

8 Zusammenfassung

Das Hepatitis-C Virus (HCV) ist ein kleines RNA-Virus, das beim Menschen schwere Lebererkrankungen hervorruft. Es kodiert für 3 Struktur- und mindestens 7 Nichtstrukturproteine. Das Nichtstrukturprotein 5A (NS5A) moduliert verschiedene Signaltransduktionswege der Wirtszelle, die für die Regulation von Zellwachstum und Zellproliferation von zentraler Bedeutung sind. Die Deregulation dieser Signalwege ist potenziell relevant im Hinblick auf die Virusreplikation, die Immunantwort des Wirts sowie die HCV-assoziierte Leberpathogenese. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, zelluläre Faktoren zu identifizieren, die für die NS5A-vermittelte Modulation zellulärer Signalwege verantwortlich sind.

Mit Hilfe eines affinitätschromatographischen Ansatzes wurde c-Raf1 als neuer Bindungspartner von NS5A identifiziert. Die Interaktion wurde in Immunpräzipitationsexperimenten aus Baculovirus-infizierten Sf21-Zellen bestätigt. Des Weiteren wurde beobachtet, dass NS5A und c-Raf1 in transient-transfizierten HuH-7-Zellen sowie in HCV-Replikon-Zellen kolokalisiert sind. N-terminale Deletionsmutanten von NS5A, die im Zellkern lokalisiert sind, bewirken eine Translokation von endogenem c-Raf1 in den Kern. Das zeigt, dass NS5A und c-Raf1 in einem physiologisch-relevanten Modellsystem interagieren.

In der Folge wurde untersucht, wie sich eine Modulation der c-Raf1-Aktivität auf die Virusreplikation auswirkt. Die Hemmung von c-Raf1 mittels eines synthetischen Inhibitors (BAY43-9006) führte zu einer Verminderung der HCV-Replikation. Dasselbe wurde beobachtet, wenn die Expression von c-Raf1 durch siRNAs reduziert wurde. Das legt den Schluss nahe, dass die Integrität von c-Raf1 eine Voraussetzung für die Virusreplikation darstellt. Die Hemmung der MAP-Kinase-Kaskade auf der Ebene von MEK (U0126) hatte keinen Einfluss auf die Virusreplikation. Das bedeutet, dass der Effekt von c-Raf1 auf die Virusreplikation nicht durch eine Hemmung der MAP-Kinase-Kaskade bedingt ist. Im Übrigen unterstreicht dieses Experiment die besondere Bedeutung von c-Raf1 für die Virusreplikation.

Außerdem wurde analysiert, inwieweit NS5A einen Einfluss auf die c-Raf1-vermittelte Signaltransduktion hat. Dabei wurde beobachtet, dass die Phosphorylierung von ERK, einem zentralen Effektor von c-Raf1, in Gegenwart von NS5A unverändert ist. Des Weiteren trägt NS5A nicht zur basalen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SRF, AP-1, NF- κ B oder STAT3 bei. Dies gilt sowohl für NS5A als isoliertes Protein als auch für NS5A im Kontext des HCV-

Polyproteins. Das legt den Schluss nahe, dass NS5A keinen Einfluss auf die c-Raf1-vermittelte Signaltransduktion hat.

Da NS5A ein Phosphoprotein und c-Raf1 eine Kinase ist, war es nahe liegend zu untersuchen, inwieweit NS5A durch c-Raf1 phosphoryliert werden kann. Zu diesem Zweck wurden NS5A und GST-Raf durch Affinitätschromatographie gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden in einem Kinase-Assay umgesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass hoch-reines GST-Raf NS5A phosphoryliert. Eine inaktive Mutante von GST-Raf (K375W) war nicht in der Lage, NS5A zu phosphorylieren. Das bedeutet, dass die Phosphorylierung im Hinblick auf c-Raf1 spezifisch war und lässt den Schluss zu, dass c-Raf1 eine NS5A-Kinase ist. In der Folge wurde untersucht, wie sich eine Inhibition von c-Raf1 (durch BAY43-9006) auf die Hyperphosphorylierung von NS5A auswirkt. Es wurde beobachtet, dass die Inhibition von c-Raf1 den Verlust der Hyperphosphorylierung von NS5A zur Folge hat. Das bedeutet, dass c-Raf1 die NS5A-Phosphorylierung auch *in vivo* beeinflusst.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit ein neuer zellulärer Bindungspartner von NS5A identifiziert wurde, der von zentraler Bedeutung für die Phosphorylierung von NS5A und die Virusreplikation ist. Unter den zahlreichen Bindungspartnern von NS5A gibt es nur wenige, die diese Kriterien erfüllen und die zum Verständnis dieses spannenden und zugleich rätselhaften Proteins beitragen.