

**Untersuchung des Einflusses des
Nicht-Strukturproteins 5A des Hepatitis C Virus
auf Zellwachstum, Apoptose und Karzinogenese
in vitro und *in vivo***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



Vorgelegt von

Malte Kriegs

aus Korbach

Februar 2007

ROBERT KOCH INSTITUT



UNIVERSITÄTS
FREIBURG KLINIKUM



Die Arbeit wurde unter der Betreuung von Dr. Eberhard Hildt angefertigt. Die experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit vom April 2004 bis Dezember 2005 am Robert Koch Institut in Berlin (AG Hildt), vom Januar bis Februar 2006 an der Universitätsklinik Freiburg (AG Hildt) und vom März bis Dezember 2006 am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg (Abteilung 2) durchgeführt.

Teile der Arbeiten wurden bereits veröffentlicht:

T. Burckstummer*, M. Kriegs*, et al. (2006). "Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication." FEBS Lett 580(2): 575-80.

*Koautorenschaft

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Will
2. Gutachter: Prof. Dr. Multhaup

Disputation am 05.06.2007

Meiner Familie und Theresa.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I-IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 HCV	1
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE, ERKRANKUNG UND THERAPIE	1
1.1.2 INFEKTIONSVERLAUF / IMMUNANTWORT	3
1.1.3 HCV: AUFBAU UND STRUKTUR	6
1.2 NS5A	7
1.2.1 STRUKTUR / PHOSPHORYLIERUNG / REPLIKATION / LOKALISATION	7
1.2.2 EINFLUSS VON NS5A AUF DIE WIRTSZELLE	9
1.2.3 HCV/NS5A UND APOPTOSE	16
1.3 APOPTOSE	18
1.3.1 APOPTOSE ALLGEMEIN	18
1.3.2 MITOCHONDRIALE APOPTOSE	20
1.3.3 REZEPTORVERMITTELTE APOPTOSE	20
1.3.4 MERKMALE DER APOPTOSE	25
1.4 MODELLSYSTEME	26
1.4.1 ZELLEN	26
1.4.2 DAS HCV-REPLICON-SYSTEM	28
1.4.3 DAS TRANSGENE MAUSMODELL FÜR HCV	30
2 ZIELSETZUNG	32
2.1 EINFLUSS VON HCV-NICHT-STRUKTURPROTEINEN AUF DIE REZEPTOR-VERMITTELTE APOPTOSE	32
2.2 BEEINFLUSSUNG DES MAP-KINASESIGNALWEGES DURCH NS5A AUF DER EBENE VON RAF-132	
2.3 ANALYSE EINER NS5A-TRANSGENEN MAUS ALS MODELL FÜR HCV-ASSOZIIERTE PATHOLOGIEEN DER LEBER	32
3 MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 MATERIAL	33
3.1.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMITTEL	33
3.1.2 ENZYME	35
3.1.3 ANTIKÖRPER	35
3.1.4 MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	36
3.1.5 LÄNGENSTANDARDS	36
3.1.6 ZYTOKINE UND INHIBITOREN	36
3.1.7 VERWENDETE KITS UND ARRAYS	37
3.1.8 PLASMIDE	37
3.1.9 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE UND SEQUENZIERMIX	38
3.1.10 GERÄTE	38
3.1.11 ZELLINIEN UND BAKTERIENSTÄMME	39
3.1.12 MÄUSE	39
3.1.13 PUFFER UND MEDIEN	40

Inhaltsverzeichnis

3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	42
3.2.1 KULTIVIERUNG, KONSERVIERUNG UND ZELLERNTTE VON BAKTERIEN	42
3.2.2 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	42
3.2.3 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN	43
3.2.4 GELELEKTROPHORESE VON DNA	43
3.2.5 PRÄPARATIVE AGAROSEGELELEKTROPHORESE UND DNA-REINIGUNG	43
3.2.6 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUCLEINSÄUREN	44
3.2.7 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	44
3.2.8 RESTRIKTION VON DNA	45
3.2.9 DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA (CIPEN)	45
3.2.10 DNA-LIGATION	45
3.2.11 TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN	46
3.2.12 CHARAKTERISIERUNG REKOMBINANTER KLONE	46
3.2.13 SEQUENZIERUNG VON DNA	46
3.2.14 RNA-ISOLATION AUS SÄUGERZELLEN, cDNA-SYNTHESE UND GEN-EXPRESSIONSANALYSE	47
3.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	50
3.3.1 KULTIVIEREN UND PASSAGIEREN VON SÄUGERZELLEN	50
3.3.2 TRANSFEKTION VON SÄUGERZELLEN	50
3.3.3 AUFSCHLUSS VON SÄUGERZELLEN UND GEWINNUNG LÖSLICHER PROTEINE	51
3.3.4 BEHANDLUNG VON HUH7 ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN SUBSTANZEN	51
3.3.5 INDUKTION VON APOPTOSE IN HUH7 UND REPLICON ZELLEN	52
3.3.6 KURIEREN VON REPLICON ZELLEN	52
3.4 PROTEINCHEMISCHE METHODEN	52
3.4.1 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	52
3.4.2 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	53
3.4.3 STERILFILTRATION	54
3.4.4 BESTIMMUNG DER LUCIFERASEAKTIVITÄT IN REPLICONZELLEN (REPORTERGENASSAY)	54
3.5 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	54
3.5.1 INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ	54
3.5.2 WESTERN BLOT	55
3.5.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS, FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING)	56
3.5.4 FÄRBUNG FÜR FACS-ANALYSE	57
3.6 METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG NS5A-TRANSGENER MÄUSE	58
3.6.1 GEWINNUNG CHROMOSOMALER DNA AUS MAUSSCHWÄNZEN UND GENOTYPISIERUNGS-PCR	59
3.6.2 SERUMGEWINNUNG VON MÄUSEN	60
3.6.3 MESSUNG VON GTP	60
3.6.4 GEWINNUNG VON ORGANEN	60
3.6.5 PRÄPARATION VON ORGANLYSATEN	61
3.6.6 BESTRAHLUNG VON MÄUSEN	61
3.6.7 HISTOLOGISCHE METHODEN	61
3.6.8 GENEXPRESSIONSANALYSE (TRANSKRIPTOM ANALYSE; MICROARRAY)	62
3.6.9 ZWEIDIMENSIONALE-GELELEKTROPHORESE (PROTEOMANALYSE)	63
3.6.10 LCMV-INFEKTION VON MÄUSEN UND TITERBESTIMMUNG	64
4 ERGEBNISSE	66
4.1 EINFLUSS VON HCV-NICHT-STRUKTURPROTEINEN AUF DIE REZEPTOR-VERMITTELTE APOPTOSE	66
4.1.1 DETEKTION UND INDUKTION VON TNF α -VERMITTELTER APOPTOSE	66
4.1.2 UNTERSCHIEDLICHES VERHALTEN VON REPLICON-ZELLEN HINSICHTLICH REZEPTORVERMITTELTER APOPTOSE	68
4.1.3 ENTFERNUNG DER HCV-REPLICON-RNA AUS DEN REPLICON-ZELLEN MIT HILFE VON IFN α	71
4.1.4 EINFLUSS DES HUH9-13-REPLICONS AUF REZEPTORVERMITTELTE APOPTOSE	72

Inhaltsverzeichnis

4.1.5 HCV-REPLICON-KONSTRUKTE HABEN KEINEN EINFLUSS AUF MITOCHONDRIAL-VERMITTELTE APOPTOSE	79
4.1.6 UNTERSCHIEDLICHE GENEXPRESSION IN HU9-13 UND HUH ET ZELLEN NACH TNF α -BEHANDLUNG	84
4.2 BEEINFLUSSUNG DES MAP-KINASESIGNALWEGES DURCH NS5A AUF DER EBENE VON RAF-1	87
4.2.1 EXPRESSION VON NS5A STEIGERT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON RAF-1 AN SERIN 338	87
4.2.2 NS5A FÜHRT NICHT ZU EINER ERHÖHTEN PHOSPHORYLIERUNG VON MEK1/2 AN SERIN 217/221	89
4.2.3 DIE AMINOSÄUREN 302-449 VON NS5A SIND AUSREICHEND FÜR DIE RAF-1-AKTIVIERUNG	90
4.2.4 DIE NS5A-VERMITTELTE AKTIVIERUNG VON RAF-1 IST UNABHÄNGIG VON DER PROTEINKINASE C	93
4.3 ANALYSE EINER NS5A-TRANSGENEN MAUS ALS MODELL FÜR HCV-ASSOZIIERTE PATHOLOGIEEN DER LEBER	97
4.3.1 EXPRESSION VON NS5A IN TRANSGENEN MÄUSEN	98
4.3.2 LEBERSPEZIFISCHE UND STABILE NS5A-EXPRESSION IN TRANSGENEN MÄUSEN	100
4.3.3 NS5A VERURSACHT KEINE PATHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN IN DEN LEBERN TRANSGENER MÄUSE	101
4.3.4 NS5A ZEIGT KEINE TUMORPROMOTOR-EIGENSCHAFTEN NACH BESTRAHLUNGS-EREIGNISSEN	104
4.3.5 NS5A-BEDINGTE ÄNDERUNG DER GENEXPRESSION IN LEBERZELLEN	109
4.3.6 NS5A-BEDINGTE VERÄNDERUNG DES PROTEINEXPRESSIONSMUSTERS IN LEBERZELLEN	111
4.3.7 NS5A INTERFERIERT MIT ANTIVIRALEN MECHANISMEN IN TRANSGENEN MÄUSEN	112
5 DISKUSSION	116
5.1 EINFLUSS VON HCV-NICHT-STRUKTURPROTEINEN AUF DIE REZEPTOR-VERMITTELTE APOPTOSE	116
5.1.1 DETEKTION UND INDUKTION VON TNF α -VERMITTELTER APOPTOSE	116
5.1.2 UNTERSCHIEDLICHES VERHALTEN VERSCHIEDENER REPLICON-ZELLINIEN HINSICHTLICH REZEPTORVERMITTELTER APOPTOSE	117
5.1.3 ENTFERNUNG DER HCV-REPLICON-RNA AUS DEN REPLICON-ZELLEN MIT HILFE VON IFN α	117
5.1.4 EINFLUSS DES HUH9-13-REPLICONS AUF REZEPTORVERMITTELTE APOPTOSE	119
5.1.5 HCV-REPLICON-KONSTRUKTE HABEN KEINEN EINFLUSS AUF MITOCHONDRIAL-VERMITTELTE APOPTOSE	120
5.1.6 UNTERSCHIEDLICHE GENEXPRESSION IN HU9-13 UND HUH ET ZELLEN NACH TNF α -BEHANDLUNG	122
5.1.7 ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNGEN UND AUSBLICK	124
5.2 BEEINFLUSSUNG DES MAP-KINASESIGNALWEGES DURCH NS5A AUF DER EBENE VON RAF-1	129
5.2.1 EXPRESSION VON NS5A STEIGERT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON RAF-1 AN SERIN 338	129
5.2.2 NS5A FÜHRT NICHT ZU EINER ERHÖHTEN PHOSPHORYLIERUNG VON MEK1/2 AN SERIN 217/221	130
5.2.3 DIE AMINOSÄUREN 302-449 VON NS5A SIND AUSREICHEND FÜR DIE RAF-1-AKTIVIERUNG	131
5.2.4 DIE NS5A-VERMITTELTE AKTIVIERUNG VON RAF-1 IST UNABHÄNGIG VON DER PROTEINKINASE C	133
5.2.5 ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNGEN UND AUSBLICK	135
5.3 ANALYSE EINER NS5A-TRANSGENEN MAUS ALS MODELL FÜR HCV-ASSOZIIERTE PATHOLOGIEEN DER LEBER	138
5.3.1 EXPRESSION VON NS5A IN TRANSGENEN MÄUSEN	138
5.3.2 LEBERSPEZIFISCHE UND STABILE NS5A-EXPRESSION IN TRANSGENEN MÄUSEN	140
5.3.3 NS5A VERURSACHT KEINE PATHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN IN DEN LEBERN TRANSGENER MÄUSE	140

Inhaltsverzeichnis

5.3.4 NS5A ZEIGT KEINE TUMORPROMOTOR-EIGENSCHAFTEN NACH BESTRAHLUNGS-EREIGNISSEN	141
5.3.5 NS5A-BEDINGTE ÄNDERUNG DER GENEXPRESSION IN LEBERZELLEN	143
5.3.6 NS5A-BEDINGTE VERÄNDERUNG DES PROTEINEXPRESSIONSMUSTERS IN LEBERZELLEN	145
5.3.7 NS5A INTERFERIERT MIT ANTIVIRALEN MECHANISMEN IN TRANSGENEN MÄUSEN	146
5.3.8 ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNGEN UND AUSBLICK	149
5.4. ARBEITSHYPOTHESE	152
6 ZUSAMMENFASSUNG	154
7 SUMMARY	156
8 LITERATUR	158
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
CURRICULUM VITAE	XII
PUBLIKATIONEN	XII
KONGRESSTEILNAHMEN	XIII
VORTRÄGE	XIII
POSTERPRÄSENTATIONEN	XIII
DANKSAGUNG	XIV-XV