechender Veränderung viraler Antigenen anzupassen. [84] Die Mutationen entstehen vor allem im Bereich der  $CD8^+$ -T-Zell-Epitope, was auf einen von den  $CD8^+$ -T-Zellen ausgehenden Selektionsdruck hinweist [85, 86]. Limitiert wird die virale Variabilität durch eine ausreichende HCV-Replikation, sodass eine Balance zwischen effizienter Umgehung des Immunsystems und einer ausreichenden viralen Vitalität entsteht [87]. Durch diese schnelle Virusevolution werden auch die gebildeten Antikörper ineffektiv, auch diese können einen Selektionsdruck auf die Quasispezies ausüben [88]. Weiterhin kann die Assoziation mit körpereigenen Lipoproteinen [88] oder die Zell-Zell-Transmission eine Resistenz gegenüber den zirkulierenden Antikörpern bewirken [40].

Insgesamt unterhält das Hepatitis-C-Virus eine Homöostase, die eine ausreichende Virusreplikation erlaubt, ohne eine Situation hervorzurufen, die mit der Lebensfähigkeit von Wirt bzw. Wirtszelle nicht vereinbar sind [64]. Weiterhin wird die HCV-induzierte Leberschädigung vorrangig durch die immunvermittelte Entzündung hervorgerufen und nicht durch den direkten zytotoxischen Effekt des Virus [16]. Die Interferenz des Virus mit dem Immunsystem des Wirtes und die hierdurch hervorgerufene Fehlregulation der Immunreaktion spiegelt sich auch in immunvermittelten extrahepatischen Manifestationen wieder, wie unter anderem Kryoglobulinämie, Sjögren-Syndrom oder Glomerulonephritiden, die sich im Rahmen der chronischen Hepatitis C-Infektion entwickeln können [89].

### 1.3 CHEMOKINE

Chemokine sind eine große Familie an multifunktionalen Zytokinen, die ihren Namen aufgrund ihrer chemotaktischen Wirkung erhalten haben [90]. Chemokine haben ein Molekulargewicht von 8 bis 14 kD [91] und sind charakterisiert durch eine Chemokindomäne, die vier Cysteine in einer hoch konservierten Positionierung beinhaltet [92]. Die Benennung der CXC-Chemokine ergibt sich durch eine einzelne Aminosäure, welche die N-terminalen Cysteine voneinander trennt. Im Gegensatz dazu, liegen die Cysteine der CC-Familie direkt nebeneinander. Insgesamt orientiert sich die Namensgebung nach den strukturellen Eigenschaften und nicht der Funktion der Zytokine, da die verschiedenen Familien Proteine mit diversen Funktionen einschließen. [92]

Chemokine sind nicht nur bei der Immunzell-Rekrutierung bei Entzündungen essentiell, sie führen auch zu Aktivierung und Degranulation von Immunzellen sowie zur Transkription verschiedener Gene [90, 91, 93]. Auch im Rahmen der Homöostase von Organen einschließlich der Beeinflussung von Apoptose und Angiogenese spielen sie eine wichtige Rolle [90, 91, 93] und üben unter anderem auch im Kontext von Lebererkrankungen pleiotrope Effekte auf Nicht-Immunzellen aus [94]. So regulieren Chemokine im Rahmen einer Hepatitis die Wanderung und Aktivität von Hepatozyten, Kupfferzellen, Ito-Zellen, Endothelzellen und zirkulierenden Immunzellen. Im Rahmen von Lebererkrankungen aktivierte Kupfferzellen aber auch andere Zellpopulationen sezernieren unter anderem Interleukin (IL)-1 $\beta$  und CXC-Chemokine, wie CXCL1, CXCL2 und CXCL8, wodurch neutrophile Granulozyten rekrutiert und aktiviert werden und es zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies sowie Proteasen kommt. Dadurch bedingt, kann es zur Ausbildung hepatischer Nekrose kommen. [94]

Ihre Funktion entfalten die Chemokine durch Bindung an Chemokinrezeptoren. Es wurden 50 verschiedene humane Chemokine und 20 verschiedene Chemokinrezeptoren beschrieben [93]. Die verschiedenen Chemokine können unterschiedliche und sogar gegensätzliche biologische Funktionen über die Bindung am gleichen Rezeptor induzieren [94].

Nach Bindung der Chemokine an die typischen G-Protein-gekoppelten Membranproteine dissoziieren diese Membranproteine in ihre G $\alpha$ 1- und G $\beta$ - $\gamma$ -Untereinheiten und aktivieren die der Phosphatidylinositol-3-kinase und der Rho-Guanosintriphosphatase nachgeschalteten Signalwege. Der nachfolgende zelluläre Kalziumeinstrom führt zur Aktivierung von Downstream-Kaskaden, welche zum Beispiel zu Konformationsänderungen von Leukozyten-Integrinen führen. Die Konformationsänderung bedingt eine verstärkte Interaktion mit Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und

erleichtert so die Leukozytenadhäsion sowie Extravasation. Die Konzentrierung von Chemokinen am Ort des Gewebeschadens erfolgt über eine hohe Affinität der Chemokine zu Glykosaminoglykanen. Diese sind in der extrazellulären Matrix und an endotheliale Oberflächen gebunden, sodass die Chemokine lokal immobilisiert werden und sich ein zum Ort des Gewebsschadens hin zunehmender Konzentrationsgradient entwickelt. [94] Es ist naheliegend, dass auch das Hepatitis-C-Virus, das zur Entwicklung einer persistierenden Infektion führen kann, über Mechanismen verfügt, die es erlauben, in diese für die Entwicklung von Immunantwort und Entzündungsgeschehen essentiellen Signalketten einzugreifen und hierdurch sowohl die antivirale Immunantwort als auch das Entzündungsgeschehen zu beeinflussen [95].

### 1.3.1 CXC FAMILIE

Die CXC-Chemokin-Familie wird unterteilt in ELR-Chemokine und Nicht-ELR-Chemokine. ELR-Chemokine tragen in ihrer Proteinsequenz als Charakteristikum zwischen dem N-Terminus und dem ersten Cystein eine Sequenz aus drei Aminosäuren: Glutamat, Leucin und Arginin [92]. Zu den ELR-Chemokinen gehören CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 und CXCL15 [90]. Mitglieder der ELR-Chemokin-Familie zeichnen sich durch eine potente chemotaktischer Wirkung auf neutrophile Granulozyten aus [90] und fördern die Neovaskularisation über eine angiogene Aktivität [96]. Weiterhin wirken alle ELR-Chemokine über den CXC-Chemokinrezeptor 2 (CXCR2), wobei CXCL6 und CXCL8 auch an CXCR1 binden [97].

Nicht-ELR-Chemokine bilden eine heterogene Gruppe von Chemokinen mit unterschiedlichen Funktionen. Sie verbindet das Nicht-Vorhandensein der ELR-Sequenz. [92] Zu der Nicht-ELR-Chemokinfamilie gehören CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14 und CXCL16 [90].

### 1.3.2 CXCL1, CXCL2 UND CXCL3

Die Chemokine CXCL1, auch bekannt als *growth-regulated protein  $\alpha$*  (GRO $\alpha$ ) und *melanoma growth stimulating activity  $\alpha$*  (MSGA $\alpha$ ), CXCL2, auch bekannt als GRO $\beta$  und MGSAB $\beta$ , und CXCL3, auch bekannt als GRO $\gamma$  oder MGSAG $\gamma$ , gehören zu der CXC-Chemokin-Familie [91]. CXCL1, CXCL2 und CXCL3 wirken chemotaktisch bzw. aktivierend auf Immunzellen, wie Neutrophile, Basophile, Eosinophile, Monozyten und Lymphozyten, sowie die glatte Muskulatur [90].

Im Rahmen von Wundheilung produzieren beispielsweise Keratozyten und Endothelzellen CXCL1 und exprimieren verstärkt den entsprechenden Rezeptor CXCR2 in Bereichen, in

denen Epithelialisierung und Neovaskularisation stattfinden. Die im Rahmen der Wundheilung stattfindende Leukozyteneinwanderung, Keratozytenproliferation und Migration sowie Angiogenese können durch CXCL1 und auch durch CXCL8 und ihren gemeinsamen Rezeptor CXCR2 vermittelt werden. [98]

Auch in der Tumorgenese sind CXC-Chemokine beteiligt. So wurden bei Patienten mit malignem Melanom erhöhte Serumkonzentrationen von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 gemessen und in kolorektalen Tumoren konnte eine erhöhte CXCL1-Proteinsynthese festgestellt werden. [97]

### 1.3.3 CXCL8

Auch das CXC-Chemokin CXCL8 gehört der Familie der ELR-CXC-Chemokine an [91, 92]. Zahlreiche Zellen des Immunsystems, wie mononukleären Phagozyten, T-Lymphozyten und Neutrophile, aber auch andere Zellpopulationen wie Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen, wie beispielsweise Hepatozyten, produzieren CXCL8 als 99 Aminosäuren großes Vorläuferprotein. Durch posttranslationale Modifikationen entstehen zahlreiche Varianten des auch als IL8 bekannten Chemokins, wobei es in seiner Hauptform aus einem 72 Aminosäuren großen Polypeptid besteht. [99] Seine Wirkung vermittelt CXCL8 über die zwei Rezeptoren CXCR1 und CXCR2. Über die Bindung dieser Rezeptoren bedingt CXCL8 wie auch die übrigen CXCR1/2-Liganden eine Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration, die Freisetzung von Enzymen und Sauerstoffradikalen sowie eine Aktivierung der Phospholipase D. [100]

Entdeckt wurde CXCL8 als ein starker chemotaktischer Transmitter und ein Aktivator für neutrophile Granulozyten [92]. Jedoch weist es zahlreiche weitere Funktionen im Rahmen von Entzündungen auf und wird als Antwort auf proinflammatorische Zytokine wie IL1 und TNF $\alpha$  [99], sowie Bakterien und EGF durch eine Reihe verschiedener Zellpopulationen sezerniert [101]. Auch virale Infektionen induzieren die Sekretion von CXCL8 [102–107]. So wirkt das Encephalomyokarditis Virus (EMCV) der IFN $\alpha$ -induzierten Hemmung der viralen Replikation durch CXCL8-Sekretion entgegen [104].

Auch im Rahmen einer Hepatitis C-Infektion weisen Patienten signifikant erhöhte CXCL8-Serumkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden auf. Wobei signifikant erhöhte CXCL8-Serumkonzentrationen unter IFN-Medikation ein Therapieversagen anzeigen [69]. Patienten, die auf die IFN-Therapie ansprechen, haben hingegen eine reduzierte CXCL8-Promotoraktivität [105]. Die im Rahmen der Hepatitis C-Infektion induzierte CXCL8-Expression vermindert die antivirale IFN-Antwort [68, 106, 107]. Dies erfolgt zum Beispiel durch die Hemmung der Oligoadenylat-Synthetase [68] einer durch Typ I-Interferone

induzierten Synthetase, die zur Spaltung von viraler und zellulärer RNA im Rahmen der angeborenen Immunantwort beiträgt [108]. So steigert eine CXCL8-Stimulation die HCV-RNA-Synthese in chronisch replizierenden Zellen während ein CXCL8-*Knockdown* die virale Replikation vermindert. Dieser Effekt konnte im Rahmen einer akuten Hepatitis C-Infektion nicht belegt werden, sodass eine ambivalente CXCL8-Wirkung möglich wäre. [108]

Hohe CXCL8-Serumkonzentrationen sind darüber hinaus mit einer Progression von Leberfibrose und Leberzirrhose bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion oder auch alkoholtoxischer Hepatitis assoziiert, wobei festgestellt wurde, dass die Fibroseprogression zudem mit einer Zunahme von CXCR1 und CD68<sup>+</sup> hepatischen Makrophagen einhergeht [109]. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Feststellungen, dass die Hepatitis C-Infektion zu einer Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung der TH2-Antwort führt [16, 52] und die aus T-Helfer-2-Zellen sezernierten Zytokine IL4 und IL13 die Expression von CXCR1 und CXCR2 auf humanen Makrophagen fördern und damit CXCL8 eine chemotaktische Wirkung auch für Makrophagen verleihen [110].

Ferner spielt CXCL8 im Zusammenhang der Selbsterneuerung, Chemoresistenz und der Tumorgenese von *tumor initiating cells* (TIC) von Lungen-, Brust-, Darm- und Endometrium-Tumoren eine wichtige Rolle [111] und ist für die Angiogenese in Tumoren verantwortlich [97, 112]. Im Rahmen des hepatozellulären Karzinoms sind ansteigende CXCL8-Serumkonzentrationen bei Tumorprogression oder Metastasierung messbar [111]. Die Regulation der CXCL8-Produktion in unstimulierten Zellen erfolgt durch drei Mechanismen. Durch Bindung des Negativ-regulierenden Elements (NRE) des *NFκB-repressing factor* (NRF), der Octamer-Bindungsstelle im CXCL8-Promotorbereich des Octamer-1 (OCT-1)-Gens sowie durch eine Deacetylierung der Histone durch Histon-Deacetylase 1 wird die Expression von CXCL8 gehemmt. [101]

Wird eine Zelle mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL1 oder TNF stimuliert, erfolgt die Induktion der Expression von CXCL8 wie bei anderen Chemokinen auch durch die Ausbildung eines Enhanceosoms am Promotorbereich. Hierbei spielen im Wesentlichen zwei Signalwege eine wichtige Rolle. Ein Signalweg aktiviert durch *NFκB-inducing kinase* (NIK) oder *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Kinase-Kinase (MEKK1) die Freisetzung von NFκB aus dem inhibitorischen Komplex mit IκB, und ermöglicht hierdurch die Translokation von NFκB in den Nukleus. Der zweite Signalweg verläuft über eine Aktivierung der C-Jun-N-terminale Kinasen (JNK), wobei letztere in der Regel über die MAP-Kinase-Kinase (MKK)4 und MKK7 aktiviert werden können. [113] Dies führt zu

einer Aktivierung von *activating protein 1* (AP1), welches durch gemeinsame Bindung mit *CAAT/enhancer binding protein* (C/EBP) an den CXCL8-Promoter in einigen Zellen durch gesteigerte Transkription zur vermehrten CXCL8-Expression führt [101]. Posttranskriptionell führt die Aktivierung des MKK6-p38-MK2-Signalweges zur Stabilisierung der CXCL8-mRNA [114]. Auch EGF ist in der Lage, eine CXCL8-Expression zu induzieren. In humanen Epithelzellen erfolgt dies JNK- und NFκB-abhängig, wobei die CXCL8-Expression nur geringfügig gesteigert und EGF als ein schwacher Aktivator dieser Faktoren beschrieben wird [113]. Im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom stimuliert EGF die CXCL8-Produktion durch eine EGFR-vermittelte Aktivierung des PI3K/Akt- und des Erk1/2-Signalweges [115].

Die Regulation der CXCL8-Expression im Rahmen der Hepatitis C-Infektion kann durch virale Proteine, aber auch durch die antivirale Antwort des angeborenen Immunsystems auf das Virus erfolgen. Durch die Erkennung der doppelsträngigen RNA mittels RIG-1 werden unter anderem NFκB und IRF-3 aktiviert. Diese Faktoren sind in der Lage, direkt an den CXCL8-Promotor zu binden und die CXCL8-Transkription zu induzieren. [116] Unklar ist inwieweit die durch die Aktivierung von RIG-1 bedingte Expression von CXCL8 für die Induktion der Expression von CXCL8 durch HCV relevant ist. Dies insbesondere, da HCV selbst durch die HCV-kodierte Protease NS3/4A die intrazelluläre Signalweiterleitung von RIG-1 durch die proteolytische Spaltung von CARDIF (auch MAVS oder VISA) [59], eine zentrale Komponente der Signalübertragung von RIG-1, unterbricht.

Dass das Hepatitis-C-Virus die CXCL8-Expression induziert, ist gut dokumentiert, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen nur unzureichend verstanden sind [117]. Bisherige Untersuchungsbefunde legen nahe, dass sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Mechanismen involviert sind [117], wobei bislang als virale, für die Induktion der CXCL8-Expression verantwortliche Faktoren, die Nicht-Strukturproteine NS2 [118], NS4A, NS4B [119], NS5A [68] und Core [119] identifiziert wurden. Hierbei führen NS4A und NS4B über die Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren zu vermehrten CXCL8-Promotoraktivität [119]. Darüber hinaus ist NS5A in der Lage, den CXCL8-Promotor direkt zu transaktivieren [68] und zur Synthese von CXCL8-mRNA und Protein zu führen [68, 106]. Interessanterweise führt die HCV-induzierte CXCL8-Produktion wiederum zur Aktivierung der Erk-, JNK- und MAPK-Signalwege mit einer daraus resultierenden Heraufregulation der Expression von Cyclooxygenase 2 (COX-2) [120]. Das HCV-Core-Protein führt dagegen durch eine Aktivierung von NFκB-assoziierten Signalwegen zur vermehrten CXCL8-

Transkription [105, 121], wobei Ray *et al.* belegen konnten, dass die HCV-bedingte Regulation des NFκB Genotyp-abhängig ist [122].

Sillanpää *et al.* stellten eine reduzierte CXCL8-Expression durch das virale Nicht-Strukturprotein NS3/4A fest. Einschränkend ist hier anzumerken, dass Sillanpää *et al.* in ihrer Studie UHCV-Zelllinien (von humanen Osteosarcoma-abgeleitete Zelllinien) verwenden, die stabil entweder die HCV-Nicht-Strukturproteine NS3/4A, NS4B oder das gesamte HCV-Polyprotein exprimieren und kein replikationsfähiges HCV-Genom. Ferner wird in dieser Arbeit die Chemokinexpression durch das Sendai-Virus induziert. [123]

#### 1.4 DER EPIDERMAL WACHSTUMSFAKTOR UND SEINE SIGNALWEGE

Als erster Wachstumsfaktor wurde der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) 1962 durch Cohen *et al.* beschrieben. EGF besteht aus 53 Aminosäuren und enthält zur Aufrechterhaltung seiner Tertiärstruktur drei intramolekulare Disulfidbrücken. [124] Seine Funktion entfaltet es über den EGF-Rezeptor (EGFR) und spielt eine fundamentale Rolle in der Aktivierung und Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, wie Geweberegeneration, -aufrechterhaltung und -differenzierung, aber auch Apoptose [125]–[127].

Der EGF-Rezeptor, auch bekannt als ErbB1 (*avian erythroblastosis oncogene B*), ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase und gehört der ErbB-Rezeptorfamilie an [128]. Die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie bestehen aus drei Hauptdomänen. Extrazellulär befindet sich die Domäne, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist. Über ein hydrophobes, transmembranes Segment ist diese mit der zytoplasmatischen Domäne verbunden. [125] Neben der Tyrosinkinase enthält die zytoplasmatische Domäne weitere regulatorische Sequenzen mit Tyrosin-, Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen [129]. Dabei kann die Phosphorylierung sowohl durch die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität des EGFR als auch über zytosolische Kinasen, wie c-Src (*cellular sarcoma*) und Januskinase2 (Jak2) erfolgen. Insgesamt sind zwanzig verschiedene Tyrosin-, zehn Serin- und vier Threonin-Phosphorylierungsstellen, sowie über hundert mit dem EGF-Rezeptor interagierende Proteine beschrieben. [126]

Der EGFR-Signalweg ist in vielen verschiedenen Karzinomzelltypen durch Mechanismen wie Überexpression oder konstitutive Stimulation überaktiviert und dereguliert [127]. Auch in hepatozellulären Karzinom-Zellen ist der EGFR häufig überexprimiert, was mit einer hohen proliferativen Aktivität des Karzinoms, dem Vorhandensein von Metastasen und einem verminderten krankheitsfreien Überleben korreliert [130, 131].

Im Rahmen von viralen Infektionen erfüllen der EGF-Rezeptor und seine nachgeschalteten Signalwege wichtige Funktionen. So dient der EGF-Rezeptor, wie bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben, zum Beispiel als Wirtsfaktor beim Eintritt des Hepatitis-C-Virus in die Wirtszelle [24, 28, 29].

Weiterhin ist beschrieben, dass eine Aktivierung des EGFR-Signalweges mit der antiviralen Immunantwort interferiert. So kann eine EGFR-Aktivierung zu einer verminderten antiviralen IFN $\alpha$ -vermittelten Immunantwort bei erfolgter HCV-Infektion führen. [67] Ferner verhindert eine EGF-Stimulation in Plattenepithelkarzinomzellen eine IFN $\alpha$ -induzierte apoptotische DNA-Fragmentierung [132]. Die basale EGFR-Aktivierung induziert die STAT3-Phosphorylierung und -Aktivierung und führt zur Imbalance zwischen STAT1 und STAT3, wohingegen die EGFR-Hemmung eine gesteigerte antivirale Antwort bewirkt, indem es zu einer gesteigerten Bildung von SOCS3 und so zu einer STAT3-Hemmung kommt. Als Gegenspieler zum proinflammatorischen IFN $\alpha$ -induzierten STAT1 ist STAT3 ein wichtiger Faktor im Rahmen der Leberregeneration und begünstigt Zellüberleben, Proliferation und Immuntoleranz. [67]

Ein weiterer Prozess, in dem EGF eine wichtige Rolle spielt, ist die Leberregeneration und Beeinflussung von Gewebe-aufrechterhaltenden Prozessen. Durch die virale Manipulation der EGF/EGFR-vermittelten Signaltransduktion interagiert das Hepatitis-C-Virus damit auch mit wichtigen Mechanismen der Kontrolle der zellulären Funktionen. [133]

Im Folgenden werden zentrale Signalkaskaden des epidermalen Wachstumsfaktors und die Einflussnahme von HCV auf diese beschrieben.

#### 1.4.1 AKTIVIERUNG DES EGFR DURCH EGF

Durch die Bindung eines EGF-Moleküls an den EGF-Rezeptor ändert sich die Konformation des Rezeptors, sodass zwei benachbarte EGFR miteinander oder mit anderen ErbB-Rezeptoren ein Homo- bzw. Heterodimer ausbilden. Infolgedessen wird die intrinsische Tyrosinkinase aktiviert und eine Auto-Phosphorylierung induziert. Die dadurch phosphorylierten intrazellulär gelegenen Tyrosin-, Serin- und Threonin-Reste des Rezeptors dienen als hoch affine Bindungsstellen für zytoplasmatische Moleküle, die an der Weiterleitung biologischer Signale beteiligt sind. [129] Die phosphorylierten Tyrosinreste weisen spezifische Bindungsstellen für *src-homology2*-(SH2-) Domänen-haltige Proteine auf. Signalmoleküle, die über ihre SH2-Domänen mit dem aktivierten EGFR interagieren, sind unter anderem die Phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), *SH2-containing proto-oncogene* (Shc), Protein-Tyrosin-Phosphatase 2C (PTP 2C), sowie das *non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1* (Nck1) [124].

Über die Adapterproteine Grb2 und Shc erfolgt die Rekrutierung von Ras (*rat sarcoma*) und die Aktivierung von *mitogen activating protein kinase* (MAPK)-Signalwegen. Da der EGF-Rezeptor nicht direkt mit der Phosphoinositid-3-kinase interagieren kann, erfolgt die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges auch über eine Rekrutierung von Ras. [128] Die Aktivierung dieser Signalwege führt zu verschiedensten zellulären Antworten, wie Genexpression, Restrukturierung des Zytoskeletts, Hemmung der Apoptose und Erhöhung der zellulären Proliferation [127].

Einen wichtigen negativen Rückkopplungsmechanismus stellt die Internalisierung des EGF-EGFR-Komplexes dar. Die Liganden-induzierte Rezeptorendozytose resultiert im Recycling des Rezeptors an die Zelloberfläche oder in der Degradation des Rezeptors. Die Signaltransduktion findet auch während des Endosomentransportes zum Lysosom statt. Aufgrund der Vielfältigkeit der Endozytosemechanismen und noch widersprüchlichen Daten ist der genaue Mechanismus der Signalweiterleitung im Verlauf der Endozytose bislang nicht vollständig aufgeklärt. [134]

Das Hepatitis-C-Virus nimmt unter anderem über das Phosphoprotein NS5A Einfluss auf die Rezeptorendozytose. NS5A bindet zelluläre Proteine, die in die EGFR-Endozytose involviert sind und führt im frühen Endosom zu einer Rezeptor-Umverteilung mit Entkopplung des Liganden-Rezeptor-Komplexes nach EGF-Stimulation. [135] Weiterhin hemmt NS5A sowohl nach EGF-Stimulation als auch in unstimulierten Zellen die EGFR-Degradation [135]. Unter EGF-Stimulation hemmt NS5A die EGFR-Degradation durch die Hemmung der EGFR-Ubiquitinierung und die Interaktion mit *cas ligand with multiple SH3 domains* (CMS), einem in die EGFR-Endozytose involvierten Adaptermolekül [136].

#### 1.4.2 DIE MITOGEN-AKTIVIERTEN PROTEINKINASE-SIGNALWEGE

Die *mitogen-activated proteinkinase* (MAPK)-Kaskaden sind zentrale intrazelluläre Signalweiterleitungssysteme. Sie bestehen aus drei Kernkinasen und häufig zusätzlich aus einer vor- (MAPK-Kinase-Kinase-Kinase, MAP4K) und einer nachgeschalteten Kinase (MAPK-*activated proteinkinase*, MAPKAPK). Zu den Kernkinasen, deren Phosphorylierung sequentiell erfolgt, gehören die MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K), die MAPK-Kinase (MKK) und die Gruppe der MAPK. Am Ende der Kaskade werden Transkriptionsfaktoren, Transkriptionssuppressoren und Chromatin-Remodulierungsproteine wie auch Proteine, die die RNA-Stabilität und die Translation kontrollieren in ihrer Aktivität beeinflusst und damit zahlreiche zelluläre Prozesse, wie unter anderem

Genexpression, intrazelluläre Signalweiterleitung, Proliferation, Differenzierung, Wachstum, Motilität und Apoptose. [137]

### **MEK1-Erk1/2-Signalkaskade**

Die Adapterproteine Grb2 und Shc können an mehreren Tyrosinresten des EGF-Rezeptors binden [138]. Grb2 verbindet den EGFR mit dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor *son of sevenless* (SOS), welcher das Membran-assoziierte Ras durch den Austausch des gebundenen GDP durch GTP aktiviert [139]. Das aktivierte Ras wiederum interagiert mit der Serin-Threonin-Proteinkinase Raf1 (*proto-oncogen rapidly accelerated fibrosarcoma*), die für eine Aktivierung der *mitogen/extracellular signal-regulated kinase* (MEK1) verantwortlich ist [140]. Die Ras-Raf1-Signalkaskade kann auch über eine Bindung des Grb2-SOS-Komplexes über die SH2-Domäne des Grb2 an das Adapterprotein Shc initiiert werden [141] und im Rahmen des EGFR-Signalweges auch am Endosomen ablaufen [142]. Weiterhin kann Raf1 über die Proteinkinase C (PKC) oder *mixed-lineage protein kinase 3* (MLK3) aktiviert werden [121, 122].

Die MAPK-Kinase MEK1 ist eine Threonin-Tyrosinkinase und phosphoryliert unter anderen die *extracellular-signal-regulated kinase* (Erk) 1/2 an der Thr/Glu/Tyr-Sequenz in der Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne [137]. Die aktivierte Proteinkinase Erk1/2 transloziert in den Nukleus, wo sie einerseits Transkriptionsfaktoren wie Elk1, Ets1, Sap1a, c-myc, Tal und STAT phosphoryliert und hierdurch die Aktivität dieser Faktoren beeinflusst [137], andererseits in Form von Erk2 auch direkt an die DNA binden kann und so zum Beispiel als Suppressor der INF $\gamma$ -induzierten Gene *OSA-1* und *IRF-9* dient [145]. Ferner aktiviert die Proteinkinase Erk1/2 weitere Kinasen, wie die ribosomalen S6-Kinasen (RSK), die zytosolische Phospholipase A2 (PLA2), die *microtubule-associated proteins* (MAP)-1, -2 und -4 sowie die Tau-Proteinkinase, und beeinflusst hierdurch ebenfalls die Aktivität der Faktoren c-Fos, GSK3 und c-Jun. Sie phosphoryliert zudem auch die Proteine der vorgeschalteten Kaskade SOS, Raf1 und MEK1 sowie den EGF-Rezeptor und reduziert hierdurch ihre katalytische Aktivität im Sinne einer negativen Rückkopplung. Spezifische Phosphatasen dephosphorylieren und inaktivieren Erk1/2, sodass diese wieder ins Zytosol transloziert und mit MEK1 reassoziert. [137]

Die Bedeutung des MEK1/Erk1/2-Signalweges für den viralen Lebenszyklus von HCV ist noch nicht eindeutig geklärt. So wird sowohl eine HCV-induzierte Hemmung als auch Aktivierung des MEK1/Erk1/2-Signalweges beschrieben. Auch sind die Berichte zu der Bedeutung dieses Signalweges für den viralen Lebenszyklus widersprüchlich.

Unter anderem wird beschrieben, dass die Hemmung dieses Signalweges und insbesondere die Hemmung von MEK1 und Erk2 zu einer erhöhten viralen Replikation und hohen NS5A-Proteinkonzentrationen führt [146–149]. NS5A hemmt hierbei die EGF-vermittelte Aktivierung des Erk1/2-Signalweges oberhalb von Ras mit verringerter EGFR-Tyrosinphosphorylierung, abnormer Rekrutierung der Adapterproteine Grb2 und Shc und reduzierter Shc-Phosphorylierung [150], womöglich hervorgerufen durch Sequestration von Grb2 vom aktivierten EGFR [135, 146]. In Bezug auf die antivirale Immunantwort soll eine MEK1-Hemmung in Replikonzellen eine verminderte antivirale  $\text{INF}\gamma$ -Antwort bedingen [147].

Macdonald *et al.* untersuchten den MEK-Erk1/2-Signalweg sowohl in EGF-stimulierten als auch in unstimulierten Zellen [148]. Dabei stellten sie fest, dass NS5A die Erk1/2-abhängigen Transkriptionsfaktoren im EGF-stimulierten Zustand nicht so stark wie in unstimulierten Zellen hemmt [148], sodass EGF anscheinend die NS5A-induzierte Hemmung des Erk1/2-Signalweges zum Teil wieder aufhebt.

Im Gegensatz zu diesen Befunden legen andere Arbeiten nahe, dass eine HCV-Infektion zu einer Stimulation des MEK1/Erk1/2-Signalweges führt [128], welche für die HCV-RNA-Replikation förderlich ist [151], und durch Herabregulation von  $\text{IFN}\alpha/\beta$ -stimulierenden Genen (ISG) und  $\text{IFN}$ -Rezeptoren 1 und 2 antiviral wirkt [149]. Weiterhin bedingt das virale Struktur-Protein Core eine hohe basale Raf1-Aktivität sowie eine prolongierte Erk1/2-Aktivierung als Antwort auf die EGF-Stimulation [152]. Darüber hinaus führt die Aktivierung der EGFR-Erk1/2-Signalkaskade auch zu einer Phosphorylierung der *MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1* (MKNK1), welche als Wirtsfaktor den viralen Zelleintritt über den EGFR erleichtert [153]. Daneben wurde auch eine Korrelation einer Erk1/2-Aktivierung in Lebergewebeproben aus HCC mit dem Vorhandensein einer HCV-Infektion festgestellt [154]. Der Grund für diese kontroversen Befunde ist letztendlich unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass verschiedene Modellsysteme für HCV verwendet wurden und möglicherweise auch prozedurale Unterschiede bzw. Unterschiede im experimentellen Aufbau bestehen, die für die divergenten Befunde mitverantwortlich sind.

### **JNK-Signalkaskade**

Die c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK)-Signalkaskade ist auch als *stress-activated proteinkinase* (SAPK)-Signalkaskade bekannt, wird jedoch auch durch Stress-unabhängige Stimuli und Mitogene aktiviert. Diese Stimuli aktivieren kleine GTPasen wie *cell division control protein 42 homolog* (CDC42) und *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1)

oder Adapterproteine wie TRAF, die eine Vielzahl an MAP4K und MAP3K aktivieren, sodass in der Folge unter anderen MKK4 oder MKK7 phosphoryliert und hierdurch aktiviert werden, die wiederum JNK phosphorylieren und aktivieren. [155] JNK und ihre Substrate regulieren die Aktivität und zum Teil auch die Expression von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, JunB, JunD, ATF2, p53, JDP2 und c-Myc [155] und beeinflussen damit in Abhängigkeit vom Zelltyp und von ko-agierenden Signalen eine Vielzahl von zellulären Funktionen einschließlich Proliferation, Differenzierung und Apoptose [153].

Bei der Induktion des JNK-Signalweges durch EGF-Rezeptorstimulation ist die Aktivierung über Rac1 beschrieben. Rac1 wiederum kann durch Bindung an Phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphaten (PI3P) im Rahmen des Phosphoinositol-3-Kinase-Signalweges oder durch Erhöhung der intrazelluläre Kalziumkonzentration im Rahmen des Phospholipase C-Signalweges aktiviert werden. [156]

Im Rahmen der HCV-Infektion wird die virale Replikation durch die Aktivität der JNK-Signalkaskade gehemmt [153]. Die JNK-Signalkaskade vermittelt, wie bereits oben beschrieben, eine HCV NS4B-induzierte Aktivierung von STAT3 [157].

### **p38<sup>MAPK</sup> -Signalkaskade**

Die durch Stress, Rezeptoraktivierung und zelluläre Prozesse aktivierbare p38<sup>MAPK</sup> und die durch diese aktivierte Signalkaskade zählt ebenfalls zu den SAPK-Signalkaskaden und weist eine Vielzahl an Wechselwirkungen und gemeinsamen Komponenten mit der JNK-Signalkaskade auf. Ähnlich der JNK-Signalkaskade werden über Adapterproteine, kleine GTPasen, MAP4K sowie MAP3K die Kinasen MKK3 und MKK6 phosphoryliert und aktiviert. [155] Die durch MKK3 und MKK6 aktivierte p38<sup>MAPK</sup> moduliert, ebenfalls in Abhängigkeit vom Zelltyp und ko-agierenden Signalen, direkt oder über nachgeschaltete Kinasen zahlreiche Substrate [155] wie MAPKAP Kinase (MK) 2 [158] und MK3 [159], sowie einige MAPKAP Kinasen der Erk1/2-Signalkaskade, wie die *MAPK-interacting serine/threonine-protein kinase 1/2* (MNK1/2) und *mitogen- and stress-activated proteinkinase* (MSK1), sodass Quervernetzungen zwischen den drei wichtigsten MAPK-Signalkaskaden bestehen. Transkriptionsfaktoren, die durch p38<sup>MAPK</sup> reguliert werden, sind ATF-1/2/6, Sap1, CHOP, p53, C/EBP, MEF2C, MEF2A und HBP1 [155]. Darüber hinaus interagiert sie über die Regulation der Expression des *suppressors of cytokine signaling* (SOCS) 3 auch mit der Aktivität anderer Signalkaskaden wie der IL-6-induzierten Signalübertragung über STAT3 [160].

Im Rahmen der HCV-Infektion konnte eine gesteigerte p38<sup>MAPK</sup>-Phosphorylierung nachgewiesen werden [161]. Hierbei scheint das virale Phosphoprotein NS5A direkt mit der

p38<sup>MAPK</sup> sowie mit der *mixed lineage kinase 3* (MLK3), einem Aktivator der p38<sup>MAPK</sup>, zu interagieren und führt zur Hemmung der MLK3/p38<sup>MAPK</sup>-Signalkaskade, die Stress-induziert zur Apoptose führt [162]. Auch wurde eine direkte Mitwirkung des p38<sup>MAPK</sup>/MK2-Signalweges im Rahmen der IFN $\alpha$ -vermittelten Immunantwort gegen das Hepatitis-C-Virus beschrieben [163]. Darüber hinaus reguliert MK2 weitere Zytokine, wie TNF $\alpha$  und IL1 [164]. Das HCV-Coreprotein aktiviert direkte, extrazelluläre einen Komplementsystem-Rezeptor gC1qR über einen p38<sup>MAPK</sup>-abhängigen Signalweg, der zur vermehrten CXCL8-Expression in humanen Lungenfibroblasten führt [165].

#### 1.4.3 PHOSPHOINOSITID-3-KINASE-AKT-SIGNALWEG

Die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) erfolgt in Antwort auf eine EGF-Stimulation über die Rekrutierung vom *Grb2-associated-binding protein 1* (Gab1) [166]. Die PI3-Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositole (PI) der inneren Schicht der Doppellipidmembran zu Phosphatidylinositol -3, 4, 5-trisphosphaten (PI3P), die als Bindungsstellen für die *Pleckstrin homology* (PH)-Bindungsdomäne-haltige Proteinkinase Akt und die *phosphoinositid-dependent kinase* (PDK)1 dienen [167, 168]. PDK1 und eine weitere Kinase, wie *mammalian target of rapamycin complex* (mTORC)2 oder *DNA-dependent proteinkinase* (DNA-PK) phosphorylieren und aktivieren Akt [169, 170]. Akt, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB), ist eine Serin-Threoninkinase [171]. Es phosphoryliert zahlreiche Substrate [171] und reguliert unterschiedliche zelluläre Prozesse, wie Proteinsynthese, Zellzyklus, Kontrolle des Glukosemetabolismus [133].

Das Hepatitis-C-Virus nimmt durch seine Proteine entscheidenden Einfluss auf die EGF-induzierte PI3K/Akt-Signalkaskade. NS5A interagiert direkt mit der p85 Untereinheit der PI3K und bewirkt eine gesteigerte Phosphorylierung der Kinase. Folglich kommt es zu einer verstärkten Akt-Aktivierung mit gesteigerter Phosphorylierung und Hemmung des proapoptischen Proteins *Bcl-2-antagonist of cell death* (BAD). [172, 173] Auch NS4B ist in der Lage, die Aktivität der PI3K zu steigern, indem es die Aktivierung des *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP) und Fas fördert [174].

NS3/4A spaltet an zwei verschiedenen Schnittstellen die T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (TCPTP), einem endogenen Negativregulator des EGF-Rezeptors. Die dadurch bedingte Herabregulation des TCPTP führt zu einer konstitutiven Akt-Aktivierung und Sensibilisierung der HCV-Replikon-tragenden Zellen gegenüber einer EGF-Stimulation mit erhöhter EGFR-Phosphorylierung und Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ )- sowie Akt-Signalkaskaden. [24]

### 1.4.4 PHOSPHOLIPASE C-SIGNALWEG

Die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) bindet mit ihrer SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste des aktivierten EGF-Rezeptors. Im Bereich der Zellmembran katalysiert sie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DG). Ein zentraler Effekt von IP<sub>3</sub> ist die Induktion der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern sowie die Aktivierung von Kalzium- und Calmodulin-abhängigen CAM-Kinasen. [124] Diacylglycerol aktiviert unterschiedliche Isoformen der Proteinkinase C (PKC). PKC ist eine Serin-Threoninkinase, die bei der Regulation von Wachstumsfaktor-abhängigen Prozessen, wie Proliferation und Differenzierung beteiligt ist. Nach einer EGF-Stimulation kann die aktivierte PKC zur direkten Phosphorylierung von EGFR führen. Dies bewirkt eine erhöhte Ligandenaffinität und Kinaseaktivität des Rezeptors sowie die Umlenkung vom Ubiquitin-vermitteltem Abbau zum Rezeptor-Recycling zurück zur Membran. [175]

Das Hepatitis-C-Virus interferiert auf mehreren Wegen mit dem PLC $\gamma$ -Signalweg. Das Nicht-Strukturprotein NS3 führt als Pseudosubstrat der PKC zur Hemmung ihrer katalytischen Aktivität. [176] Weiterhin hemmt NS5A die *spleen tyrosin kinase* (Syk), eine *non-receptor*-Tyrosinkinase, mit dem Effekt einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung von PLC $\gamma$ 1 [177].

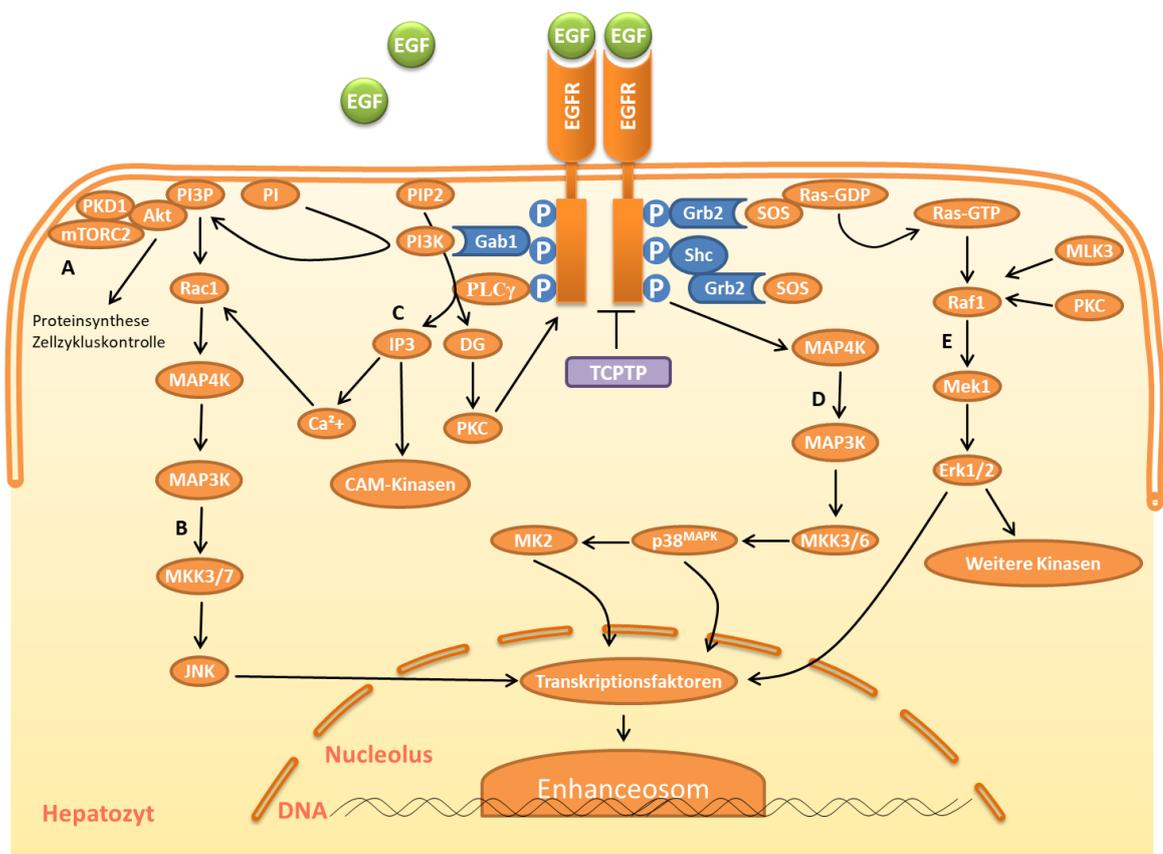


Abb. 3: Die Signalweiterleitung nach Stimulation des EGF-Rezeptor durch EGF

Vereinfachte Darstellung der wichtigsten und in dieser Arbeit beschriebenen Signalwege des EGF-Rezeptors nach Stimulation mit EGF. Die zahlreichen Wechselwirkungen und Quervernetzungen sind aus Übersichtsgründen nicht abgebildet. Nach Bindung von EGF kommt es zur Dimerisierung des EGFR und Auto-Phosphorylierung durch die intrinsische Tyrosinkinase, dadurch entstehen aus den Tyrosin-, Serin- und Threonin-Resten des Rezeptors Bindungsstellen für zytoplasmatische Moleküle. Dargestellt sind von links nach rechts die PI3-Kinase-Akt- (A), JNK- (B), PLC $\gamma$ - (C), p38MAPK- (D) und Mek1-ERK1/2- (E)-Signalwege. A: Die PI3-Kinase wird über die Rekrutierung des Gab1 an den Rezeptor aktiviert und phosphoryliert PI zu PI3P, die als Bindungsstelle für u.a. Akt, PDK1 und mTORC2 dient. Wobei die zuletzt genannten Akt phosphorylieren und aktivieren. Akt wiederum phosphoryliert weitere Substrate und reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse. B: Die JNK-Signalkaskade wird nach EGF-Stimulation durch Rac1 aktiviert. Rac1 kann u.a. durch Bindung an PI3P oder durch Erhöhung der intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert werden. Dies führt zur Phosphorylierung zahlreicher MAP4K und MAP3K, welche wiederum MKK4 oder MKK7 und in der Folge JNK aktivieren. JNK und ihre Substrate regulieren schließlich zahlreiche Transkriptionsfaktoren. C: Die PLC $\gamma$  bindet direkt an den aktivierten EGF-Rezeptor und katalysiert PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und DG. IP<sub>3</sub> induziert eine Kalziumfreisetzung sowie eine Aktivierung von CAM-Kinasen und DG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche u.a. Raf1 aktivieren kann (E) und durch EGFR-Phosphorylierung zur gesteigerten Ligandenaffinität und Kinaseaktivität sowie Hemmung der Rezeptorendozytose. D: Bei dem p38MAPK-Signalweg werden über verschiedene Adaptorproteine sowie MAP4K und MAP3P die Kinasen MKK3 und MKK6 phosphoryliert, welche wiederum p38MAPK aktivieren. Die Kinase p38MAPK reguliert sowohl direkt Transkriptionsfaktoren oder weiter nachgeschaltete Kinasen, wie MK2. E: Über das Adaptorproteine Grb2 alleine oder über Shc bindet SOS, welcher das Membran-assoziierte Ras durch den Austausch des gebundenen GDP durch GTP aktiviert. Das aktivierte Ras interagiert mit Raf1, welches wiederum durch PKC und MLK3 reguliert werden kann. Diese Interaktion führt zur Aktivierung von MEK1, die u.a. für die Phosphorylierung und Aktivierung von Erk1/2 verantwortlich ist. Erk1/2 reguliert zahlreiche Transkriptionsfaktoren und weitere Kinasen. Eigene Erstellung nach folgender Literatur: [124, 129, 133, 137, 141, 145, 155, 156, 158, 159, 161, 166–171, 178]

## 1.5 T-ZELL PROTEIN TYROSIN PHOSPHATASE

Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP) werden in transmembrane und intrazelluläre Enzyme eingeteilt und sind durch eine konservierte Aminosäuresequenz (I/V)HCXAGXXR(S/T)G mit katalytisch essentiellen Cystein- und Arginin-Resten charakterisiert [179]. Sie wirken als Agonisten oder Antagonisten in Protein-Tyrosinkinase-vermittelten Signalwegen und regulieren zahlreiche physiologische Prozesse, wie zelluläre Proliferation, Migration und Differenzierung [180]. Die T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (TCPTP), die erstmals in T-Zellen beschrieben wurde, jedoch ubiquitär vorkommt, gehört zu den intrazellulären Enzymen und enthält eine SH2-Domäne, welche im Rahmen der Signalübermittlung Substratproteine mit phosphoryliertem Tyrosin erkennt. Durch alternatives *splicing* kommt das Protein mit einer Masse von 48 kD (TC48) und 45 kD (TC45) vor. [179] Sowohl TC45 als auch TC48 erkennen den aktivierten EGF-Rezeptor als Substrat. TC45 befindet sich initial am Nukleus und erkennt neben EGFR auch p52-Shc (*Src homology and collagen*) als Substrat. [179] Shc ist ein Adapterprotein mit zahlreichen Protein-Protein-Bindestellen, wie *phosphotyrosine-binding* (PTB)-Domäne, *collagen-homology* (CH)-Domäne und *Src homology 2* (SH2)-Domäne und existiert durch alternatives *splicing* in drei Isoformen p46, p52 und p66 [181]. Wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, bindet Shc an phosphorylierte Tyrosinreste des aktivierten EGFR, rekrutiert Ras und aktiviert MAPK-Signalwege.

Nach einer Stimulation mit EGF transloziert TC45 aus dem Nukleus und hemmt die Bindung von p52-Shc mit Grb2 [179]. Weiterhin hemmt TC45 die EGF-vermittelte JNK-Aktivierung, ohne jedoch die Aktivität von Erk2 zu beeinflussen [180]. Als negativer Regulator der EGF-induzierten PI3K-Signalkaskade ist TC45 in der Lage, die Aktivierung von Akt zu hemmen [180]. TCPTP kann durch Kollagen-gebundenes Integrin aktiviert werden, sodass es zu einer Hemmung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion nach Bindung des Kollagens an die Zelle kommt [182].

In Bezug auf die Hepatitis C-Infektion konnte in vorangehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass die virale NS3/4A Protease die TCPTP an zwei Motiven spaltet und hierdurch die Konzentration von TCPTP reduziert [24]. Da TCPTP ein wichtiger endogener „Negativregulator“ der Signalübertragung von EGFR ist, führt die Virus-vermittelte Steigerung der TCPTP-Proteinkonzentration zu einer Sensibilisierung gegenüber einer Stimulation mit EGF. Hierdurch kommt es zu einer verstärkten EGF-induzierten Aktivierung nachgeschalteter Signale wie PLC $\gamma$  und Akt. Zudem bedingt die Virus-bedingte Herabregulation der TCPTP eine EGFR-unabhängige, konstitutive Aktivierung von Akt. [24] Weiterhin führt NS3/4A durch die TCPTP-Spaltung zu einer Veränderung der interzellulären Kommunikation, welches eine Verschiebung der antiviralen Immunantwort von einer T-Helfer1-Zell-Antwort zu einer T-Helfer2-Zell-Antwort zur Folge hat [183]. Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, da Arbeiten nahelegen, dass eine Viruselimination eine prädominante T-Helfer1-Antwort voraussetzt [52].

## 1.6 ZIEL DER ARBEIT

Das Hepatitis-C-Virus verursacht in der überwiegenden Zahl der Infektionen eine chronische Infektion mit anhaltend hoher Virusreplikation. Hierbei kommt es in der Regel zu einem mitunter über mehrere Jahrzehnte gehenden Verlauf, in dem die Infektion trotz hoher Viruslast weitestgehend asymptomatisch verläuft. [1] Dieser Sachverhalt belegt, dass HCV im Rahmen der „Co-Evolution“ Mechanismen entwickelt haben muss, die es dem Virus ermöglichen, die antivirale Immunantwort wie auch die Entzündungsreaktion des Wirtes zu unterlaufen bzw. zu modifizieren. Darüber hinaus muss es in der Lage sein, die Infrastruktur der Wirtszelle zu nutzen ohne die Viabilität derselben zu sehr zu beeinträchtigen. [13]

Chemokine sind zentrale chemotaktische Signale, über die die Rekrutierung von Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort gesteuert und kontrolliert werden und damit auch die Zusammensetzung der Immunzellpopulationen in einem Gewebe sowie das lokale Mikromilieu [90, 94].

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten belegen, dass es in Gegenwart von HCV zu einer proteolytischen Spaltung und damit zu einer Herabregulation der Protein-Tyrosin-Phosphatase TCPTP kommt. Letztere ist ein zentraler endogener Negativregulator des EGF-Rezeptors, sodass die Herabregulation derselben zu einer verstärkten Liganden-induzierten Signalübertragung führt. [24]

Vor diesem Hintergrund war zentrales Anliegen der Arbeit, zu prüfen, ob eine verstärkte Aktivierbarkeit von EGFR auch Einfluss auf immunologische Signalnetzwerke und hierbei insbesondere auf die Freisetzung von Chemokinen der CXCR2 Familie hat.

Insbesondere sollten die folgenden Punkte geklärt werden:

- 1) Führt die Stimulation mit EGF und die EGF-induzierte Signalübertragung in hepatozytären Zelllinien wie Huh7 zu einer verstärkten Freisetzung von CXCR2 Liganden wie CXCL1, 2, 3 und 8?
- 2) Hat das subgenomische virale Replikon von HCV hierauf einen Einfluss?
- 3) Wenn ja, spielt eine Steigerung der Proteinsynthese der TCPTP, wie sie in Gegenwart von HCV nachgewiesen werden kann, in diesem Kontext möglicherweise eine Rolle?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL, SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN

#### Materialien für die Zellkultur

Gewebekulturflaschen: 75 cm <sup>2</sup>	<i>Greiner</i> ; Solingen, Deutschland
Gewebekulturschalen: 60 mm	<i>Falcon</i> ; Heidelberg, Deutschland
Gewebekulturplatten: 6-well	<i>Nunc</i> ; Wiesbaden, Deutschland

#### Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM/Nutrient Mix F-12	<i>Invitrogen</i> ; Karlsruhe, Deutschland
DMSO	<i>Sigma</i> ; München, Deutschland
FCS	<i>Perbio</i> ; Bonn, Deutschland
Geneticin G418	<i>Invitrogen</i> ; Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	<i>Invitrogen</i> ; Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM	<i>Invitrogen</i> ; Karlsruhe, Deutschland
PBS (w/o Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )	<i>Invitrogen</i> ; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	<i>Cytogen</i> ; Sinn-Fleisbach, Deutschland
Zeocin	<i>Invitrogen</i> ; Karlsruhe, Deutschland

#### Reagenzien und Feinchemikalien

5x siRNA-Buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
6-Aminocapronsäure	<i>Sigma</i> ; München, Deutschland,
Aprotinin	<i>Sigma</i> ; München, Deutschland
Benzamidin	<i>Sigma</i> ; München, Deutschland
Bradford Protein-Assay	<i>BioRad</i> ; Hercules, USA
Bromphenolblau	<i>Merck</i> ; Darmstadt, Deutschland
BSA	<i>PAA-Laboratories</i> ; Linz, Österreich
DharmaFECT 4 Transfection Reagent	Thermo Scientific, Waltham, USA
EDTA	<i>Merck</i> ; Darmstadt, Deutschland
EGF, human	<i>Roche</i> ; Mannheim, Deutschland
Glycerin	<i>Merck</i> ; Darmstadt, Deutschland
Glycerol	<i>Merck</i> ; Darmstadt, Deutschland
Glycin	<i>Merck</i> ; Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	<i>Sigma</i> ; München, Deutschland
Methanol	<i>Fluka</i> ; St. Gallen, Schweiz

NaCl	<i>Fluka</i> ; St. Gallen, Schweiz
Na-Pyrophosphat	<i>Sigma</i> ; München, Deutschland
Natriumorthovanadat	<i>Fluka</i> ; St. Gallen, Schweiz
Pefabloc	<i>Fluka</i> ; St. Gallen, Schweiz
SDS	<i>Serva</i> ; Heidelberg, Deutschland
siGenome Human PTPN2 siRNA (SMART pool)	Thermo Scientific, Waltham, USA
siGenome Non-Targeting siRNA #1	Thermo Scientific, Waltham, USA
siGenome Non-Targeting siRNA #3	Thermo Scientific, Waltham, USA
siGenome Non-Targeting siRNA #5	Thermo Scientific, Waltham, USA
Tris	<i>Sigma</i> ; München, Deutschland
Triton X 100	<i>Merck</i> ; Darmstadt, Deutschland
Tween-20	<i>Merck</i> ; Darmstadt, Deutschland
$\beta$ -Glycerolphosphat	<i>Sigma</i> ; München, Deutschland

### **Inhibitoren**

AG1478	<i>Calbiochem</i> ; Bad Soden, Deutschland
LY294002	<i>Calbiochem</i> ; Bad Soden, Deutschland
SB202190	<i>Calbiochem</i> ; Bad Soden, Deutschland
SB203580 Hydrochlorid	<i>Calbiochem</i> ; Bad Soden, Deutschland
U0126	<i>Calbiochem</i> ; Bad Soden, Deutschland
Wortmannin	<i>Calbiochem</i> ; Bad Soden, Deutschland

### **Kits**

Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!	<i>eBioscience</i> ; San Diego, USA
QIAshredder	<i>Qiagen</i> ; Hilden, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	<i>Qiagen</i> ; Hilden, Deutschland
MycoTrace (Mycoplasma PCR Detection Kit)	<i>PAA-Laboratories</i> , Linz, Österreich
RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen</i> ; Hilden, Deutschland

### **PCR**

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	<i>Applied Biosystems</i> ; Foster City, USA
Power SYBR Green PCR Master Mix	<i>Applied Biosystems</i> ; Foster City, USA

## Western Blot

Amersham Hyperfilm ECL	<i>GE Healthcare</i> , Fairfield, USA
Amersham Hybond-P PVDF-Membran	<i>GE Healthcare</i> , Fairfield, USA
Developer G153A+B	<i>AGFA</i> ; Mortsels, Belgien
Precision Plus Protein TM	<i>BioRad</i> ; Hercules, USA
Dual Color Standard	
Rapid Fixer G356	<i>AGFA</i> ; Mortsels, Belgien
Reblot Plus Strong	<i>Millipore Merck</i> ; Darmstadt, Deutschland
WL Chemiluminescence Reagent Plus	<i>Perkin Elmer</i> ; Waltham, USA

## Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Herkunft	Hersteller
<b>Akt/PKB</b>	Kaninchen, polyklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>EGFR</b>	Kaninchen, polyklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>Erk 1/2 (p44/42 MAPK)</b>	Kaninchen, monoklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>GAPDH</b>	Maus, monoklonal	<i>Biodesign</i> ; Saco, USA
<b>HCV NS3 [806]</b>	Maus, monoklonal	<i>Abcam</i> ; Cambridge, GB
<b>MAPKAPK-2</b>	Kaninchen, polyklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>p38<math>\alpha</math><sup>MAPK</sup></b>	Kaninchen, polyklonal	<i>Santa Cruz</i> ; Santa Cruz, USA
<b>Phospho-Akt (Thr308)</b>	Maus, monoklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>Phospho-Akt (Ser473)</b>	Kaninchen, monoklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>Phospho-EGFR (Tyr1068)</b>	Kaninchen, polyklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>Phospho-Erk1/2 (Thr202/Thr204)</b>	Maus, monoklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>Phospho-MAPKAPK-2 (Thr222)</b>	Kaninchen, monoklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>Phospho-p38<sup>MAPK</sup> (Thr180/Tyr182)</b>	Kaninchen, polyklonal	<i>Cell Signaling</i> ; Danvers, USA
<b>TCPTP</b>	Maus, monoklonal	<i>R&amp;D Systems</i> ; Minneapolis, USA
Sekundärantikörper	Herkunft	Hersteller
<b>HRP-anti-Kaninchen</b>	Ziege, polyklonal	<i>DAKO</i> ; Hercules, USA
<b>HRP-anti-Maus</b>	Kaninchen, polyklonal	<i>DAKO</i> ; Hercules, USA

## Oligonukleotide

Tabelle 2 Verwendete Oligonukleotide in der *real-time* quantitativen PCR

Bezeichnung	Nukleotidsequenz in 5'→3'	
<b>Humanes SDHA</b>	sense	CAC AGG GTC CAC TTC CTA ACA
	antisense	TTC AGC ATG ACA ACT GCT TTG
<b>Humanes TCPTP</b>	sense	AGA TGT GGT GTC TCG GTC GAT
	antisense	CGT GAT CTT TCT CAG GGC CA
<b>Humanes CXCL 1</b>	sense	CTG GCG GAT CCA AGC AAA T
	antisense	CAT TCC CCT GCC TTC ACA AT
<b>Humanes CXCL 2</b>	sense	GGA ATC CAA GAA AAT GGC CA
	antisense	CAT ACA TTT CCC TGC CGT CAC
<b>Humanes CXCL 3</b>	sense	TGC TTG TAG GGC ATA ATG CCT
	antisense	AGA GAA ACG CTG CAG AAT GGA
<b>Humanes CXCL 8</b>	sense	AGA AGT TTT TGA AGA GGG CTG AGA
	antisense	CAG ACC CAC ACA ATA CAT GAA GTG

## Geräte

Blottingkammer Fastblot	<i>Biometra</i> ; Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer Multigel	<i>Biometra</i> ; Göttingen, Deutschland
CO <sub>2</sub> Water Jacketed Incubator (Forma Model 3121)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Curix 60	<i>AGFA</i> ; Mortsel, Belgien
Multiskan Spectrum	Thermo Scientific, Waltham, USA
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences; Amersham, UK
7500 Real-Time PCR System	<i>Applied Biosystems</i> ; Foster City, USA
Viiia 7 Real-Time PCR System	<i>Applied Biosystems</i> ; Foster City, USA

## Software

MS Office	<i>Microsoft</i> , Washington, USA
Prism 5	<i>GraphPad</i> ; San Diego, USA
Mendeley	<i>Elsevier</i> , Amsterdam, Niederlande

## 2.2 ZELLINIEN

**Tabelle 3: Verwendete Zelllinien mit den entsprechenden Kultivierungsmedien**

Zelllinie	Beschreibung	Kultivierung
<b>Huh 7</b>	Humane Hepatomazelllinie	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10% FCS
<b>Huh 9-13</b>	Humane Hepatomazelllinie mit subgenomischem Replikon (NS2-NS5B)	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10% FCS; 1mg/ml G418
<b>Huh 5-15</b>	Humane Hepatomazelllinie mit subgenomischem Replikon (NS2-NS5B)	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10% FCS; 1mg/ml G418
<b>HepG2</b>	Humane Hepatomazelllinie	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10% FCS
<b>HepG2 NS3/4A</b>	Humane Hepatomazelllinie; konstitutive Expression von HA-NS3/4A und GFP	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10% FCS; 350µg/ml Zeocin <sup>®</sup>
<b>HepG2 mock</b>	Humane Hepatomazelllinie; Kontrollzelllinie konstitutive Expression von GFP	DMEM/Nutrient Mix F-12; 10% FCS; 350µg/ml Zeocin <sup>®</sup>

Die verwendeten Huh 9-13 Zellen wurden von Prof. Dr. R. Bartenschlager (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. HepG2 NS3/4A und HepG2 mock Zellen wurden von Dr. E. Brenndörfer generiert [24].

## 2.3 PUFFER

### Triton-Lysepuffer

Zur Zelllyse wurde modifizierter Triton-Lysepuffer eingesetzt. Dieser bestand aus einer Lösung aus 136 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 % Glycerin, 2 mM EDTA, 50 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 20 mM Natriumpyrophosphat, 0,2 mM Pefabloc, 5 µg/ml Aptotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 4 mM Benzamidin, 1 mM Natriumorthovanadat und 1 % Triton X 100. Mit Hilfe von HCl wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Zugabe von 0,2 % SDS kurz vor dem Gebrauch führt zur Löslichkeit von membranständigen Proteinen.

### SDS-Auftragspuffer nach Lämmli

Der SDS-Auftragspuffer nach Lämmli wurde zum Auftragen von Proteinen auf das PAA-Gel bei der Gelelektrophorese verwendet. Der Puffer bestand aus 250 nM Tris/HCl (pH 6,8), 40 % Glycerol, 5 % SDS und 0,002 % Bromphenolblau. Kurz vor dem Gebrauch wurden 8 %  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben.

### **Puffer für den Western Blot**

Der verwendete Elektrophoresepuffer bestand aus 0,12 M Tris, 17 mM SDS, 1,25 M Glycin. Weiterhin wurden zwei unterschiedlich konzentrierte Anodenpuffer, Anodenpuffer I aus 0,3 M Tris und 20 % Methanol und Anodenpuffer II 0,025 M Tris und 20 % Methanol, verwendet. Der Kathodenpuffer beinhaltete 0,04 M 6-Aminocaprinsäure und 20 % Methanol. Zum Blocken und Waschen der PVDF-Membran wurde TBST verwendet, dieser besteht aus 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 137 mM NaCl und 0,1 % Tween.

## **2.4 METHODEN**

### **2.4.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN**

#### **Kultivierung der Zellen und Kryokonservierung**

Die verwendeten humanen Hepatomazelllinien wurden in DMEM/Nutrient Mix F-12, supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Der Zusatz der Antibiotika Zeocin bzw. Geneticin G418 führte durch das Vorhandensein des entsprechenden Resistenzgens zur Selektion der Virusprotein-exprimierenden Hepatomazelllinien. Um Verunreinigungen durch Mykoplasmen auszuschließen, wurden regelmäßig PCR-basierte Mykoplasmentests durchgeführt (MycoTrace, Mycoplasma PCR Detektion Kit, PAA-Laboratories).

Bei einer Konfluenz von etwa 50% konnten die Zellen durch das Überführen in Einfriermedium (DMEM/Nutrient Mix F-12, 20 % FCS, 10 % DMSO) im flüssigen Stickstoff konserviert werden.

Um die konservierten Zellen aufzutauen, wurden diese auf 37°C erwärmt und in Kulturmedium überführt. Zum Auswaschen der DMSO-Rückstände erfolgte nach vier Stunden ein Medienwechsel.

#### **Transfektion von siRNA**

Die Transfektion beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in die Zelle. Wobei hier die sogenannte *post-transcriptional gene silencing* Methode angewandt wurde, um die Synthese funktionsfähiger Proteine zu unterdrücken. Bei dieser Methode wird eine spezifische siRNA in die Zellen transfiziert. Diese siRNA verhindert die Translation durch Bindung an komplementäre Nukleotidsequenzen der mRNA. Verwendet wurde in dieser Arbeit ein Gemisch aus drei verschiedenen PTPN2 siRNA und ein Gemisch aus *siGenome Non-Targeting* siRNA #1, #3 und #5 als Negativkontrolle.

Die Transfektion von siRNA erfolgte mittels Lipofektion. Dazu wurden Huh 9-13-Zellen so auf 6-well-Platten ausgesät, dass sie nach 24 Stunden eine Konfluenz von ca. 70%

aufwiesen. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde zu Beginn das Transfektionsreagenz DharmaFECT 4 mit OptiMEM versetzt und zur Ausbildung von Liposomen fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die siRNA wurde zunächst mit 1x siRNA Puffer und anschließend mit OptiMEM verdünnt. Anschließend wurden die beiden Ansätze nach Vorschrift gemischt. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, um die Bildung von Liposomen-RNA-Komplexen zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurde zu dem siRNA/DharmaFECT-Ansatz Antibiotika-freies Kulturmedium hinzugefügt. Durch einen Medienwechsel erfolgte die Zugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen. Die Endkonzentration der siRNA betrug 50 nM siRNA und die des DharmaFECT Reagenzes 5 µl / 2 ml. Nach sechs Stunden wurde ein Medienwechsel mit Antibiotika-freiem Kulturmedium durchgeführt. 72 Stunden nach Transfektion konnten die Zellen stimuliert und anschließend von der Gewebekulturschale gelöst werden.

## 2.4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### **Isolierung von RNA**

Für die Isolierung von mRNA wurden zunächst Zellysate hergestellt. Dazu wurde in jede 60 mm-Gewebekulturschale bzw. jede Kavität der 6-well-Platte 350 µl RLT-Puffer, versetzt mit 1% β-Mercaptoethanol, gegeben und die Zellen mittels eines Schabers gelöst. Zur Homogenisierung wurden *QIAshredder* verwendet. Die Aufreinigung der mRNA erfolgte nach Protokoll des Herstellers mittels des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Die Ermittlung der RNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoDrop 1000 bei einer Extinktion von 260 nm/280 nm. Die gewonnene RNA konnte entweder bei -80°C gelagert oder direkt zur cDNA-Synthese verwendet werden.

### **cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese erfolgte durch die reverse Transkriptase-Reaktion. Dabei wurde 1 µg der isolierten RNA eingesetzt und mittels des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben umgeschrieben. Um die Synthesereaktion zu prüfen, wurden Kontroll-Ansätze ohne Zusatz des Enzyms durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde in 100 µl Wasser aufgenommen und in der Real-Time PCR eingesetzt.

### Quantitative *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die durch RNA-Isolierung und reverse Transkriptase-Reaktion gewonnene cDNA wurde unter Verwendung spezifischer Primer mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR relativ zu einer Referenz quantifiziert, um so auf die mRNA-Synthese in der Zelle rückzuschließen.

Die quantitative *real-time* PCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR. Bei der Amplifikation der DNA interkaliert ein Fluoreszenzfarbstoff in die doppelsträngige DNA. Damit nimmt die Fluoreszenz, die durch den *Light Cycler* (Applied Biosystems) detektiert wurde, proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu. In dieser Arbeit wurde der DNA-Farbstoff *SYBR Green* verwendet. Da der Farbstoff unspezifisch in jede doppelsträngige DNA interkaliert, muss bei der Auswahl der Primer darauf geachtet werden, dass nur Primer verwendet werden, die ein einziges spezifisches Produkt generieren. Die Qualität der Primer wurde indirekt durch eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR-Reaktion überprüft. Die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht die Identifizierung von unspezifischen Sekundärprodukten, wie etwa Primer-Dimere. Die verwendeten Primer wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe mit Hilfe der *Primer-Blast* Funktion der *pubmed* Datenbank erstellt. Dabei wurden Primer mit einer Größe von 19-24 bp ausgewählt, die eine Schmelztemperatur von 55-60°C und einen CG-Gehalt von etwa 50% aufweisen. Das zu generierende Amplikon sollte aus 90-120 bp bestehen. Als Ausgangsmaterial der quantitativen *real-time* PCR wurde je Kavität in der 96-Well-Platte 10 ng cDNA eingesetzt sowie 12,5 µl *Power SYBR Green PCR Master Mix* und Primer in einer Endkonzentration von 400 nM hinzugefügt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach etablierten und standardisierten Parametern (Denaturierung 95 °C, Primerhybridisierung 50 °C, Amplifikation 70 °C, 40 Zyklen). Das humane SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A) diente als Referenz.

Für die relative Quantifizierung wurde die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode verwendet [184]. Dabei beschreibt der CT-Wert eine signifikant über der Hintergrund-Floureszenz liegende detektierte Floureszenz [184].

### 2.4.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

#### Zellyse

Für die Proteinanalysen müssen die Zellen zunächst lysiert werden. Dazu wurden die Zellen mit eiskaltem PBS (+  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ), welches mit 100 nM Natriumorthovanadat supplementiert wurde, gewaschen und die folgenden Schritte auf Eis durchgeführt, um eine Proteolyse durch freigesetzte Proteasen zu minimieren. Die Zellen wurden in modifiziertem Triton-Lysepuffer lysiert. Dabei wurde 150 µl Triton-Lysepuffer auf eine 60 mm Kulturschale und

in jedes *well* einer 6-*well*-Platte 80 µl Puffer gegeben. Mittels eines Schabers wurden die Zellen von der Gewebekulturschale abgelöst, durchmischt und für 10 Minuten in Lysepuffer inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen bei 4°C und 13.000 rpm für 15 Minuten wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **Proteinbestimmung nach Bradford**

Für die Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford durchgeführt. Dabei wurde der *BioRad-Protein-Assay* verwendet, welcher den Farbstoff *Coomassie brilliant blue* enthält. Das Reagenz wurde zunächst in einem 1:5-Verhältnis mit Wasser verdünnt. Jeweils 996 µl der Lösung und 4 µl der Probe wurden in Küvetten gegeben. Als Referenz wurde die verdünnte Protein-Assay-Lösung genutzt. Die photometrische Messung der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels des *Ultrospec 2100 pro*-Photometers. Durch die Komplexbildung von Proteinen mit dem Farbstoff verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum im sauren Milieu von 465 nm auf 595 nm, sodass die Absorption bei 595 nm für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet werden kann.

### **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot**

Für die Analyse der gewonnenen Proteinmischung erfolgte eine SDS-Polyacrylamidelektrophorese. Die verwendeten SDS-Polyacrylamidgele beinhaltenen SDS-Lösung, Ammoniumsulfat-Lösung, Polyacrylamid, TEMED, Wasser und Tris. Für das Sammelgel wurde ein 5 % Polyacrylamid (PAA)-Gel aus 50 µl 10%iger SDS-Lösung, 50 µl 10%iger Ammoniumsulfat-Lösung, 830 µl 30%iges Acrylamid, 5 µl TEMED, 3,4 ml Wasser und 360 µl Tris pH 6,8 gegossen. Für das Trenngel wurde ein 12 % Polyacrylamid (PAA)-Gel aus 150µl 10%iger SDS-Lösung, 150µl 10%iger Ammoniumsulfat-Lösung, 6ml 30%iges Acrylamid, 6µl TEMED, 4,9ml Wasser und 3,8ml Tris pH 8,8 verwendet.

Das Sammelgel wurde über das Trenngel überschichtet. Vor dem Auftragen der Proben auf das PAA-Gel wurde das Proteinlysate (je Probe XX µg Protein) mit Vierfach-SDS-Auftragspuffer nach Lämmli versetzt und für 5 min bei 95 °C zur Proteindenaturierung aufgeköcht. Nach kurzer Abzentrifugation der Proben konnten der Überstand auf das Gel aufgetragen werden. Als Proteinstandard wurde *Precision Plus Protein TM Dual Color Standard* eingesetzt, welches eine Größenordnung der Proteinbanden ermöglicht. Die diskontinuierliche Auftrennung erfolgte mit dem Gelelektrophoresesystem der Firma Biometra mit Hilfe eines Elektrophoresepuffers. Dabei erfolgte die Auftrennung zunächst bei 100 V (Sammelgel) und anschließend bei 140 V (Trenngel).

Anschließend erfolgte der Western Blot, bei dem die aufgetrennten Proteine vom PAA-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert wurden. Dieser Transfer erfolgte in einer

Elektroblottingapparatur der Firma Biometra. Nach der *Semidry-Blotting*-Methode wurde ein Stromfluss zwischen den Elektroden durch *Whatman*-Papier (Schleicher und Schuell) erreicht, welches in Blottingpuffer unterschiedlicher Ionenstärke (Anoden- und Kathodenpuffer) getränkt war. Die angelegte Stromstärke betrug 1 mA pro cm<sup>2</sup> für 60 bis 180 Minuten, je nach Größe der zu transferierenden Proteine.

Daraufhin erfolgt die Immundetektion spezifischer Proteine auf der PVDF-Membran. Dafür wurde die PVDF-Membran mit 5 % BSA oder 5 % Milchpulver gelöst in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Der primäre Antikörper verdünnt in 5 % BSA/TBS-T oder 5 % Milchpulver/TBS-T (1:1000 bis 1:15000 je nach Antikörper) wurde über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben und schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran für drei Mal 20 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper, ebenfalls verdünnt in 5 % BSA/TBS-T (1:5000), erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Membran für drei Mal 20 Minuten mit BSA-TBST konnten die Immunkomplexe detektiert werden. Die Detektion fand mit *WL Chemiluminescence Reagent Plus* und ECL-Filmen mit Hilfe der Entwicklungsmaschine Curix 60 der Firma AGFA statt. Um weitere Proteine auf der PVDF-Membran zu detektieren, wurden die Immunkomplexe mit *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* (Millipore) nach Herstellerangaben von der Membran gelöst.

## **ELISA**

Mit Hilfe des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde das Chemokin CXCL 8 (auch IL-8) im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Dabei wurde das *Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!* nach Herstellerangaben (*eBioscience*) verwendet. Eine 96 well Platte (NUNC MaxiSorp) wurde mit einem gegen humanes IL-8 gerichteten Antikörper über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte gewaschen. Die Waschschriffe erfolgten mit PBS, supplementiert mit 0,05 % Tween-20. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die *wells* mit *Assay Diluent* (*eBioscience*) bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nun konnte die Platte gewaschen und mit einer Verdünnungsreihe des humanen, rekombinanten IL-8-Proteins als Standardverdünnung und dem gewonnenen Zellkulturüberstand für zwei Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert werden. Die Standardverdünnung ermöglicht die Zuordnung der gemessenen Absorption zu den Proteinkonzentrationen in pg/ml. Nach weiteren fünf Waschschriffen wurde Biotin-markierter humaner IL-8 Antikörper nach Herstellerangaben auf die Platte gegeben. Innerhalb einer einstündigen Inkubationszeit konnte der biotinmarkierte

Antikörper an das Substrat binden. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte die Zugabe von HRP-gekoppeltem Avidin für 30 Minuten, welches mit hoher Affinität an Biotin bindet. Durch weitere Waschschrte konnte das nicht gebundene HRP-Avidin entfernt und das HRP-Substrat TMB hinzugegeben werden. Im Dunkeln wurde die Platte nun 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ l einer 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Proben wurden mittels eines Mikroplatten-Spektrophotometers (*Multiskan Spectrum*) bei einer Wellenlänge von 570 nm und 450 nm nach Herstellerangaben gemessen.

## 2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Signifikanz-Berechnung ( $p < 0,05$ ) der mRNA-Expression und CXCL8-Proteinsynthese erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests durch die Software *Prism 5* (*GraphPad*; San Diego, USA)

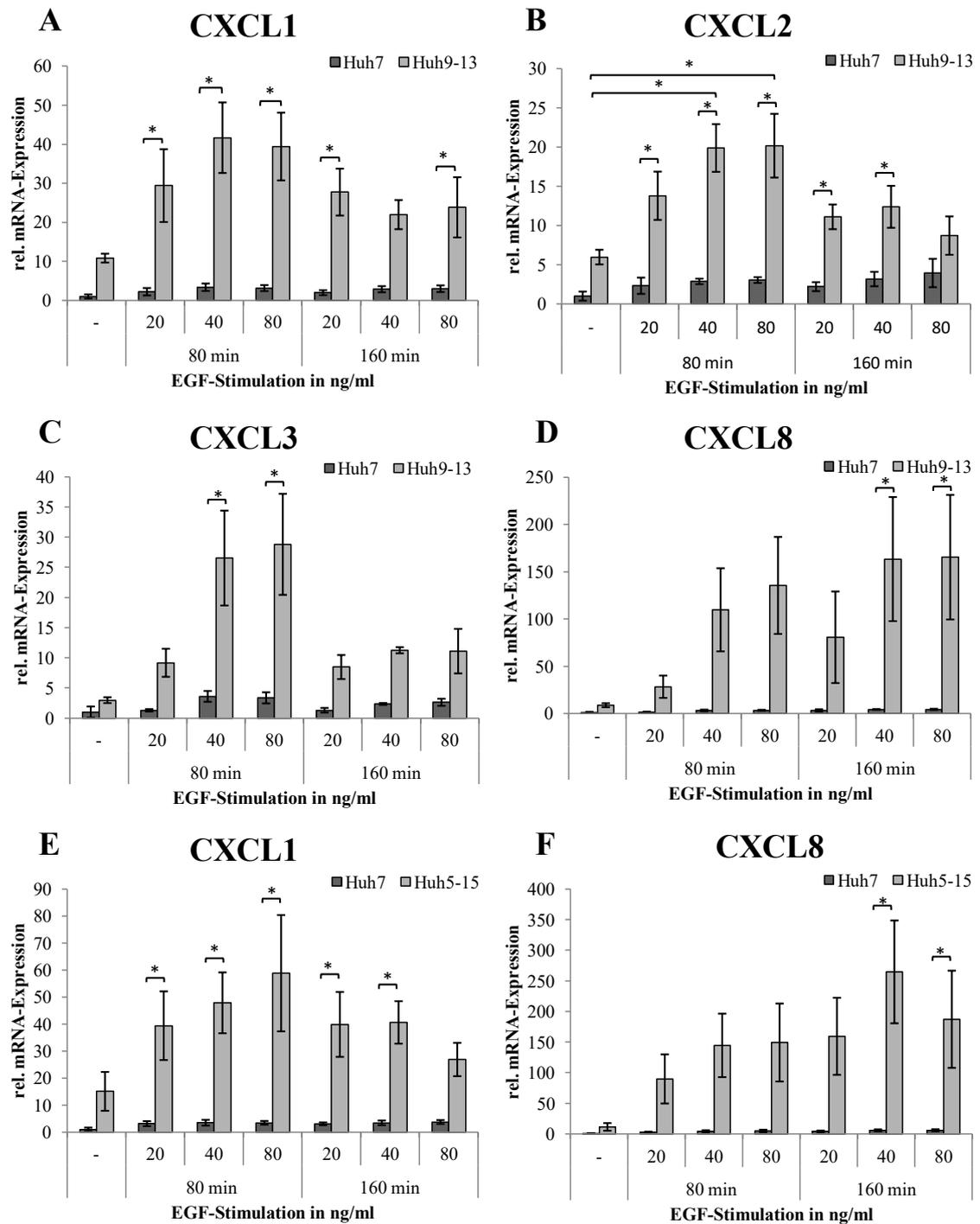
### 3 ERGEBNISSE

Das Hepatitis-C-Virus beeinflusst die Signaltransduktion von Wirt und Wirtszelle, um die antivirale Wirtsantwort zu umgehen, Entzündungsreaktionen im Wirt zu beeinflussen und die Infrastruktur der Wirtszelle zu nutzen ohne zu sehr mit der Viabilität der Wirtszelle zu interferieren (Kapitel 1.2), [52]. Die vorrangig durch Chemokine vermittelte interzelluläre Kommunikation ist dabei eine wesentliche Determinante für die lokale Zusammensetzung von Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität [90, 94]. Es ist daher naheliegend, dass HCV diese Signalübertragung nachhaltig beeinflusst.

Die vorgelegte Arbeit befasst sich mit dem Einfluss des Hepatitis-C-Virus auf die basale und EGF-abhängige Chemokinexpression in Hepatozyten sowie dem Einfluss des Virus auf die EGFR-abhängige Signaltransduktion.

#### 3.1 DAS HEPATITIS-C-VIRUS BEEINFLUSST IN HUH-ZELLEN DIE BASALE CHEMOKINEXPRESSION SOWIE DIE EGF-INDUZIERTE EXPRESSION VON CXCL1-3 UND CXCL8

Da der EGF/EGFR-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Leberregeneration sowie der Beeinflussung Gewebe-aufrechterhaltender Prozesse spielt und mit  $\text{IFN}\alpha$ -induzierten Signalwegen interagiert [133], wurde in dieser Arbeit zunächst der Einfluss des epidermalen Wachstumsfaktors EGF auf die Chemokinexpression der Hepatozyten untersucht und die Fähigkeit von HCV diese zu beeinflussen. Dazu wurden humane Hepatomazellen, die ein subgenomisches HCV-Replikon exprimieren (Huh9-13) sowie entsprechende Kontrollzellen mit rekombinantem EGF in unterschiedlichen Konzentrationen für 80 oder 160 Minuten stimuliert (**Abb. 4 A–D**). Als Kontrollzellen dienten Huh7 Zellen, die keine viralen Proteine exprimieren. Mittels RT-PCR-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass bereits die basale mRNA-Expression der Chemokine CXCL1–3 und CXCL8 in Huh9-13-Zellen im Vergleich zu den Huh7-Zellen erhöht ist. Unter EGF-Stimulation war die mRNA-Expression dieser Chemokine in Huh9-13-Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen deutlich verstärkt (**Abb. 4 A–D**), wobei hier insbesondere die Expression von CXCL8 durch HCV-Replikon deutlich verstärkt wurde (**Abb. 4 D**).

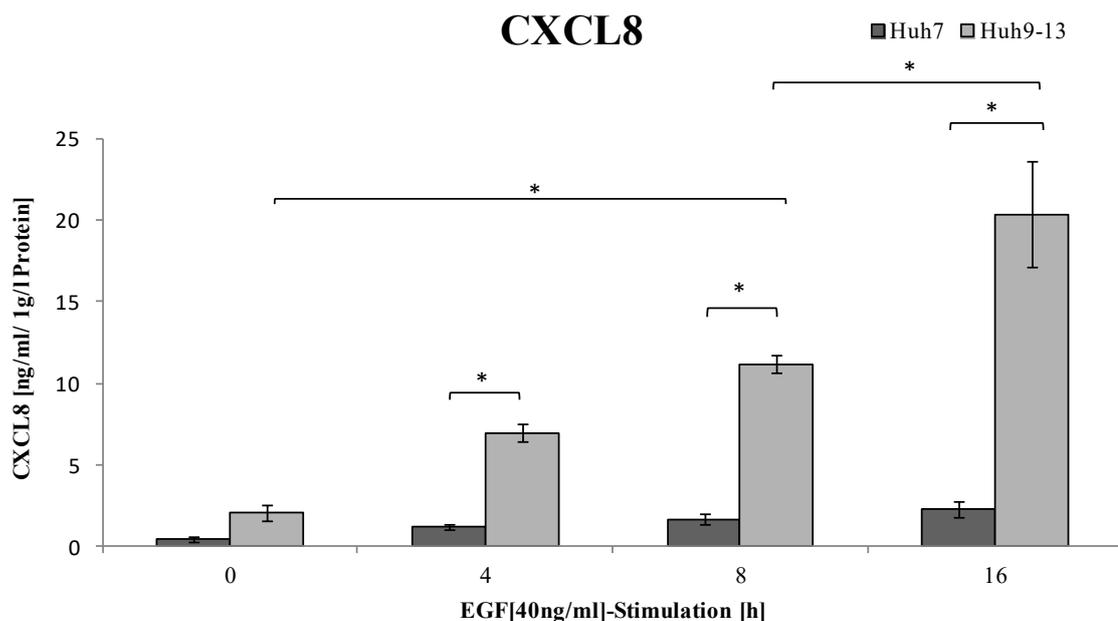


**Abb. 4: HCV beeinflusst in Huh-Zellen die basale Chemokinexpression und befähigt EGF die Expression von CXCL1–3 und 8 zu induzieren.**

Huh7-Zellen und Zellen die das subgenomische HCV-Replikon exprimieren (Huh9-13- (A–D) sowie Huh5-15- (E–F) Zellen) wurden mit 20, 40 oder 80 ng/ml humanen EGF für 80 und 160 Minuten stimuliert. Die mRNA Expression wurde mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer durchgeführt und mittels  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die auf die Kontrolle (unstimulierte Huh7-Zellen) normalisiert wurden. Die Signifikanz (\*) wurde mittels des ANOVA-Tests berechnet. Teile dieser hier dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [185].

Um auszuschließen, dass die dargestellten Effekte klonale Artefakte sind, die im Rahmen der Selektion von Zellpopulationen mit stabiler Expression eines subgenomischen Replikons [44] entstehen können, wurde eine zweite Replikon-tragende Zelllinie (Huh5-15) unter identischen Bedingungen untersucht. Auch hier stellte sich eine sowohl erhöhte basale als auch EGF-stimulierte CXCL1 und CXCL8-mRNA-Expression in Replikonzellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen dar (**Abb. 4 E-F**). Da die Chemokin-mRNA-Expression unter Stimulation mit 40 ng/ml EGF für eine Dauer von 80 Minuten optimal war, wurden diese Bedingungen auch in den nachfolgenden Experimenten verwendet.

Nachdem belegt werden konnte, dass die viralen NS-Proteine sowohl die basale als auch die EGF-vermittelte Chemokin mRNA-Expression verstärken, sollte in einem nächsten Schritt ermittelt werden, ob sich diese gesteigerte Chemokin mRNA-Expression auf Proteinebene widerspiegelt. Dazu wurden Huh9-13-Replikonzellen und Huh7-Kontrollzellen mit jeweils 40 ng/ml EGF für vier, acht und sechzehn Stunden stimuliert. Mittels ELISA wurde anschließend die Konzentration an freiem CXCL8 im Zellkulturüberstand bestimmt, da für CXCL8 bereits auf mRNA-Ebene die deutlichsten Effekte sichtbar wurden. Übereinstimmend mit den Befunden auf RNA-Ebene konnte auch auf Proteinebene belegt werden, dass die CXCL8-Freisetzung bereits unter basalen Bedingungen in Zellen, die das subgenomische HCV-Replikon beherbergen, verstärkt ist, und dass dies im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen durch EGF-Stimulation um ein Mehrfaches weiter verstärkt wird (**Abb. 5**).



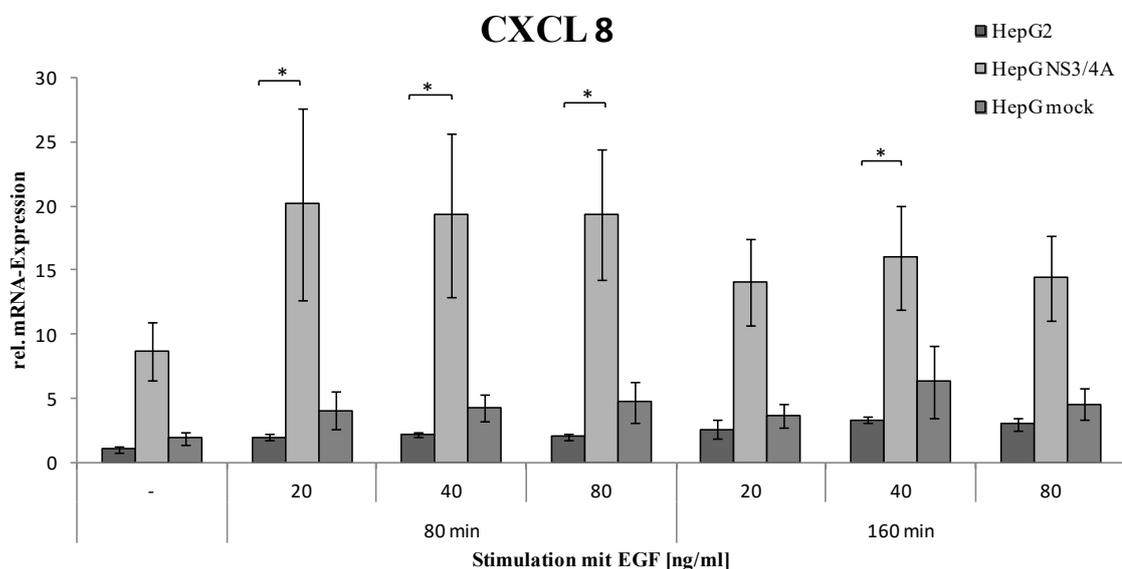
**Abb. 5: HCV induziert die CXCL8-Expression unter EGF-Stimulation.**

Huh7-Kontrollzellen und Huh9-13-Replikonzellen wurden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Nach vier, acht und sechzehn Stunden wurde im Zellüberstand mittels eines ELISA und einem Mikroplatten-

Spektrophotometer die CXCL8-Konzentration gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der CXCL8-Proteinkonzentration in ng/ml in 1g/l Gesamtprotein aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz (\*) wurde mittels des ANOVA-Tests berechnet. Teile dieser hier dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [185].

### 3.2 NS3/4A INDUZIERT EINE VERSTÄRKT, EGF-VERMITTELTE CXCL8-MRNA-EXPRESSION

Die vorangehend ausgeführten Daten legen nahe, dass HCV mit der EGF-Signalübertragung interagiert und hierdurch die verstärkte EGF-induzierbare Chemokinexpression mit vermittelt. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe legen nahe, dass HCV über die Virus-kodierte NS3/4A-Protease mit der Signalübertragung des EGF-Rezeptors interferiert. Es sollte daher die Annahme geprüft werden, dass NS3/4A auch für den Einfluss von HCV auf die basale bzw. EGF-induzierbare Expression von CXCL8 mit verantwortlich ist. Hierzu wurden HepG2-Zellen verwendet, die das Nicht-Strukturprotein NS3/4A stabil exprimieren. Als Kontrolle dienten mock-transfizierte HepG2-Zellen [24]. Wie in **Abb. 6** dargestellt kommt es in HepG2-Zellen, die NS3/4A stabil exprimieren, im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen zu einer signifikanten Verstärkung der basalen wie auch der EGF-induzierbaren Expression von CXCL8. Diese Befunde legen nahe, dass die NS3/4A-Protease des Hepatitis-C-Virus eine relevante Rolle für die Heraufregulation der basalen wie auch der EGF-induzierbaren CXCL8-Expression spielt.



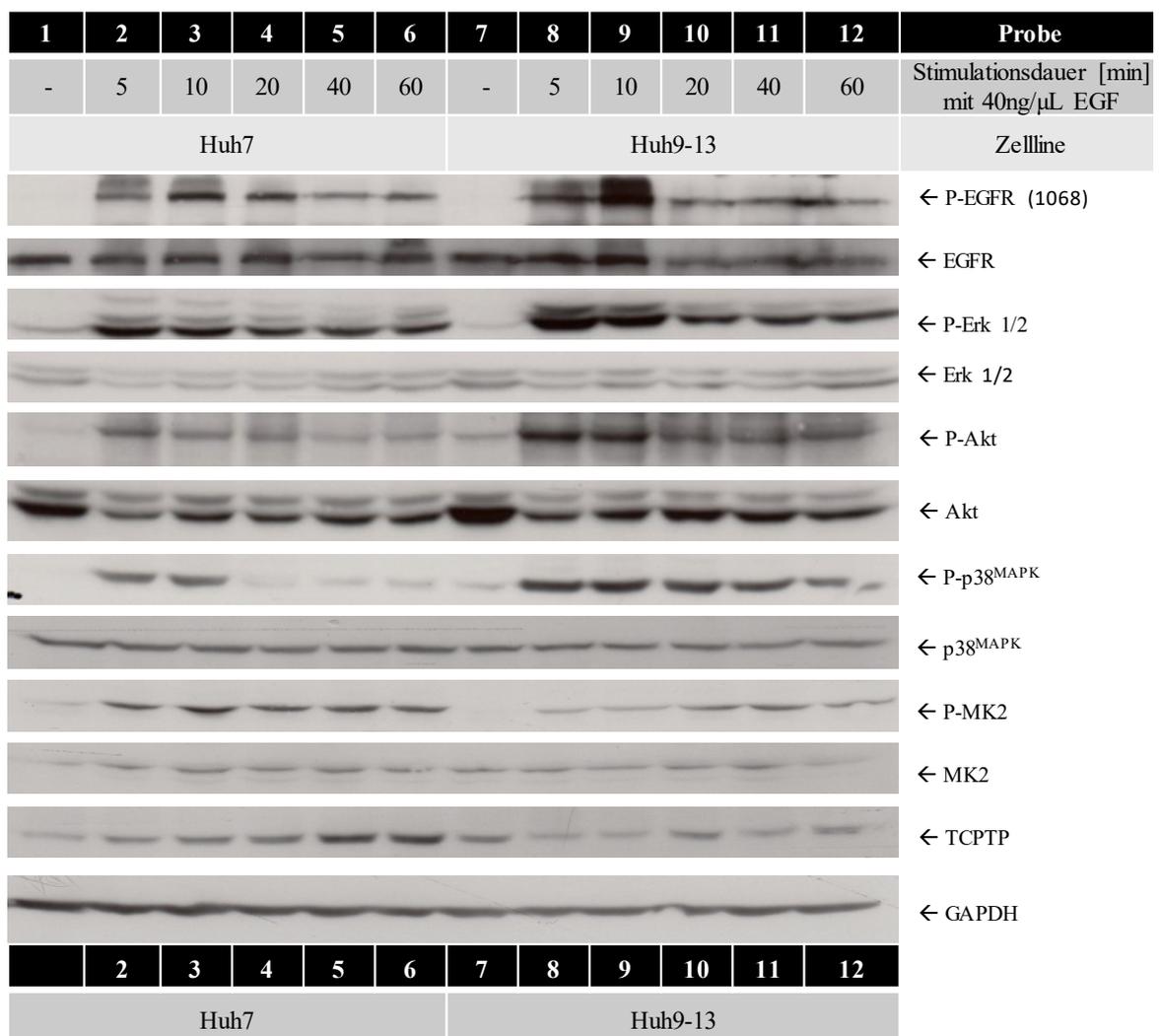
**Abb. 6: Die HCV-kodierte NS3/4A Protease führt zu einer Verstärkung von basaler und EGF-induzierter CXCL8-Expression.**

HepG2 Zellen, HepG2 NS3/4A Zellen und HepG2 mock-transfizierte Zellen wurden mit 20, 40 oder 80 ng/ml humanem EGF stimuliert. Nach 80 und 120 Minuten erfolgte die mRNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Die RT-PCR wurde mit genspezifischen Primern durchgeführt und die erhobenen Daten mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten, die auf die Kontrolle (unstimulierte Huh7-Zellen) normalisiert wurden. Die Signifikanz (\*)

wurde mittels des ANOVA-Tests berechnet. Teile dieser hier dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [185].

### 3.3 HCV VERSTÄRKT DIE INTRAZELLULÄRE SIGNALÜBERTRAGUNG VON EGFR

Die vorangehend ausgeführten Befunde lassen annehmen, dass das subgenomische HCV-Replikon Einfluss auf die intrazelluläre Signalübertragung nimmt und hierdurch sowohl die basale wie auch die EGF-induzierte Expression von CXCR2-Liganden verstärkt. Es sollte daher geklärt werden, ob die basale wie auch die EGF-induzierte intrazelluläre Signalübertragung durch HCV beeinflusst wird. Hierfür wurden vorrangig intrazelluläre Signalwege untersucht für die bekannt ist, dass ihre Aktivität durch EGF beeinflusst wird bzw. in die Regulation von CXCL8-Liganden involviert sind. Hierzu wurde die Expression und Aktivierung des EGF-Rezeptors sowie von Erk1/2, Akt, p38<sup>MAPK</sup> und MK2 in Zellen, die das subgenomische HCV-Replikon beherbergen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen untersucht (**Abb. 7**). Darüber hinaus wurde die Expression des endogenen Negativ-Regulators des EGF-Rezeptors, TCPTP, analysiert



**Abb. 7:** HCV verstärkt die EGF-vermittelte EGFR-Phosphorylierung mit konsekutiver Aktivierung von Akt, Erk1/2 sowie p38<sup>MAPK</sup>

Huh7- und Huh9-13-Zellen wurden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Nach 5, 10, 20, 40 oder 60 Minuten wurden die Zellen lysiert und das Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot sowie Immunodetektion wurde die Expression und Aktivierung von EGFR, Erk1/2, p38<sup>MAPK</sup>, MK2 und Akt sowie der TCPTP Expression analysiert. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution für 15 Minuten behandelt, um die Antikörper von der Membran zu lösen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes exemplarisch dargestellt. Teile dieser hier dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [185].

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors wurde anhand der Phosphorylierung des Tyrosins Y1068 detektiert. Das phosphorylierte Tyrosin 1068 ist eine Autophosphorylierungsstelle des EGFR und Bindestelle für das Signalprotein Grb2. Es fungiert als eine wichtige, jedoch nicht einzige Initiierungsstelle der EGF-induzierten Ras- sowie MAP-Kinaseaktivierung [186]. Die Phosphorylierung des EGFR am Tyrosinrest 1068 war unter EGF-Stimulation nach 10 Minuten am stärksten und in Huh9-13-Replikonzellen deutlich stärker ausgeprägt, als in Huh7-Kontrollzellen (**Abb. 7**). Dies belegt die aus der Literatur bekannte gesteigerte Aktivierung des EGF-Rezeptors unter dem Einfluss viraler Nicht-Strukturproteine bzw. des subgenomischen HCV-Replikons [30].

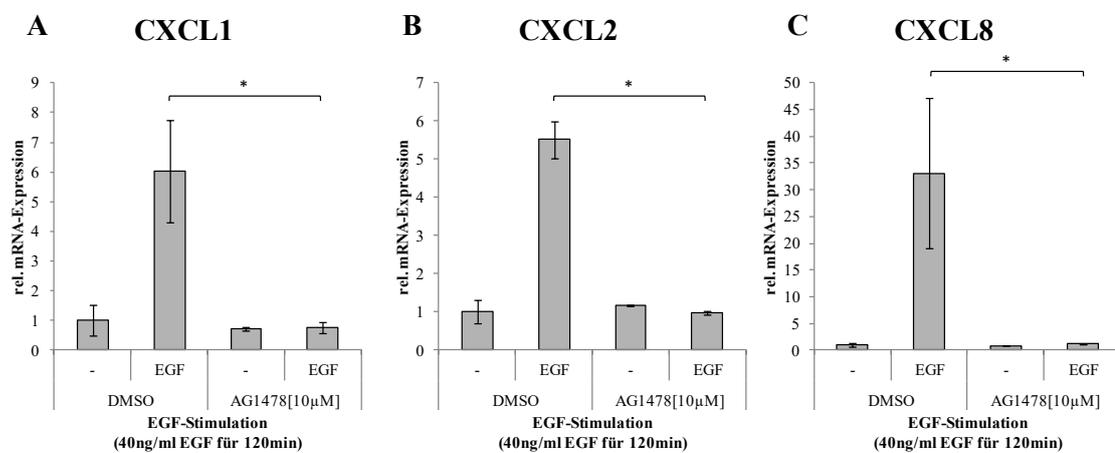
Zu den bekannten EGF/EGFR-abhängigen Signalkaskaden gehören unter anderem der MEK1-Erk1/2-Signalweg und der PI3K/Akt-Signalweg (Kapitel 1.4.1), die in diesem Experiment untersucht wurden. Dabei konnten in Huh9-13-Zellen sowohl eine stärkere Erk1/2-Phosphorylierung als auch eine stärkere Akt-Phosphorylierung nach EGF-Stimulation im Vergleich zu Huh7-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 7**). Demnach führt die Anwesenheit von HCV zu einer verstärkten Aktivierung von EGFR sowie der nachgeschalteten Kinasen Erk1/2- und Akt. Dieser Zusammenhang wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten veröffentlicht und konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden [24, 152, 187].

Ein Signalweg, der für die Kontrolle der Expression von CXCL8 von Bedeutung ist, ist die Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> [165]. Ergänzend wurde daher die Aktivität der p38<sup>MAPK</sup> unter EGF-Stimulation in Zellen untersucht, die das subgenomische Replikon von HCV exprimieren. Wie in **Abb. 7** dargestellt, kommt es in Gegenwart des HCV-Replikons zu einer deutlich verstärkten und prolongierten Aktivierung der Proteinkinase p38<sup>MAPK</sup> durch EGF, welches sich überraschenderweise jedoch nicht in einer verstärkten Aktivierung der durch die p38<sup>MAPK</sup> aktivierten Effektor kinase MK2 widerspiegelt. Tatsächlich ist im Vergleich zu Kontrollzellen die Aktivierung des p38<sup>MAPK</sup>-Substrates MK2 in Zellen, die das Replikon exprimieren deutlich reduziert (**Abb. 7**). In Übereinstimmung mit vorangehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte die Herabregulation der TCPTP durch HCV, die durch die NS3/4A-vermittelte Spaltung vermittelt wird [24], belegt werden (**Abb. 7**).

Insgesamt konnte damit nachgewiesen werden, dass es in Hepatomazellen in Gegenwart des Hepatitis-C-Virus-Replikons zu einer Verstärkung der durch EGF induzierten Aktivierung des EGF-Rezeptors wie auch der Signalmoleküle Erk1/2, Akt und p38<sup>MAPK</sup> kommt, und dass dies zum Teil auch mit einer veränderten zeitlichen Kinetik der Aktivierung einhergeht.

### 3.3.1 DIE VERSTÄRKUNG DER EGF-INDUZIERTEN CHEMOKINEXPRESSION IN GEGENWART VON HCV IST EGF-REZEPTOR ABHÄNGIG

Als Nächstes sollte bestätigt werden, dass die Verstärkung der EGF-vermittelten Chemokinexpression durch HCV nicht Rezeptor-unabhängig erfolgt. Um dies zu prüfen wurde der Einfluss von AG1478, einem Inhibitor, der die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors spezifisch hemmt, auf die EGF induzierte Expression der Chemokine CXCL1, 2 und 8 in Huh9-13-Replikonzellen untersucht. Wie den in **Abb. 8** zusammengefassten Daten zu entnehmen ist, blockiert die Hemmung des EGF-Rezeptors die EGF-induzierte Expression der CXCR2-Liganden CXCL1, 2 und 8 in diesen Zellen vollständig, sodass davon auszugehen ist, dass auch die in Gegenwart des HCV-Replikons verstärkte EGF-induzierte Expression dieser Chemokine die Aktivierung des Rezeptors voraussetzt (**Abb. 8**).

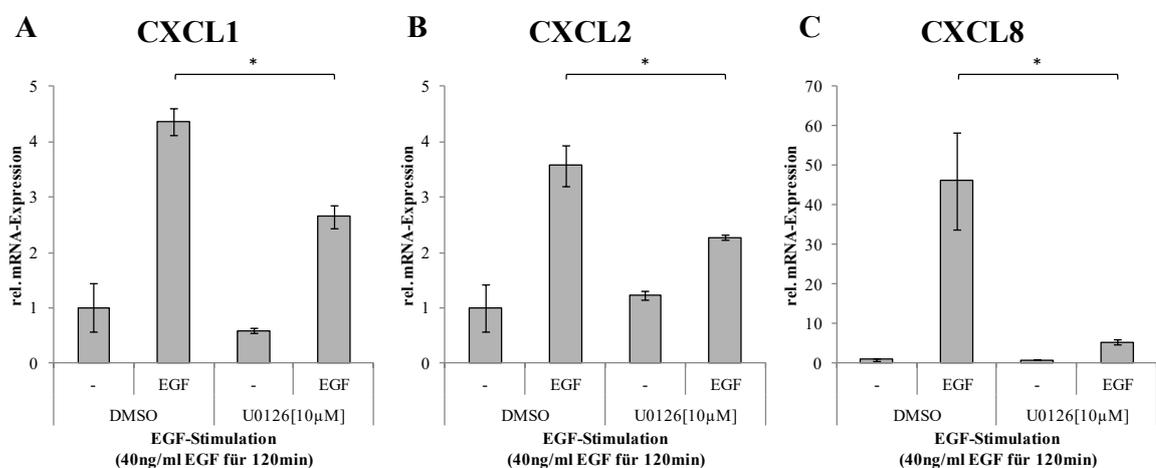


**Abb. 8: Hemmung des EGF-Rezeptors führt auch in Zellen, die das subgenomische HCV-Replikon exprimieren, zu einer vollständigen Aufhebung der Induktion der mRNA-Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL8 durch EGF.**

HCV-Replikon exprimierende Huh9-13 Zellen wurden zunächst mit 10 μM AG1478 (einem EGFR-Inhibitor) bzw. mit dem entsprechenden Lösungsmittel DMSO (Kontrolle) im gleichen Volumen für eine Stunde vorinkubiert. Die Ansätze wurden dann entweder mit 40 ng/ml EGF stimuliert bzw. dienten als Kontrolle (ohne Zugabe von EGF). Nach 120 Minuten erfolgte die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Die RT-PCR wurde mit genspezifischen Primern durchgeführt und die erhobenen Daten mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten, die auf die Kontrolle (nur mit DMSO behandelte Huh9-13-Zellen) normalisiert wurden. Die Signifikanz (\*) wurde mittels des ANOVA-Tests berechnet. Teile dieser hier dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [185].

### 3.3.2 DER MEK1-ERK1/2-SIGNALWEG IST IN DER VERMITTLUNG DER EGF-INDUZIERTEN CXCL8-EXPRESSION BETEILIGT

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) induziert in Hepatomazellen, welche das subgenomische HCV-Replikon exprimieren, eine verglichen mit Kontrollzellen verstärkte Chemokinexpression durch gesteigerte Aktivierung des EGF-Rezeptors. Mittels Immunodetektion wurde zudem eine verstärkte Erk1/2-Phosphorylierung in EGF-stimulierten subgenomischen Huh9-13-Replikonzellen festgestellt (**Abb. 7**). Daher wurde im nächsten Experiment die MAPK-Kinase MEK1/2, eine Threonin-Tyrosinkinase die Erk1/2 phosphoryliert [137], mittels U0126, einem spezifischen MEK1/2 Inhibitor [188] gehemmt und die Auswirkungen auf die Chemokinexpression untersucht (**Abb. 9**).



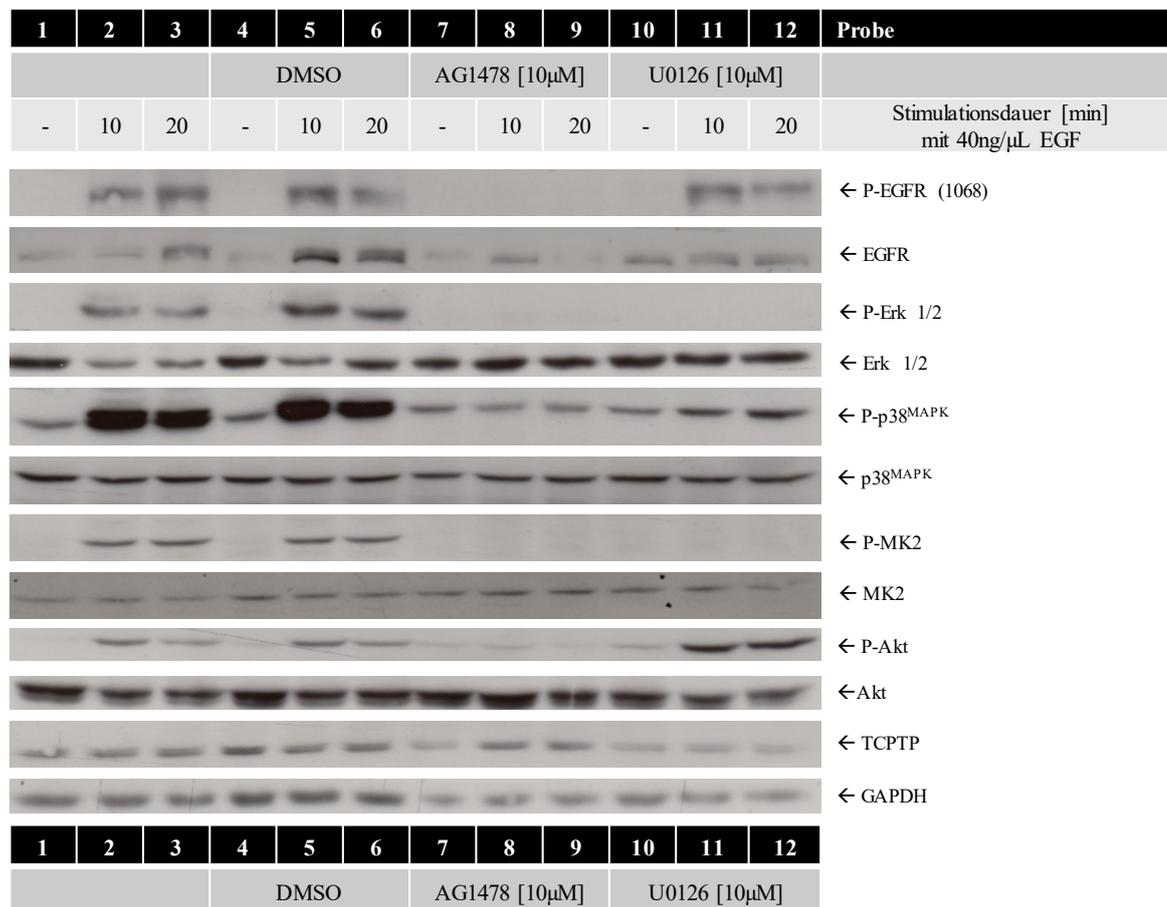
**Abb. 9: Die EGF-induzierte CXCL8-Expression in Huh9-13 Replikonzellen lässt sich durch eine Hemmung von MEK1 nahezu aufheben.**

HCV-Replikon exprimierende Huh9-13 wurden zunächst mit 10 μM U0126 (einem MEK1/2-Inhibitor) bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO im gleichen Volumen für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend wurden die Ansätze entweder mit 40 ng/ml EGF stimuliert oder dienten als Kontrolle (ohne Zugabe von EGF). Nach 120 Minuten erfolgte die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Die RT-PCR wurde mit genspezifischen Primern durchgeführt und die erhobenen Daten mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten, die auf die Kontrolle (nur mit DMSO behandelte Huh9-13-Zellen) normalisiert wurden. Die Signifikanz (\*) wurde mittels des ANOVA-Tests berechnet. Teile dieser hier dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [185].

Die Hemmung der MAPK-Kinase MEK1/2 führte unter EGF-Stimulation zu einer signifikanten Reduktion der CXCL1- und CXCL2-mRNA-Synthese, jedoch zu keiner vollständigen Hemmung der basalen Expressionslevel (**Abb. 9 A, B**). Daher ist davon auszugehen, dass die Signalweiterleitung, über die die EGF-Stimulation zur CXCL1- und CXCL2-mRNA-Expression führt, nicht nur durch eine Aktivierung des MEK1/2-Signalweges, sondern auch durch Aktivierung weiterer Signalkaskaden vermittelt wird. Im Falle des CXCL8 erfolgte unter MEK1/2-Hemmung eine sehr starke Reduktion der Transkriptmenge, fast bis auf basale CXCL8-mRNA-Level (**Abb. 9 C**). Dies belegt, dass

die MEK1/2-Signalkaskade eine übergeordnete Rolle in der EGF-vermittelten CXCL8-Expression spielt.

Vorangehend ausgeführte Daten legen nahe, dass die EGFR-Hemmung zu einer vollständigen Reduktion der EGF-vermittelten Chemokinexpression führt und der MEK1/2-Signalweg an der HCV-bedingten Induktion der EGF-vermittelten Chemokinexpression beteiligt ist. Es wurde daher in weiterführenden Experimenten der Einfluss der Hemmung des EGFR durch AG1478 und der MEK1/2 durch U0126 auf die basale und EGF-induzierte Aktivierung, wie auch Expression des EGF-Rezeptors sowie der Signalmoleküle Erk1/2, p38<sup>MAPK</sup>, MK2 und Akt untersucht. Dafür wurden Huh9-13-Replikonzellen für eine Stunde mit 10  $\mu$ M AG1478, 10  $\mu$ M U0126 oder dem Lösungsmittel DMSO inkubiert und anschließend mit EGF stimuliert. Die Aktivität und Expression von EGFR, Erk1/2, p38<sup>MAPK</sup>, MK2 und Akt wurde mittels Immunoblot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert (**Abb. 10**).



**Abb. 10: Einfluss der EGFR- und MEK1-Hemmung auf die EGF/EGFR-vermittelte Signaltransduktion.**

Huh9-13-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M AG1478 (EGFR-Inhibitor), 10  $\mu$ M U0126 (MEK1/2-Inhibitor) oder der gleichen Menge des Lösungsmittels DMSO für eine Stunde inkubiert oder unbehandelt belassen. Nach Stimulation mit 40 ng/ml EGF für 10 oder 20 Minuten wurden die Zellen lysiert und 50  $\mu$ g Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot sowie Immunodetektion wurde die Expression von phosphorylierten und unphosphorylierten EGFR, Erk1/2, p38<sup>MAPK</sup>, MK2 und Akt und TCPTP mittels spezifischer Antikörper detektiert. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Zwischen den einzelnen

Detektionen wurde die Membran mit Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution für 15 Minuten behandelt, um die Antikörper von der Membran zu lösen. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt und die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes exemplarisch dargestellt. Teile dieser hier dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [185].

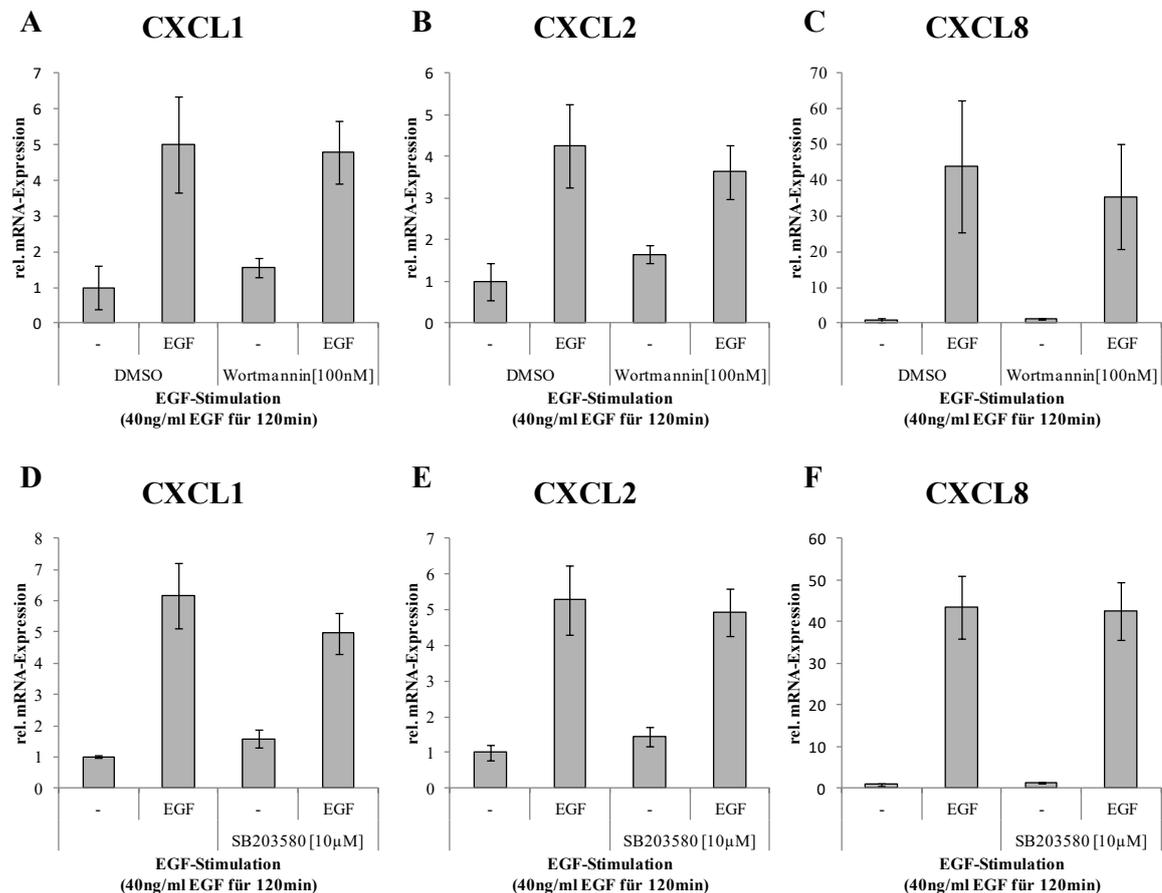
Wie aus **Abb. 10** hervorgeht, wird die EGF-induzierte Aktivierung von Erk1/2, wie auch die Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup>, der MK2 und der Akt in Huh9-13-Zellen über den EGF-Rezeptor vermittelt. Hiermit übereinstimmend führt die Hemmung des EGF-Rezeptors durch AG1478 in Huh9-13-Zellen zu einer nahezu vollständigen Blockade der Aktivierung dieser Signalmoleküle durch EGF (**Abb. 7**). Die erfolgreiche Hemmung des EGF-Rezeptors durch AG1478 wird durch die Aufhebung der EGF-induzierten Phosphorylierung des Rezeptors am Tyrosinrest 1068 in Gegenwart des Inhibitors bestätigt (**Abb. 10**). Darüber hinaus belegen die Befunde aus den Untersuchungen zur Hemmung der MEK1/2, dass die EGF-induzierte Aktivierung von Erk1/2, p38<sup>MAPK</sup> und MK2 in Huh9-13-Zellen über die Aktivierung von MEK1/2 vermittelt wird, während die Aktivierung der Proteinkinase Akt MEK1/2 unabhängig erfolgt.

Eine Hemmung der MEK1/2 verhindert unter EGF-Stimulation erwartungsgemäß eine Aktivierung von Erk1/2, einem *downstream target* der MEK1/2. Auch die p38<sup>MAPK</sup>-Phosphorylierung ist unter MEK1/2-Hemmung, verglichen mit den Kontrollen, deutlich reduziert. Jedoch ist unter MEK1/2-Hemmung die Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> stärker als unter EGFR-Hemmung. Daraus lässt sich schließen, dass p38<sup>MAPK</sup> auch durch MEK1/2 reguliert wird, es jedoch noch andere EGFR-abhängige Signalwege gibt, die zur Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> führen. Die MK2 bleibt im Rahmen des untersuchten Signalweges auch bei geringer p38<sup>MAPK</sup>-Phosphorylierung inaktiv und scheint in der EGF-Signalweiterleitung in Huh9-13-Replikonzellen keine Rolle zu spielen, oder wird durch die HCV-Nicht-Strukturproteine gehemmt. Unter MEK1-Hemmung bleibt die EGFR-abhängige aktivierende Phosphorylierung von Akt weiter bestehen, sodass diese wie erwartet zwar durch den EGFR jedoch nicht durch MEK1 in ihrer Aktivität reguliert wird (**Abb. 10**).

Zusammenfassend führt die EGF-Stimulation humaner Hepatomazellen zur Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und infolgedessen zur Aktivierung des MEK1/2/Erk1/2-Signalweges, wobei die Gegenwart des subgenomischen HCV-Replikons die Aktivierung dieser Kinasen verstärkt. Dies resultiert in Replikonzellen in einer verstärkten CXCL1, CXCL2 und CXCL8-mRNA-Expression, wobei, wie bereits erläutert, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten nahelegen, dass an der Regulation der durch EGF-induzierten Expression der Chemokine CXCL1 und CXCL2 zusätzliche Signalwege beteiligt sein müssen.

### 3.3.3 DIE PI3-KINASE UND DIE $p38^{\text{MAPK}}$ SIND NICHT IN DIE EGF-VERMITTELTE CXCL1-, CXCL2- UND CXCL8-MRNA-EXPRESSION INVOLVIERT

Wie in **Abb. 10** ersichtlich, wird nicht nur der MEK1/2/Erk1/2-Signalweg, sondern auch die  $p38^{\text{MAPK}}$ - und die PI3K/Akt-Signalkaskade durch EGF-Stimulation aktiviert. Daher wurde ebenfalls der Einfluss dieser Signalkaskaden auf die Chemokinexpression untersucht (**Abb. 11**).



**Abb. 11:** Weder die Hemmung der PI3K noch der  $p38^{\text{MAPK}}$  haben einen Einfluss auf die EGF-induzierte mRNA-Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL8 in Huh9-13 Replikonzellen.

HCV-Replikon exprimierende Huh9-13 Zellen wurden entweder mit 100 nM Wortmannin (PI3K-Inhibitor) (A–C) oder mit 10  $\mu\text{M}$  SB203580 ( $p38^{\text{MAPK}}$ -Inhibitor) (D–F) für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 ng/ml EGF für die angegebene Zeit stimuliert und anschließend zur Präparation von RNA lysiert. Die RT-PCR wurde mit genspezifischen Primern durchgeführt und mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten, die auf die Kontrolle normalisiert wurden. Teile dieser hier dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [185].

Dazu wurden Huh9-13-Zellen mit 100 nM Wortmannin (PI3K-Inhibitor) [189] oder 10  $\mu\text{M}$  SB203580 ( $p38^{\text{MAPK}}$ -Inhibitor) [188] für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 ng/ml EGF für 120 Minuten stimuliert. Die Auswertung der anschließenden RT-PCR ergab keinen Hinweis auf eine Beteiligung des PI3K/Akt- oder  $p38^{\text{MAPK}}$ -Signalweges an der EGF-induzierten Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL8, da die Inhibitorgabe keinen Einfluss auf die EGF-induzierte mRNA-Expression

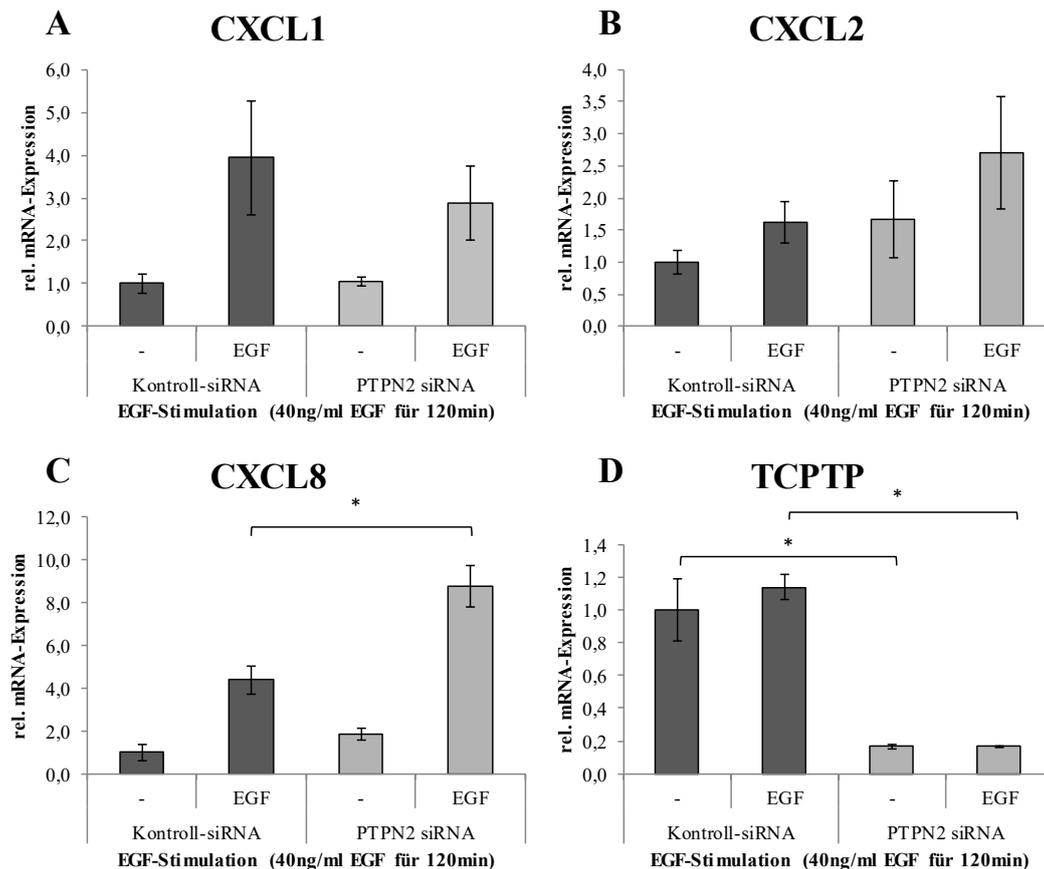
hatte (**Abb. 11**). Demnach kann gefolgert werden, dass die PI3K/Akt- sowie p38<sup>MAPK</sup>-Signalwege nicht an der Regulation der durch EGF vermittelten und durch HCV verstärkten RNA-Synthese der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL8 beteiligt sind.

### 3.4 TCPTP IST IN DER EGF-ABHÄNGIGEN EXPRESSION DES CXCL8 INVOLVIERT

Übereinstimmend mit Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe [24] konnte belegt werden, dass es in Gegenwart des subgenomischen HCV-Replikons zu einer Reduktion der Proteinlevel von TCPTP kommt (**Abb. 7**). Diese Herabregulation der TCPTP Proteinlevel geht in Zellen, die das subgenomische Replikon von HCV beherbergen, mit einer Verstärkung der intrazellulären Signalübertragung von EGF einher (**Abb. 14** und [24]). Um zu analysieren, ob die NS3/4A-vermittelte TCPTP-Spaltung auch einen Einfluss auf die Chemokinexpression hat, wurde die Expression des TCPTP Transkripts mittels spezifischer siRNA antagonisiert.

#### 3.4.1 DER TCPTP-KNOCKDOWN VERSTÄRKT DIE EGF-VERMITTELTE CXCL8-EXPRESSION IN HUH7-ZELLEN

Zunächst wurde der Effekt des TCPTP-Knockdown auf die CXCL1, CXCL2 und CXCL8-mRNA-Expression untersucht. Dazu wurden die transfizierten Zellen mit 40 ng/ml EGF für 120 Minuten stimuliert. Nach mRNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer die mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL8 analysiert (**Abb. 12 A-C**). Zur Kontrolle des TCPTP-Knockdowns wurde auch die TCPTP-mRNA mittels spezifischer Primer im Rahmen der RT-PCR analysiert (**Abb. 12 D**).



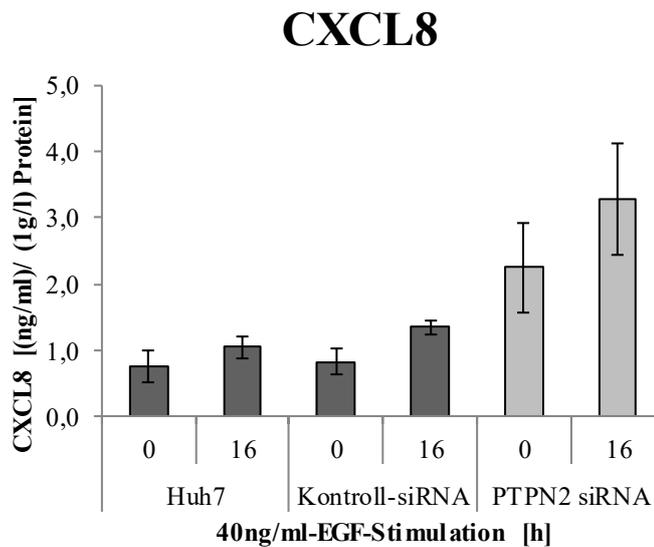
**Abb. 12:** Der TCPTP-Knockdown verstärkt die EGF-vermittelte CXCL8-mRNA-Expression in Huh7-Zellen.

Huh7-Zellen wurden mit PTPN2 bzw. Kontroll-siRNA in einer Endkonzentration von 50 nM siRNA transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit 40 ng/ml EGF stimuliert oder dienten der Kontrolle (keine Zugabe von EGF). Nach 120 Minuten erfolgte die mRNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Die RT-PCR wurde mit genspezifischen Primern durchgeführt und die erhobenen Daten mit der  $\Delta\Delta CT$ -Methode ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die auf die Kontrolle (unstimulierte, mit Kontroll-siRNA-transfizierte Huh9-13-Zellen) normalisiert wurden. Die Signifikanz (\*) wurde mittels des ANOVA-Tests berechnet.

Wie in **Abb. 12** dargestellt, kommt es unter verminderter TCPTP-mRNA-Expression zu keinen relevanten Änderungen der Expression von CXCL1 (**Abb. 12 A**), während die basale wie auch die EGF induzierte mRNA-Expression von CXCL2 hierdurch tendenziell, jedoch nicht signifikant verstärkt wird (**Abb. 12 B**). Hingegen führt die siRNA vermittelte Hemmung/Verminderung der Transkript-Expression von TCPTP (**Abb. 12 D**) zu einer deutlichen Verstärkung der basalen und vor allem der EGF-induzierten Expression von CXCL8 (**Abb. 12 C**) auf Transkriptionsebene.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die gesteigerte CXCL8-Expression nach TCPTP-Knockdown auch auf Proteinebene widerspiegelt. Dazu erfolgte nach dem gleichen Versuchsablauf wie oben beschrieben der TCPTP-Knockdown für 72 Stunden. Die transfizierten Huh7-Zellen wurden mit jeweils 40 ng/ml EGF für 16 Stunden stimuliert und

die Zellkulturüberstände anschließend mittels ELISA hinsichtlich der CXCL8-Proteinkonzentration untersucht (**Abb. 13**).



**Abb. 13:** Der TCPTP-Knockdown steigert sowohl die basale als auch die EGF-vermittelte CXCL8-Ausschüttung in Huh7-Zellen.

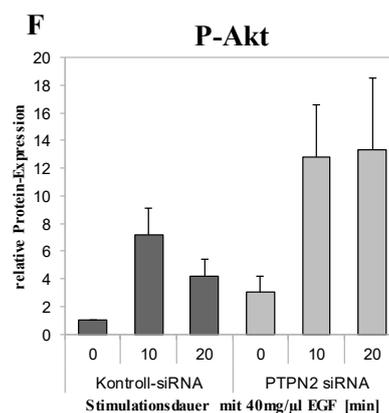
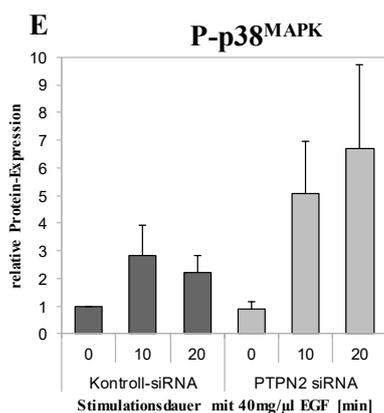
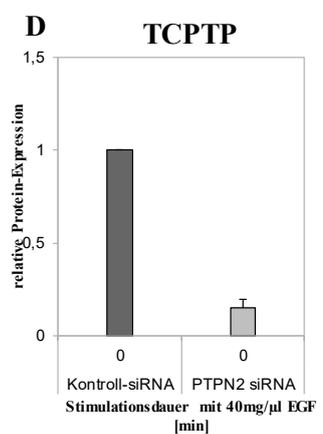
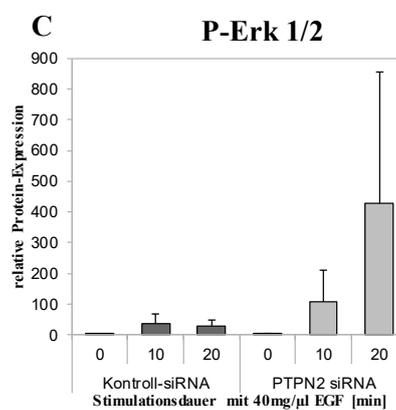
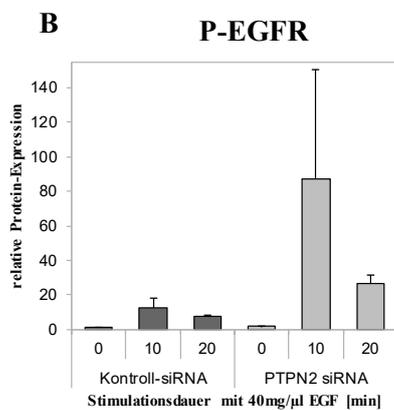
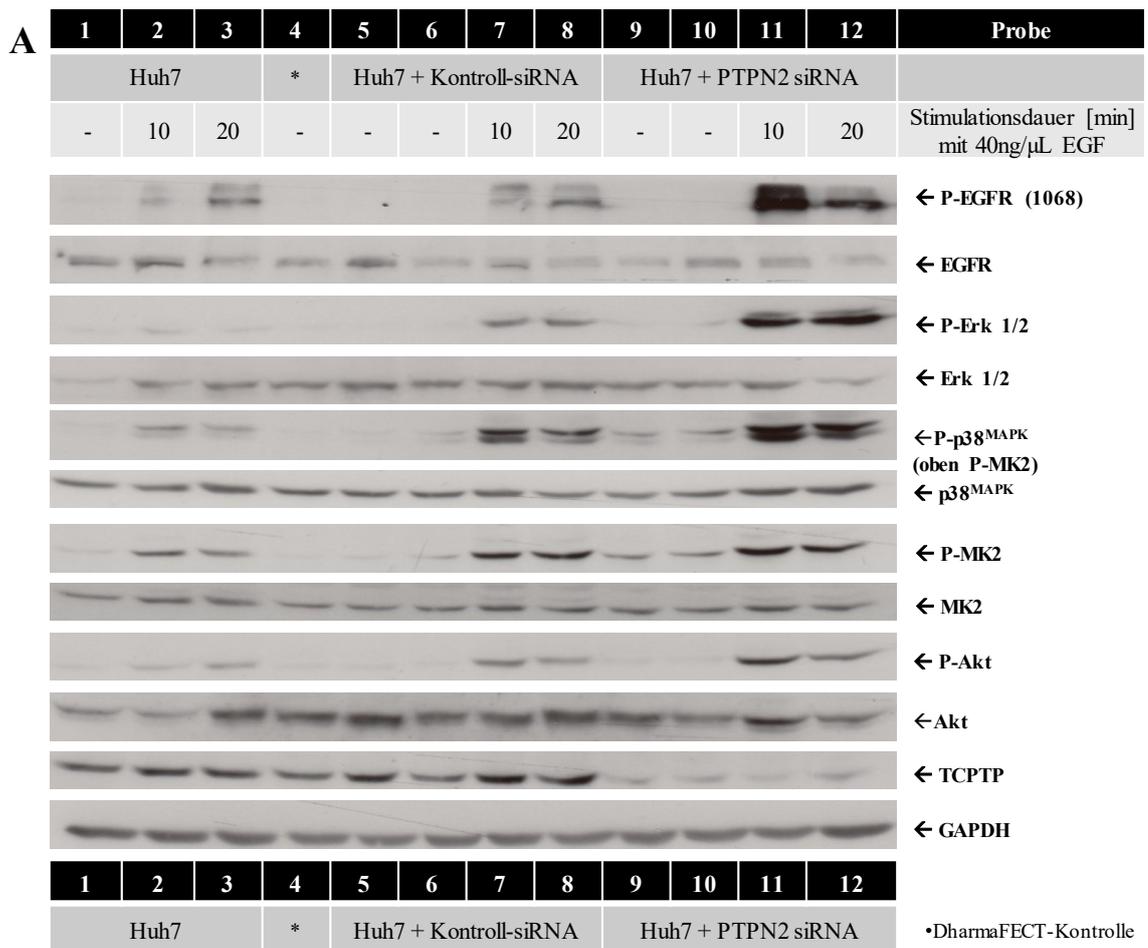
Huh7-Zellen wurden mit PTPN2 siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert (jeweils 50 nM). 72 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten Huh7-Zellen sowie unbehandelte Huh7-Zellen als Kontrolle mit 40 ng/ml EGF stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach 16 Stunden wurde der Zellüberstand abgenommen und mittels ELISA und einem Mikroplatten-Spektralphotometer die CXCL8-Konzentration gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Übereinstimmend mit den Befunden aus der Analyse der Transkript-Expression lässt sich auch in Zellen, in denen die Expression der TCPTP gehemmt wird, eine Erhöhung der basalen wie auch der EGF-induzierten CXCL8-Konzentration nachweisen (**Abb. 13**).

#### 3.4.2 DER TCPTP-KNOCKDOWN VERSTÄRKT DIE AKTIVIERUNG DER EGFR-ABHÄNGIGEN SIGNALWEGE

Nachdem belegt werden konnte, dass ein TCPTP-Knockdown zu einer erhöhten basalen wie auch EGF-induzierten Expression von CXCL8-Transkript und Freisetzung von CXCL8-Protein führt, wurde der Einfluss einer Suppression der TCPTP-Expression auf die Aktivierbarkeit der EGFR-abhängigen Signalübertragung mittels spezifischer siRNA untersucht. Hierzu wurde wiederum eine Transfektion mit PTPN2 und Kontroll-siRNA in Huh7-Zellen durchgeführt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit 40 ng/ml EGF für 10 oder 20 Minuten stimuliert und die aktivierende Phosphorylierung sowie das Gesamtproteins von EGFR, Erk1/2, p38<sup>MAPK</sup>, MK2 und Akt mittels phosphospezifischer Antikörper bzw. gegen das Gesamtprotein gerichteter Antikörper mittels Immunoblot analysiert (**Abb. 14**). Ebenso wurde die Expression von TCPTP auf Proteinebene mittels

Immunoblot untersucht. Der reduzierte TCPTP-Gehalt in PTPN2 siRNA transfizierten Zellen bestätigte den erfolgreichen TCPTP-Knockdown (Abb. 14).



**Abb. 14: Der TCPTP-Knockdown verstärkt die Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalwege.**

Zunächst erfolgte eine Transfektion von PTPN2 siRNA bzw. Kontroll-siRNA in einer Endkonzentration von 50 nM siRNA in Huh7-Zellen. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit 40 ng/ml EGF stimuliert oder dienten der Kontrolle. Nach 10 bzw. 20 Minuten wurden die Zellen lysiert und 30 µg Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot und anschließender Immunodetektion wurde die Aktivierung von EGFR, Erk1/2, p38<sup>MAPK</sup>, MK2 und Akt sowie TCPTP mittels spezifischer Antikörper untersucht. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Zwischen den einzelnen Detektionen wurde die Membran mit Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution für 15 Minuten behandelt, um die Antikörper von der Membran zu lösen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes exemplarisch dargestellt (**A**). Die DharmaFECT-Kontrolle (\*) wurde zum Ausschluss einer Beeinflussung des Versuchsaufbaus durch das Transfektionsreagenz DharmaFECT 4 durchgeführt. Die Abbildungen **B-F** stellen graphisch die densitometrische Auswertungen von drei unabhängig durchgeführten Western Blots dar. Die Densitometrie wurde freundlicherweise durch Dr. Kerstin Rufinatscha unter Verwendung der Software Image J (Rasband, W. S., U. S. National Institutes of Health, Maryland, USA) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten, die auf die Kontrolle (unstimulierte Huh7-Zellen) normalisiert sind. Teile dieser hier dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [185].

Wie aus den in **Abb. 14** zusammengefassten Immunoblots und ihrer densitometrischen Analyse hervorgeht, führt im Vergleich zu den Kontrollen der *Knockdown* der TCPTP zu einer gesteigerten Phosphorylierung von EGFR sowie der nachgeschalteten Kinasen Erk1/2 und Akt. Der Effekt der TCPTP-Suppression war hierbei vergleichbar zu dem Einfluss des subgenomischen HCV-Replikons auf die EGF-induzierte Aktivierung der entsprechenden Signalproteine in Zellen, die das subgenomische Replikon des Hepatitis-C-Virus (Huh9-13-Zellen) exprimieren (**Abb. 7**). Zusammenfassend legen die hier ausgeführten Befunde nahe, dass die HCV vermittelte Hemmung der TCPTP-Expression [24] zumindest partiell für den Einfluss von HCV auf die EGF-induzierte Signalübertragung wie auch die basale und EGF-induzierte Expression von CXCL8 verantwortlich ist.

Weiterhin stellt sich unter TCPTP-*Knockdown* und EGF-Stimulation eine verstärkte basale p38<sup>MAPK</sup>-Phosphorylierung dar, die unter EGF-Stimulation weiter zunahm (**Abb. 14**). Auch dieser Effekt wurde bereits in den Replikon-exprimierenden Zellen nachgewiesen (**Abb. 7**). Anders verhält es sich mit der Aktivierung der MK2. Der TCPTP-*Knockdown* führt bei verstärkter Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup>, wie erwartet, auch zu einer verstärkten Phosphorylierung des p38<sup>MAPK</sup> Substrates MK2 (**Abb. 14**). In Huh9-13-Replikonzellen bleibt die MK2-Phosphorylierung trotz p38<sup>MAPK</sup>-Phosphorylierung jedoch überraschenderweise deutlich geringer als in den Huh7-Kontrollzellen (**Abb. 7**). Dies legt nahe, dass HCV mit der Aktivierung der MK2 durch die p38<sup>MAPK</sup> auf bislang ungeklärte Weise interferiert.

## 4 DISKUSSION

Der trotz zumeist persistierend hoher Virustiter mitunter über Jahrzehnte gehende asymptomatische oder symptomarme Verlauf der HCV Infektion legt nahe, dass HCV mit den Mechanismen interferiert, die die antivirale Immunantwort wie auch die Entzündungsreaktion im Wirt kontrollieren. In diesem Kontext stellen Chemokine, als für die Rekrutierung der verschiedenen Immunzellpopulationen wichtige Faktoren, eine Gruppe von Mediatoren dar, die wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der lokalen Immunzellpopulationen und damit auf das immunologische und inflammatorische (Mikro-) Milieu haben. [90, 94]

Vor diesem Hintergrund war es Ziel der hier ausgeführten Untersuchungen, den Einfluss von HCV auf die Expression von Chemokinen zu untersuchen. Hierbei sollte zunächst eine Fokussierung auf Chemokine erfolgen, die für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten relevant sind. In diesem Kontext waren vor allem die Mitglieder der CXC Chemokinfamilie CXCL1, 2, 3 und CXCL8 von Bedeutung, die über den Chemokinrezeptor CXCR2 erkannt werden [97]. Da EGF im Rahmen von Reparaturprozessen nach Leberschädigung eine wichtige Bedeutung zukommt [133] und die Serum-Konzentrationen von EGF in Patienten mit chronischer Hepatitis C erhöht sind [185, 190] sollte zudem untersucht werden, ob EGF einen Einfluss auf die Expression dieser Chemokine durch die Wirtszelle hat.

Die Ergebnisse der vorangehend ausgeführten Untersuchungen legen nahe, dass die Präsenz des subgenomischen HCV-Replikons zu einer verstärkten basalen Expression der Chemokine CXCL1, 2, 3 und CXCL8 durch die Wirtszelle führt. Interessanterweise konnte darüber hinaus belegt werden, dass EGF, welches bei entsprechenden hepatozytären Kontrollzellpopulationen (Huh7) nur einen geringen Einfluss auf die Expression genannter Chemokine hat, in der Präsenz des subgenomischen Replikons zu einer deutlich verstärkten Expression der Chemokine CXCL1, 2, 3 und CXCL8 führt. Hierbei war der Effekt auf die Induzierbarkeit der Expression von CXCL8 durch Stimulation mit EGF am stärksten ausgeprägt (**Abb. 4** und **5**). Die Tatsache, dass HCV Einfluss auf die Expression von Chemokinen durch die Wirtszelle hat, ist dabei bereits seit längerem bekannt und am Beispiel verschiedener Chemokine beschrieben [95]. Beispielsweise konnte für CXCL8 belegt werden, dass HCV in der Wirtszelle die Expression von CXCL8 über einen NF $\kappa$ B- und AP1-abhängigen Mechanismus induziert [68] und hierdurch mit durch TypI Interferone induzierten antiviralen Effektormechanismen interferiert [68, 106, 107]. Übereinstimmend damit konnte bei Patienten mit chronischer Hepatitis C eine positive Korrelation zwischen Serumkonzentration von CXCL8 und Viruslast dokumentiert werden [185].

Die Beobachtung, dass die Gegenwart des subgenomischen HCV-Replikons nicht nur zu einem Anstieg der basalen Expression von CXCR2-Liganden wie CXCL1-3 und CXCL8 führt, sondern auch mit einer massiven Steigerung der Produktion genannter Chemokine in Reaktion auf Stimulation der Wirtszelle mit EGF einhergeht, ist bislang nicht beschrieben. Vor dem Hintergrund, dass erhöhte EGF-Konzentrationen im Serum von Patienten [185, 190] beschrieben sind, ist dieser Befund jedoch hochinteressant, da er impliziert, dass die infizierte Wirtszelle möglicherweise eine relevante Quelle für die erhöhten CXCL8-Konzentrationen im Serum von Patienten [69] mit chronischer HCV Infektion darstellen könnte. Bisher beschrieben ist EGF als schwacher Aktivator einer JNK- und NF $\kappa$ B-abhängigen CXCL8-Expression in humanen Epithelzellen [113] bzw. einer PI3K/Akt- und Erk1/2-abhängige CXCL8-Expression in Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms [115], jedoch nicht im Zusammenhang mit einer HCV Infektion. Dass sowohl die Konzentrationen von EGF, als auch die Konzentrationen von CXCL8 im Serum von Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion erhöht sind, konnte zwischenzeitlich auch durch weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigt werden [185]. Da durch CXCR2-Liganden führend die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten vermittelt wird [90], ist ferner denkbar, dass es über die HCV-bedingte Freisetzung genannter Chemokine zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die HCV infizierte Leber kommt, und dass letztere, zumindest zum Teil, für den ebenfalls bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion beschriebenen Anstieg der TNF $\alpha$ -Konzentrationen im Serum [191] mitverantwortlich sind. Letzteres ist besonders interessant, da Untersuchungen an transgenen Mäusen mit Leber-spezifischer Expression der viralen NS3/4A Protease nahelegen, dass es bei diesen Tieren ebenfalls zu einer Erhöhung der Serumkonzentrationen von TNF $\alpha$  kommt, und dass dies wesentlich zu den gleichzeitig bei diesen Tieren dokumentierten protektiven Effekten von NS3/4A beiträgt [192]. Weiterhin gestützt wird die oben beschriebene Annahme dadurch, dass im Rahmen dieser Arbeit eine Relevanz des viralen NS3/4A für die HCV-induzierten CXCL8-Expression belegt werden konnte (**Abb. 6**). In der Literatur sind bereits verschiedene HCV-kodierende Proteine wie NS2 [118], NS4A, NS4B [119] NS5A [68] und Core [119] beschrieben, welche in die HCV-induzierten CXCL8-Expression involviert sind. Dabei wurden sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Mechanismen aufgeführt [117]. Weiterhin ist anzumerken, dass die gesteigerte CXCL8-Proteinsynthese nicht nur Einfluss auf das immunologische Milieu hat, sondern auch mit einer erhöhten HCV-RNA-Replikation in Replikonzellen assoziiert ist [68].

Unter Berücksichtigung, dass vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe nachweisen konnten, dass NS3/4A durch proteolytische Spaltung die Proteinsynthese von TCPTP reduziert [24], welche ein wichtiger endogener „Negativregulator“ der EGFR-Signalübertragung ist [180], und dem Beleg, dass NS3/4A eine relevante Rolle in der CXCL8-Expression im Rahmen einer EGF-Stimulation spielt (**Abb. 6**), wurde in dieser Arbeit eine weitere Verknüpfung der beschriebenen Daten hergestellt. So konnte durch einen TCPTP-*Knockdown* durch spezifische siRNA die HCV-induzierte TCPTP-Senkung, die zur Verstärkung der EGF-induzierbaren Signalwege führt [24], nachempfunden (**Abb. 14**) und mit dem Nachweis, dass TCPTP in der EGF-abhängigen CXCL8-Expression involviert ist (**Abb. 12** und **13**), erweitert werden. Basierend auf den in dieser Arbeit aufgeführten Daten könnte man die Schlussfolgerung ziehen, dass HCV zumindest teilweise durch eine NS3/4A-vermittelte Spaltung von TCPTP die EGFR-abhängigen Signalwege verstärkt, die im Rahmen einer EGF-Stimulation zur CXCL8-Expression führen.

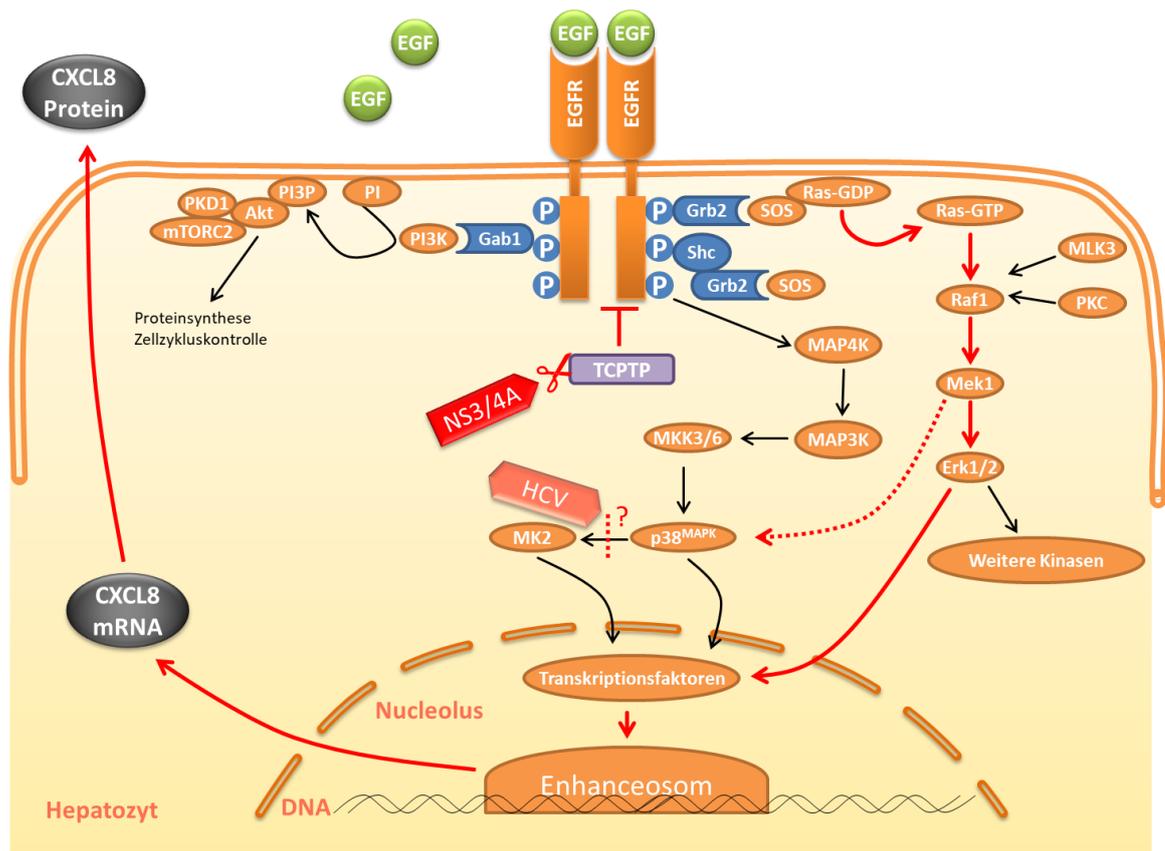
Eine verstärkte Aktivierung des EGF-Rezeptors sowie seiner Kinasen Erk1/2 und Akt in Anwesenheit von HCV ist bereits bekannt [24, 152, 187]. In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt (**Abb. 7**) und darüber hinaus belegt werden, dass die EGF-vermittelte CXCR2-Liganden-Expression EGFR-abhängig erfolgt (**Abb. 8**). Somit fungiert der EGF-Rezeptor im Rahmen der HCV-Infektion nicht nur als Cofaktor für den viralen Zelleintritt [25], sondern spielt eine entscheidende Rolle bei der EGF-vermittelten CXCR2-Liganden-Expression und damit in der viralen Immunmodulation. Die Relevanz des EGF-Rezeptors im Rahmen der HCV-Infektion wird darüber hinaus dadurch bekräftigt, dass das HCV-NS5A Einfluss auf die EGFR-Endozytose nimmt und damit einen verminderten Abbau des Liganden-Rezeptor-Komplexes bzw. des EGF-Rezeptors selbst bewirkt [135, 136].

Die vorbeschriebene verstärkte Aktivierung des MEK1/2-Erk1/2-Signalweges in Anwesenheit von HCV [139], auch unter EGF-Stimulation [152], konnte in dieser Arbeit nicht nur bestätigt werden, es konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass der MEK1/2-Erk1/2-Signalweg eine übergeordnete Rolle in der EGF-vermittelten CXCR2-Liganden-Expression in HCV-Replikon-exprimierenden Zellen spielt, insbesondere in Hinblick auf die CXCL8-Expression (**Abb. 9**).

Obwohl die hier dargestellten Daten nahelegen, dass die PI3K/Akt- sowie p38<sup>MAPK</sup>-Signalwege nicht an der Regulation der EGF-vermittelten CXCR2-Liganden-Expression in HCV-Replikonzellen beteiligt sind (**Abb. 11**), konnte ein interessanter Aspekt dargestellt werden. Es ist beschrieben, dass die Gegenwart des HCV zu einer Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> führt [24, 161] und das p38<sup>MAPK</sup> in der Kontrolle der HCV-Core-vermittelten CXCL8-Expression in humanen Lungenfibroblasten beteiligt ist [165]. Eine verstärkte p38<sup>MAPK</sup>-

Aktivierung sowohl in Anwesenheit des HCV-Replikons als auch unter TCPTP-*Knockdown* konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt und durch die Beobachtung einer verstärkten Aktivierung unter EGF-Stimulation ergänzt werden (**Abb. 7** und **11**), ohne jedoch eine EGF-abhängige CXCR2-Liganden-Expression in Hepatomazellen zu induzieren (**Abb. 11**). Überraschenderweise resultiert die oben beschriebene Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> im Rahmen des TCPTP-*Knockdowns* in der Aktivierung des p38<sup>MAPK</sup>-Substrates MK2 (**Abb. 14**), jedoch nicht in Gegenwart des HCV-Replikons (**Abb. 7** und **10**). Dies legt nahe, dass HCV mit der Aktivierung der MK2 durch die p38<sup>MAPK</sup> auf bislang ungeklärte Weise interferiert. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass im Wesentlichen die Aktivierung des p38<sup>MAPK</sup>/MK2-Signalweges im Rahmen einer IFN $\alpha$ -vermittelten Immunantwort gegen das Hepatitis-C-Virus involviert ist [163], und dass CXCL8 eine Resistenz gegen Typ1-Interferone vermittelt [69, 68, 104, 107]. Somit bleibt es künftigen Untersuchungen vorbehalten, nachzuweisen, ob die CXCL8 vermittelte IFN $\alpha$ -Resistenz im Zusammenhang mit der MK2-Inaktivität in Gegenwart des HCV-Replikons steht.

Durch die oben dargestellten Befunde wäre somit zu schlussfolgern, dass das HCV unter anderem durch eine NS3/4A-vermittelte TCPTP-Spaltung eine EGFR-Sensibilisierung und damit eine EGF-abhängige Aktivierung des MEK1/2-Erk1/2-Signalweges induziert, welche zumindest teilweise zur verstärkten Sekretion von CXCR2-Liganden führt. Eine schematische Darstellung der hier erarbeiteten Hypothese wird in **Abb. 15** dargestellt.



**Abb. 15: Das Hepatitis-C-Virus befähigt EGF die Expression des Chemokins CXCL8 MEK1/Erk1/2-abhängig zu induzieren.**

In dieser Grafik wird die Hypothese der vorliegenden Arbeit zusammengefasst. EGF bindet an den EGFR eines Hepatozyten. Dadurch werden die EGFR-abhängigen Signalkaskaden aktiviert. Hier sind die wichtigsten und in der Arbeit untersuchten Signalkaskaden dargestellt: PI3K-Akt-, p38<sup>MAPK</sup>-MK2- und MEK1-Erk1/2-Signalkaskade. Weiterhin wurde TCPTP, ein endogener negativer EGFR-Regulator, dargestellt. Das virale Nicht-Strukturprotein HCV NS3/4A spaltet TCPTP, wodurch die EGFR-Phosphorylierung und nachfolgende Aktivierung der EGFR-Signalkaskaden in Antwort auf EGF gesteigert wird. Durch eine gesteigerte Aktivierung des MEK1-Erk1/2-Signalweges erfolgt eine erhöhte CXCL8-mRNA und -Proteinsynthese. Weiterhin konnte eine MEK1-abhängige Phosphorylierung der p38<sup>MAPK</sup> nachgewiesen werden. Darüber hinaus erfolgt in HCV-Replikon Zellen trotz p38<sup>MAPK</sup>-Aktivierung keine MK2-Phosphorylierung, sodass eine HCV-induzierte Hemmung dieses Phosphorylierungsschrittes denkbar ist. Eigene Erstellung.

Sowohl der Befund, dass die Serumkonzentrationen von CXCR2-Liganden wie CXCL8 [69, 185] sowie die des Wachstumsfaktors EGF [185, 190] in Patienten mit chronischer HCV-Infektion erhöht sind und mit der Viruslast korrelieren, als auch der Nachweis einer Normalisierung von CXCL8- [193] und EGF-Serumkonzentrationen [190] bei Patienten mit erfolgreicher HCV-Eradikation legen virusinduzierte Veränderungen nahe. Somit kann, wie oben bereits beschrieben, spekuliert werden, dass das Hepatitis-C-Virus EGF-abhängig durch verstärkte CXCL8-Expression die Rekrutierung von Neutrophilen in infiziertes Gewebe fördert und somit Entzündungsreaktionen begünstigt. Im Hinblick auf die *in vivo*-Relevanz der hier dargestellten Daten ist zu beachten, dass Entzündungen der

Pfortader und Gallengangläsionen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion mit der hepatischen Expression von CXCL8 in Zusammenhang stehen [194].

Bezüglich der Methodenwahl ist abschließend zu erwähnen, dass das in dieser Arbeit verwendete Replikonsystem den entscheidenden Durchbruch in der HCV-Forschung darstellte [43] und sich durch eine langjährige Erfahrung unterschiedlicher Forscher und zuverlässigen Ergebnissen auszeichnet. Trotz beschriebener Systemschwächen, wie der eingeschränkten Übertragung der Ergebnisse auf das vitale Virus, da das Replikon einerseits nur aus NS3-NS5 und die 3'- und 5'-UTR besteht ,und andererseits nicht der gesamte virale Lebenszyklus einschließlich der Partikel-Bildung durchlebt wird, konnten die hier dargestellten Befunde zwischenzeitlich in großen Teilen in Zellkulturen mit stabil infektiösen Viruspartikeln durch die Arbeitsgruppe reproduziert werden [185].

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] World Health Organisation, *Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection*. Geneva: ISBN 978-92-4-154875-5, 2014.
- [2] 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. 1975.,” *Rev. Med. Virol.*, vol. 11, no. 1, pp. 3–8; discussion 8-9, 2001.
- [3] 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*, vol. 244, no. 4902, pp. 359–62, Apr. 1989.
- [4] M. Cornberg *et al.*, “A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel.,” *Liver Int.*, vol. 31 Suppl 2, pp. 30–60, Jul. 2011.
- [5] J. J. Feld and J. H. Hoofnagle, “Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C.,” *Nature*, vol. 436, no. 7053, pp. 967–72, Aug. 2005.
- [6] C. Sarrazin *et al.*, “Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus(HCV)-Infektion,” *Z. Gastroenterol.*, vol. 58, no. 11, pp. 1110–1131, Nov. 2020.
- [7] I. M. Jacobson *et al.*, “Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 25, pp. 2405–16, Jun. 2011.
- [8] B. R. Bacon *et al.*, “Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 13, pp. 1207–17, Mar. 2011.
- [9] L. Delang, J. Neyts, I. Vliegen, S. Abrignani, P. Neddermann, and R. De Francesco, “Hepatitis C virus-specific directly acting antiviral drugs.,” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp. 289–320, Jan. 2013.
- [10] J. J. Feld *et al.*, “Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 27, pp. 2599–2607, Dec. 2015.
- [11] T. Berg *et al.*, “Real-world effectiveness and safety of glecaprevir/pibrentasvir for the treatment of chronic hepatitis C infection: data from the German Hepatitis C-Registry,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 49, no. 8, pp. 1052–1059, Apr. 2019.
- [12] G. Gerold and T. Pietschmann, “The HCV Life Cycle: In vitro Tissue Culture Systems and Therapeutic Targets.,” *Dig. Dis.*, vol. 32, no. 5, pp. 525–37, Jan. 2014.
- [13] J. G. Bode, E. D. Brenndörfer, and D. Häussinger, “Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus.,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 462, no. 2, pp. 254–65, Jun. 2007.

- [14] P. Simmonds, "The origin of hepatitis C virus," *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 369, pp. 1–15, 2013.
- [15] D. B. Smith *et al.*, "Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource.," *Hepatology*, vol. 59, no. 1, pp. 318–27, Jan. 2014.
- [16] J. G. Bode, E. D. Brenndörfer, and D. Häussinger, "Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response.," *Biol. Chem.*, vol. 389, no. 10, pp. 1283–98, Oct. 2008.
- [17] M. Lavie, A. Goffard, and J. Dubuisson, "Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer," *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 9, no. 2, pp. 71–86, 2007.
- [18] P. André *et al.*, "Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles.," *J. Virol.*, vol. 76, no. 14, pp. 6919–28, Jul. 2002.
- [19] A. Takamizawa *et al.*, "Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers.," *J. Virol.*, vol. 65, no. 3, pp. 1105–13, Mar. 1991.
- [20] D. Moradpour and F. Penin, "Hepatitis C virus proteins: from structure to function.," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp. 113–42, Jan. 2013.
- [21] E. Steinmann, F. Penin, S. Kallis, A. H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann, "Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions," *PLoS Pathog.*, vol. 3, no. 7, pp. 0962–0971, 2007.
- [22] X.-D. Li, L. Sun, R. B. Seth, G. Pineda, and Z. J. Chen, "Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 49, pp. 17717–22, Dec. 2005.
- [23] K. Li *et al.*, "Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 8, pp. 2992–7, Feb. 2005.
- [24] E. D. Brenndörfer *et al.*, "Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase.," *Hepatology*, vol. 49, no. 6, pp. 1810–20, Jun. 2009.
- [25] J. Lupberger *et al.*, "EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy.," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 5, pp. 589–95, May 2011.
- [26] Q. Shi, J. Jiang, and G. Luo, "Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes.," *J. Virol.*, vol. 87, no. 12, pp. 6866–75, Jun. 2013.

- [27] A. Albecka *et al.*, “Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle.,” *Hepatology*, vol. 55, no. 4, pp. 998–1007, Apr. 2012.
- [28] V. L. D. Thi *et al.*, “Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 37, pp. 31242–31257, 2012.
- [29] L. Zona *et al.*, “HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex.,” *Cell Host Microbe*, vol. 13, no. 3, pp. 302–13, Mar. 2013.
- [30] J. Diao *et al.*, “Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry.,” *J. Virol.*, vol. 86, no. 20, pp. 10935–49, Oct. 2012.
- [31] Y. Tong, D. Lavillette, Q. Li, and J. Zhong, “Role of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 in virus entry and assembly,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. JUN. Frontiers Media S.A., 19-Jun-2018.
- [32] E. Blanchard *et al.*, “Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis,” *J. Virol.*, vol. 80, no. 14, pp. 6964–6972, Jul. 2006.
- [33] 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.*, vol. 80, no. 4, pp. 1734–1741, Feb. 2006.
- [34] M. Niepmann, “Hepatitis C virus RNA translation.,” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp. 143–66, Jan. 2013.
- [35] P. Schult *et al.*, “MicroRNA-122 amplifies hepatitis C virus translation by shaping the structure of the internal ribosomal entry site,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018.
- [36] V. Schregel, S. Jacobi, F. Penin, and N. Tautz, “Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 13, pp. 5342–7, Mar. 2009.
- [37] V. Lohmann, “Hepatitis C virus RNA replication.,” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp. 167–98, Jan. 2013.
- [38] B. D. Lindenbach, “Virion assembly and release.,” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp. 199–218, Jan. 2013.
- [39] J. M. Timpe *et al.*, “Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies.,” *Hepatology*, vol. 47, no. 1, pp. 17–24, Jan. 2008.
- [40] C. L. Brimacombe *et al.*, “Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission.,” *J. Virol.*, vol. 85, no. 1, pp. 596–605, Jan. 2011.

- [41] J. Jo, V. Lohmann, R. Bartenschlager, and R. Thimme, "Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus.," *J. Gen. Virol.*, vol. 92, no. Pt 3, pp. 477–93, Mar. 2011.
- [42] H. Barth, E. Robinet, T. J. Liang, and T. F. Baumert, "Mouse models for the study of HCV infection and virus-host interactions.," *J. Hepatol.*, vol. 49, no. 1, pp. 134–42, Jul. 2008.
- [43] V. Lohmann, "Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line," *Science (80-. )*, vol. 285, no. 5424, pp. 110–113, Jul. 1999.
- [44] V. Lohmann, S. Hoffmann, U. Herian, F. Penin, and R. Bartenschlager, "Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture.," *J. Virol.*, vol. 77, no. 5, pp. 3007–19, Mar. 2003.
- [45] R. Sumpter *et al.*, "Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I," *J. Virol.*, vol. 79, no. 5, pp. 2689–2699, Mar. 2005.
- [46] X. Du *et al.*, "Hepatitis C virus replicative double-stranded RNA is a potent interferon inducer that triggers interferon production through MDA5," *J. Gen. Virol.*, vol. 97, no. 11, pp. 2868–2882, Nov. 2016.
- [47] K. Li, Z. Chen, N. Kato, M. Gale, and S. M. Lemon, "Distinct Poly(I-C) and Virus-activated Signaling Pathways Leading to Interferon- $\beta$  Production in Hepatocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 17, pp. 16739–16747, Apr. 2005.
- [48] J. W. Schoggins and C. M. Rice, "Innate immune responses to hepatitis C virus.," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp. 219–42, Jan. 2013.
- [49] A. A. Negash *et al.*, "IL-1 $\beta$  production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease.," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 4, p. e1003330, Jan. 2013.
- [50] D.-R. Yang and H.-Z. Zhu, "Hepatitis C virus and antiviral innate immunity: Who wins at tug-of-war?," *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 13, pp. 3786–3800, Apr. 2015.
- [51] D. E. Levy, I. J. Marié, and J. E. Durbin, "Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection.," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 1, no. 6, pp. 476–86, Dec. 2011.
- [52] E. D. Brenndörfer and M. Sällberg, "Hepatitis C virus-mediated modulation of cellular immunity.," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 60, no. 5, pp. 315–29, Oct. 2012.
- [53] C. Neumann-Haefelin and R. Thimme, "Adaptive immune responses in hepatitis C

- virus infection.," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp. 243–62, Jan. 2013.
- [54] S. L. Tsai, Y. F. Liaw, M. H. Chen, C. Y. Huang, and G. C. Kuo, "Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity.," *Hepatology*, vol. 25, no. 2, pp. 449–58, Feb. 1997.
- [55] C. Neumann-Haefelin and R. Thimme, "Success and failure of virus-specific T cell responses in hepatitis C virus infection.," *Dig. Dis.*, vol. 29, no. 4, pp. 416–22, Jan. 2011.
- [56] J. Jo *et al.*, "Low perforin expression of early differentiated HCV-specific CD8+ T cells limits their hepatotoxic potential.," *J. Hepatol.*, vol. 57, no. 1, pp. 9–16, Jul. 2012.
- [57] J. Jo *et al.*, "Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model.," *Gastroenterology*, vol. 136, no. 4, pp. 1391–401, Apr. 2009.
- [58] M. C. Sabo *et al.*, "Neutralizing monoclonal antibodies against hepatitis C virus E2 protein bind discontinuous epitopes and inhibit infection at a postattachment step.," *J. Virol.*, vol. 85, no. 14, pp. 7005–19, Jul. 2011.
- [59] R. Lin *et al.*, "Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage.," *J. Virol.*, vol. 80, no. 12, pp. 6072–83, Jun. 2006.
- [60] H. Dansako, M. Ikeda, Y. Ariumi, T. Wakita, and N. Kato, "Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases.," *Arch. Virol.*, vol. 154, no. 5, pp. 801–10, Jan. 2009.
- [61] Y. Liang, X. Cao, Q. Ding, Y. Zhao, Z. He, and J. Zhong, "Hepatitis C virus NS4B induces the degradation of TRIF to inhibit TLR3-mediated interferon signaling pathway," *PLoS Pathog.*, vol. 14, no. 5, May 2018.
- [62] Q. Ding *et al.*, "Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity," *J. Hepatol.*, vol. 59, no. 1, pp. 52–58, Jul. 2013.
- [63] S. Nitta *et al.*, "Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity," *Hepatology*, vol. 57, no. 1, pp. 46–58, Jan. 2013.
- [64] M.-T. Wong and S. S.-L. Chen, "Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection.," *Cell. Mol. Immunol.*, Dec. 2014.
- [65] J. G. Bode *et al.*, "IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves

- induction of suppressor of cytokine signaling-3,” *FASEB J.*, vol. 17, no. 3, pp. 488–90, Mar. 2003.
- [66] Y. Funaoka *et al.*, “Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91,” *J. Virol.*, vol. 85, no. 12, pp. 5986–94, Jun. 2011.
- [67] J. Lupberger *et al.*, “Epidermal growth factor receptor signaling impairs the antiviral activity of interferon-alpha,” *Hepatology*, vol. 58, no. 4, pp. 1225–35, Oct. 2013.
- [68] S. J. Polyak *et al.*, “Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response,” *J. Virol.*, vol. 75, no. 13, pp. 6095–106, Jul. 2001.
- [69] S. J. Polyak, K. S. Khabar, M. Rezeiq, and D. R. Gretch, “Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy,” *J. Virol.*, vol. 75, no. 13, pp. 6209–11, Jul. 2001.
- [70] A. De Maria *et al.*, “Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 2, pp. 445–455, Feb. 2007.
- [71] M. Jinushi *et al.*, “Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection,” *J. Immunol.*, vol. 173, no. 10, pp. 6072–81, Nov. 2004.
- [72] N. H. Gruener *et al.*, “Sustained Dysfunction of Antiviral CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes after Infection with Hepatitis C Virus,” *J. Virol.*, vol. 75, no. 12, pp. 5550–5558, Jun. 2001.
- [73] H. Wedemeyer *et al.*, “Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic hepatitis C virus infection,” *J. Immunol.*, vol. 169, no. 6, pp. 3447–58, Sep. 2002.
- [74] F. Lechner *et al.*, “Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus,” *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 9, pp. 1499–512, May 2000.
- [75] D. J. Kittlesen, K. A. Chianese-Bullock, Z. Q. Yao, T. J. Braciale, and Y. S. Hahn, “Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation,” *J. Clin. Invest.*, vol. 106, no. 10, pp. 1239–1249, Nov. 2000.
- [76] S. Fahey, E. Dempsey, and A. Long, “The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 25–40, Jan. 2014.
- [77] E. D. Brenndörfer *et al.*, “Hepatitis C virus non-structural 3/4A protein interferes with intrahepatic interferon- $\gamma$  production,” *Gut*, vol. 61, no. 4, pp. 589–596, Apr. 2012.

- [78] H. Radziewicz, R. M. Dunham, and A. Grakoui, "PD-1 tempers Tregs in chronic HCV infection.," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 3, pp. 450–3, Mar. 2009.
- [79] H. Radziewicz *et al.*, "Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression.," *J. Virol.*, vol. 81, no. 6, pp. 2545–53, Mar. 2007.
- [80] A. Dolganiuc *et al.*, "Viral and host factors induce macrophage activation and loss of toll-like receptor tolerance in chronic HCV infection.," *Gastroenterology*, vol. 133, no. 5, pp. 1627–36, Nov. 2007.
- [81] A. Broad, D. E. J. Jones, and J. A. Kirby, "Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological &quot;damage limitation&quot; effect and an important potential opportunity for therapy.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 13, no. 21, pp. 2487–502, 2006.
- [82] J. A. Mengshol *et al.*, "A Crucial Role for Kupffer Cell-Derived Galectin-9 in Regulation of T Cell Immunity in Hepatitis C Infection," *PLoS One*, vol. 5, no. 3, p. e9504, Mar. 2010.
- [83] M. Zimmermann, C. Flechsig, N. La Monica, M. Tripodi, G. Adler, and N. Dikopoulos, "Hepatitis C virus core protein impairs in vitro priming of specific T cell responses by dendritic cells and hepatocytes.," *J. Hepatol.*, vol. 48, no. 1, pp. 51–60, Jan. 2008.
- [84] P. Simmonds, "Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on.," *J. Gen. Virol.*, vol. 85, no. Pt 11, pp. 3173–88, Nov. 2004.
- [85] A. L. Erickson *et al.*, "The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes.," *Immunity*, vol. 15, no. 6, pp. 883–95, Dec. 2001.
- [86] S. Guglietta *et al.*, "Positive selection of cytotoxic T lymphocyte escape variants during acute hepatitis C virus infection.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, no. 9, pp. 2627–37, Sep. 2005.
- [87] L. Uebelhoer *et al.*, "Stable cytotoxic T cell escape mutation in hepatitis C virus is linked to maintenance of viral fitness.," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 9, p. e1000143, Jan. 2008.
- [88] C. Di Lorenzo, A. G. N. Angus, and A. H. Patel, "Hepatitis C virus evasion mechanisms from neutralizing antibodies.," *Viruses*, vol. 3, no. 11, pp. 2280–300, Nov. 2011.
- [89] D. Yamane, D. R. McGivern, T. Masaki, and S. M. Lemon, "Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C.," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp.

263–88, Jan. 2013.

- [90] K. J. Laing and C. J. Secombes, “Chemokines,” *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 28, no. 5, pp. 443–60, May 2004.
- [91] a Zlotnik and O. Yoshie, “Chemokines: a new classification system and their role in immunity,” *Immunity*, vol. 12, no. 2, pp. 121–7, Feb. 2000.
- [92] B. J. Rollins, “Chemokines,” *Blood*, vol. 90, no. 3, pp. 909–28, Aug. 1997.
- [93] C. Gerard and B. J. Rollins, “Chemokines and disease,” *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 2, pp. 108–15, Feb. 2001.
- [94] F. Marra and F. Tacke, “Roles for chemokines in liver disease,” *Gastroenterology*, vol. 147, no. 3, pp. 577-594.e1, Sep. 2014.
- [95] A. Brass and E. D. Brenndörfer, “The role of chemokines in hepatitis C virus-mediated liver disease,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 3, pp. 4747–79, Jan. 2014.
- [96] R. M. Strieter *et al.*, “The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 45, pp. 27348–57, Nov. 1995.
- [97] E. C. Keeley, B. Mehrad, and R. M. Strieter, “Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization,” *Exp. Cell Res.*, vol. 317, no. 5, pp. 685–90, Mar. 2011.
- [98] R. M. Devalaraja *et al.*, “Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 115, no. 2, pp. 234–44, Aug. 2000.
- [99] M. Baggiolini, A. Walz, and S. L. Kunkel, “Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils,” *J. Clin. Invest.*, vol. 84, no. 4, pp. 1045–9, Oct. 1989.
- [100] S. A. Jones, M. Wolf, S. Qin, C. R. Mackay, and M. Baggiolini, “Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 13, pp. 6682–6, Jun. 1996.
- [101] E. Hoffmann, O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht, “Multiple control of interleukin-8 gene expression,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 72, no. 5, pp. 847–855, Nov. 2002.
- [102] T. Murayama *et al.*, “Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene,” *J. Virol.*, vol. 71, no. 7, pp. 5692–5, Jul. 1997.
- [103] M. A. Fiedler, K. Wernke-Dollries, and J. M. Stark, “Respiratory syncytial virus increases IL-8 gene expression and protein release in A549 cells,” *Am. J. Physiol.*,

- vol. 269, no. 6 Pt 1, pp. L865-72, Dec. 1995.
- [104] K. S. Khabar *et al.*, “The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha.,” *J. Exp. Med.*, vol. 186, no. 7, pp. 1077–85, Oct. 1997.
- [105] Y. Hoshida *et al.*, “Hepatitis C virus core protein and hepatitis activity are associated through transactivation of interleukin-8.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 192, no. 2, pp. 266–75, Jul. 2005.
- [106] S. Girard *et al.*, “An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin-8 induced by the hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis.,” *Virology*, vol. 295, no. 2, pp. 272–283, 2002.
- [107] Y. Jia, L. Wei, D. Jiang, J. Wang, X. Cong, and R. Fei, “Antiviral action of interferon-alpha against hepatitis C virus replicon and its modulation by interferon-gamma and interleukin-8.,” *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 22, no. 8, pp. 1278–85, Aug. 2007.
- [108] B. C. A. Koo, P. McPoland, J. P. Wagoner, O. J. Kane, V. Lohmann, and S. J. Polyak, “Relationships between hepatitis C virus replication and CXCL-8 production in vitro.,” *J. Virol.*, vol. 80, no. 16, pp. 7885–93, Aug. 2006.
- [109] H. W. Zimmermann *et al.*, “Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis.,” *PLoS One*, vol. 6, no. 6, p. e21381, Jan. 2011.
- [110] R. Bonecchi *et al.*, “Induction of Functional IL-8 Receptors by IL-4 and IL-13 in Human Monocytes,” *J. Immunol.*, vol. 164, no. 7, 2000.
- [111] K. H. Tang *et al.*, “CD133(+) liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXCL1 signaling.,” *Hepatology*, vol. 55, no. 3, pp. 807–20, Mar. 2012.
- [112] A. Koch *et al.*, “Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis,” *Science (80-. )*, vol. 258, no. 5089, pp. 1798–1801, Dec. 1992.
- [113] H. Holtmann *et al.*, “Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 10, pp. 6742–53, Oct. 1999.
- [114] R. Winzen *et al.*, “The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism.,” *EMBO J.*, vol. 18, no. 18, pp. 4969–80, Sep. 1999.
- [115] Y. Zhang, L. Wang, M. Zhang, M. Jin, C. Bai, and X. Wang, “Potential mechanism of interleukin-8 production from lung cancer cells: an involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk pathway.,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 227, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2012.

- [116] J. Wagoner *et al.*, “Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection.,” *J. Virol.*, vol. 81, no. 1, pp. 309–18, Jan. 2007.
- [117] J. Green, K. S. A. Khabar, B. C. A. Koo, B. R. G. Williams, and S. J. Polyak, “Stability of CXCL-8 and related AU-rich mRNAs in the context of hepatitis C virus replication in vitro.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 193, no. 6, pp. 802–11, Mar. 2006.
- [118] J.-K. Oem *et al.*, “Hepatitis C virus non-structural protein-2 activates CXCL-8 transcription through NF- $\kappa$ B,” *Arch. Virol.*, vol. 153, no. 2, pp. 293–301, Feb. 2008.
- [119] H. Kadoya, M. Nagano-Fujii, L. Deng, N. Nakazono, and H. Hotta, “Nonstructural proteins 4A and 4B of hepatitis C virus transactivate the interleukin 8 promoter.,” *Microbiol. Immunol.*, vol. 49, no. 3, pp. 265–73, Jan. 2005.
- [120] W.-C. Chen *et al.*, “HCV NS5A Up-Regulates COX-2 Expression via IL-8-Mediated Activation of the ERK/JNK MAPK Pathway.,” *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0133264, Jan. 2015.
- [121] S. Clément, S. Pascarella, S. Conzelmann, C. Gonelle-Gispert, K. Guilloux, and F. Negro, “The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8.,” *J. Hepatol.*, vol. 52, no. 5, pp. 635–43, May 2010.
- [122] R. B. Ray *et al.*, “Distinct functional role of Hepatitis C virus core protein on NF- $\kappa$ B regulation is linked to genomic variation,” *Virus Res.*, vol. 87, no. 1, pp. 21–29, Jul. 2002.
- [123] M. Sillanpää, P. Kaukinen, K. Melén, and I. Julkunen, “Hepatitis C virus proteins interfere with the activation of chemokine gene promoters and downregulate chemokine gene expression.,” *J. Gen. Virol.*, vol. 89, no. Pt 2, pp. 432–43, Feb. 2008.
- [124] J. Boonstra, P. Rijken, B. Humbel, F. Cremers, A. Verkleij, and P. van Bergen en Henegouwen, “The epidermal growth factor.,” *Cell Biol. Int.*, vol. 19, no. 5, pp. 413–30, May 1995.
- [125] W. S. Chen *et al.*, “Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation.,” *Cell*, vol. 59, no. 1, pp. 33–43, Oct. 1989.
- [126] S. Morandell, T. Stasyk, S. Skvortsov, S. Ascher, and L. A. Huber, “Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network.,” *Proteomics*, vol. 8, no. 21, pp. 4383–401, Nov. 2008.
- [127] B. Jutten and K. Rouschop, “EGFR signaling and autophagy dependence for growth,

- survival, and therapy resistance,” *Cell Cycle*, vol. 13, no. 1, pp. 42–51, Dec. 2013.
- [128] A. Citri and Y. Yarden, “EGF-ERBB signalling: towards the systems level.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 7, pp. 505–16, Jul. 2006.
- [129] J. Schlessinger and a Ullrich, “Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases.,” *Neuron*, vol. 9, no. 3, pp. 383–91, Sep. 1992.
- [130] Y. Ito *et al.*, “Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma.,” *Br. J. Cancer*, vol. 84, no. 10, pp. 1377–83, May 2001.
- [131] Ninio *et al.*, “Hepatitis C Virus Enhances the Invasiveness of Hepatocellular Carcinoma via EGFR-Mediated Invadopodia Formation and Activation,” *Cells*, vol. 8, no. 11, p. 1395, Nov. 2019.
- [132] M. Caraglia *et al.*, “EGF activates an inducible survival response via the RAS-> Erk-1/2 pathway to counteract interferon-alpha-mediated apoptosis in epidermoid cancer cells.,” *Cell Death Differ.*, vol. 10, no. 2, pp. 218–29, Feb. 2003.
- [133] 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.*, vol. 390, no. 10, pp. 1013–32, Oct. 2009.
- [134] R. Avraham and Y. Yarden, “Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 2, pp. 104–17, Feb. 2011.
- [135] J. Mankouri, S. Griffin, and M. Harris, “The hepatitis C virus non-structural protein NS5A alters the trafficking profile of the epidermal growth factor receptor.,” *Traffic*, vol. 9, no. 9, pp. 1497–509, Sep. 2008.
- [136] Z. Igloi, A. Kazlauskas, K. Saksela, A. Macdonald, J. Mankouri, and M. Harris, “The hepatitis C virus NS5A protein blocks EGFR degradation via a proline motif dependent interaction.,” *J. Gen. Virol.*, Apr. 2015.
- [137] C. Widmann, S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson, “Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human,” *Physiol Rev*, vol. 79, no. 1, pp. 143–180, Jan. 1999.
- [138] A. G. Batzer, D. Rotin, J. M. Ureña, E. Y. Skolnik, and J. Schlessinger, “Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, no. 8, pp. 5192–201, Aug. 1994.
- [139] D. Bar-Sagi, “The Sos (Son of sevenless) protein,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 5, no. 4, pp. 165–169, May 1994.
- [140] A. B. Vojtek, S. M. Hollenberg, and J. A. Cooper, “Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf,” *Cell*, vol. 74, no. 1, pp. 205–214, Jul. 1993.

- [141] K. Seedorf, "Intracellular signaling by growth factors.," *Metabolism.*, vol. 44, no. 10 Suppl 4, pp. 24–32, Oct. 1995.
- [142] N. Fehrenbacher, D. Bar-Sagi, and M. Philips, "Ras/MAPK signaling from endomembranes.," *Mol. Oncol.*, vol. 3, no. 4, pp. 297–307, Aug. 2009.
- [143] D. N. Chadee and J. M. Kyriakis, "MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 8, pp. 770–6, Aug. 2004.
- [144] W. Kolch *et al.*, "Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation.," *Nature*, vol. 364, no. 6434, pp. 249–52, Jul. 1993.
- [145] S. Hu *et al.*, "Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling.," *Cell*, vol. 139, no. 3, pp. 610–22, Oct. 2009.
- [146] S. L. Tan *et al.*, "NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 10, pp. 5533–8, May 1999.
- [147] Y. Huang *et al.*, "Mechanistic link between the anti-HCV effect of interferon gamma and control of viral replication by a ras-MAPK signaling cascade," *Hepatology*, vol. 43, no. 1, pp. 81–90, Jan. 2006.
- [148] A. Macdonald, K. Crowder, A. Street, C. McCormick, K. Saksela, and M. Harris, "The Hepatitis C Virus Non-structural NS5A Protein Inhibits Activating Protein-1 Function by Perturbing Ras-ERK Pathway Signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 20, pp. 17775–17784, Mar. 2003.
- [149] Q. Zhang *et al.*, "Activation of the Ras/Raf/MEK pathway facilitates hepatitis C virus replication via attenuation of the interferon-JAK-STAT pathway.," *J. Virol.*, vol. 86, no. 3, pp. 1544–54, Mar. 2012.
- [150] A. Macdonald, J. K. Y. Chan, and M. Harris, "Perturbation of epidermal growth factor receptor complex formation and Ras signalling in cells harbouring the hepatitis C virus subgenomic replicon.," *J. Gen. Virol.*, vol. 86, no. Pt 4, pp. 1027–33, Apr. 2005.
- [151] S. Gretton, M. Hughes, and M. Harris, "Hepatitis C virus RNA replication is regulated by Ras-Erk signalling.," *J. Gen. Virol.*, vol. 91, no. Pt 3, pp. 671–80, Mar. 2010.
- [152] S. Giambartolomei, F. Covone, M. Levrero, and C. Balsano, "Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein.," *Oncogene*, vol. 20, no. 20, pp. 2606–10, May 2001.
- [153] S. Kim *et al.*, "Contrasting roles of mitogen-activated protein kinases in cellular entry

- and replication of hepatitis C virus: MKNK1 facilitates cell entry.," *J. Virol.*, vol. 87, no. 8, pp. 4214–24, Apr. 2013.
- [154] K. J. Schmitz *et al.*, "Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection.," *J. Hepatol.*, vol. 48, no. 1, pp. 83–90, Jan. 2008.
- [155] A. Plotnikov, E. Zehorai, S. Procaccia, and R. Seger, "The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 9, pp. 1619–1633, 2011.
- [156] A. S. L. Chan and Y. H. Wong, "Epidermal growth factor differentially augments G i-mediated stimulation of c-Jun N-terminal kinase activity," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 142, no. 4, pp. 635–646, Jun. 2004.
- [157] Y. Li *et al.*, "Hepatitis C virus activates Bcl-2 and MMP-2 expression through multiple cellular signaling pathways.," *J. Virol.*, vol. 86, no. 23, pp. 12531–43, Dec. 2012.
- [158] J. Rouse *et al.*, "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.," *Cell*, vol. 78, no. 6, pp. 1027–37, Sep. 1994.
- [159] M. M. McLaughlin *et al.*, "Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 14, pp. 8488–92, Apr. 1996.
- [160] J. G. Bode *et al.*, "The MKK6/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Capable of Inducing SOCS3 Gene Expression and Inhibits IL-6-Induced Transcription," *Biol. Chem.*, vol. 382, no. 10, pp. 1447–53, Jan. 2001.
- [161] S.-F. He, W. Wang, H. Ren, L.-J. Zhao, and Z.-T. Qi, "Interferon alpha and ribavirin collaboratively regulate p38 mitogen-activated protein kinase signaling in hepatoma cells.," *Cytokine*, vol. 61, no. 3, pp. 801–7, Mar. 2013.
- [162] Y. Amako *et al.*, "Hepatitis C virus NS5A inhibits mixed lineage kinase 3 to block apoptosis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 34, pp. 24753–63, Aug. 2013.
- [163] H. Ishida *et al.*, "Involvement of p38 signaling pathway in interferon-alpha-mediated antiviral activity toward hepatitis C virus.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 321, no. 3, pp. 722–7, Aug. 2004.
- [164] A. Neininger *et al.*, "MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 5, pp. 3065–8, Feb. 2002.

- [165] J. P. Moorman, S. M. Fitzgerald, D. C. Prayther, S. A. Lee, D. S. Chi, and G. Krishnaswamy, "Induction of p38- and gC1qR-dependent IL-8 expression in pulmonary fibroblasts by soluble hepatitis C core protein.," *Respir. Res.*, vol. 6, p. 105, Jan. 2005.
- [166] G. A. Rodrigues, M. Falasca, Z. Zhang, S. H. Ong, and J. Schlessinger, "A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 4, pp. 1448–59, Mar. 2000.
- [167] T. F. Franke, D. R. Kaplan, and L. C. Cantley, "PI3K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis," *Cell*, vol. 88, no. 4, pp. 435–437, Feb. 1997.
- [168] M. Katz, I. Amit, and Y. Yarden, "Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, no. 8, pp. 1161–76, Aug. 2007.
- [169] J. Feng, J. Park, P. Cron, D. Hess, and B. A. Hemmings, "Identification of a PKB/Akt Hydrophobic Motif Ser-473 Kinase as DNA-dependent Protein Kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 39, pp. 41189–41196, Sep. 2004.
- [170] D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, and D. M. Sabatini, "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.," *Science*, vol. 307, no. 5712, pp. 1098–101, Feb. 2005.
- [171] R. Meier and B. A. Hemmings, "Regulation of protein kinase B.," *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, vol. 19, no. 1–4, pp. 121–8, Jan. .
- [172] A. Street, A. Macdonald, K. Crowder, and M. Harris, "The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 13, pp. 12232–41, Mar. 2004.
- [173] Y. He *et al.*, "Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase.," *J. Virol.*, vol. 76, no. 18, pp. 9207–17, Sep. 2002.
- [174] C.-Y. Park, H.-J. Jun, T. Wakita, J. H. Cheong, and S. B. Hwang, "Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 14, pp. 9237–46, Apr. 2009.
- [175] J. L. Oliva, E. M. Griner, and M. G. Kazanietz, "PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors.," *Growth Factors*, vol. 23, no. 4, pp. 245–252, 2005.
- [176] P. Hartjen *et al.*, "The NTPase/helicase domain of hepatitis C virus nonstructural

- protein 3 inhibits protein kinase C independently of its NTPase activity.," *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 18, no. 3, pp. 447–58, Sep. 2013.
- [177] S. Inubushi *et al.*, "Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein tyrosine kinase Syk.," *J. Gen. Virol.*, vol. 89, no. Pt 5, pp. 1231–42, May 2008.
- [178] R. Reinehr and D. Häussinger, "Epidermal growth factor receptor signaling in liver cell proliferation and apoptosis.," *Biol. Chem.*, vol. 390, no. 10, pp. 1033–7, Oct. 2009.
- [179] T. Tiganis, A. M. Bennett, K. S. Ravichandran, and N. K. Tonks, "Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 3, pp. 1622–34, Mar. 1998.
- [180] T. Tiganis, B. E. Kemp, and N. K. Tonks, "The protein-tyrosine phosphatase TCPTP regulates epidermal growth factor receptor-mediated and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 39, pp. 27768–75, Sep. 1999.
- [181] K. Sato *et al.*, "Adaptor protein Shc undergoes translocation and mediates up-regulation of the tyrosine kinase c-Src in EGF-stimulated A431 cells.," *Genes Cells*, vol. 5, no. 9, pp. 749–64, Sep. 2000.
- [182] E. Mattila, T. Pellinen, J. Nevo, K. Vuoriluoto, A. Arjonen, and J. Ivaska, "Negative regulation of EGFR signalling through integrin- $\alpha$ 1 $\beta$ 1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 78–85, Jan. 2005.
- [183] E. D. Brenndörfer, A. Brass, J. Karthe, G. Ahlén, J. G. Bode, and M. Sällberg, "Cleavage of the T cell protein tyrosine phosphatase by the hepatitis C virus nonstructural 3/4A protease induces a Th1 to Th2 shift reversible by ribavirin therapy.," *J. Immunol.*, vol. 192, no. 4, pp. 1671–80, Feb. 2014.
- [184] ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, "User Bulletin # 2," 1997. [Online]. Available: <http://hcg.unh.edu/protocol/realtime/UserBulletin2.pdf>.
- [185] C. Groepper *et al.*, "HCV modifies EGF signalling and upregulates production of CXCR2 ligands: Role in inflammation and antiviral immune response.," *J. Hepatol.*, vol. 69, no. 3, pp. 594–602, Sep. 2018.
- [186] M. Rojas, S. Yao, and Y. Z. Lin, "Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 44, pp. 27456–61, Nov. 1996.

- [187] H. Nakamura, H. Aoki, O. Hino, and M. Moriyama, "HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt," *Hepatol. Res.*, vol. 41, no. 5, pp. 455–462, May 2011.
- [188] M. Cargnello and P. P. Roux, "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 75, no. 1, pp. 50–83, Mar. 2011.
- [189] A. Arcaro and M. P. Wymann, "Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses," *Biochem. J.*, vol. 296, no. 2, pp. 297–301, Dec. 1993.
- [190] P. Anatol, F. Robert, and P. Danuta, "Effect of interferon alpha2b plus ribavirin treatment on selected growth factors in respect to inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C," *World J. Gastroenterol.*, vol. 11, no. 12, p. 1854, Mar. 2005.
- [191] E. Larrea, N. Garcia, C. Qian, M. P. Civeira, and J. Prieto, "Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C.," *Hepatology*, vol. 23, no. 2, pp. 210–7, Feb. 1996.
- [192] E. D. Brenndörfer *et al.*, "Anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  treatment promotes apoptosis and prevents liver regeneration in a transgenic mouse model of chronic hepatitis C.," *Hepatology*, vol. 52, no. 5, pp. 1553–63, Nov. 2010.
- [193] A. Alhethel, A. Albarrag, Z. Shakoor, K. Alswat, A. Abdo, and W. Al-Hamoudi, "Assessment of pro-inflammatory cytokines in sera of patients with hepatitis C virus infection before and after anti-viral therapy," *J. Infect. Dev. Ctries.*, vol. 10, no. 10, pp. 1093–1098, Oct. 2016.
- [194] K. Shimoda *et al.*, "Interleukin-8 and hIRH (SDF1- $\alpha$ /PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C," *Hepatology*, vol. 28, no. 1, pp. 108–115, Jul. 1998.

# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, ohne die diese Dissertation nicht zu Stande gekommen wäre.

Allen voran danke ich ganz herzlich Prof. Dr. Johannes Bode, der diese Arbeit über eine lange Zeit unermüdlich betreut, mich stets unterstützt und mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffnet hat. Ich bedanke mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit an einer so spannenden Thematik arbeiten zu können.

Weiterhin gilt mein Dank PD Dr. Julia Reifenberger für die Bereitschaft meine Promotion als Zweitgutachterin und PD Dr. Heike Hermanns für die Bereitschaft meine Promotion als Drittgutachterin zu betreuen.

Bei dem ehemaligen Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Herrn Prof. Dr. Häussinger bedanke ich mich für die Möglichkeit, die experimentelle Arbeiten in der von Ihm geleiteten Klinik durchführen zu können. Weiterhin bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung durch das integrierte Graduiertenkolleg zum Sonderforschungsbereich 974 sowie für die wissenschaftliche Ausbildung durch die Mitglieder und insbesondere der Leitung des Kollegs, Prof. Dr. Verena Keitel und Prof. Dr. Holger Gohlke.

Herrn Prof. Dr. Ralf Bartenschlager danke ich für die Bereitstellung der unterschiedlichen HCV Zellkulturmodelle.

Ein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie und insbesondere der AG Bode für die gute Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Dr. Sabine Stindt, Dr. Christian Ehling, Dr. Ute Albrecht, Dr. Sanaz Spitzley und Maike Talajlo für die Einarbeitung und die hilfreichen Anregungen und Tipps bei der Durchführung der experimentellen Arbeit. Die stets gute und kollegiale Stimmung in der Arbeitsgruppe wird mir immer in guter Erinnerung bleiben. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Dr. Sabine Stindt und Dr. Ute Albrecht für die mehrfache und kritische Durchsicht dieser Dissertation und die konstruktiven Anmerkungen. Dr. Christina Gröpper und Dr. Kerstin Rufinatscha möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei der Veröffentlichung ihrer und meiner wissenschaftlich erarbeiteten Ergebnisse danken.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinen Eltern, Swetlana und Waldemar Triller, für die umsichtige und unermüdliche Unterstützung in allen Lebenslagen, die vielen Schwierigkeiten die sie auf sich genommen haben, um mir meinen bisherigen Lebensweg einschließlich dem Medizinstudium und der Grundlage zu dieser Arbeit zu ermöglichen.

Meiner Schwester und besten Freundin Elena Schmidt möchte ich mich für das stets offene Ohr zu jeder Tages- und Nachtzeit und tatkräftige Unterstützung bedanken. Danke, dass Du mich immer verstehst!

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Andreas Schröder, der mich in allen Lebenslagen und mit allen ihm zur Verfügung stehenden Mitteln unterstützt. Ich danke für die langen und ausdauernden Diskussionen und die unermüdliche Motivation. Für die Geduld die Du mir entgegengebracht hast, für die vielen Stunden die Du bei mir warst, während ich die RT-PCR bis in die späte Nacht durchgeführt oder an der Doktorarbeit geschrieben habe, für die Durchsicht aller meiner geschriebenen Texte, und für die Versorgung unseres Sohnes, während ich diese Arbeit zu Ende schrieb, danke ich sehr. Dir widme ich diese Arbeit.