

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: HCV-Infektionen weltweit (<i>World Health Organisation</i> ; 2000).	1
Abbildung 2.: HCV und HCC-Entstehung.	2
Abbildung 3: Typischer Verlauf einer HCV-Infektion.	4
Abbildung 4: HCV-Genom, Translation und proteolytische Spaltung.	7
Abbildung 5: NS5A-Graphik.	9
Abbildung 6: Schlüsselereignisse desRaf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinasesignalweges.	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der für diese Arbeit wichtigen Ereignisse der rezeptorvermittelten und mitochondrialen Apoptose.	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Replicon-Modells.	28
Abbildung 9: Replicon-Konstrukte der Zelllinien huh9-13 und huh ET.	29
Abbildung 10: Induktion von TNF α -vermittelter Apoptose in huh7, huh9-13 und huh ET Zellen.	67
Abbildung 11: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen bezüglich TNF α -vermittelter Apoptose.	69
Abbildung 12: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen bezüglich TRAIL-vermittelter Apoptose.	70
Abbildung 13: Eliminierung des HCV-Replicons aus huh9-13 und huh ET Zellen mittels Interferon α .	72
Abbildung 14: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen mit und ohne Replicon bezüglich TNF α -vermittelter Apoptose.	75
Abbildung 15: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen mit und ohne Replicon bezüglich TRAIL-vermittelter Apoptose.	78
Abbildung 16: Induktion mitochondrialer Apoptose in huh7 Zellen durch Etoposide und CHx.	79
Abbildung 17: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen mit und ohne Replicon bezüglich Etoposide-vermittelter Apoptose.	81
Abbildung 18: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen mit und ohne Replicon bezüglich Actinomycin D-vermittelter Apoptose.	83
Abbildung 19: Unterschiede in der Genexpression von für die Apoptose relevanter Gene in huh9-13 und huh ET Zellen nach TNF α -Stimulation.	84
Abbildung 20: NS5A-Expression in huh7 Zellen verursacht gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung.	88
Abbildung 21: Gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung in HCV-Replicon-Zellen im Vergleich zu huh7 Zellen.	89
Abbildung 22: Eine durch NS5A gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung führt nicht zu einer gesteigerten MEK1/2-Phosphorylierung.	90
Abbildung 23: NS5A-Expressionskonstrukte zur Eingrenzung der für die gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung verantwortlichen Domäne, ihre Expression und Lokalisation.	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 24: Abhängigkeit der Raf-1-Phosphorylierung von verschiedenen N-terminalen NS5A-Deletionskonstrukten.	93
Abbildung 25: Funktionalität verschiedener Inhibitionsmechanismen für den Raf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinaseweg.	94
Abbildung 26: Einfluss verschiedener Inhibitionsmechanismen für den Raf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinaseweg auf die NS5A-vermittelte Raf-1-Phosphorylierung.	95
Abbildung 27: Leberspezifische DNA-Expressionskassette für His-NS5A-V5.	97
Abbildung 28: Nachweis von NS5A in transgenen Mäusen auf DNA- und Protein-Ebene.	98
Abbildung 29: Expressionsvergleich von NS5A in verschiedenen <i>founder</i> -Linien.	99
Abbildung 30: Nachweis von NS5A mittels Immunfluoreszenzfärbung.	100
Abbildung 31: Leberspezifische NS5A-Expression.	100
Abbildung 32: Nachweis von NS5A in Mäusen verschiedenen Alters.	101
Abbildung 33: Histologische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren.	102
Abbildung 34: Histologische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren.	103
Abbildung 35: PCNA-Expression in den Lebern von transgenen und nicht transgenen Mäusen.	104
Abbildung 36: Mittlere GPT-Aktivität in Seren von transgenen und WT-Mäusen.	105
Abbildung 37: Histologische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren 6 Monate nach Bestrahlung.	106
Abbildung 38: Histologische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren 2 Monate nach Bestrahlung.	107
Abbildung 39: Histochemische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren nach Bestrahlung.	108
Abbildung 40: Zusammenfassung und Zuordnung der durch das Transgen beeinflussten Gene.	111
Abbildung 41: Unterschiede in der Proteinexpression, untersucht mit 2-D-Gel-Analysen von Leberlysaten.	112
Abbildung 42: NS5A interferiert mit antiviralen Mechanismen in transgenen Mäusen.	113
Abbildung 43: NS5A inhibiert die Expression IFN-abhängiger antiviraler Gene.	115
Abbildung 44: Arbeitshypothese zum Einfluss der NS5A-vermittelten Raf-1-Phosphorylierung im Zusammenhang mit einer HCV-Infektion.	152

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper	35
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper	36
Tabelle 3: Plasmide und Vektoren	37
Tabelle 4: Primer für PCR	38
Tabelle 5: Primer für die Sequenzanalyse	38
Tabelle 6: Plasmidmenge pro Transfektionsansatz	51
Tabelle 7: Nach TNF α -Behandlung unterschiedlich regulierte Gene in huh 9-13 und huh ET Zellen unter Verwendung eines Membranen-Arrays.	85
Tabelle 8: Häufigkeit spontaner Tumore bei NS5A transgenen (trg) und nicht transgenen (wt) Mäusen.	102
Tabelle 9: Tumorfrequenzen bei NS5A-transgenen und nicht	105
Tabelle 10: Für histochemische Untersuchungen verwendete Lectine, ihre Zuckerspezifität und Resultat der Färbung.	108
Tabelle 11: Verstärkt exprimierte Gene in NS5A-transgenen Mäusen.	109
Tabelle 12: Vermindert exprimierte Gene in NS5A-transgenen Mäusen.	110

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

2',5'-OAS	2',5'-Oligoadenylat-Synthase	c-Myc	<i>phosphatase</i> <i>cellulare myelocytomatosis viral oncogene</i>
6xHis	hexa-Histidin Peptid	CMGC-Kinasen-Famile	CDK, MAPK, Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK3), Kasein Kinase (casein
A	Absorption (dimensionslos)	CMV	Cytomegalovirus
Abb.	Abbildung	Con1	Consensussequenz 1
Act.D	Actinomycin D	C-Terminus	Carboxyterminus
Ak, Ab	Antikörper, <i>antibody</i>	CTL	<i>cytotoxic T cells</i>
Akt	Protein Kinase B (PKB)	CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Akt	Aktivität	Cy3	Indocarbocyanin
ALT	Alanin-Aminotransferase	Da	Dalton
AMP	Adenosin-5-monophosphat	DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phylindol
AP	alkalische Phosphatase	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
AP-1	Aktivaor-Protein 1	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor</i>	DD	<i>death domain</i>
APS	Ammoniumpersulfat	DED	<i>death effector domain</i> oder <i>caspase recruitment domain</i>
AS	Aminosäure	DEPC	Diethylpyrocarbonat
ASK-1	<i>apoptosis signal regulating kinase 1</i>	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
ATP	Adenosin-5-triphosphat	DIABLO	<i>direct IAP binding protein with low pI (Smac)</i>
BAD	<i>Bcl-2 antagonist of cell death protein</i>	DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>	DMEM	<i>DULBECCOs modified EAGLE Medium</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X Protein</i>	DMF	Dimethylformamid
BAY43-9006	Raf-Kinase Inhibitor II (Bayer)	DMSO	Dimethylsulfoxid
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma/leukemia-2</i>	DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
BH-Domäne	<i>Bcl-2 homology domain</i>	DNAse	Deoxyribonuclease
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
Bisacrylamid	N,N'-Methylen-bisacrylamid	DR4	<i>death receptor 4 (TRAIL-R1)</i>
bp, Bp	Basenpaare, <i>base pairs</i>	DR5	<i>death receptor 5 (TRAIL-R2)</i>
BPB	Bromphenolblau	DTT	1, 4-Dithiothreitol
BSA	Bovines (Rinder) Serum Albumin	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
cAMP	<i>cyclic AMP</i>	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Caspase	<i>cysteine aspartic acid specific protease</i>	E1/E2	<i>HCV envelop protein 1/2</i>
CD4/8	<i>Cluster of differentiation marker 4/8</i>	E1B 19kDa	humanes Adenovirus-Protein
CdK	Cyclin abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)	EB	Elutions-Puffer
cDNA	Complementäre DNA	ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
CHx	Cyclohexemid	ECMV	Encephalomyocaditis Virus
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdatm (<i>calf intestinal</i>		

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	HEPES	N'-2- Hydroxyethylpiperazin-2- ethansulfonsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	HepG2	Humane hepatoma Zelllinie
EGFP	verändertes Grün fluoreszierendes Protein	HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
eIF2	Eukaryontischer Initiations- Factor 2	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum	Hsp	Hitze-Shock-Protein
ERK	Extrazellulär- Signal regulierte Kinase	huh-7	humane hepatoma Zelllinie 7
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>	hVAP-33	<i>human vesicle-associated membrane protein- associated protein of 33 kDa</i>
FADD	<i>fas-associating death domain protein</i>	IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
Fas	Apo1	IF	Immunfluoreszenz
FasL	Fas Ligand (=Apo1L)	IFN- α/γ	Interferon-alpha/gamma
FCS	<i>foreward scatter</i>	Ig	Immunglobulin
FCS, FKS	Fötales Kälberserum	IgG	Immunglobulin G
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	IKK	I κ B Kinase-Komplex
FL	Fluoreszenz	IKK $\alpha, \beta,$	I κ B Kinase α, β
FLICE	<i>FADD-like ICE (Caspase 8)</i>	IKK γ	I κ B Kinase γ
FLIP	FLICE inhibierendes Protein	IL	Interleukin
FVB/N	Mausstamm mit Fv-1b Allel (Friend leukemia virus)	IP	Immunpräzipitation
G ₂ /M	Gap (Lücke) 2/Mitose Phase	IP	Isoelektrischer Punkt
GCK	<i>germinal center kinase</i>	IPTG	Isopropyl-beta- Thiogalactopyranosid
Gö 6976	PKC-Inhibitor	IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
G-Protein	<i>guanine nucleotide binding proteins</i>	ISDR	<i>interferon-sensivity determining region</i>
GPT	Glutamat-Pyruvat Transaminase	I κ B	<i>inhibitor of kappa B</i>
Grb2	<i>growth factor receptor- bound protein 2</i>	Jak	Janus Kinase
GTP/GDP	Guanosin-5'- triphosphat/diphosphat	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
H/E	Hämatoxylin/Eosin	kDa	Kilo-Dalton
HBc	HBV Core-Protein	LB	Luria-Bertani (Bakterien- Medium)
HBV	Hepatitis B Virus	LCMV	Lymphozytäres Choriomenigitis Virus
HBx	HBV X-Protein	LHBs	HBV L-Protein (<i>small</i>)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (<i>hepatocellular carcinoma</i>)	LMP-1	<i>latent membrane protein 1</i>
HCV	Hepatitis C Virus	LMW	<i>large molecular weight</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney cell line</i>	LPS	Lipopolysaccharid
HeLa	Henrietta Lacks, humane Zervikale Kebszelllinie	Luc	Luciferase
Hep3B	humane Hepatokarzinom- Zelllinie 3B	MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
		MEK	MAPK/ERK Kinase
		MEKK1	MAPK/ERK Kinase 1
		MHBS	Middle Hepatitis B Surface Protein

Abkürzungsverzeichnis

MHC-I	<i>major histocompatibility complex class I</i>	PDGF	<i>plated derived growth factor</i>
Mm-1	<i>C-myc-binding protein; prefoldin subunit 5</i>	PFA	<i>phosphonofornic acid</i>
moi	<i>multiplicity of infection</i>	Pi	anorganisches Phosphat
MOPS	3-N-(Morpholino) Propansulfonsäure	PI	Propidiumiodid
mRNA	Boten (<i>massanger</i>)	PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
NaAc.	Natriumazetat	PKC	Proteinkinase C
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-dinucleotid (oxidiert)	PKR	RNA-aktivierte Protein Kinase (Protein kinase R)
NaPB	Natrium-Phenylbutyrat	PMA	<i>phobol-12-myesrat-13-acetat</i>
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>	PMSF	Phenylmethan-sulfonylfluorid
NFκB	Nukleärer Faktor κB	Pol.	Polymerase
NIH 3T3	murine embryonale Fibroblasten	PPi	Pyrophosphat
NLS	<i>nuclear localization signal</i>	PS	Phosphatidylserin
Nm23-H2	<i>non-metastatic cells 2 protein; nucleoside diphosphate kinase B</i>	PTX1	<i>pituary homeobox 1 homologue</i>
NP-40	Nonidet P-40	PVDF	Polyvinylendifluorid
NS3-5B	Nicht-Struktur Proteine 3 bis 5B (3, 4A, 4B, 5A, 5B)	Ras	abgeleitet von: Ratten Sarkom virus
NS5A	Nicht-Strukturprotein 5A des Hepatits C Virus	RC	Replikationskomplex
NSXY	Nicht-Strukturprotein XY (Hepatitis C Virus)	RIP	<i>receptor interacting protein</i>
N-Terminus	Aminoterminus	RLU	<i>relative light units</i>
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
NTR	<i>not translated region</i>	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
OD	Optische Dichte	rpm	<i>rotations per minute</i>
ORF	<i>open reading frame</i>	rRNA	ribosomale RNA
OT	Objektträger	RT	Raumtemperatur
p21/waf	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>	RT	Reverse Transkription
p38	MAPK p38	SCID	<i>severe combined immunodeficiency disease</i>
p53	zelluläres Tumorantigen p53	SDS	Sodiumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase	Ser	Serin
PARP	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase	Sf9 cells	<i>Spodoptera frugiperda ovarian cell line</i>
PAS	Perjodsäure Schiff'sches Reagenz	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline	Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspase (=Diablo)</i>
PCNA	<i>proliferation cell nuclear antigen</i>	SNARE	<i>soluble N-methylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	SODD	<i>silencer of death domain</i>
PD98059	MEK-Inhibitor	SOS	<i>son of sevenless</i>
PDCD2	<i>programmed cell death 2</i>	Src	Sarcoma induzierendes Gen des Rous Sarcoma Virus

Abkürzungsverzeichnis

SRCAP	<i>Snf2-related CBP activator protein</i>
SRF	<i>Serum response factor</i>
SSC	Saline Sodium Citrat
SSC	<i>sideward scatter</i>
STAT-3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TACE	<i>TNF-alpha converting enzyme</i>
TAE	Tris-gepufferte Essigsäure
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tBid	<i>truncated Bid</i>
TBP	TATA-Bindungsprotein
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TLM	Translocations-Motif
TNF	Tumornekrose-Faktor
TNF-R1	TNF-Rezeptor 1 (CD120a)
TNF-R2	TNF-Rezeptor 2 (CD120b)
TRADD	<i>TNF-R1-associated death domain protein</i>
TRAF	TNF-R assoziierter Faktor
Trail	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L)</i>
TRAIL-R1	TRAIL Rezeptor 1 (DR4)
TRAIL-R2	TRAIL Rezeptor 2 (DR5)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
Tyr	Tyrosin
U	<i>Unit</i> , Einheit enzymatischer Aktivität
U0126	MEK inhibitor
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vergl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumenprozent
V5	Epitop der Paramyxovirus (SV5)-Proteine P und V
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

Danksagung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Eberhard Hildt**, der mir diese Arbeit ermöglichte, sie betreute und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Zudem bedanke ich mich bei ihm für sein Verständnis und seine Hilfsbereitschaft in schweren Zeiten und für seine Unterstützung trotz den für ihn nicht unbedingt nahe liegenden Entscheidungen meiner Person.

Herzlichen Dank an **Prof. Dr. Hans Will**, der diese Arbeit als Erstgutachter betreute und der mich als Gastwissenschaftler unkompliziert und ausgesprochen hilfsbereit in seine Abteilung aufgenommen hat. Zudem danke ich allen anderen **Mitgliedern der Abteilung 2** des Heinrich-Pette-Instituts für die herzliche Aufnahme, Unterstützung und die schöne Zeit, die ich mit ihnen verbracht habe.

Zudem möchte ich mich bei **Prof. Dr. G. Multhaupt** dafür bedanken, dass er sich bereiterklärte, die vorliegende Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Ein besonderer Dank auch an **Dr. Michael Bruns, Uwe Tessmer, Prof. Dr. U. Schumacher** und **Sandra Köln**, die mich sehr unterstützt haben und deren Bemühungen eine Menge Daten und Erkenntnisse zu dieser Arbeit beigesteuert haben. Zudem Dank an alle am **Robert Koch Institut, Heinrich-Pette-Institut, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf** und an der **Uniklinik Freiburg**, die mir hilfreich mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Ganz besonders seien dabei die Mitarbeiter der verschiedenen **Tierhaltungen** hervorgehoben, deren Hilfsbereitschaft mir das Arbeiten erheblich erleichtert hat.

Dr. Tilmann Bürckstümmer danke ich für die menschlich angenehme und ausgesprochen produktive Zusammenarbeit bei der Erforschung von NS5A, die mir nicht nur in der ersten Zeit über viele Schwierigkeiten hinweg geholfen hat. Die HCV-Subgruppe der NG1 war schon was Besonderes.

Danke auch an **Katharina Ross** und **Bianca Bolewski**, die meine ersten Diplomarbeiten-Betreuungsversuche ertragen haben und die wichtige Erkenntnisse und Daten auch im Zusammenhang mit dieser Arbeit erbracht haben. Die Zusammenarbeit mit ihnen hat viel Spaß gemacht und war auch für mich sehr lehrreich. Zudem danke ich meinen

Danksagung

Praktikantinnen und Praktikanten **Christian Strube**, **Annika Lubitz** und **Mörries Thiele**, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein Dankeschön auch an **Markus Möbs**, **Joachim Lupberger** und **Börries Brandenburg**, und alle restlichen **Mitarbeiter der AG Hildt** für die Jahre der tollen Zusammenarbeit und gegenseitigen Hilfsbereitschaft.

Danke auch an die Kollegen in der neuen AG Hildt in Freiburg, besonders **Kiyoshi Himmelsbach**, für die geleistete Unterstützung und die Päckchen.

Zum Schluss möchte ich mich noch herzlich bei meinen **Eltern**, meiner **Schwester** und meinen **Freunden** bedanken, die mir zur Seite standen und mich unterstützten wo immer sie konnten.

Mein herzlichster Dank gilt **Theresa Bergann**, dafür, dass es sie gibt.