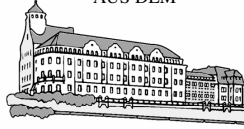


AUS DEM



1900 - 2000

BERNHARD-NOCHT-INSTITUT FÜR TROPENMEDIZIN
FREIE UND HANSESTADT HAMBURG

Inhibition von Proteinkinasen der Proteinkinase C Familie durch das Nichtstrukturprotein 3 des Hepatitis C Virus

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Chemie an der
Universität Hamburg

Philip Hartjen

Hamburg 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg in der Abteilung für Virologie unter der Leitung von PD Dr. P. Borowski angefertigt.

1. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Chris Meier
2. Gutachter der Dissertation: PD Dr. Peter Borowski

1. Gutachter der Disputation: Prof. Dr. Chris Meier
2. Gutachter der Disputation: Prof. Dr. Ulrich Hahn
3. Gutachter der Disputation: Dr. Edzard Spillner

Tag der Disputation: 14.12.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	6
1.1	Einführung in das Arbeitsgebiet	6
1.2	Hepatitis C	7
1.3	Hepatitis C und das hepatozelluläre Karzinom	7
1.4	Das Hepatitis C Virus	9
1.4.1	Strukturproteine	10
1.4.2	Nichtstrukturproteine	11
1.5	Die HCV NS3 NTPase/Helikase – Struktur und Funktion	12
1.6	Weitere Beteiligung von NS3 an der Pathophysiologie der HCV-Infektion	14
1.7	Proteinkinase C	15
1.7.1	Charakterisierung und Klassifizierung	15
1.7.2	Regulation	16
1.7.3	Die Pseudosubstratregion	17
1.7.4	Funktion	18
1.7.5	Phorbolester – wichtige Hilfsmittel bei der Aufklärung der PKC-Funktion	18
1.8	Die Rolle von Kinasen der PKC-Familie in der Karzinogenese	19
1.8.1	Tumorpromotion durch PKC-Inhibition im JB6-Modell	21
1.8.2	Tumorpromotion in durch Inhibition von PKC- δ in C-Src-überexprimierenden Zellen	21
1.9	Die Interaktion viraler Proteine mit PKC-Signalwegen	22
1.10	Zielsetzung	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Bakterienstämme	24
2.1.2	Enzyme	25
2.1.3	Chemikalien	25
2.1.4	DNA-Molekulargewichtsstandards	25
2.1.5	Protein-Molekulargewichtsstandards	26
2.1.6	Kits	26
2.1.7	Kommerziell erhältliche Plasmide	26
2.1.8	Zelllinien	26
2.1.9	Medien und Zusätze für eukaryotische Zellkultur	27
2.1.10	Oligonukleotide	27
2.1.11	Software	28
2.2	Mikrobiologische Methoden	28
2.2.1	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	28
2.2.2	Herstellung chemisch transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen	29
2.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	29
2.3	Molekularbiologische Methoden	30
2.3.1	Plasmid-DNA-Präparation	30
2.3.2	DNA-Fällung mit Ethanol	30
2.3.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	30
2.3.4	Konzentrationsbestimmung von DNA	31
2.3.5	Restriktionsverdau von DNA	31
2.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.3.7	Gerichtete TOPO®-Klonierung (<i>directional TOPO® cloning</i>) (Invitrogen)	31
2.3.8	Das Gateway® Cloning System (Invitrogen)	32

2.3.9	DNA-Sequenzierung	33
2.3.10	Analytische und präparative Auftrennung von DNA in Agarosegelen	33
2.3.11	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	34
2.3.12	Gezielte <i>in vitro</i> Mutagenese (<i>QuikChange</i>)	34
2.3.13	Erweiterte <i>QuikChange</i> Mutagenese nach Wang und Malcolm	35
2.3.14	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Plasmid-DNA als Template	36
2.4	Proteinbiochemische Methoden	37
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen	37
2.4.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	37
2.4.3	Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	38
2.4.4	Western-Blotting	38
2.4.5	Rekombinante Expression in <i>E. coli</i>	40
2.4.6	StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatografie	41
2.4.7	Ni-NTA-Affinitätschromatografie	42
2.4.8	Elektroelution von Proteinen aus SDS Polyacrylamidgelen	43
2.4.9	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	43
2.4.10	Lagerung von Proteinlösungen	43
2.4.11	<i>In vitro</i> Proteinkinase C Assay, radiometrisch	44
2.4.12	<i>In vitro</i> Proteinkinase C Assay mit ATP-Regeneration	45
2.4.13	ATPase-Assay	47
2.5	Zellbiologische Methoden	48
2.5.1	Kontinuierliche Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	48
2.5.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	49
2.5.3	Transfektion eukaryotischer Zellen	49
2.5.4	Das Flp-In™ System (Invitrogen) zur Generierung von Zelllinien mit stabiler Expression rekombinanter Proteine	49
2.5.5	Selektion von Flp-In™-3T3-Expressionszelllinien in Hygromycin B haltigem Medium	51
2.5.6	p80/MARCKS-Phosphorylierungsassay	51
2.5.7	Proliferations-Assay	52
2.5.8	DNA-Syntheseassay	52
2.5.9	Soft Agar Assay	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Sequenzvergleich des argininreichen NS3-Sequenzabschnittes mit PKC-Pseudosubstratsequenzen	54
3.2	Design rekombinanter Proteine zur Aufklärung der PKC-Inhibition durch HCV-NS3	55
3.3	Herstellung von Vektoren für die Expression von HCV-NS3-Konstrukten in <i>E. coli</i>	58
3.3.1	pET16b-d2-NS3h – Vektor zur prokaryotischen Expression von Domäne 2 der HCV-NTPase/Helikase als His-Tag-Fusionsprotein	58
3.3.2	pET16b-d2Δ-NS3h – Vektor zur prokaryotischen Expression einer designten Deletionsmutante von Domäne 2 der HCV-NTPase/Helikase als His-Tag-Fusionsprotein	59
3.3.3	pET102D-NS3h und pET102D-NS3h-D1316A – Vektoren für die prokaryotischen Expression von NS3h und NS3h-D1316A als Trx-StrepTag-Fusionsprotein	60
3.4	Herstellung von Vektoren für die Expression von HCV-NS3-Konstrukten in Säugerzellen	61
3.4.1	Subklonierung der NS3-Konstrukte in den Gateway entry vector pENTR3C	61
3.4.2	Subklonierung der NS3-Konstrukte in den Gateway destination vector pEF5/FRT/V5-DEST	64
3.5	Prokaryotische Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	65
3.5.1	Expression und Aufreinigung von d2-NS3h und d2Δ-NS3h	65
3.5.2	Expression und Aufreinigung von NS3h und NS3h-D1316A	66
3.6	Enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Proteine	67
3.7	Inhibition der enzymatischen Aktivität von Proteinkinase C Isoformen durch NS3 <i>in vitro</i>	69
3.7.1	NS3h inhibiert PKC auch bei konstanter ATP-Konzentration	73
3.8	Modus der Inhibition	75

3.9	Generierung von NIH 3T3 Zellen mit stabiler Expression von HCV-NS3-Konstrukten	77
3.10	Einfluss der NS3 NTPase/Helikase auf die intrazelluläre Proteinkinase C Aktivität von NIH 3T3 Zellen	78
3.11	Einfluss der NS3 NTPase/Helikase auf zelluläre Eigenschaften im Zusammenhang mit neoplastischer Transformation	80
3.11.1	Stabil mit NS3 NTPase/Helikase transfizierte NIH 3T3 Zellen sind morphologisch verändert	80
3.11.2	Die NS3 NTPase/Helikase hat keinen Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen in Soft Agar	82
3.11.3	Die NS3 NTPase/Helikase hat keinen Einfluss auf die DNA Syntheserate konfluenten Zellen	83
3.11.4	Die NS3 NTPase/Helikase bewirkt eine gesteigerte Zellproliferation	83
4	Diskussion	85
4.1	PKC-Inhibition durch die HCV NS3 NTPase/Helikase <i>in vitro</i>	85
4.2	Einfluss von NS3 auf die Proteinkinase C Aktivität in intakten Zellen	89
4.3	Mögliche Beteiligung der NS3 NTPase/Helikase an der HCV-assoziierten Karzinogenese	91
4.3.1	Die NS3 NTPase/Helikase bewirkt keine direkte Transformation und keine Tumorpromotion <i>in vitro</i>	91
4.3.2	Die NS3 NTPase/Helikase bewirkt gesteigerte Proliferation und eine veränderte Morphologie	93
4.4	Biologische Relevanz der erzielten Ergebnisse und Ausblick	94
5	Zusammenfassung	54
6	Abstract	99
7	Literaturverzeichnis	101
8	Abkürzungsverzeichnis	115
9	Danke!	119
10	Anhänge	120
10.1	Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge	120
10.2	Lebenslauf	122
10.3	Kongressbeiträge	123
10.4	Selbständigkeitserklärung	124

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Arbeitsgebiet

Hepatitis C ist eine virale Infektion der Leber, die durch das Hepatitis C Virus (HCV) verursacht wird. Es gibt weltweit etwa 170 Millionen HCV-Träger, das sind 3% der Weltbevölkerung. Die Hepatitis C ist aufgrund ihrer hohen Chronizität und deren Folgen von grosser sozioökonomischer Bedeutung: Etwa 80% aller HCV-Infektionen nehmen einen chronischen Verlauf. Bei ca. 20% der Patienten mit chronischer Hepatitis C kommt es nach durchschnittlich 13–25 Jahren zu schwerer Fibrose und Zirrhose der Leber, aus der sich mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 1–4% ein primäres hepatozelluläres Karzinom (HCC) entwickeln kann (Liang und Heller 2004, Michielsen et al. 2005).

Die molekulare Pathogenese des HCC bei chronischer Hepatitis C ist aber bisher weitgehend ungeklärt. Wie im Verlauf vorheriger Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, interagieren Fragmente des Nichtstrukturproteins 3 (NS3) des HCV mit dem katalytischen Zentrum der Proteinkinase C (PKC), wodurch es zur Inhibition der enzymatischen Aktivität der Kinase kommt (Borowski et al. 1999c). Störungen der intrazellulären Signaltransduktion spielen in der Pathogenese viraler Erkrankungen eine wichtige Rolle, insbesondere bei der Entstehung von Tumoren viraler Ätiologie. So sind beispielweise Änderungen der Konzentration und/oder der Aktivität zellulärer Proteinkinasen, welche durch die Einwirkung viraler Genomprodukte hervorgerufen werden, für das onkogene Potential des Hepatitis B Virus (HBV) (Benn und Schneider 1995, Nijhara et al. 2001, Bouchard et al. 2006), des humanen Papillomavirus (HPV) (Zhang et al. 2002, zur Hausen 2002) und des bovinen Papilloma Virus (BPV) (Meyer et al. 1994) maßgeblich mitverantwortlich.

In Anbetracht der bekannten Rolle der PKC bei Tumorpromotion und Karzinogenese könnte die intermolekulare Interaktion des viralen Proteins NS3 mit der Wirtszell-PKC am Auftreten des HCV-assoziierten hepatozellulären Karzinoms beteiligt sein. Daher sollten in dieser Arbeit die Mechanismen der molekularen Interaktion zwischen HCV-NS3 und PKC weiter aufgeklärt, und deren Langzeitauswirkung auf den Phänotyp von Säugerzellen u.a. in Assays auf neoplastische Transformation untersucht werden.

1.2 Hepatitis C

Mitte der 1970er Jahre wurde bemerkt, dass Blutkonserven weltweit mit einem unbekanntem Erreger kontaminiert waren, der die damals als non-A, non-B Hepatitis bezeichneten Leberentzündungen hervorruft (Feinstone et al. 1975). Erst 1989 wurde das Hepatitis C Virus (HCV), der Erreger der meisten dieser überwiegend durch Blut übertragbaren non-A, non-B Hepatitiden, als erstes Virus mit rein molekularbiologischen Methoden entdeckt (Choo et al. 1989). HCV ist ein bedeutendes Pathogen – weltweit sind etwa 170 Millionen Menschen mit dem parenteral übertragbaren Virus infiziert, das sind 3% der Weltbevölkerung. In Deutschland geht man von jährlich ca. 5000 HCV-Neuinfektionen aus (Schreier und Höhne 2001). HCV wird hauptsächlich durch direkten Blut-Kontakt übertragen, insbesondere bei der Mehrfachbenutzung von Spritzbesteck von Drogenabhängigen. Ein großer Teil der HCV-Infektionen (bis zu 50%) ist allerdings immer noch unbekanntem Ursprungs (Heintges und Wands 1997). Sexuelle, sowie vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind sind möglich, das Infektionsrisiko ist bei diesen Übertragungswegen jedoch sehr gering (Polywka et al. 1997, Meisel et al. 1995, Pellicano et al. 2004).

Die Therapie der Wahl für die chronische Hepatitis C ist heute eine Kombination aus pegyliertem Interferon alpha (PEG-IFN- α) und Ribavirin (Manns et al. 2006). Beide Substanzen sind Breitbandvirostatika, die nicht spezifisch in den Lebenszyklus von HCV eingreifen. Der Therapieerfolg ist mäßig, insbesondere bei Infektion mit dem in Europa und Nordamerika verbreiteten Genotyp 1. Hier sprechen nur ca. 40–45% der Patienten auf die Therapie an (Di Bisceglie und Hoofnagle 2002). Ein Impfstoff steht derzeit nicht zur Verfügung.

1.3 Hepatitis C und das hepatozelluläre Karzinom

HCV ist, zusammen mit dem Hepatitis B-Virus (HBV), dem humanen Papillomavirus (HPV), dem Epstein-Barr Virus (EBV) und dem humanen T-Zell-lymphotropen Virus (HTLV-I), eines der wichtigsten humanpathogenen Viren die eindeutig mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht werden können. Obwohl HCV, im Gegensatz zu HBV, als RNA-Virus nicht in das humane Genom integrieren und DNA nicht direkt schädigen kann, muss die HCV-Infektion als weltweit maßgeblicher Faktor für die Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms angesehen werden. Auch stellt die chronische Hepatitis C die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation dar (Montalbano und Neff 2005).

Da die chronische Hepatitis C typischerweise vorwiegend asymptomatisch und mit sehr unterschiedlichem klinischem Ausgang verläuft, ist es schwierig, die Progressionsrate zur Leberzirrhose und zum HCC genau abzuschätzen. El Serag hat in einem systematischen

Review den Zusammenhang zwischen HCV-Infektion und Entwicklung eines HCC untersucht (El-Serag 2002) und dazu alle relevanten, zwischen 1980 und 2001 veröffentlichten Daten analysiert. Die durchschnittliche Zeitspanne zwischen Infektion und beginnender Zirrhose betrug 13–25 Jahre, bis zur Entstehung des HCC vergingen durchschnittlich 17–31 Jahre. Die meisten, aber nicht alle HCC entwickelten sich in zirrhotischen Lebern. Aufgrund der hohen Variabilität konnte kein aussagekräftiger Risikofaktor ermittelt werden, allerdings war das HCC-Risiko der HCV-infizierten deutlich erhöht. Mehrere Studien haben die jährliche HCC-Inzidenz in Patientenkohorten mit HCV-assoziiierter Leberzirrhose ermittelt. Diese reicht von 1–4% pro Jahr in den meisten Ländern (Fattovich 1998, Gordon et al. 1998, Degos et al. 2000, Fattovich et al. 1997) bis zu 7% in Japan (Chiba et al. 1996, Nishiguchi et al. 1995).

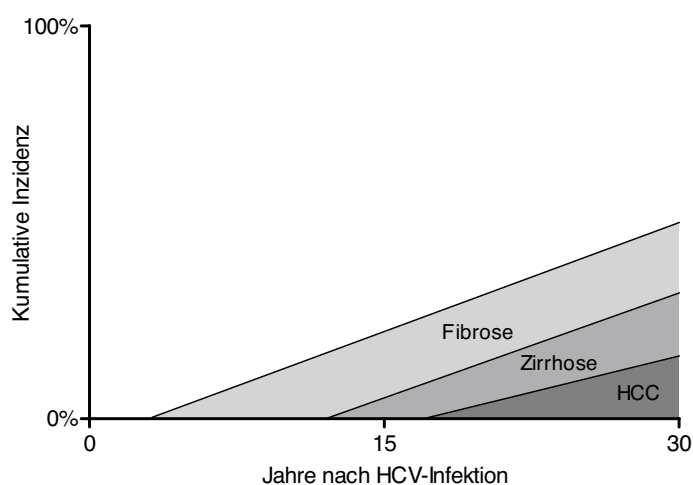


Abbildung 1-1. Kumulative Inzidenzen für die Entstehung von Fibrose, Zirrhose und Hepatozellulärem Karzinom (HCC) nach HCV-Infektion. Gezeigt ist eine schematische Vereinfachung der Progression chronischer Hepatitis C von Fibrose über Zirrhose zum HCC. Die dargestellte Progression basiert auf Schätzwerten (siehe Text). Ein HCC kann auch ohne vorangegangene Zirrhose entstehen. Nach (Liang und Heller 2004).

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört in vielen Ländern zu den häufigsten Krebserkrankungen und ist, aufgrund der sehr schlechten Prognose, die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache (Bosch et al. 1999). In 40,1% aller HCC-Patienten finden sich Anti HCV-Antikörper, wobei HCV-1b den Genotyp mit der höchsten Prävalenz darstellt (Brecht et al. 1998). Der grösste klinische Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC ist die Leberzirrhose, unabhängig von ihrer Ätiologie (Levrero 2006, Michielsen et al. 2005, Zaman et al. 1985), 70–90% aller HCC entwickeln sich in zirrhotischen Lebern. Bei einer bestehenden Hepatitis C kann das HCC allerdings auch ohne vorangegangene Zirrhose entstehen (El-Serag 2002, Ikeda et al. 1993).

Wie die Karzinogenese der meisten Krebsarten, verläuft auch die Hepatokarzinogenese in einem Mehrstufenprozess (siehe auch Abschnitt 1.8.1, S. 21). Da das HCV-assoziierte HCC nach vielen Jahren chronischer Hepatitis, im Allgemeinen auf der Grundlage einer Leberzirrhose auftritt, ging man bisher davon aus, dass die maligne Transformation der Hepatozyten hauptsächlich durch den erhöhten Leberzellumsatz in einem entzündlichen Milieu

verursacht wird. Die Entzündung begünstigt genetische und epigenetische Veränderungen durch oxidative DNA-Schädigung, und damit der das Zustandekommen initialer Transformationen. Durch die gesteigerte Proliferation der Hepatozyten kommt es dann zur Tumorphorprogression. Mehrere experimentelle Indizien deuten allerdings darauf hin, dass HCV auch direkter an der Transformation von Hepatocyten beteiligt sein könnte. Vornehmlich die viralen Proteine core (Moriya et al. 1998, Yoshida et al. 2002), NS3 (Sakamuro et al. 1995, Schulze zur Wiesch et al. 2003, Smirnova et al. 2006) und NS5a (Gale et al. 1999) stehen in der Diskussion, direkt an der HCV-induzierten Karzinogenese beteiligt zu sein.

1.4 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV) gehört der Familie der Flaviviridae an und ist der einzige Vertreter des eigenständigen Genus „Hepacivirus“ (Tellinghuisen und Rice 2002). Die Detaillierte Untersuchung des HCV-Lebenszyklus war bisher in Ermangelung eines Zellkultursystems für die Virusreplikation, sowie eines Kleintiermodells sehr schwierig. Im Juli 2005 ist es T. Wakita, R. Bartenschlager und anderen gelungen, ein chimäres HCV-Genom zu klonieren, von dem sich erstmalig effizient infektiöse Partikel *in vitro* generieren lassen, mit denen Schimpansen infiziert werden können (Wakita et al. 2005, Lindenbach et al. 2005). Zudem sind aus Schimpansen wiedergewonnene Virusisolate in Zellkultur rekultivierbar (Lindenbach et al. 2006). Dadurch ist der komplette HCV-Lebenszyklus genauen *in vitro* und *in vivo* Analysen zugänglich.

Durch die Untersuchung einzeln exprimierter HCV-Proteine und aus Studien an Replikonsystemen, also selbstreplizierenden, genomischen RNA-Molekülen in Zellkultursystemen, ist aber schon viel über die Funktion der einzelnen HCV-Proteine während der Replikation bekannt. HCV besitzt ein ca. 9,6 kb großes Einzelstrang-RNA-Genom mit positiver Orientierung. Dieses codiert für ein ungefähr 3000 Aminosäuren langes Polyprotein, das nach der Translation durch zelluläre, im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lokalisierte, und zwei virale Proteasen in mindestens zehn verschiedene virale Proteine prozessiert wird (Tellinghuisen und Rice 2002). Abbildung 1-2 zeigt die Genomorganisation von HCV und die Prozessierung des Polyproteins. Die einzelnen viralen Proteine wurden hinsichtlich ihrer Funktionen im HCV-Lebenszyklus charakterisiert. Zudem sind für die meisten von ihnen vielfältige Einflüsse auf zelluläre Funktionen beschrieben worden. Im Folgenden werden die bekannten Funktionen der viralen Proteine zusammengefasst.

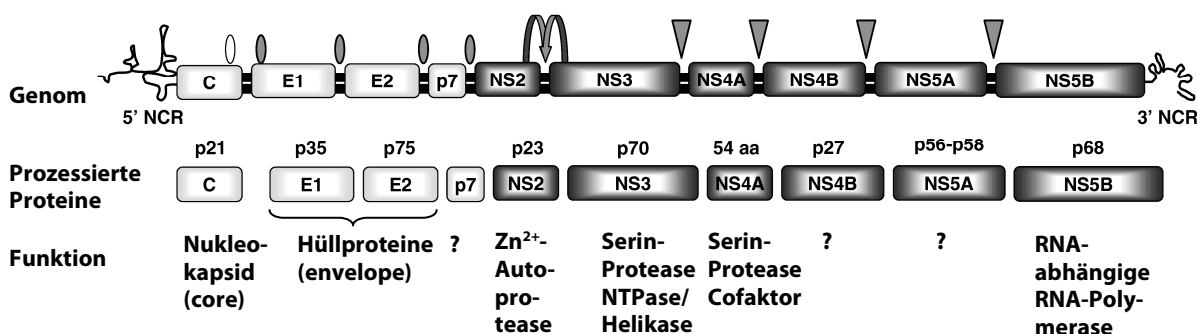


Abbildung 1-2. Schematische Darstellung der HCV Genomorganisation und der Prozessierung des HCV Polyproteins. Das HCV Genom umfasst 9,6 kb positiv gerichteter Einzelstrang RNA. Ein langer offener Leserahmen codiert für das ca. 3000 AS lange HCV Polyprotein, an beiden Enden befinden sich nicht-codierende Bereiche (NCR). Das HCV Polyprotein wird von zellulären und viralen Proteasen zu Strukturproteinen (hellgrau) und Nichtstrukturproteinen (dunkelgrau) prozessiert. Die mit den Nichtstrukturproteinen assoziierten enzymatischen Aktivitäten sind bezeichnet. Schnittstellen der im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lokalisierten zellulären Signalpeptidase sind durch graue Ovale gekennzeichnet. Das weiße Oval markiert eine zusätzliche Schnittstelle für die C-terminale Prozessierung des core-Proteins durch die Signalpeptid Peptidase. Die Pfeile zeigen die Schnittstellen der NS3-Serinprotease und der NS2-3 Autoprotease an. Zusätzlich zu ihrer Funktion bei der Virus-Replikation wurden viele Interaktionen der HCV-Proteine mit zellulären Proteinen beschrieben. Nach (Levrero 2006).

1.4.1 Strukturproteine

Core Protein

Dieses basische, RNA-bindende Protein, bildet das HCV-Nukleokapsid. Für HCV-Core wurden zudem zahlreiche Einflüsse auf Wirtszellfunktionen wie Transkription, Lipidmetabolismus und mehrere Signalwege beschrieben (Tellinghuisen und Rice 2002). Zudem wird es mit der Induktion von Steatose und HCC assoziiert (Moriya et al. 1997, Moriya et al. 1998).

Envelope Glycoproteine E1 und E2

Diese Typ-I-Transmembranproteine stellen die viralen Hüllproteine dar. Sie werden an ihren Ektodomänen im ER glykosyliert und bilden nichtkovalente Heterodimere. Für E2 wurde eine Interaktion mit der dsRNA-abhängigen Protein Kinase (PKR) beschrieben, einer Proteinkinase mit wichtigen Funktionen für das angeborene Immunsystem (Taylor et al. 1999).

p7

p7 ist ein 63 Aminosäuren langes Polypeptid, das im HCV Polyprotein direkt N-terminal der Nichtstrukturproteine lokalisiert ist. Es ist nicht klar, ob p7 ein Bestandteil der viralen Partikel ist. p7 besteht aus zwei Transmembrandomänen und bildet Hexamere, für die Ionenkanal-

Aktivität beschrieben wurde (Griffin et al. 2003, Pavlovic et al. 2003). Die Funktionen dieses viralen Proteins sind nicht bekannt.

1.4.2 Nichtstrukturproteine

NS2-3 Autoprotease

Die NS2/3 Verbindungsstelle im HCV Polyprotein wird autoproteolytisch gespalten. Die NS2-3 Autoprotease-Aktivität geht von NS2 und dem N-terminalen Drittel von NS3 aus. Sie ist für die Replikation *in vivo* unerlässlich, nicht aber für die Replikation subgenomischer Replikons, d.h. selbstreplizierender RNA-Moleküle in Zellkultursystemen *in vitro*. Es ist nicht klar, ob NS2 nach der Trennung von NS3 weitere Funktionen erfüllt (Brass et al. 2006).

NS3 und NS4A

NS3 ist ein multifunktionelles, 631 AS langes Protein, das aus einer im N-terminalen Drittel lokalisierten Serinprotease und einer in den C-terminalen zwei Dritteln gelegenen NTPase/Helikase besteht. Beide Enzymaktivitäten sind gut charakterisiert (Malcolm et al. 2006, Dumont et al. 2006). Die NS3 Protease ist im Komplex mit ihrem Kofaktor NS4A u.a. an der Prozessierung des HCV Polyproteins beteiligt, die NS3 NTPase/Helikase ist für die Replikation der viralen RNA unerlässlich. Durch die Helikaseaktivität werden wahrscheinlich doppelsträngige RNA-Replikationsintermediate entwunden, RNA-Sekundärstrukturen aufgebrochen und die virale RNA von RNA-bindenden Proteinen befreit (Brass et al. 2006). Diese Arbeit befasst sich mit dem C-terminalen NS3-Anteil, also der NTPase/Helikase, die im nächsten Abschnitt ausführlicher beschrieben wird.

NS4B

Über die Funktionen dieses 27 kDa grossen Proteins ist wenig bekannt, da es aufgrund seiner starken Hydrophobizität schwierig zu untersuchen ist. NS4B ist in einem vom ER abgeleiteten Membrankompartiment lokalisiert (Hugle et al. 2001) und induziert Veränderungen in intrazellulären Membranen, an die sich wahrscheinlich der HCV-Replikationskomplex anlagert (Egger et al. 2002, Gosert et al. 2003).

NS5A

NS5A ist ein phosphoryliertes Zink-Metalloprotein, für das zahlreiche Interaktionspartner beschrieben worden sind (Tellinghuisen und Rice 2002, Macdonald und Harris 2004). Die biologische Relevanz dieser Befunde und die Rolle von NS5A im HCV-Lebenszyklus bleiben unklar.

NS5B

NS5B, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp), ist das Schlüsselenzym bei der Replikation des HCV-Genoms. NS5B ist unabhängig von anderen Proteinen integral in die ER-Membran integriert, die funktionale Domäne befindet sich im Cytosol (Schmidt-Mende et al. 2001). Die HCV-RNA-Replikation findet im membranassoziierten HCV-Replikationskomplex statt, der aus den viralen Nichtstrukturproteinen, zellulären Proteinen, und RNA besteht (Gosert et al. 2003).

1.5 Die HCV NS3 NTPase/Helikase – Struktur und Funktion

Die HCV NS3 NTPase/Helikase ist eine DExH/D-Box RNA-Helikase aus der Helikase Superfamilie II. Sie katalysiert die durch NTP-Hydrolyse getriebene Entwindung von Homo- und Heteroduplices aus RNA und DNA in 3'-5'-Richtung (Tai et al. 1996). Das Enzym transloziert über einen Ratschen-Mechanismus directional auf dem doppelsträngigen Nukleinsäuresubstrat und entwindet es dabei (Levin et al. 2005). Translokation und Entwindung sind so an NTP-Bindung und -Hydrolyse gekoppelt, dass die Bewegung in diskreten Schritten erfolgt (Dumont et al. 2006). Die Struktur der HCV NTPase/Helikase in Abwesenheit von Nukleinsäuren wurde röntgenkristallografisch mit Auflösungen von 2,1 Å (Yao et al. 1997) bzw 2,3 Å (Cho et al. 1998) (siehe Abbildung 1-3) sowie mit einem gebundenen Oligonukleotid bei 2,2 Å gelöst (Kim et al. 1998). Sie besteht aus drei nahezu gleich grossen Domänen, von denen sich insbesondere die Domänen 1 und 2 in ihrer Konformation stark ähneln. Die Domänen 1 und 3 sind enger miteinander assoziiert als jede einzelne von ihnen mit Domäne 2. Daraus resultiert eine recht hohe Flexibilität von Domäne 2, die gegenüber den anderen beiden Domänen beweglich ist. Die sieben hoch konservierte Aminosäuresequenzen (Motive I–VII) der Helikase Superfamilie II finden sich auf der Oberfläche der Domänen 1 und 2. Das Motiv VI ist zentraler Gegenstand dieser Arbeit und wird im Folgenden detaillierter beschrieben.

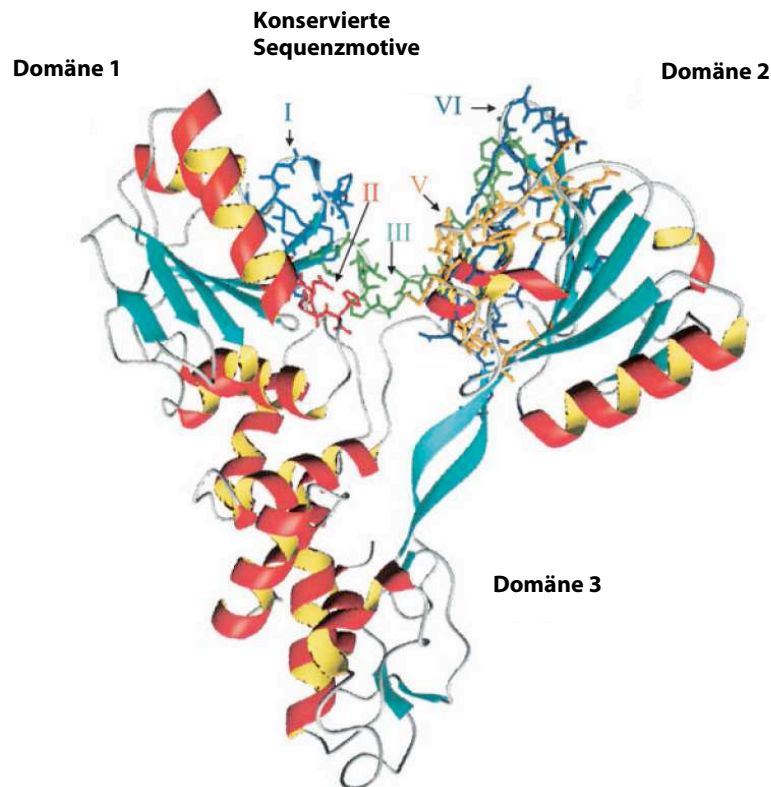


Abbildung 1-3. Ribbon Diagram der HCV RNA NTPase/Helikase Domänen (PDB 1HEI (Yao et al. 1997)). Die konservierten Sequenzmotive I–VI der Helikase Superfamilie II sind markiert.

Das argininreiche Motiv VI in HCV-NS3 – Interaktion mit Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen

Auf der Oberfläche von Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase, zwischen den Aminosäuren 1487 und 1500 des HCV Polyproteins findet sich ein argininreiches Motiv (Motiv VI der Superfamilie II Helikasen): Arg-Arg-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Gly-Arg-Arg-Gly-Ile-Tyr-Arg (siehe Abbildung 1-3). Die Funktion dieses Motivs bei der Helikaseaktivität besteht wahrscheinlich darin, die NTP-Hydrolyse mit Translokation und Entwindung zu koppeln (Kim et al. 1998, Lin und Kim 1999). Arbeiten unserer Arbeitsgruppe legen eine zusätzliche Rolle dieses Motivs in der Pathophysiologie der HCV-Infektion nahe. Ein Vergleich der Verteilung der basischen und hydrophoben Aminosäuren innerhalb dieser HCV-Sequenz mit denen der funktionellen Domänen der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und der Proteinkinase C (PKC) offenbarte hochgradige Ähnlichkeiten mit den autoinhibitorischen Pseudosubstratregionen der PKA und der PKC, die jeweils in den regulatorischen Domänen der Enzyme lokalisiert sind (siehe auch Abschnitt 3.1, S. 54).

Kurze synthetische Peptide mit der Sequenz des argininreichen Motivs, sowie nicht-physiologische NS3-Fragmente, die das Motiv enthalten inhibieren die katalytische Aktivität

von PKA und PKC *in vitro* (Borowski et al. 1996, Borowski et al. 1999c). Die Interaktion mit dem viralen Antigen führt auch zur Immobilisierung der PKC im zytosolischen Zellkompartiment und somit zur Inhibition der Assoziation mit spezifischen Rezeptorproteinen. Damit hat das virale Protein das Potential in wichtige Signalwege der infizierten Wirtszelle einzugreifen, um eine vorteilhafte Umgebung für den Erhalt und die Verbreitung der viralen Infektion zu schaffen. Dauerhafte Störungen der PKC-vermittelten Signaltransduktion, durch Tumorpromotoren oder virale Onkoproteine, können zur Entwicklung eines Tumorphänotyps führen (siehe Abschnitt 1.8, S.19). Die intermolekulare Interaktion von NS3 mit der Wirtszell-PKC könnte daher am Auftreten des HCV-assoziierten hepatozellulären Karzinoms beteiligt sein. Aus diesem Grund waren die weitere Aufklärung der Mechanismen der Wechselwirkung zwischen NS3 und PKC, sowie deren Langzeitauswirkung auf den Phänotyp der Zelle, Ziel dieser Arbeit.

1.6 Weitere Beteiligung von NS3 an der Pathophysiologie der HCV-Infektion

Zusätzlich zu seiner Schlüsselrolle bei der Virusreplikation und der Polyproteinprozessierung sind vielfältige Einflüsse von NS3 auf Zellfunktionen *in vitro* beschrieben worden. Die Expression von NS3 führt zur Transformation von Fibroblasten (Sakamuro et al. 1995, Zemel et al. 2001, Smirnova et al. 2006). In unserer Arbeitsgruppe wurden Hinweise auf die Hemmung der enzymatischen Aktivitäten und der Translokation der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und der Proteinkinase C (PKC) gefunden (siehe auch Abschnitt 1.5, S. 13). NS3 interagiert *in vitro* mit dem Tumorsuppressorprotein p53 (Ishido und Hotta 1998). Die Interaktion geht von einem in der NS3-Proteasedomäne gelegenen Sequenzbereich aus und stört die *trans*-aktivierende Funktion von p53 (Deng et al. 2006). Zudem wurde eine p53-abhängige Inhibition der p21^{waf1}-Promotoraktivität durch NS3 in NIH 3T3 Zellen beobachtet (Kwun et al. 2001). Das sind hinsichtlich einer möglichen Beteiligung von NS3 an der HCV assoziierten Karzinogenese wichtige Befunde. p53 ist ein zentraler Regulator der Apoptose und des Zellzyklus, der durch Stress-Signale wie DNA-Schädigung oder Hypoxie aktiviert wird (Vousden und Lu 2002). Aktiviertes p53 kann als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen regulieren, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Zudem führt die stabile Expression von NS3-Fragmenten in NIH 3T3 Zellen, wahrscheinlich p53-abhängig zu einer erhöhten Resistenz gegen Actinomycin-D-induzierte Apoptose (Fujita et al. 1996). Auch gibt es Hinweise darauf, dass NS3 die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) induziert, was u.a. zu DNA-Schädigung führen kann (Machida et al. 2006).

In jüngster Zeit sind wichtige Entdeckungen gemacht worden, die Mechanismen aufzeigen, über die NS3 dazu beitragen könnte, dass HCV dem angeborenen Immunsystem,

und meist auch der antiviralen Wirkung der Interferon-Therapie, entgeht. Die NS3/4A-Serinprotease inhibiert die IFN- β -Induktion durch Blockade des dsRNA-aktivierten retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-Pathways (Foy et al. 2005) und des toll-like Rezeptor 3 (TLR3)-Pathways (Li et al. 2005). Diese Befunde konnten durch Wiederherstellung der IFN-Induktion durch den NS3/4A-Proteaseinhibitor BILN-2061 funktional bestätigt werden (Foy et al. 2005). (Otsuka et al. 2005) führen die Inhibition der IFN- β -Induktion durch NS3 allerdings auf eine Interaktion des NTPase/Helikase-Anteils von NS3 mit der TANK-binding kinase 1 (TBK1) zurück, die eine entscheidende Rolle bei der TLR3-vermittelten IFN- β -Induktion spielt: TBK1 aktiviert den Transkriptionsfaktor IRF-3, der die IFN- β -Expression induziert. Der NTPase/Helikase-Anteil von HCV-NS3 scheint die IRF-3-Aktivierung zu unterbinden. Möglicherweise spielen mehrere Mechanismen *in vivo* eine Rolle.

1.7 Proteinkinase C

1.7.1 Charakterisierung und Klassifizierung

Die Proteinkinase C (PKC), eine Familie von Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen, wurde ursprünglich als Ca^{2+} /Phospholipid-abhängige Proteinkinase beschrieben (Ogawa et al. 1981) und wird heute in drei Subfamilien unterteilt. Diese unterscheiden sich u.a. in ihrer Struktur und ihrer Aktivierbarkeit durch Lipide und Ca^{2+} . Die cPKCs (conventional PKCs) benötigen für ihre Aktivierung Ca^{2+} , Diacylglycerol (DAG) oder TPA (siehe Abschnitt 1.7.5, S. 18) und saure Lipide wie Phosphatidylserin (PS). Die nPKCs (novel PKCs) sind durch DAG und saure Lipide aktivierbar, Die aPKCs (atypical PKCs) benötigen für ihre katalytische Aktivität allein saure Lipide. Alle PKC-Isoformen bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette, die strukturell in eine C-terminale katalytische und eine N-terminale regulatorische Untereinheit gegliedert ist. Die Untereinheiten sind über eine flexible „hinge“-Region miteinander verbunden. Die regulatorische Untereinheit enthält neben den Bindungsstellen für die allosterischen Aktivatoren wie PS, DAG und Ca^{2+} ein kurzes, argininreiches Motiv, die sogenannte autoinhibitorische Pseudosubstratregion, die durch Bindung der Substratbindungsstelle den inaktiven Zustand nichtaktivierter PKC konserviert (Newton und Johnson 1998). Abbildung 1-4 zeigt die Einteilung der PKC-Isoformen in die Subfamilien und ihre Domänenstruktur.

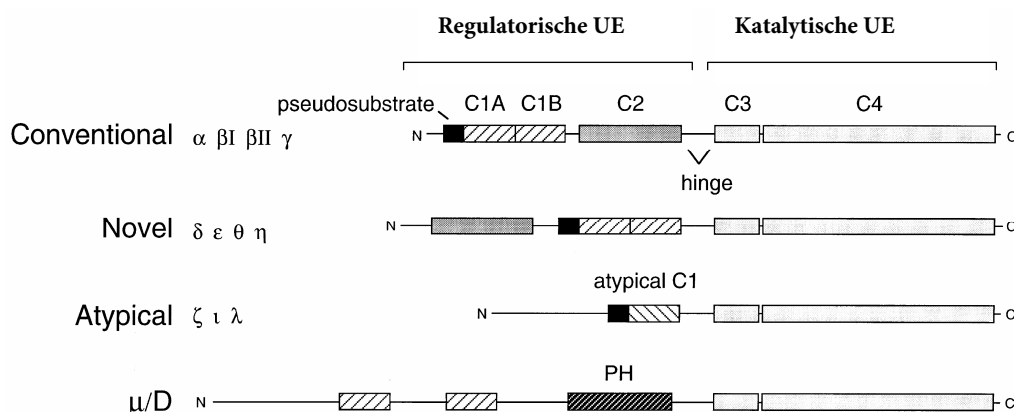


Abbildung 1-4. Domänenstruktur der PKC-Subfamilien. Alle PKC-Isoformen bestehen aus einer N-terminalen regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Untereinheit. Die C1-Domäne bindet DAG und Phorboltester, die C2-Domäne bindet anionische Lipide und in cPKCs Ca^{2+} . Die PH-Domäne bindet Phosphoinositide. Die C3-Domäne bindet ATP und die C4-Domäne das Peptidsubstrat. Bis auf PKC- μ besitzen alle PKC-Isoformen eine Pseudosubstratregion. Die Isozyme PKC- β I und PKC- β II sind Spleißvarianten, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden (Coussens et al. 1987). Die später entdeckte PKC- μ , deren Mausehomolog als Proteinkinase D (PKD) bezeichnet wird, besitzt im Gegensatz zu den übrigen Isoformen eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne und keine Pseudosubstratregion, kann aber wie die nPKCs mit DAG aktiviert werden (Newton und Johnson 1998). Sie wird heute als Mitglied der PKD-Familie klassifiziert (Rozenfurt et al. 2005). Die Mitglieder der Subfamilien sind links aufgeführt. Nach (Newton und Johnson 1998), modifiziert.

1.7.2 Regulation

Bis detaillierte Untersuchungen zur subzellulären Verteilung in verschiedenen Zelltypen vorlagen, wurde davon ausgegangen, dass nichtaktivierte PKC im Cytosol vorliegt und nach erfolgter Aktivierung zur Plasmamembran transloziert. Es zeigte sich jedoch, dass PKC-Isoformen in nahezu allen Zellkompartimenten zu finden sind (Liu und Heckman 1998). Die Aktivierung des Enzyms ist jedenfalls eng mit seiner Translokation zur partikulären Fraktion der Zelle gekoppelt (Mochly-Rosen et al. 1991, Janz et al. 1995), wo aktivierte PKC stabile Komplexe mit spezifischen membranständigen Rezeptoren, den sogenannten "receptors for activated C kinase" (RACKs) bildet (Mochly-Rosen et al. 1991, Ron und Mochly-Rosen 1995). Durch die RACK-Bindung wird die Kinase im aktiven Zustand konserviert und es kommt zur Substratphosphorylierung (Ron und Mochly-Rosen 1995).

Aktivität und intrazelluläre Lokalisation der PKC-Isoformen werden zudem durch Phosphorylierung reguliert. 1998 wurde die Proteinkinase PDK-1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1) als upstream-Kinase identifiziert. Die durch PDK-1 katalysierte Phosphorylierung der PKC-Isoformen an drei konservierten Positionen ist für die katalytische Aktivität und die korrekte intrazelluläre Lokalisation erforderlich (Dutil et al. 1998, Chou et al. 1998, Le Good et al. 1998). Die Aktivität der PKC-Isoformen wird zusätzlich über den

Phosphorylierungsstatus weiterer Ser/Thr-Reste moduliert, woran weitere Proteinkinasen und wahrscheinlich auch Phosphatasen beteiligt sind (Newton 2001). Obwohl alle 11 PKC-Isoformen eine ähnliche Struktur aufweisen, unterscheiden sie sich in ihrer Responsivität auf allosterische Aktivatoren (Azzi et al. 1992, Marquez et al. 1992), ihrer Affinität für die Substrate (Kiley et al. 1996), sowie ihrer Lokalisation (Goodnight et al. 1995, Wang et al. 1995). Zudem wird in jeder Gewebs- und Zellart ein individuelles Muster an Isoformen exprimiert (Furness et al. 2006).

1.7.3 Die Pseudosubstratregion

Die intramolekulare Interaktion zwischen Pseudosubstratregion und Substratbindungsstelle, die zur Autoinhibition nichtaktivierter PKC führt, ist im Kontext dieser Arbeit sehr wichtig und soll hier detaillierter erläutert werden. Die Pseudosubstratregion beinhaltet eine Substrat-Konsensus-Sequenz, die jedoch an der potentiell phosphorylierbaren Position keinen Phosphat-Akzeptor (Serin oder Threonin), sondern einen konservierten, nichtphosphorylierbaren Aminosäurerest aufweist (House und Kemp 1987). Sie unterbindet die katalytische Aktivität der PKC autoinhibitorisch durch Bindung an die Substratbindungsstelle in der C4-Region der katalytischen Domäne (Newton 1995).

Durch die Bindung der Aktivatoren wird diese autoinhibitorische Wechselwirkung aufgehoben, wodurch die Bindung und Phosphorylierung von Substratproteinen möglich wird. Charakteristisch für das Enzym ist also die Dislokation der regulatorischen Untereinheit aus dem katalytischen Zentrum als Voraussetzung für seine Aktivierung. Gezielte Mutagenese der Pseudosubstratregion führt zu Effektor-unabhängiger Aktivität (Pears et al. 1990) und synthetische Peptide mit der Aminosäuresequenz der autoinhibitorischen Pseudosubstratdomäne, so genannte "Pseudosubstrate" inhibieren die enzymatische Aktivität der PKC kompetitiv (House und Kemp 1987). Obwohl die röntgenkristallografische Strukturaufklärung vollständiger PKC-Isoformen bisher nicht gelungen ist, lassen sich durch Modellstudien mit gelösten Strukturen einzelner PKC-Domänen und Proteinen mit starker PKC-Homologie strukturelle Voraussagen über die Interaktion zwischen Pseudosubstratregion und Substratbindungsstelle machen. Nach (Orr und Newton 1994b) wird die Interaktion durch eine Reihe saurer Aminosäuren der C4-Region der katalytischen Untereinheit vermittelt, die eine Bindungstasche für die basischen Aminosäurereste der Pseudosubstratregion bilden.

1.7.4 Funktion

Funktionell nehmen Kinasen der PKC-Familie Schlüsselpositionen bei der Regulation einer Vielzahl zellulärer Funktionen ein, die von so grundlegenden Prozessen wie der Zellzykluskontrolle bis zu komplexen neurologischen Vorgängen wie Gedächtnisfunktionen reichen (Mellor und Parker 1998). Die Regulierbarkeit durch Ca^{2+} und Diacylglycerol (DAG) weist die cPKCs und die nPKCs als Bestandteile von Signalübertragungswegen aus, in deren Verlauf Phospholipase C (PLC) aktiviert wird. Die Aktivierung der PLC erfolgt entweder über G Protein gekoppelte Rezeptoren oder über Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK) (Krauss 1997). Die große Zahl verschiedener PKC-Isoformen legt unterschiedliche Funktionen nahe. Da die einzelnen Isoformen jedoch keine gravierenden Unterschiede in der Substratphosphorylierung *in vitro* aufweisen (Jaken 1996), ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Funktionen der Isoformen hauptsächlich auf spezifischer Aktivierung und Kompartimentierung basieren. Zu den *in vivo* relevanten PKC-Substraten zählen u.a. Zytoskelettproteine (Vinculin, Talin, Vimentin), Membranproteine (MARCKS, EGFR) und Kernproteine (Nucleolin) (Ivaska et al. 2005, Parker und Murray-Rust 2004) sowie signalling-Enzyme wie z.B. Proteinkinasen (Brandlin et al. 2002) und Phospholipasen (Becker und Hannun 2005).

Es häufen sich Hinweise darauf, dass Kinasen der PKC-Familie Schlüsselpositionen bei der Regulation kritischer Zellzyklusübergänge einnehmen. Dazu gehören Ein- und Austritt in den Zellzyklus sowie die G_1 und G_2 Kontrollpunkte. Der Einfluss von PKC auf die Zellzyklusübergänge kann sowohl fördernd als auch hemmend sein, abhängig vom vom Zeitpunkt der PKC-Aktivierung im Verlauf des Zellzyklus und von den beteiligten Isoformen (Black 2000). Als wichtigster Mechanismus für die PKC-vermittelte Hemmung der Zellzyklus-Progression gilt die Induktion der Expression von $p21^{\text{waf1}}$, einem Protein mit inhibitorischer Wirkung auf Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), durch deren sequentielle Aktivierung die Zellzyklus-Progression reguliert ist. Die molekularen Vorgänge, durch die es zur PKC-vermittelten Induktion von $p21^{\text{waf1}}$ kommt scheinen vielfältig und komplex zu sein und sowohl auf der Ebene der Transkription (Zezula et al. 1997, Akashi et al. 1999, Zeng und el-Deiry 1996) als auch posttranskriptionell (Zezula et al. 1997, Akashi et al. 1999, Todd und Reynolds 1998) stattzufinden. Die Mechanismen der PKC-vermittelten positiven Regulation des Zellzyklus sind weitgehend ungeklärt. In anbetracht ihrer wichtigen Rolle bei der Zellzykluskontrolle überrascht es nicht, dass die Fehlregulation von Kinasen der PKC-Familie mit Karzinogenese-prozessen assoziiert wird (siehe Abschnitt 1.8, S. 19).

1.7.5 Phorbolster – wichtige Hilfsmittel bei der Aufklärung der PKC-Funktion

Eine für die Identifizierung und Charakterisierung der PKC-Familie ungemein wertvolle Eigenschaft ist die kurzfristige, spezifische Aktivierbarkeit der meisten Isoformen durch tumorpromovierende Phorbolster wie 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), auch

bekannt als Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA). Phorbol-ester und Diacylglycerol (DAG) besetzen die gleiche Bindungsstelle und bewirken, durch die Ausbildung einer hydrophoben Oberfläche, die Erhöhung der Membranaffinität der PKC (Zhang et al. 1995). Phorbol-ester kompetieren mit DAG und können DAG als cPKC/nPKC-Aktivator *in vitro* und *in situ* ersetzen – sie sind also funktionelle DAG-Analoga.

TPA bewirkt aber eine im Vergleich mit DAG etwa hundertfach stärker ausgeprägte Steigerung der Membranaffinität der PKC, so dass TPA zu einer viel stärkeren PKC-Aktivierung führt. TPA besitzt eine so hohe Affinität zu cPKCs und nPKCs, dass es allein, auch in Abwesenheit saurer Lipide (PS), die Membrabassoziaton dieser Enzyme herbeiführen kann (Mosior und Newton 1996). Die PKC-Aktivierung durch Phorbol-ester kehrt sich jedoch nach einiger Zeit in ihr Gegenteil um. Nach längerer TPA-Behandlung werden die TPA-stimulierbaren PKC-Isoformen proteolytisch abgebaut (Young et al. 1987), was zum kompletten Verlust der Aktivität der betroffenen Isoformen führen kann (Lu et al. 1998).

Die stark tumorpromovierende Wirkung der Phorbol-ester wird erst nach längerer Exposition beobachtet und ist wahrscheinlich auf die Reduktion bestimmter PKC-Aktivitäten zurückzuführen (siehe Abschnitt 1.8.1 und 1.8.2, S. 21). Da auch Phorbol-ester-Rezeptoren beschrieben worden sind, die nicht zur PKC-Familie gehören (Kazanietz 2000, Brose und Rosenmund 2002), müssen Experimente, in denen eine TPA-Behandlung zur artifiziellen PKC-Regulation genutzt wird, entsprechend kritisch betrachtet werden.

1.8 Die Rolle von Kinasen der PKC-Familie in der Karzinogenese

Die in den frühen 1980er Jahren gemachte Entdeckung, dass PKCs hochaffine Rezeptoren für tumorpromovierende Phorbol-ester sind (Castagna et al. 1982, Kikkawa et al. 1983, Leach et al. 1983) war der erste klare Hinweis auf eine Beteiligung von Proteinkinasen an Karzinogenese-prozessen. Auch wegen der funktionalen Beteiligung von Mitgliedern der PKC-Familie Mitglieder der PKC-Familie an der zellulären Regulation von Proliferation, Morphologie und Differenzierung (Abraham et al. 1998, Toker 1998, Black 2000), sind PKCs seit langem im Blickfeld der Krebsforschung. In Übereinstimmung mit ihrer wichtigen Rolle bei diesen im Zusammenhang mit neoplastischer Transformation und Karzinogenese relevanten Prozessen, wurden Hinweise auf Fehlregulation von PKCs in Tumorzellen gefunden. Die PKC- α -Expression ist in der Mehrzahl der Adenokarzinome des Dickdarmes reduziert (Verstovsek et al. 1998, Kahl-Rainer et al. 1996), was eine Tumorsuppressorfunktion für PKC- α nahe legt, die auch für andere PKC-Isoformen diskutiert wird. So führt die Überexpression bzw. die Aktivierung von PKC- α (Abraham et al. 1998, Frey et al. 2000), PKC- β II (Choi et al. 1990) oder PKC- δ (Perletti et al. 1999, Cerda et al. 2006) in Colon-Karzinom-Zelllinien oder nicht transformierten Darmepithelzellen zu Wachstumshemmung, und reduziert die Tumori-

genizität der transformierten Zellen in Nacktmäusen. Zudem führt PKC-Inhibition in mehreren Zellkultur-Systemen zu Tumorpromotion – zwei dieser Systeme werden im Folgenden erläutert (Abschnitte 1.8.1 und 1.8.2).

Verschiedene *in vitro* Untersuchungen legen nahe, dass wahrscheinlich besonders den nPKC-Isoformen δ und ϵ besondere Bedeutung bei Karzinogeneseprozessen zukommt. Dabei deutet vieles darauf hin, dass PKC- δ als Tumorsuppressor fungiert. PKC- δ wirkt in verschiedenen Zelllinien anti-proliferativ und proapoptotisch (Jackson und Foster 2004). Die Hemmung der Expression oder der enzymatischen Aktivität von PKC- δ begünstigt einen transformierten Phänotyp (Heit et al. 2001, Hornia et al. 1999, Perletti et al. 1999) und führt in 3Y1-Rattenfibroblasten, die das c-src-Protooncogen überexprimieren zu Tumorpromotion (Lu et al. 1997), siehe hierzu auch Abschnitt 1.8.2. Desweiteren wirkt PKC- δ hemmend auf die Zellzyklus-Progression (Griner und Kazanietz 2007).

Von PKC- ϵ gehen *in vitro* dem entgegengesetzte Wirkungen aus. So stellt *Pkce* in Epithelialzellen und Fibroblasten ein transformierendes Onkogen dar, dessen Überexpression in verschiedenen Zellkultur-Modellen Proliferationssteigerung, matrixunabhängiges Wachstum und Tumorigenizität der Zellen in Nacktmäusen bewirkt (Cacace et al. 1996, Mischak et al. 1993). Die Überexpression von PKC- ϵ in Lungentumorzellen induziert die Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges sowie die Expression von BCL-XL und XIAP, was in einer anti-apoptotischen Wirkung resultiert. Zudem sind Melanomzellen mit niedriger PKC- ϵ Expression für TRAIL-induzierte Apoptose sensibilisiert (Gillespie et al. 2005).

PKC- δ ist also generell mit apoptotischer und antimitogener, PKC- ϵ hingegen mit anti-apoptotischer und mitogener Aktivität assoziiert, wie in Abbildung 1-5 zusammenfassend dargestellt ist. Diese Befunde, und mithin die PKC-Isoformen δ und ϵ , sind im Kontext der Karzinogenese von grosser Relevanz, weil die Störung des Verhältnisses von apoptotischen zu mitogenen Signalen ein Hauptmerkmal neoplastisch transformierter Zellen ist.

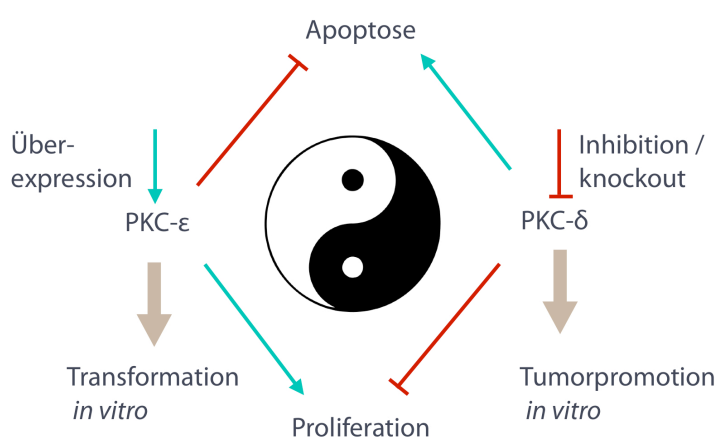


Abbildung 1-5. Komplementäre Funktionen von PKC- δ und PKC- ϵ bei der Survival-Regulation. Daten aus *in vitro* Studien deuten stark auf gegensätzliche Funktionen von PKC- δ und PKC- ϵ bei der Regulation von Proliferation und Apoptose hin. Grüne Pfeile symbolisieren Aktivierung, rote Pfeile Hemmung. Nach (Griner und Kazanietz 2007).

1.8.1 Tumorpromotion durch PKC-Inhibition im JB6-Modell

Nach dem Mehrstufenmodell der Karzinogenese bilden sich Tumoren nach mehreren, aufeinanderfolgenden Runden von Mutation (Initiation) und klonaler Expansion der mutierten Zellen (Promotion) (DiGiovanni 1992). Substanzen, die die Proliferation unvollständig transformierter Zellen stimulieren, werden als Tumorpromotoren bezeichnet. Tumorpromotoren bewirken die Zunahme der Anzahl partiell transformierter Zellen, und somit der Wahrscheinlichkeit für die Ansammlung weiterer Mutationen, was die Karzinogenese beschleunigt (Yuspa und Poirier 1988).

JB6-Zellen sind murine Epidermalzellen, die ein gut etabliertes Modell für die Untersuchung von tumorpromotor-induzierter neoplastischer Transformation *in vitro* darstellen (Colburn et al. 1980). In bestimmten JB6-Zellklonen induzieren tumorpromovierende Phorbolster (siehe Abschnitt 1.7.5, S. 18) wie 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) und andere Tumorpromotoren irreversibel die Fähigkeit zu matrixunabhängiger Proliferation in Soft Agar (anchorage independent growth) (Colburn et al. 1979), sowie die Fähigkeit in BALB/c-Mäusen Tumoren zu formen (Colburn et al. 1985). Der Phänotyp „Anchorage independence“ kennzeichnet eine abgeschlossene neoplastische Transformation. Die induzierbaren JB6-Klone, zu denen auch der in dieser Arbeit verwendete Klon JB6-Cl41-5a zählt, werden als P+ (Tumorpromotor-sensitiv) bezeichnet. Die tumorpromotorresistenten JB6 Zellen werden P- genannt. Eine Inhibition der zellulären PKC-Aktivität durch selektive Inhibitoren, oder durch langfristige Behandlung mit TPA, induziert in P+ JB6-Zellen einen Tumorphänotyp (Kischel et al. 1989). In dieser Arbeit sollte durch die Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit von mit NS3-Konstrukten transfizierten JB6-Cl41-5a-Zellen in Soft Agar überprüft werden, ob NS3 tumorpromovierende Effekte verursacht.

1.8.2 Tumorpromotion in durch Inhibition von PKC- δ in C-Src-überexprimierenden Zellen

In 3Y1-Rattenfibroblasten, die das c-src-Protooncogen überexprimieren, induzieren PKC-Inhibitoren sowie der tumorpromovierende Phorbolster 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), dass bei längerer Inkubation zum Abbau von PKC- δ führt (Lu et al. 1998), irreversibel die Fähigkeit zu matrixunabhängiger Proliferation in Soft Agar (Lu et al. 1997). Die Ausbildung dieses Phänotyps ist auf die Hemmung, bzw. den Abbau von PKC- δ zurückzuführen (Lu et al. 1997). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die im *in vitro* PKC-Assay beobachtete PKC- δ -Inhibition durch NS3 in c-Src überexprimierenden, mit NS3-Konstrukten transfizierten 3Y1-Rattenfibroblasten zur Induktion von Koloniebildung in Soft Agar ausreicht.

1.9 Die Interaktion viraler Proteine mit PKC-Signalwegen

Viele virale Proteine sind dazu in der Lage, zelluläre Funktionen spezifisch zu beeinflussen, um eine vorteilhafte Umgebung für den Erhalt und die Verbreitung der viralen Infektion zu schaffen. Bekannt sind virale Proteine, die zur Störung der Wirtsimmunität führen oder Zytoskelett-Funktionen zum intrazellulären Kapsidtransport nutzbar machen (Alcami und Koszinowski 2000, Cudmore et al. 1995).

In Anbetracht der zentralen Rolle von PKC-Isoenzymen in essentiellen zellulären Signalwegen ist es nicht verwunderlich, dass mehrere Beispiele für Störung der PKC-Funktion durch virale Proteine gefunden wurden. Das HIV-Protein Nef interagiert mit PKC- θ und inhibiert die Translokation der Kinase vom Cytosol zur Plasmamembran (Smith et al. 1996). Zudem wurde eine Protein-Protein Interaktion zwischen Nef und dem PKC-Rezeptorprotein RACK1 beschrieben (Gallina et al. 2001). Derartige Störungen von PKC-Funktionen könnten an der mit der HIV-Infektion assoziierten Beeinträchtigung von T-Zell-Effektorfunktionen beteiligt sein. Tardif et al. beobachteten eine gestörte Aktivierung und Translokation von PKC in Epstein-Barr Virus infizierten Monozyten, die durch das EBV-Protein ZEBRA verursacht werden (Tardif et al. 2002). Volmer et al. beschreiben eine verminderte intrazelluläre PKC-Aktivität in Neuronen, die mit dem Borna disease virus (BDV) infiziert wurden (Volmer et al. 2006). Die Inhibition kommt hier vermutlich nicht wie in den beiden o. g. Fällen durch eine Störung der PKC-Aktivierung oder -Translokation zustande, sondern durch Konkurrenz des BDV-Phosphoproteins mit den neuronalen PKC-Substraten MARCKS und Munc18. Muranyi et al. 2002 haben eine weitere Wechselwirkung zwischen einem viralen Protein und zellulärer PKC beschrieben (Muranyi et al. 2002). Grosse DNA-Viren wie das Cytomegalovirus (CMV) replizieren ihr Genom im Zellkern und benötigen sowohl den Kern als auch das Cytoplasma zum Zusammenbau reifer Viruspartikel. Subvirale Partikel müssen also die Kernhülle passieren, deren Poren aber eigentlich viel zu eng sind. Das Cytomegalovirus Protein M50/p35 bewirkt die Translokation zellulärer PKC zur inneren Kernmembran. Dort kommt es daraufhin zur Phosphorylierung und der anschließenden Auflösung von Kernlamina, wodurch die Kernhülle für die subvirale Partikel durchlässig wird, so dass diese ins Cytoplasma gelangen.

1.10 Zielsetzung

Dieser Arbeit lag die Intention zugrunde, einen potentiellen Mechanismus der molekularen Pathogenese der HCV-Infektion weiter aufzuklären. Ausgehend von der Beobachtung, dass Fragmente der NS3 NTPase/Helikase PKC inhibieren können (Borowski et al. 1999c, Borowski et al. 2000), sollte zunächst geklärt werden, ob auch das NS3 NTPase/Helikase Holoenzym zur PKC-Inhibition *in vitro* in der Lage ist. Alle 11 PKC-Isoformen sollten dabei

hinsichtlich ihrer Inhibierbarkeit durch rekombinantes NS3 untersucht werden. Zudem sollte für alle PKC-Isoformen überprüft werden, ob die Inhibition spezifisch durch Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen der argininreichen Region HCV(1487–1500) und der PKC zustandekommt.

Bei der Bearbeitung dieser Fragestellungen musste dem Umstand Rechnung getragen werden, dass die NS3 NTPase/Helikase eine NTPase-Aktivität aufweist und die resultierende ATP-Hydrolyse mit der PKC-Aktivitätsmessung im radiometrischen Assay interferiert. Daher sollten zwei verschiedene experimentelle Ansätze zur Messung der ATPase-unabhängigen PKC-Inhibition durch die NS3 NTPase/Helikase verfolgt werden. Die kinetischen Parameter der PKC-Inhibition sollten unter Verwendung einer NTPase-defizienten Mutante ermittelt werden. In einem nichtradioaktiven PKC-Assay, in dem die ATP-Konzentration in den Ansätzen durch ein ATP regenerierendes System konstant gehalten wird, sollte dann die Inhibition einer PKC-Isoform durch wildtyp NS3 NTPase/Helikase gemessen werden. Stimmt die hier gemessene Inhibition mit den Parametern für die Mutante überein, kann davon ausgegangen werden, dass die Punktmutation keinen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen der argininreichen Region HCV(1487–1500) und der PKC, und damit die PKC-Inhibition hat.

Zur Klärung der Relevanz der *in vitro* gemessenen PKC Inhibition durch NS3 für die Situation in intakten Zellen sollten parallel NIH 3T3 Zellen stabil mit verschiedenen NS3-Konstrukten transfiziert, und ihre intrazelluläre PKC-Aktivität bestimmt werden.

Die zentrale Rolle der PKC an der Regulation von Differenzierungsprozessen und Zellproliferation legte eine mögliche Beteiligung von NS3 am Auftreten des HCV assoziierten hepatozellulären Karzinoms durch Inhibition der zellulären PKC-Aktivität *in vivo* nahe. PKC-Inhibition kann zu Tumorpromotion führen (Kischel et al. 1989, Lu et al. 1997) und es gibt Hinweise auf PKC-Fehlregulation in Tumorzellen (Verstovsek et al. 1998, Kahl-Rainer et al. 1996). Aus diesem Grund sollten an den stabil transfizierten NIH 3T3 Zellen, sowie an weiteren, mit NS3-Konstrukten transfizierten Zelllinien zudem Untersuchungen von zellulären Eigenschaften durchgeführt werden, die im Zusammenhang mit neoplastischer Transformation stehen. So sollte die Hypothese geprüft werden, dass NS3 durch die Inhibition zellulärer PKC-Aktivität zu Tumorpromotion oder neoplastischer Transformation führen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Stämme für die Klonierung und Vermehrung von Plasmiden

XL1-Blue (E. coli)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZΔM15Tn10 (Tet^r)] (Bullock et al. 1987) (Stratagene)

DH5α (E. coli)

supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (Invitrogen)

TOP 10F'(E. coli)

F [lacIq Tn10 (tetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80 lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(strR) endA1 nupG (Invitrogen)

Stämme für die Proteinexpression

BL21(DE3) (E. coli)

E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal (DE3)(Stratagene)

BL21-(DE3) Star (E. coli)

E. coli B F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal⁻ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr] (Invitrogen)

2.1.2 Enzyme

Für molekularbiologische Arbeitstechniken eingesetzte Enzyme

Gateway® LR Clonase™ Enzym Mix	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen
Turbo Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene

Restriktionsendonukleasen wurden von Fermentas oder von New England Biolabs erworben.

Proteinkinase C

Rattenhirn PKC wurde von der Firma Calbiochem bezogen, rekombinante Proteinkinase C Isoenzyme von der Firma ProQinase (Freiburg). Die codierenden Sequenzen der Enzyme entstammen den folgenden Spezies:

Isoform	Spezies
α	Maus
βI	Mensch
βII	Mensch
γ	Ratte
δ	Ratte
ε	Maus
η	Maus
θ	Mensch
ι	Mensch
μ	Mensch
ζ	Mensch

2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Alexis Biochemicals, Aldrich, Biomol, Biorad, Fluka, GE Healthcare, Hartmann Analytic, Invitrogen, Merck, MP Biomedicals, Pierce, Serva, Sigma, Roche und Roth bezogen.

2.1.4 DNA-Molekulargewichtsstandards

MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready to use	Fermentas
1 kb DNA Leiter GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
100 bp DNA Leiter GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas

2.1.5 Protein-Molekulargewichtsstandards

Molecular Weight Marker for proteins (# 69811) Sigma-Aldrich

2.1.6 Kits

Champion™ pET102 Directional TOPO® Expression Kit	Invitrogen
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
NucleoBond AX	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
PepTag® Assay for Non-Radioactive Detection of Protein Kinase C	Promega
TransIT®- 3T3 Transfection Kit	Mirus

2.1.7 Kommerziell erhältliche Plasmide

pEGFP-C2	Clontech
pENTR3C	Invitrogen
pEF5/FRTV5-Dest	Invitrogen
pOG44	Invitrogen
pET102/D-TOPO®	Invitrogen
pET16b	Novagen

2.1.8 Zelllinien

3Y1-c-Src

c-Src überexprimierende 3Y1-Rattenfibroblasten, zur Verfügung gestellt von David A. Foster
Department of Biological Sciences, Hunter College of The City University of New York

Flp-In™-3T3:

Maus (NIH/Swiss), embryonale Fibroblasten mit singulärer FRT-Erkennungssequenz.
ATCC Nummer der parentalzelle NIH/3T3: CRL-1658
Bezogen von Invitrogen

JB6 Cl41-5a:

Maus (BALB/c), etabliert aus neonatalen Epidermalzellen.
ATCC Nummer: CRL-2010, bezogen von LGC-Promochem

2.1.9 Medien und Zusätze für eukaryotische Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) mit GlutaMax™	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) Phosphatfrei	Invitrogen
Minimum Essential Medium (MEM)	Invitrogen
Donor Bovine Serum	Invitrogen
Foetal Bovine Serum	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin Solution (5000:5000) liquid	Invitrogen
Hygromycin B	Invitrogen, Cayla
Zeocin	Invitrogen
Trypsin-EDTA, liquid: 0,05% Trypsin; 0,53 mM EDTA × 4 Na ⁺	Invitrogen

2.1.10 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von MWG bezogen.

Klonierungsprimer

NS3-D2FW	5' -GGGAATTCCATATGAACATCGAGGAGGTTGCTCTG-3'
NS3-D2RV	5' -CGGCTCGAGTCATGCCACAAATCTGTAGATGCC-3'
HCVHH-pENTR3C forward	5' -ATCGGATCCGATATGGTGGACTTTATCCCTGTGGA-3'
HCVHH-pENTR3C reverse	5' -GATTGAATTCCTTGCTCGTGACGACCTCCAGGT-3'
HCVNs3D2pENTR3Cfw	5' -ATCGGATCCGATATGGACATCGAGGAGGTTGCTCTG-3'
HCVNs3D2pENTR3Crv	5' -GATTGAATTCCTTGCCACAAATCTGTAGATGC-3'
EGFPpENTR3Cfw	5' -ATCGGATCCC GCCACCATGGTGAGCAAGG-3'
EGFPpENTR3Crv	5' -GATTGAATTCCTTCTGTACAGCTCGTCCATGC-3'
NS3h-pET102D forward	5' -CACCGTGGACTTTATCCCTGTGGA-3'
NS3h-pET102D-reverse	5' -TTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCTGCTCGTGACGAC CTCCAGGT-3'

Mutageneseprimer

NS3D2QC1fw	5' -GTGATAGACTGCAATACGTGTCTTGACCCTACCTTCACCATTG-3'
NS3D2QC1rv	5' -CAATGGTGAAGGTAGGGTCAAGACACGTATTGCAGTCTATCAC -3'
NS3D2QC2fw	5' -GCAATACGTGTCTTGACCCTACCTTCCCCAGGATGCTGTCTCC-3'
NS3D2QC2rv	5' -GGAGACAGCATCCTGGGGGAGGGTAGGGTCAAGACACGTATTGC-3'
NS3-D1316Afw	5' -GCTTATGACATAATAATTTGTGcCGAGTGCCACTCCACGG-3'
NS3-D1316Arv	5' -CCGTGGAGTGGCACTCGgCACAAATTATTATGTCATAAGC-3'
NS3-C1318AH1319Afw	5' -CATAATAATTTGTGACGAGgCgCCTCCACGGATGCCACATCC-3'
NS3-C1318AH1319Arv	5' -GGATGTGGCATCCGTGGAGgCgCCTCGTCACAAATTATTATG-3'

Sequenzierprimer

TrxFus forward	5' -CAGGTTAGCGTCGAGGAA-3'
T7 fw	5' -TCCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
T7 rv	5' -TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'
Seq1	5' -TGAGTCTATGGAAACTACCA-3'
Seq2	5' -GTCCTGGACCAAGCGGAGAC-3'

2.1.11 Software*Software für die Strukturvorhersage und Darstellung von Proteinen*

Die Vorhersage der dreidimensionalen Struktur von Proteinen wurde mit SWISS MODEL (Schwede et al. 2003) durchgeführt. Ribbondiagramme wurden mit dem Swiss-PdbViewer (Guex und Peitsch 1997) erstellt und mit POV-Ray (POV-Ray-Team 2004) gerendert.

Software zur Auswertung von Autoradiogrammen (PhosphorImager-Scans)

ImageQuant 5 (Molecular Dynamics)

Software für die Datenanalyse

Prism 4 (GraphPad), Excel (Microsoft)

2.2 Mikrobiologische Methoden**2.2.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli***

E. coli Kulturen wurden aus einzelnen Klonen gezüchtet.

*Für die Kultivierung von *E. coli* verwendete Medien*

LB-Flüssigmedium 10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 ad 1000 ml ddH₂O, pH 7,2 (Einstellung mit NaOH)

LB-Agarplatten 4 g Bacto-Trypton
 2 g Hefeextrakt
 6 g Bacto-Agar
 ad 400 ml ddH₂O

Antibiotika

Antibiotika wurden in den in (Sambrook et al. 1989) angegebenen Konzentrationen zugegeben. Alle Medien wurden vor dem Zusatz von Antibiotika oder anderen Zusätzen autoklaviert und auf ca. 45 °C abgekühlt.

2.2.2 Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli* Zellen

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml Vorkultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Dann wurde die Kultur für 15 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (15 min bei 4 °C und 2000 rpm im GSA-Rotor). Das Pellet wurde in 33,5 ml eiskaltem RF I-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min bei 4 °C und 2000 rpm im SS34-Rotor) wurde das Pellet in 8 ml eiskaltem RF II-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die *E. coli* Zellen wurden zu 100 µl in 1,5 ml Eppendorf-Tubes aliquotiert und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Verwendete Lösungen

RFI-Puffer: 100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ * 4 H₂O
30 mM K-Acetat
10 mM CaCl₂ * 2 H₂O
15% Glycerol
pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern

RFII-Puffer: 10 mM MOPS (pH 6,8)
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ * 2 H₂O
15% Glycerol
pH 6,8 mit Essigsäure einstellen,
sterilfiltrieren und bei 4°C lagern

2.2.3 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von chemisch transformationskompetenten *E. coli* Zellen wurde die Methode nach (Hanahan 1983) durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (100 µl) für 15 min auf Eis aufgetaut. Ein vollständiger Ligationsansatz (20 µl), ein Fünftel (10 µl) eines *QuikChange* Ansatzes oder 100 ng Plasmid-DNA zur Retransformation wurden zu den Zellen gegeben und die Ansätze wurden für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach

einem 1 minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurde je 1 ml LB-Medium hinzugefügt und die Ansätze wurden für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Aliquots der Ansätze auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmid-DNA-Präparation

Miniprep

Plasmid-DNA-Präparationen in kleinem Maßstab wurden aus 5 ml *E. coli* Kultur mit dem „NucleoSpin® Plasmid Kit“ (Macherey-Nagel) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Midiprep

Plasmid-DNA-Präparationen in mittlerem Maßstab wurden aus 30–100 ml *E. coli* Kultur mit dem „NucleoBond AX Kit“ (Macherey-Nagel) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

2.3.2 DNA-Fällung mit Ethanol

Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt und gut gemischt. Nach Zugabe des 2,5 fachen Volumens abs. Ethanol und erneutem Mischen wurde die Lösung für 0,5 bis 2 h bei –20 °C gelagert. Nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (30 min bei 14000 × g) wurde der Überstand abgenommen und 1 Volumen 70% Ethanol zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 14000 × g) wurde der Überstand verworfen, das Pellet für ca. 10 min an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

2.3.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung von DNA aus proteinhaltigen Lösungen (z.B. nach Restriktionsverdau) wurde die Lösung auf ein Volumen von 200 µl gebracht und das gleiche Volumen Phenol (Roth) zugegeben. Nach vortexen und Zentrifugation (5 min bei 14000 × g) wurde die obere, DNA-haltige Phase in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (Roth) versetzt, gevortext und zentrifugiert (5 min bei 14000 × g). Die obere Phase wurde abgenommen und in einem frischen Eppendorfgefäß mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (Roth) versetzt und gevortext. Nach Zentrifugation (5

min bei $14000 \times g$) wurde die DNA aus der oberen Phase in einem frischen Eppendorfgefäß durch Ethanolfällung (s.o.) präzipitiert.

2.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. 1 OD_{260 nm} entspricht einer Konzentration von ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm ist ein Indikator für die Reinheit der DNA und ist bei einer reinen DNA-Lösung >1,8. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigung mit Proteinen hin.

2.3.5 Restriktionsverdau von DNA

Analytische und präparative Ansätze zum Restriktionsverdau wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen in möglichst kleinem Volumen durchgeführt. Für analytische Ansätze wurden DNA-Mengen von 0,2–1 µg und für präparative Ansätze 0,5–2 µg DNA eingesetzt. Pro µg DNA wurden 2–10 u Restriktionsendonuklease verwendet. Doppelverdau von DNA mit zwei Restriktionsendonukleasen wurde in kompatiblen Puffern durchgeführt.

2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligationen von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Für eine Ligation wurden 300 ng Vektor mit der dreifachen Stoffmenge Insert mit Ligasepuffer und 0,5 µl (2,5 u) T4-DNA Ligase (Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

2.3.7 Gerichtete TOPO®-Klonierung (*directional TOPO® cloning*) (Invitrogen)

Durch gerichtete TOPO®-Klonierung (*directional TOPO® cloning*) lassen sich blunt-end-PCR-Produkte gerichtet in Vektoren klonieren. Die Methode basiert auf der Entdeckung, dass doppelsträngige DNA gerichtet mit Oligonukleotiden ligiert werden kann, die an Topoisomerase gebunden sind (Cheng und Shuman 2000). Dazu wird ein forward-primer für die PCR designt, der am 5'-Ende die 4 Basen Sequenz (CACC) enthält. Der in dem „Champion™ pET102 Directional TOPO® Expression Kit“ von Invitrogen enthaltene Vektor pET102/D-TOPO® ist bereits linearisiert und besitzt am Topoisomerasegebundenen 3'-Ende des zur Expressionsrichtung komplementären Stranges einen GTGG-Überhang. Dieser Überhang bindet das CACC-Ende des PCR-Produktes und ermöglicht so die gerichtete Klonierung gemäß dem Mechanismus nach (Cheng und Shuman 2000).

Die Durchführung der Klonierungen erfolgte nach den Angaben im Protokoll des Herstellers. Für die Transformation wurden die im Kit enthaltenen chemisch kompetenten TOP10 *E.coli* Zellen verwendet. Die Bakterien wurden auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert, über Nacht kultiviert und mittels PCR auf den Erfolg der Klonierung hin überprüft. Dazu wurden die gewachsenen Kolonien in 20 µl ddH₂O suspendiert und für 10 min bei 94 °C inkubiert. Mit je 1 µl Suspension wurde eine PCR mit den Primern „TrxFus forward“ und „T7 Term“ durchgeführt. So konnte überprüft werden, ob ein Insert von der erwarteten Grösse im Vektor enthalten war. Die Integrität der erhaltenen Plasmide wurde durch Sequenzierung überprüft.

2.3.8 Das Gateway® Cloning System (Invitrogen)

Bei der Gateway-Klonierung werden DNA-Segmente über ortsspezifische Rekombination zwischen verschiedenen Plasmiden transferiert. Eine zur Gateway-Klonierung genutzte Rekombinationsreaktion ist die „LR-Reaktion“. Sie ermöglicht den schnellen Transfer einer Gensequenz, z.B. in einen Expressionsvektor, ohne dass dafür Restriktionsverdau und Ligation durchgeführt werden müssen. Ein Vorteil des Gateway® Systems ist die Möglichkeit den *entry clone* mit verschiedenen *destination vectors* zu rekombinieren, um sehr schnell den gewünschten Expressionsvektor zu erhalten. Die klonierte cDNA ist im *entry clone* von attL „recombination sites“ flankiert. Der *destination vector* trägt das *ccdB*-Gen, flankiert von attR1 und attR2 „recombination sites“. Die Rekombination zwischen den attL und attR sites, wird vom Gateway® LR Clonase™ Enzym Mix (Invitrogen) katalysiert. Das Ergebnis ist der gewünschte *expression clone* und ein Nebenprodukt, das das *ccdB*-Gen trägt. Das *ccdB*-Gen ist ein „Suizid-Gen“, dessen Genprodukt mit der *E. coli* DNA-Gyrase interferiert (Bernard und Couturier 1992). So wird erreicht, dass nach der Transformation eines *E.coli* Klonierungsstamms mit dem Reaktionsansatz keine mit Nebenprodukt oder nicht rekombiniertem *destination vector* transformierte Klone wachsen. Abbildung 2-1 veranschaulicht den Vorgang der LR-Rekombination. Zur Durchführung von LR-Rekombinationsreaktionen wurden die Reaktionsansätze (s.u.) für 1 h bei 25 °C inkubiert. Dann wurden 2 µl Proteinase K-Lösung zugegeben, die Ansätze gevortext und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Reaktionsansätze direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

Reaktionsansatz (10 µl): 50 ng *entry clone*
 150 ng *destination vector*
 2 µl 5 × LR-Clonase Reaktionspuffer
 2 µl Clonase
 ad 10 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA)



Abbildung 2-1. Schematische Darstellung der LR-Rekombination. Nach Gateway™ Cloning Technology manual, Invitrogen 2003

2.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von doppelsträngigen DNA-Proben erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977), modifiziert. Die Sequenzierung wurde von der Firma Agowa durchgeführt.

2.3.10 Analytische und präparative Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,5–2%igen Agarosegelen durch horizontale Gelelektrophorese. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden alle Proben mit 6 × Auftragspuffer versetzt. Die Gele enthielten Ethidiumbromid (Finalkonzentration 0,2 µg/ml), so dass die Banden direkt im Anschluss an den Gellauf im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und gegebenenfalls ausgeschnitten werden konnten. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5–10 V/cm Gellänge für 0,5–2 h.

Verwendete Lösungen

1 × TAE – Puffer	40 mM Tris-Acetat pH 8,3 2 mM EDTA
x% TAE-Agarosegel	x% Agarose gelöst in 1 × TAE
6 × Auftragspuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 15% Ficoll 400

DNA-Molekulargewichtsstandards

MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready to use (Fermentas)
1 kb DNA Leiter GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas)
100 bp DNA Leiter GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas)

2.3.11 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel), das QUIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen), oder das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß den Angaben der Hersteller benutzt.

2.3.12 Gezielte *in vitro* Mutagenese (QuikChange)

Durch Anwendung der *QuikChange*TM *site-directed mutagenesis* Methode (Stratagene) können Mutationen an beliebigen Stellen einer Nukleotidsequenz eingefügt werden. Als Template dienen *dam*-methylierte Plasmide. Durch zwei zueinander revers-komplementäre Primer wird die Mutation in das Plasmid eingefügt. Die Mutagenese-Primer binden an die zu mutierenden Bereiche des Plasmids und werden anschließend durch die Polymerase zu einem vollständigen, mutierten DNA-Strang aufgefüllt. Das Template wird durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease DpnI entfernt, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA an der häufig vorkommenden Zielsequenz 5'-Gm⁶ATC-3' hydrolysiert (Nelson und McClelland 1992). Bei der methylierten DNA handelt es sich um die eingesetzte Template-DNA, die hemimethylierte DNA entsteht durch Zusammenlagerung eines Stranges der Template-DNA mit einem komplementären PCR-Produkt. Das Produkt der *QuikChange* Mutagenese kann durch Transformation in kompetente *E. coli* Zellen eingebracht werden. Durch die *E. coli*-DNA-Reparatursysteme werden die Nicks geschlossen und das Plasmid methyliert. Aufgrund der Methylierung kann das Mutagenese-Produkt als Template für weitere Mutagenese-Runden eingesetzt werden. Abbildung 2-2 zeigt schematisch den Ablauf der *QuikChange* Mutagenese. Zur Durchführung der *Quikchange* Mutagenese wurden die Reaktionsansätze (s.u.) zusammenpipettiert und das unten angegebene Thermocyclerprogramm durchlaufen. Anschließend erfolgte der DpnI Verdau durch Zugabe von 10 U des Enzyms direkt in die Ansätze und Inkubation für 1 h bei 37 °C. 10 µl der Ansätze wurden direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Die Integrität der resultierenden Plasmide wurde durch Sequenzierung der gesamten codierenden Bereiche überprüft.

Ansatz zur QuikChange Mutagenese (50 µl)

50 ng Plasmid-DNA (Template)

125 ng Mutageneseprimer-sense

125 ng Mutageneseprimer-antisense

250 µM dNTPs

5 µl 10 × *Pfu*-Puffer (Stratagene)

2,5 U Turbo-*Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Stratagene)

ad 50 µl ddH₂O

Thermocycler-Programm

18 ×	{	2	Initiale Denaturierung	95 °C	30 sec
		3	Denaturierung	94 °C	30 sec
		4	Annealing	55 °C	1 min
			Elongation	68 °C	1 min/kb Plasmidlänge

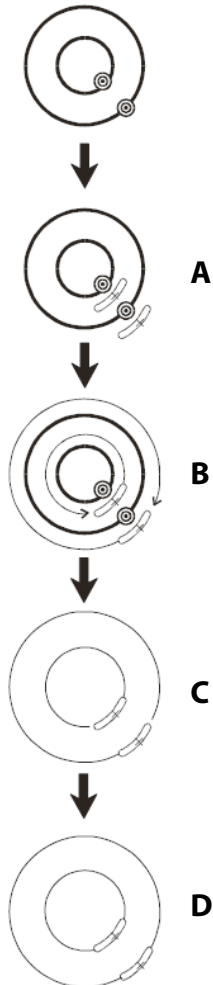


Abbildung 2-2. Ablauf der QuikChange Mutagenese. Als Template dient ein zirkuläres, methyliertes, doppelsträngiges Plasmid. Im ersten Schritt lagern sich zwei komplementäre Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation tragen, an die entsprechenden Sequenzbereiche des Plasmids an (**A**). Durch die Aktivität der Pfu-Polymerase werden die Oligonukleotide zu einem nichtmethylierten Plasmid verlängert (**B**), das die gewünschte Mutation trägt und genickt ist. Durch Zugabe der Restriktionsendonuklease DpnI werden methylierte Ausgangsplasmide und hemi-methylierte Hybridplasmide abgebaut (**C**). Nur die vollständig nicht methylierten Plasmide, die in beiden Strängen die gewünschte Mutation tragen, bleiben erhalten. Diese Plasmide werden durch Transformation in *E. coli* Zellen eingebracht. Durch die *E. coli*-eigenen Reparatursysteme werden die Nicks geschlossen (**D**). Die Abbildungen sind dem „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit instruction manual“ der Firma Stratagene entnommen.

2.3.13 Erweiterte QuikChange Mutagenese nach Wang und Malcolm

Durch eine erweiterte *QuikChange* Mutagenese können „schwierige“ Mutationen wie etwa umfangreiche Deletionen und Insertionen oder Multimutationen in die Template-DNA eingefügt werden (Wang und Malcolm 1999). Bei diesen Mutationen unterscheidet sich die Sequenz der Primer deutlich von der Vektorsequenz, so dass die Bildung von „Primer-Dimeren“ gegenüber der Bindung des Mutagenese-Primers an sein Template stark bevorzugt ist. Deshalb wurde zuerst ein Thermocyclerprogramm (s.u.) in zwei getrennten Ansätzen

(s.u.) mit jeweils nur einem Primer durchlaufen. Anschließend wurden jeweils 25 µl von jedem Ansatz miteinander vereinigt und mit 1 µl Turbo-Pfu-Polymerase versetzt. Anschließend wurde ein zweites Thermocyclerprogramm durchlaufen und 10 U DpnI zugegeben. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 1 h wurden 10 µl direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Die Integrität der resultierenden Plasmide wurde durch Sequenzierung der gesamten codierenden Bereiche überprüft.

Ansatz zur erweiterten QuikChange Mutagenese (Gesamtvolumen: 50 µl)

50 ng Plasmid-DNA (Template)

125 ng Mutageneseprimer (sense bzw. antisense in getrennten Ansätzen)

250 µM dNTPs

5 µl 10 × *Pfu*-Puffer (Stratagene)

2,5 U Turbo-*Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Stratagene)

ad 50 µl ddH₂O

Thermocyclerprogramm 1

		Initiale Denaturierung	95 °C	30 sec
10 ×		2 Denaturierung	94 °C	30 sec
		3 Annealing	55 °C	1 min
		4 Elongation	68 °C	1 min/kb Plasmidlänge

Thermocyclerprogramm 2

		Initiale Denaturierung	95 °C	30 sec
18 ×		2 Denaturierung	94 °C	30 sec
		3 Annealing	55 °C	1 min
		4 Elongation	68 °C	1 min/kb Plasmidlänge

2.3.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Plasmid-DNA als Template

Zur präparativem Amplifikation von Doppelstrang-DNA-Fragmenten unter Einsatz von Plasmid-DNA als Template wurde *Pfu* DNA Polymerase („Turbo *Pfu*“, Promega) oder Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) verwendet. Diese Polymerasen besitzen neben der 5'→3'-Polymerase-Aktivität auch eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität. Aufgrund dieser Proofreading-Fähigkeit arbeiten sie mit einer besonders niedrigen Fehlerrate. Für die analytische PCR wurde *Taq*-Polymerase verwendet, die lediglich eine 5'→3'-Exo-

nuklease-Aktivität besitzt. PCR-Reaktionen wurden unter den vom Hersteller der Polymerase empfohlenen Bedingungen in 0,2 ml Eppendorf-tubes durchgeführt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen wurden „Coomassie Brilliant Blue“ enthaltende Reagenzien der Hersteller Pierce oder Biorad nach Herstellerangaben eingesetzt. Der Assay wurde in Mikrotiterplatten in Doppel- bis Vierfachbestimmung unter Zuhilfenahme einer Rinderserum-Albumin (BSA) Standardkurve durchgeführt. Da Triton X-100 mit der Messung interferiert, wurde bei der Bestimmung Triton X-100-haltiger Proben die Triton X-100 Konzentration in allen Wells auf denselben Wert eingestellt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Zur diskontinuierlichen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde die Standardmethode (Laemmli 1970, Ornstein 1964) angewendet. Die Gele hatten folgende Maße: 200 mm × 100 mm × 1,5 mm. Die Polymerisation von Trenn- und Sammelgel wurde durch Zugabe von 0,025% Ammoniumpersulfat und 0,05% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) initiiert. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, für ca. 3 min bei 100 °C denaturiert und in die Geltaschen überführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 130 V.

Verwendete Lösungen

Acrylamidlösungs-Mix :	30% Acrylamid 0,8% N,N-Methylbisacrylamid in H ₂ O
Laemmli-Laufpuffer :	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 0,1% SDS
Trenngelpuffer (4 ×) :	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,5% SDS
Sammelgelpuffer (4 ×) :	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,5% SDS

Probenpuffer (4 ×)	0,219 mM Tris/HCl pH 6,8
	10% SDS
	5,8% β-Mercaptoethanol
	0,04% Bromphenolblau
	16% Glycerol

2.4.3 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die untere Detektionsgrenze dieser Färbemethode liegt bei ca. 100 ng Protein pro Bande. Die Färbung erfolgte durch leichtes Schwenken in Färbelösung bei Raumtemperatur für ca. 20 min und anschließendes leichtes Schwenken in Entfärbelösung bei Raumtemperatur für mindestens 2 h.

Verwendete Lösungen

Färbelösung : 0,5% Coomassie Brillant Blue
 10% Essigsäure
 40% Ethanol

Entfärbelösung : 10% Essigsäure
 40% Ethanol

2.4.4 Western-Blotting

Proteine lassen sich durch *Western-Blotting* und *Immunprinting* spezifisch nachweisen. Dafür werden die Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mit einem spezifischen primären Antikörper wird das gewünschte Protein auf der Membran markiert und danach z.B. durch einen mit einem Enzym, z.B. Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugierten sekundären Antikörper über eine Farb- oder Lumineszenzreaktion detektiert. Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran wurde im *semi-dry* Verfahren durchgeführt. Dazu wurde in einer *Semi-dry-Blot*-Kammer ein luftblasenfreier Stapel aus drei Lagen Towbin-Puffer-getränktem Whatman-Papier, Nitrozellulosemembran, Gel und drei weiteren Lagen Towbin-Puffer-getränktem Whatman-Papier aufgebaut. Der Proteintransfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 1,25 mA/cm² Gelfläche für 1 h bei RT durchgeführt. Der Erfolg des Proteintransfers wurde durch eine Ponceau-Färbung der Nitrozellulosemembran überprüft. Dazu wurde die Membran 5 min in der Ponceau-Lösung leicht geschwenkt und überschüssige Farbe durch Spülen mit 10% Essigsäure entfernt. Die Banden des Molekulargewichtsmarkers wurden mit Bleistift nachgezeichnet.

Immunprinting von Western-Blots

Die Membranen wurden für 1 – 24 h in Blockierlösung geschwenkt, die Lösung wurde abgossen und 10 ml einer Lösung des primären Antikörpers in PBS oder TBS zugegeben in der die Membran für 1 – 24 h leicht geschwenkt wurde. Dann wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS-T oder TBS-T gewaschen. Wenn HRP-gekoppelte primäre Antikörper verwendet wurden, erfolgte anschließend die Detektion in einer Farbreaktion durch Zugabe von recomBlot Immunoblot TMB-Substratlösung (MIKROGEN) oder in einer Chemolumineszenzreaktion im ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) nach Vorschrift des Herstellers.

Wurden nicht-HRP-gekoppelte primäre Antikörper verwendet, so erfolgte zunächst eine Inkubation in 10 ml einer Lösung eines HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers in PBS oder TBS für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken. Die Detektion erfolgte dann wie oben beschrieben nach dreimaligem Waschen für 2 min mit PBS-T oder TBS-T.

Verwendete Lösungen

Towbin-Puffer	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 20% Methanol
Ponceau Lösung	0,2% Ponceau-S 3% Essigsäure
TBS (Tris-Buffered Saline)	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-T	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% Tween 20
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 140 mM NaCl 2,7 mM KCl pH 7,4 (mit HCl eingestellt)
PBS-T	PBS 0,1% Tween 20

2.4.5 Rekombinante Expression in *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren für die prokaryotischen Expression basieren auf den Expressionsvektoren pET16b (Novagen) oder pET-102D (Invitrogen). Die Transkription der zu exprimierenden cDNA steht hier unter Kontrolle des T7-RNA-Polymeraseabhängigen T7-Promotors. Die in den verwendeten *E.coli*-Expressionsstämmen genomisch integrierte T7-RNA-Polymerase wiederum steht unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Der *lac*-Repressor reprimiert die Transkription der T7-RNA-Polymerase im lactosefreien Zustand aktiv bis die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactosid), einem nicht metabolisierbaren Lactoseanalogon, induziert wird. Abbildung 2-3 veranschaulicht den beschriebenen Sachverhalt.

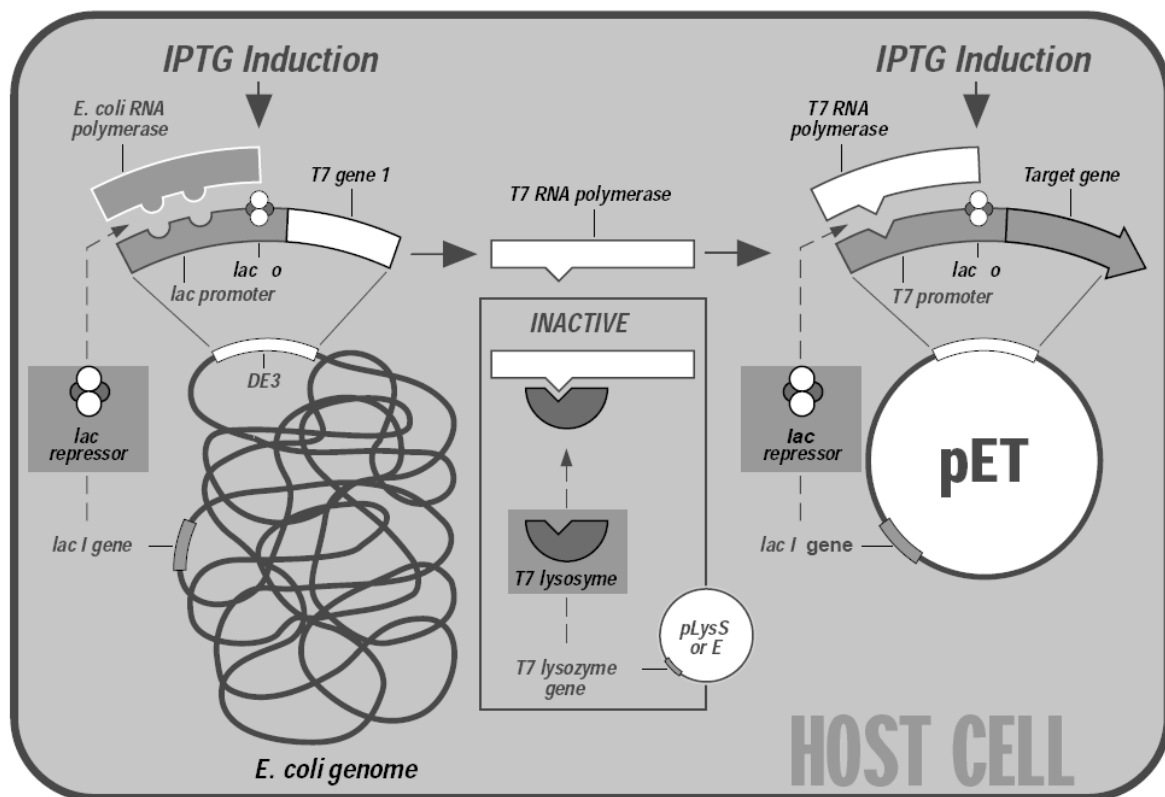


Abbildung 2-3. Regulation der Expression bei Verwendung des BL21(DE3)-pET-Systems. (pET System Tutorial, Novagen Catalog 2002–2003)

Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurde LB Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und ca. 1:100 mit Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 37° C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 erreicht war. Die Induktion der Expression erfolgte dann durch Zugabe von IPTG (Konzentration 0,1–1 mM, je nach Expressionskonstrukt), entweder bei Raumtemperatur oder bei 37 °C. 2 Stunden nach der

Induktion wurden die Kulturen bei 5000 rpm im GSA-Rotor (Sorvall) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots genommen und per SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden jeweils $100/\text{OD}_{600}\ \mu\text{l}$ der Kultur abgenommen, die Bakterien bei 5000 rpm für 10 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (10 min bei $5000 \times g$) und in SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert. So enthielt jedes Aliquot in etwa die gleiche Bakterienzellzahl und der Verlauf der Expression konnte anhand der auf dem Gel bzw. im Western Blot sichtbaren Banden beurteilt werden.

Zur Bestimmung des Anteils an löslichem rekombinantem Protein wurde eine analytische Testlyse im kleinen Maßstab mit anschließender SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt. Dazu wurde nach beendeter Induktion jeweils 1 ml der Kultur abgenommen und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert (10 min bei $5000 \times g$). Das Bakterienpellet wurde in 1 ml Puffer L gevortext und sonifiziert (Desintegrator B-15, 5×15 s Pulse, Einstellung: maximal). Nach Zentrifugation (15 min bei $14000 \times g$) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml SDS-PAGE Probenpuffer suspendiert. Überstand und Pellet wurden daraufhin per SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Verwendete Lösungen

Puffer L: 100 mM Tris pH 7,5
 10% Glycerin
 0,05% Triton X-100
 1 mM β -Mercaptoethanol

2.4.6 StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatografie

Proteine, die mit einem C-terminalen StrepTag II[®] (Aminosäuresequenz: WSHPQFEK) fusioniert waren, wurden durch StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatografie aufgereinigt. Die Bindung dieses Tags an StrepTactin erfolgt ausserordentlich spezifisch, so dass entsprechende Fusionsproteine in der Regel in einer Einschnitt-Affinitätschromatografie zur Homogenität aufgereinigt werden können.

Zur Aufreinigung von prokaryotisch exprimierten StrepTag II Fusionsproteinen wurde das in Puffer W aufgenommene Bakterienpellet in einem Downcer homogenisiert und anschließend sonifiziert (Desintegrator Branson B-15, 5×15 s Pulse, Einstellung: maximal). Die Suspension wurde zentrifugiert (10 min bei $20000 \times g$), das Pellet verworfen und der Überstand auf die mit 2 Matrixvolumina Puffer W äquilibrierte Matrix aufgetragen (Flussrate $<1\text{ ml/min}$). Nach waschen mit 3 Matrixvolumina Puffer W erfolgte die Elution mit $10 \times \frac{1}{2}$ Matrixvolumen Puffer E. Zur Regeneration der Säule wurden 3×5 Matrixvolumina Puffer R und anschließend 2×4 Matrixvolumina Puffer W auf die Säule geben.

Verwendete Lösungen

Puffer W:	100 mM Tris pH 7,5 10% Glycerin 0,05% Triton X-100 1 mM β -Mercaptoethanol 300 mM NaCl
Puffer E:	Puffer W 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer R:	Puffer W 1 mM HABA (4-Hydroxyazobenzene-2-carboxylic-acid)

2.4.7 Ni-NTA-Affinitätschromatografie

His-Tag-Fusionsproteine wurden durch Ni-NTA-Affinitätschromatografie unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und im matrixgebundenen Zustand renaturiert. Bei dieser Methode handelt es sich um eine IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography), bei der Ni^{2+} -Ionen, die über den chelierenden Liganden NTA (Nitrilotriacetic acid bzw. *N,N*-Bis(carboxymethyl)Glycin) an eine Matrix gekoppelt sind, mit den Histidin-Seitengruppen des His-Tags interagieren.

Zur Aufreinigung von prokaryotisch exprimierten His-Tag-Fusionsproteinen wurde das in Puffer W aufgenommene Bakterienpellet in einem Downcer homogenisiert und anschließend sonifiziert (Desintegrator Branson B-15, 5×15 s Pulse, Einstellung: maximal). Die Suspension wurde zentrifugiert (10 min bei $20000 \times g$), das Pellet verworfen und der Überstand weiter aufgereinigt. Dazu wurde die Matrix mit 2 Matrixvolumina Puffer W äquilibriert und mit dem Bakterienlysat für 1 h bei RT geschüttelt. Nach waschen mit 3 Matrixvolumina Puffer W erfolgte die Renaturierung durch aufeinander folgende Auftragung von je 2 ml Puffer W mit abnehmender Harnstoffkonzentration auf die Säule (6 M, 6 M, 4 M, 3 M, 2 M, 1 M und Puffer ohne Harnstoff). Eluiert wurde mit $10 \times \frac{1}{2}$ Matrixvolumen Puffer E.

Verwendete Lösungen

Puffer W:	100 mM Tris pH 7,5 10% Glycerin 0,05% Triton X-100 1 mM β -Mercaptoethanol 7 M Harnstoff
-----------	--

Puffer E: 100 mM Tris pH 7,5
 10% Glycerin
 0,05% Triton X-100
 1 mM β -Mercaptoethanol
 1 M Imidazol

2.4.8 Elektroelution von Proteinen aus SDS Polyacrylamidgelen

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 1 h in einer 4 M Natriumacetat Lösung geschwenkt. Bei dieser „Acetat-Färbung“ wird das Gel trübe, die Proteinbanden jedoch bleiben klar (Higgins und Dahmus 1979). Die Banden wurden ausgeschnitten und das Protein durch Elektroelution aus dem Gel isoliert. Die Elektroelution erfolgte in einem „BIOTRAP Elektroseparationssystem“ der Firma Schleicher&Schuell in Tris-Glycin-Puffer bei einer Spannung von 100 V über Nacht (12–14 Stunden) bei 4 °C. Anschließend wurde die Spannung auf 200 V erhöht und die Elektroelution 3 Stunden weitergeführt, um SDS-Reste zu entfernen.

Verwendete Lösungen

Tris-Glycin-Puffer: 2,9 g Tris
 14,4 g Glycin
 ad 1 l ddH₂O

2.4.9 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Nach der Aufreinigung wurden die Proteine mit Hilfe von Amicon Ultra Zentrifugen Filtereinheiten der Firma Millipore gemäß den Herstellerangaben aufkonzentriert. Um störende niedermolekulare Substanzen aus der Lösung zu entfernen wurde jeweils 2 × mit Puffer gewaschen (Jeweils der Elutionspuffer der zuletzt angewendeten Reinigungsmethode, im Fall der StrepTactin-Sepharose Affinitätschromatografie wurde jedoch kein Desthiobiotin in diesen Waschpuffer gegeben).

2.4.10 Lagerung von Proteinlösungen

Zur längerfristigen Lagerung (bis zu einigen Monaten) wurden die aufkonzentrierten Lösungen mit 1 Volumen Glycerin versetzt und bei –20 °C gelagert.

2.4.11 *In vitro* Proteinkinase C Assay, radiometrisch

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Proteinkinasen der PKC-Familie wurde zunächst die spezifische Radioaktivität des eingesetzten ATP durch Mischung von kaltem ATP mit [γ - ^{32}P]ATP (MP Biomedicals oder Hartmann Analytic) auf 125 nCi/pmol eingestellt. Die Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert (Finalvolumen 40 μl) und die Reaktion durch die Zugabe von ATP gestartet. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 30 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 20 μl SDS-Probenpuffer und Inkubation der Proben für 3 min bei 95°C gestoppt. Die Proben wurden sodann auf ein 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen; nach dem Gellauf erfolgte die Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie brilliant blue. Das entfärbte Gel wurde auf einem Gelrockner getrocknet und für 2–6 Stunden auf einen PhosphorImager-Screen aufgelegt. Die Auswertung der PhosphorImager-Scans erfolgte mit Hilfe der Software ImageQuant 5 (Molecular Dynamics).

Ansatz (Gesamtvolumen 40 μl)

20 mM	Tris/HCl pH 7,5
10% (v/v)	Glycerin
0,05% (v/v)	Triton X-100
1 mM	β -Mercaptoethanol
10 $\mu\text{g/ml}$	3-sn-Phosphatidyl-L-Serin
200 nM	12-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA)
10 mM	MgCl_2
50 μM	CaCl_2
0,1 mg/ml	BSA
100 nM	ATP (0,5 μCi [γ - ^{32}P]ATP, MP Biomedicals oder Hartmann Analytic)
1–20 ng	Proteinkinase C, je nach Isoform/Präparation
x μg	Histon HIIIS (unterschiedliche Mengen, siehe Legenden im Ergebnisteil)

Auswertung der Rohdaten

Die Rohdaten wurden in Microsoft Excel ausgewertet und mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4 nach nichtlinearer Regression als halblogarithmische Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt. IC_{50} (Hemmstoffkonzentration bei der halbmaximale Hemmwirkung erreicht ist) wurde in GraphPad Prism 4 rechnerisch aus den Kurven ermittelt.

2.4.12 *In vitro* Proteinkinase C Assay mit ATP-Regeneration

Dieser Assay basiert auf dem kommerziell erhältlichen „PepTag® Assay for Non-Radioactive Detection of Protein Kinase C“ von der Firma Promega. Das Peptid „C1“, P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K trägt bei pH 8 eine Nettoladung von +1. Wird dieses Peptid durch Protein Kinase C phosphoryliert, ändert sich die Nettoladung zu -1. Dadurch lässt sich phosphoryliertes Peptid durch Elektrophorese in einem Agarose-Gel von nicht phosphoryliertem Peptid trennen. Da das Peptid mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, ist es unter UV-Licht sichtbar. Zusätzlich wird die ATP-Konzentration in den Ansätzen durch ein ATP regenerierendes System (Creatinphosphat und Creatinkinase) konstant gehalten (Aoubala et al. 2001). Mögliche ATPase-Aktivitäten in den Proteinpräparationen werden dadurch kompensiert. Der Assay wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt (Anleitung zum „PepTag® Assay for Non-Radioactive Detection of Protein Kinase C“, Technical Bulletin No. 132, Promega). Zusätzlich wurden 20 mM Creatinphosphat (Sigma) und 1 U Creatinkinase (Aus Kaninchenmuskel, Sigma) sowie die als PKC-Inhibitoren zu charakterisierenden Proteine zugegeben. Abbildung 2-4 zeigt schematisch den Aufbau des Assays.

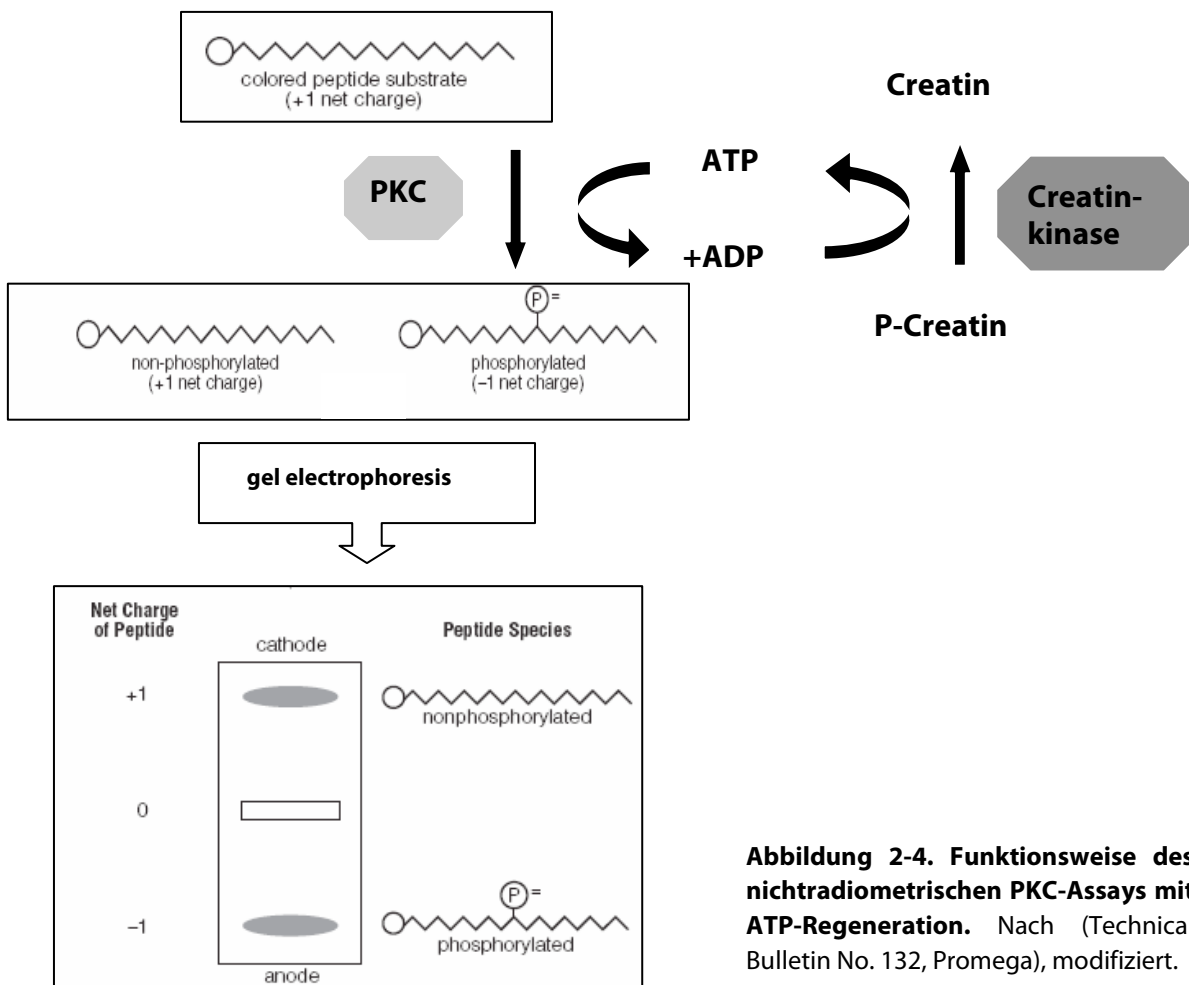


Abbildung 2-4. Funktionsweise des nichtradiometrischen PKC-Assays mit ATP-Regeneration. Nach (Technical Bulletin No. 132, Promega), modifiziert.

Die Ansätze (s.u.) wurden auf Eis zusammenpipettiert, und die Reaktion durch Zugabe des C1-Peptids gestartet. Nach Inkubation bei 30 °C für 40 min. wurden die Ansätze zum Stoppen der Reaktion auf Eis gestellt und nach Zugabe von 10 µl Glycerin sowie 10 µl Gel-Laufpuffer einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen (0,8% Agarose in Gel-Laufpuffer). Dann wurden die Gele auf einen UV-Transilluminator gelegt und fotografiert.

Ansatz (25 µl)

<u>Substanz</u>	<u>Pipettiert (µl)</u>	<u>Endkonzentration</u>
PepTag PKC Reaction Buffer 5 ×,	5	
HEPES (pH 7,4)		20 mM
CaCl ₂		1,3 mM
DTT		1 mM
MgCl ₂		10 mM
ATP (62,5mM)	1	3,5 mM
PepTag C1 Peptide (0,4 µg/µl)	5	70 µM
PKC Activator 5 × Solution, sonifiziert	5	0,2 mg/ml
PKC-alpha (225 ng/µl)	1	9 ng/µl
Creatinphosphat (500mM)	0,8	16 mM
Creatinkinase (2U/µl)	0,5	1 U/25 µl
Peptide Protection Solution	1	
NS3 Präparationen	siehe Legenden	
ddH ₂ O	ad 25µl	

Verwendete Lösungen

PepTag® PKC Reaction 5 × Buffer	100 mM HEPES (pH 7,4) 6,5 mM CaCl ₂ 5 mM DTT 50 mM MgCl ₂ 5 mM ATP
PKC Activator 5 × Solution	1 mg/ml 3-sn-Phosphatidyl-L-Serin in H ₂ O
Gel-Laufpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 8,0 3,5 M Harnstoff

2.4.13 ATPase-Assay

Nach (Wardell et al. 1999), dünnschichtchromatografisch. Die Ansätze (s.u.) wurden auf Eis zusammenpipettiert und die Reaktion durch die Zugabe von ATP gestartet. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 25 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA und gründliches Mischen gestoppt. Jeweils 1 µl der Reaktionsansätze wurden auf PEI-Collulose-Folie (0,1 mm, Macherey-Nagel) aufgetragen und mit 0,4 M Kaliumdihydrogenphosphat (pH 3,4) als Laufmittel in einer aufsteigenden Dünnschichtchromatografie (Laufstrecke ca. 10 cm) aufgetrennt. Die Chromatogramme wurden an der Luft getrocknet und auf PhosphorImager Screens gelegt. Die Auswertung der PhosphorImager-Scans erfolgte mit Hilfe der Software ImageQuant 5 (Molecular Dynamics).

Ansatz (20 µl)

20 mM	Tris/HCl pH 7,5
10% (v/v)	Glycerin
0,05% (v/v)	Triton X-100
1 mM	β-Mercaptoethanol
2 mM	MgCl ₂
50 mM	ATP (0,5 µCi [γ - ³² P]ATP, MP Biomedicals oder Hartmann Analytic)
12 mM (Nukleotid)	Poly(U) (Molekulargewicht 800-1000 kDa, Sigma)

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kontinuierliche Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Flp-In™-3T3 Zellen (Invitrogen) und JB6 Cl41-5a-Zellen (# CRL-2010, ATCC) wurden in Routinekultur bei 37 °C und 5% CO₂ gehalten. Dazu wurden T75 Flaschen (250 ml, Sarstedt) verwendet. Wenn die adhären wachsenden Zellen eine ungefähr 80%-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert. Dazu wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen sich ablösten. Dann wurden 5 ml Kultur-Medium zugegeben. Von dieser Zellsuspension wurden 1,5 ml in eine neue Gewebekulturflasche überführt und mit Medium auf 15 ml aufgefüllt.

Medien und Lösungen

Vollmedium für 3Y1-c-Src Zellen	D-MEM 10% Kälberserum (donor calf serum, DCS) 1% Penicillin/Streptomycin
Vollmedium für Flp-In™-3T3 Zellen	D-MEM 10% Kälberserum (donor calf serum, DCS) 1% Penicillin/Streptomycin 100 µg/ml Zeocin für Flp-In™-3T3 Host-Zellen bzw. 200 µg/ml Hygromycin B für Expressionszelllinien
Vollmedium für JB6 Cl41-5a-Zellen	MEM 5% Fötale Kälberserum (FCS) 1% Penicillin/Streptomycin
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 140 mM NaCl 2,7 mM KCl pH 7,4 (eingestellt mit HCl)

2.5.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zur Kryokonservierung wurden frisch trypsinierte Zellen bei $250 \times g$ für 5 min abzentrifugiert, und $3 \cdot 10^6$ Zellen pro ml Einfriermedium (10% DMSO, 90% des jeweiligen Vollmediums) resuspendiert, je 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen mit Schraubverschluss (Nunc) überführt und einem Styroporgefäß auf -80°C heruntergekühlt. Die kurzzeitige Lagerung erfolgte bei -80°C . Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C inkubiert, bis der Inhalt aufgetaut war, der dann sofort in eine mit 15 ml Zellkulturmedium gefüllte T75-Flasche überführt wurde. Nach 2–4 Stunde wurde das Medium gegen frisches Vollmedium ausgetauscht.

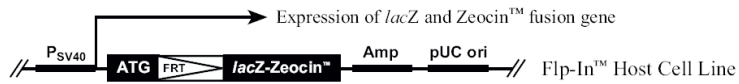
2.5.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Transfektion von 3Y1-c-Src Zellen und Flp-In[™]-3T3 Zellen wurde das Transfektionsreagenz PolyFect (Qiagen) verwendet. JB6 Cl41-5a Zellen wurden mit „TransIT-3T3“ (Mirus) transfiziert. Die Transfektion erfolgte jeweils nach Herstellerangaben.

2.5.4 Das Flp-In[™] System (Invitrogen) zur Generierung von Zelllinien mit stabiler Expression rekombinanter Proteine

Bei der herkömmlichen stabilen Transfektion von Säugerzellen erfolgt die Integration des Expressionsvektors rein zufällig an unterschiedlich transkriptionsaktiven Loci des Zellgenoms. Das führt zu einer erheblichen Variationsbreite im Expressionsniveau der einzelnen Zellklone, insbesondere da es dabei auch häufig zur Integrationen mehrerer Kopien kommt. Das erschwert den direkten Vergleich unterschiedlicher Expressionskonstrukte. Mit Hilfe des Flp-In[™] Systems von Invitrogen ist es möglich Zelllinien zu etablieren, die nach der Transfektion jeweils unterschiedliche Konstrukte an der gleichen Stelle im Genom integriert haben und diese aufgrund der singulären Integration an einem übereinstimmenden Locus mit geringer Variation im Expressionsniveau exprimieren. Dazu werden Flp-In[™] host Zelllinien verwendet, die eine einzige *Flp Recombinase Target* (FRT) Sequenz stabil im Genom an einer transkriptionell aktiven Stelle integriert haben (siehe Abbildung 2-5). Durch Kotransfektion der Flp-In[™]-Host Zelllinie mit dem Flp-In[™]-Expressionsvektor pEF5/FRT/V5-DEST und dem Flp-Rekombinase-Expressionsvektor pOG44 lassen sich leicht isogene Zelllinien mit stabiler Expression des transfizierten Konstruktes gewinnen (siehe Abbildung 2-5). Die transient exprimierte Flp-Rekombinase katalysiert die Rekombination des Expressionsvektors mit der im Genom integrierten FRT-Sequenz. In diese Arbeit wurde die Zelllinie Flp-In[™]-3T3 (Invitrogen) verwendet.

1. Die Flp-In™-Host-Zelllinie besitzt ein in das Genom integriertes Konstrukt, das ein lacZ-Zeocin-Resistenz-Fusionsprotein exprimiert, das eine FRT-Sequenz enthält.

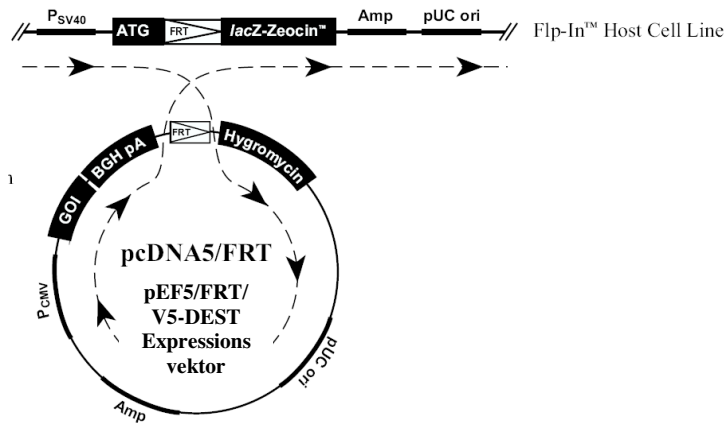


- + pOG44
- + pEF5/FRT/V5-DEST

2. Cotransfektion mit dem Expressionsvektor pEF5/FRT/V5-DEST und dem Flp-Rekombinase codierenden Vektor pOG44



3. Integration des Expressionsvektors in das Genom der Host-Zelllinie mit Hilfe der Rekombinase



4. Zustand nach erfolgter Rekombination, sowohl das Hygromycinresistenzgen als auch das im Expressions-vektor kodierte Konstrukt werden exprimiert

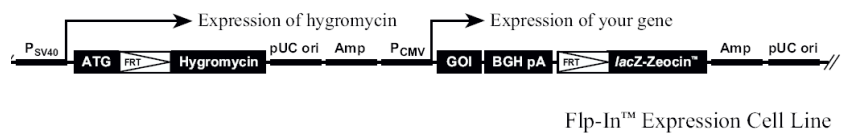


Abbildung 2-5. Funktionsweise des Flp-In™-Systems. FRT, *Flp Recombinase Target site* (Flp-Erkennungssequenz). GOI, gene of interest, einklonierte cDNA. Die Abbildungen sind dem Handbuch des Flp-In™-Systems entnommen (Flp-In™ System Manual, Invitrogen 2004)

2.5.5 Selektion von Flp-In™-3T3-Expressionszelllinien in Hygromycin B haltigem Medium

Das Medium wurde alle sieben Tage gewechselt, bis nach 14 – 21 Tagen Foci aus Hygromycin B resistenten Zellen sichtbar wurden. Zur weiteren Expansion wurden die Foci trypsinisiert und in 6-well-Zellkulturplatten überführt.

2.5.6 p80/MARCKS-Phosphorylierungsassay

Zur Bestimmung der TPA-induzierten Phosphorylierung des spezifischen Protein Kinase C Substrats p80/MARCKS in intakten Zellen, wurden zunächst $2,5 \times 10^5$ Zellen/well in 24-well-Platten ausgesät und in 2 ml Vollmedium bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Nach zweimaligem Waschen mit mit phosphatfreiem Medium wurden die Zellen für 30 min in 1 ml phosphatfreiem Medium im Brutschrank inkubiert. Zum metabolischen Labeling mit [³²P]-Orthophosphat wurden dann 200 µl phosphatfreies Medium + 0,5 mCi/ml [³²P]-Orthophosphat zugeben und die Zellen für 80 min. im Brutschrank inkubiert. 20 bzw. 5 min vor Ende der Inkubation wurden die Zellen mit dem PKC-Aktivator TPA stimuliert (siehe Abschnitt 1.7.5, S. 18). Dazu wurde TPA (Endkonzentration 400 nM) bzw. das Lösungsmittel DMSO in die entsprechenden Wells geben. Nach Waschen mit 0,5 ml eiskaltem PBS wurden 100 µl Zellyse-Puffer zugeben und die Zellen für 5 min. bei RT inkubiert. Das Zellysate wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, für 15 min bei 100 °C gekocht, zentrifugiert (10 min. bei $13000 \times g$) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die so präparierten hitzestabilen Proteine wurden dann per SDS-PAGE (10%) aufgetrennt, das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und das entfärbte Gel für 2 – 6 Stunden auf einen PhosphorImager-Screen aufgelegt. Die Auswertung der PhosphorImager-Scans erfolgte mit Hilfe der Software ImageQuant 5 (Molecular Dynamics).

Verwendete Lösungen

Phosphatfreies Medium:	Phosphatfreies D-MEM (Invitrogen)
	2,5% Kälberserum (donor calf serum, DCS)
Zellyse-Puffer:	100 mM Tris/HCl pH 7,5
	0,5% Triton X-100
	2 mM NaF
	100 mM Na ₃ VO ₄

2 mM EDTA
2 mM EGTA
5 mM PMSF

2.5.7 Proliferations-Assay

Die Proliferation von Säugerzellen wurde mit Hilfe des „CellTiter 96° AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“-Kits (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt. Diese Methode basiert auf der Nutzung einer Tetrazoliumverbindung die in lebenden Zellen zu einem Formazanprodukt reduziert wird. Die Konzentration des Formazanprodukts kann bei 490 nm photometrisch gemessen werden. Zur Durchführung des Proliferationsassays wurden 3×10^3 Zellen pro Well in eine 96-well-Platte pipettiert und mit 200 µl Medium überschichtet. Die Zellen wurden für 3–7 Tage wachsen gelassen, wobei nach spätestens 4 Tagen das Medium gewechselt wurde. Am Tag der Messung wurden 100 µl Medium abgenommen und 20 µl CellTiter 96° AQueous One Solution zugegeben. Nach einer Inkubation für 3 h bei 37 °C im Brutschrank wurde die Extinktion im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 490 nm gemessen. Als Blindprobe diente das abgenommene Medium.

2.5.8 DNA-Syntheseassay

Zur Bestimmung der DNA-Syntheserate konfluenten Zellen wurde ein Assay nach Lu et al. durchgeführt (Lu et al. 1997). Dazu wurden zunächst je 4×10^4 Zellen in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät und für 7 d bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Dann wurde das Medium gegen *low serum* Medium (wie Vollmedium aber 0,5% statt 10% DCS) ausgetauscht, so dass die Zellen in den Ruhezustand (*quiescence*) übergehen, wobei sie sich in der G0-Phase des Zellzyklus ansammeln. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen für 1 h in 100 µl [³H]-methyl-Thymidin-haltigem Vollmedium (2,5 µCi/ml [³H]-methyl-Thymidin, 20 Ci/mmol) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Zell-Harvester (Inotech) auf Filtermatten gesaugt und die Radioaktivität der unlöslichen Zellbestandteile in einem Szintillationszähler (Wallac-Trilux) gemessen.

2.5.9 Soft Agar Assay

Zur Bestimmung ihrer Koloniebildungsfähigkeit in Soft Agar wurden Zellen in „Top Agar“ suspendiert und auf eine zuvor gegossene „Base-Agar“-Schicht gegossen. Dazu wurde zunächst 0,8%iger Base-Agar hergestellt indem 1,6% noble-Agar (USB) in ddH₂O in der Mikrowelle verflüssigt und mit vorgewärmtem 2 × Vollmedium zu 0,8%igem Agar verdünnt wurde. Der Base-Agar wurde á 2 ml pro well in 24-well-Platten bzw á 7 ml in 60 mm Schalen gegossen. Dann wurden Zellen in entsprechend hergestelltem 0,3%igem Top-Agar

suspendiert und auf die Base-Agarschicht gegossen (10^3 – 10^4 Zellen in 250 μ l pro well einer 24-well-Platte bzw. 10^4 Zellen in 1,5 ml pro 60 mm Schale). Nachdem der Agar bei Raumtemperatur ausgehärtet war, wurde er mit 1 ml Medium überschichtet, und die Zellen im Brutschrank inkubiert, wobei nach spätestens 7 d das Medium gewechselt wurde. Nach 14 Tagen wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt.

In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit zur Koloniebildung in Soft Agar für verschiedene, mit NS3-Konstrukten transfizierte Zelllinien bestimmt. Im Einzelnen wurden stabil transfizierte Flp-In™ NIH 3T3 Zellen (siehe Abschnitt 2.5.4, S. 49), sowie transient transfizierte JB6-Cl41-5a-Zellen und c-Src überexprimierenden 3Y1-Rattenfibroblasten untersucht. Um einen Einfluss der Transfektionseffizienz auszuschließen wurden die transient transfizierten Zellen mit dem Vektor pEF5/FRT/V5-DEST-EGFP sowie den entsprechenden NS3-codierenden pEF5/FRT/V5-DEST-Vektoren cotransfiziert und anschließend durchflusszytometrisch sortiert. Nur Zellen mit EGFP-Fluoreszenz wurden ausgesät (siehe Abbildung 2-6).

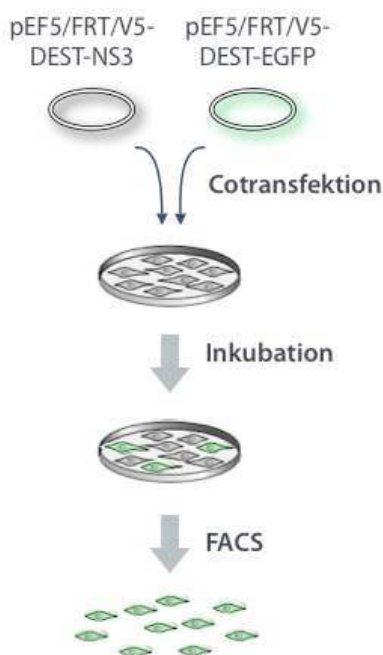


Abbildung 2-6. Transiente Transfektion und durchflusszytometrische Anreicherung transfizierter Zellen. Die Methode wurde für JB6-Cl41-5a-Zellen und c-Src überexprimierende 3Y1-Rattenfibroblasten eingesetzt. Zur Untersuchung von NIH 3T3 Zellen kamen stabil transfizierte Zellen zum Einsatz.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzvergleich des argininreichen NS3-Sequenzabschnittes mit PKC-Pseudosubstratsequenzen

Die auf dem Polyprotein-Abschnitt NS3 des Hepatitis C Virus lokalisierte Domäne 2 der HCV-NTPase/Helikase enthält eine argininreiche Aminosäuresequenz, welche hochgradige Ähnlichkeit zur inhibitorischen Pseudosubstratsequenz in der regulatorischen Untereinheit der PKC aufweist (Borowski et al. 1999c) (siehe auch Abschnitt 1.5, S. 13). Die Pseudosubstratregion der PKCs zeigt alle Charakteristika der PKC-Substrate, anstelle des phosphorylierbaren Serin- oder Threoninrestes enthält sie jedoch einen konservierten Alaninrest. Sie unterbindet die katalytische Aktivität von PKC autoinhibitorisch durch Bindung an die Substratbindungsstelle in der C4-Region der katalytischen Domäne (Newton 1995), siehe auch Abschnitt 1.7.3 auf S. 17.

HCV-NS3-Fragmente, die die argininreiche Region HCV(1487–1500) enthalten, interagieren mit cPKCs und bewirken eine Hemmung der katalytischen Aktivität *in vitro* (Borowski et al. 1999b). In dieser Arbeit sollte die inhibitorische Interaktion von NS3 mit allen PKC-Isoformen, auch aus den Klassen der nPKCs und der aPKCs charakterisiert werden. Dazu wurde die argininreiche NS3-Region zunächst mit den Pseudosubstratsequenzen aller PKC-Isoformen verglichen, wie Abbildung 3-1 zeigt.

Der Sequenzabschnitt HCV(1485–1502) weist an den signifikanten Positionen eine in etwa gleich stark ausgeprägte Homologie zu fast allen PKC-Isoformen auf. Die einzige Ausnahme ist PKC- μ , welche keine typische PKC-Pseudosubstratregion enthält. Für die Interaktion mit der Substratbindungsstelle sind die gekennzeichneten basischen Aminosäuren von besonderer Bedeutung. Sie interagieren nach (Orr und Newton 1994a) mit einer Reihe saurer Aminosäuren in der C4-Region der katalytischer Domäne der PKC (siehe auch Abschnitt 1.7.3 auf S. 17). Die basischen Aminosäuren finden sich mit Ausnahme des C-terminalen Histidins in HCV-NS3 und in den PKC-Isoformen exakt an der gleichen Position.

An der Position an der sich in PKC-Substraten der phosphorylierbare Serin- oder Threoninrest befindet, weist NS3 einen Threoninrest auf, der in dem kurzen Peptid HCV(1487–1500) (Borowski et al. 2000), nicht aber in den längeren, in dieser Arbeit untersuchten NS3-Konstrukten *in vitro* von PKC phosphoryliert wird. An der Stelle, an der in den

PKC-Pseudosubstratsequenzen ein hydrophober Aminosäurerest konserviert ist, findet sich auch in NS3 ein hydrophober Rest (Prolin).

		↓																			
HCV (1485–1502)			T	Q	R	R	G	R	T	G	R	G	G	K	P	G	I	Y	R	F	V
cPKCs	PKC-α		R	F	A	R	K	G	A	L	R	Q	K	N	V	H	E	V	K	D	H
	PKC-β		R	F	A	R	K	G	A	L	R	Q	K	N	V	H	E	V	K	N	H
	PKC-γ		L	F	C	R	K	G	A	L	R	Q	K	V	V	H	E	V	K	S	H
nPKCs	PKC-δ		T	M	N	R	R	G	A	I	K	Q	A	H	I	H	Y	I	K	N	H
	PKC-ε		P	R	K	R	Q	G	A	V	R	R	R	–	V	H	Q	V	N	G	H
	PKC-θ		L	H	Q	R	R	G	A	I	K	Q	A	K	V	H	H	V	K	C	H
aPKCs	PKC-ζ		T	R	K	R	Q	R	A	M	R	R	R	–	V	H	Q	V	N	G	H
	PKC-ζ		S	I	Y	R	R	G	A	R	R	W	R	K	L	Y	R	A	N	G	H
	PKC-ι		S	I	Y	R	R	G	A	R	R	W	R	K	L	Y	C	A	N	G	H
	PKC-μ		–																		

Abbildung 3-1. Lokales Alignment von HCV(1485–1502) mit den Pseudosubstratsequenzen der autoregulatorischen Domäne der PKC-isoformen. Der Aminosäurerest an der potentiell durch PKC phosphorylierbaren Position ist durch einen Pfeil markiert, konservierte basische bzw. unpolare Aminosäurereste sind unterstrichen gekennzeichnet. Identische bzw. sehr ähnliche Aminosäuren an konservierten Positionen sind dunkelgrau, unpolare Aminosäuren an konservierter Position sind hellgrau schattiert. Das kurze Peptid HCV(1487–1500) ist fett dargestellt. Es ist an Thr¹⁴⁹¹ durch PKC phosphorylierbar (Borowski et al. 2000). Die längeren, in dieser Arbeit untersuchten NS3-Konstrukte werden *in vitro* nicht von PKC phosphoryliert. PKC-μ enthält keine typische PKC-Pseudosubstrat site.

3.2 Design rekombinanter Proteine zur Aufklärung der PKC-Inhibition durch HCV-NS3

In dieser Arbeit sollten die Mechanismen der molekularen Interaktion zwischen HCV-NS3 und der PKC weiter aufgeklärt werden. Dazu wurden mehrere rekombinante Proteine designt, die in Abbildung 3-2 schematisch dargestellt sind. Zusätzlich zur NS3 NTPase/Helikase (NS3h) und einer NTPase defizienten NS3h-Mutante (NS3h-D1316A) sollte die isolierte rekombinante Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase untersucht werden, um nachzuweisen, dass die PKC-Inhibition durch NS3 aus der Wechselwirkung zwischen der argininreichen Region in Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase mit der PKC resultiert.

Domäne 2 der HCV-NTPase/Helikase enthält jedoch ein ungewöhnliches Strukturmerkmal. Die Aminosäuren 1458–1476 des HCV Polyproteins bilden einen langen β-Hairpin, der von der zentralen β-Faltblattstruktur in Domäne 2 bis weit in die Domäne 3 reicht, in die er fest integriert ist (siehe Abbildung 3-2 B). Die Entfernung von Domäne 3 führt zur Destabilisierung und Lösungsmittlexposition hydrophober Bereiche auf der Oberfläche des

„loops“. Die resultierende artifizielle Flexibilität des langen β -Hairpins könnte die Exposition des argininreichen Motivs und damit die PKC Inhibition durch NS3-Fragmente, denen Domäne 3 fehlt beeinflussen. Auch neigen Proteine mit artifiziell exponierten β -Strukturen zur Aggregation (Richardson und Richardson 2002).

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch diese artifiziellen Effekte zu vermeiden, wurde das rekombinante Protein d2 Δ -NS3h designt, in dem der β -Hairpin (AS 1458–1476 des HCV Polyproteins) durch *in vitro*-Mutagenese so verkürzt ist, dass nur der Schleifenboden (AS 1466–1469) erhalten bleibt. Die mit Hilfe von SWISS MODEL (siehe Abschnitt 2.1.11, S. 28) vorhergesagte Struktur des resultierenden Proteins ist in Abbildung 3-2 gezeigt. Zusätzlich wurde auch die nicht deletierte Domäne 2 (d2-NS3h) kloniert und in die Untersuchungen einbezogen.

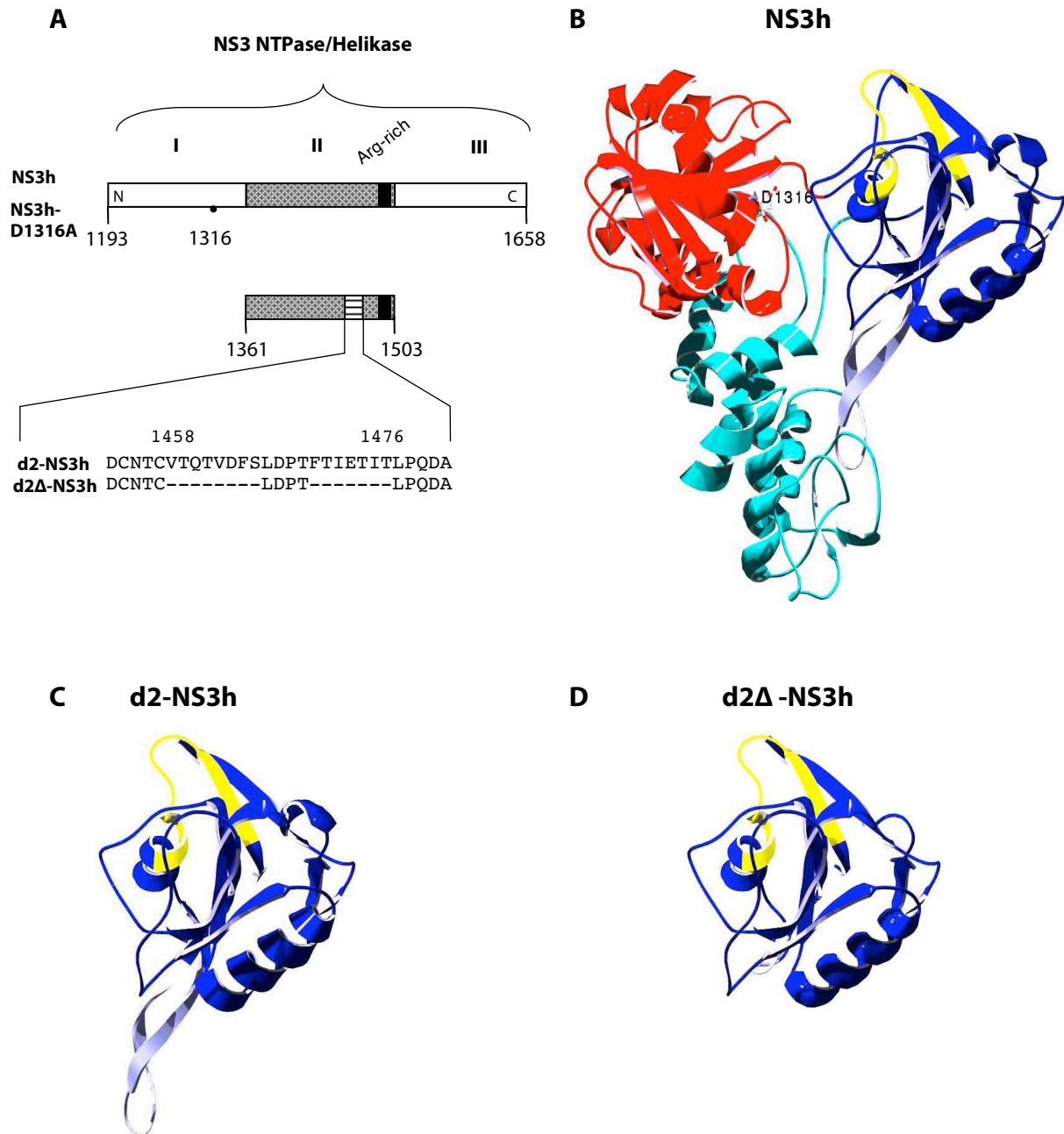
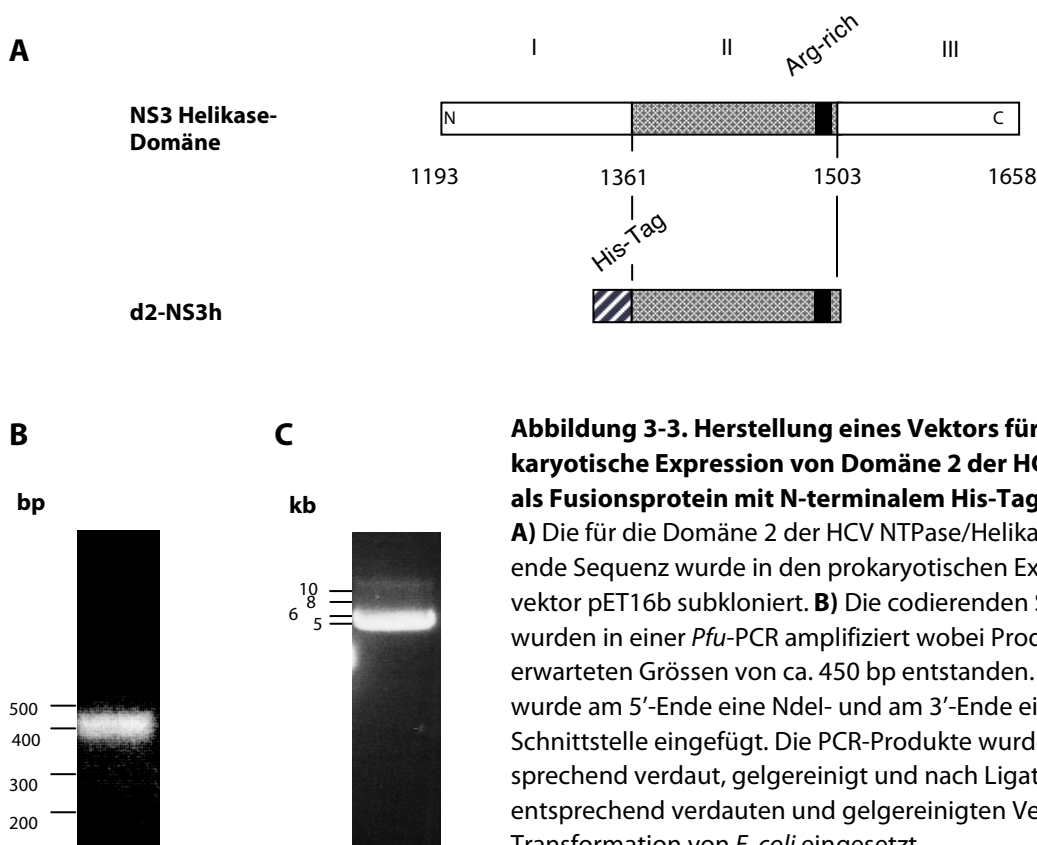


Abbildung 3-2. Design rekombinanter Proteine. **A)** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten NS3-Konstrukte. NS3h umfasst die NS3 NTPase/Helikase, NS3h-D1316A ist eine NTPase-defiziente NS3h-Mutante. Zur Untersuchung der isolierten Domäne 2 wurden d2-NS3h und d2Δ-NS3h generiert. In d2Δ-NS3h wurde der lange β -Hairpin (AS 1458–1476 des HCV Polyproteins) durch *in vitro*-Mutagenese so verkürzt, dass nur der Schleifenboden (AS 1466–1469) erhalten bleibt. **B)** Ribbon Diagramm von NS3h (PDB 1HEI (Yao et al. 1997)). Domäne 1 der NS3 NTPase/Helikase ist rot, Domäne 2 blau und Domäne 3 türkis dargestellt. Die arginreiche Region (AS 1487–1500 des HCV Polyproteins) ist gelb markiert. Der Austausch von Aspartat 1316 gegen Alanin führt zum Verlust der NTPase/Helikase-Aktivität. **C)** und **D)** zeigen Ribbon Diagramme von d2-NS3h und d2Δ-NS3h, modelliert mit SWISS MODEL (Schwede et al. 2003), basierend auf dem Koordinatensatz PDB 1HEI (Yao et al. 1997)). Alle Ribbondiagramme wurden mit dem Swiss-Pdb-Viewer (Guex und Peitsch 1997) erstellt und mit POV-Ray (POV-Ray-Team 2004) gerendert.

3.3 Herstellung von Vektoren für die Expression von HCV-NS3-Konstrukten in *E. coli*

3.3.1 pET16b-d2-NS3h – Vektor zur prokaryotischen Expression von Domäne 2 der HCV-NTPase/Helikase als His-Tag-Fusionsprotein

Die codierende Sequenz für die Subomäne 2 der HCV-NTPase/Helikase von HCV-1 (AS 1361–1503 des HCV Polyproteins) wurde in den Vektor pET16b (Novagen) subkloniert. Dazu wurde die Sequenz in einer Pfu-PCR amplifiziert, wobei an das 5'-Ende eine NdeI- und an das 3'-Ende eine XhoI-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurden. Als Template diente das Plasmid pET21b-NS3HCV, das von J. Choe zur Verfügung gestellt wurde (Kim et al. 1995). Beide o. g. Schnittstellen sind in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors, nicht aber in der restlichen Vektorsequenz und der zu klonierenden NS3-Sequenz vorhanden. PCR-Produkt und Vektor wurden mit NdeI und XhoI verdaut, gelgereinigt und ligiert. Nach Transformation in *E. coli* wurde der Erfolg der Klonierung durch Sequenzierung der protein-codierenden Sequenz bestätigt. Abbildung 3-3 zeigt die Klonierungsstrategie.



3.3.2 pET16b-d2Δ-NS3h – Vektor zur prokaryotischen Expression einer designierten Deletionsmutante von Domäne 2 der HCV-NTPase/Helikase als His-Tag-Fusionsprotein

Zur Herstellung eines Vektors für die Expression der d2-NS3h-Mutante d2Δ-NS3h wurde eine erweiterte *QuikChange* Mutagenese nach Wang und Malcolm durchgeführt (Wang und Malcolm 1999). In zwei aufeinander folgenden *Quikchange* Runden mit pET-16b-d2-NS3h als Template, wurden die für die AS 1458–1465 des HCV Polyproteins (VTQTVDFS) und AS 1470–1476 (FTIETIT) codierenden Sequenzen deletiert. Die Integrität der Plasmide wurde durch Sequenzierung des für das rekombinante Protein codierenden Bereichs überprüft. Abbildung 3-4 zeigt die deletierten Sequenzbereiche und den Ablauf der Mutagenese.

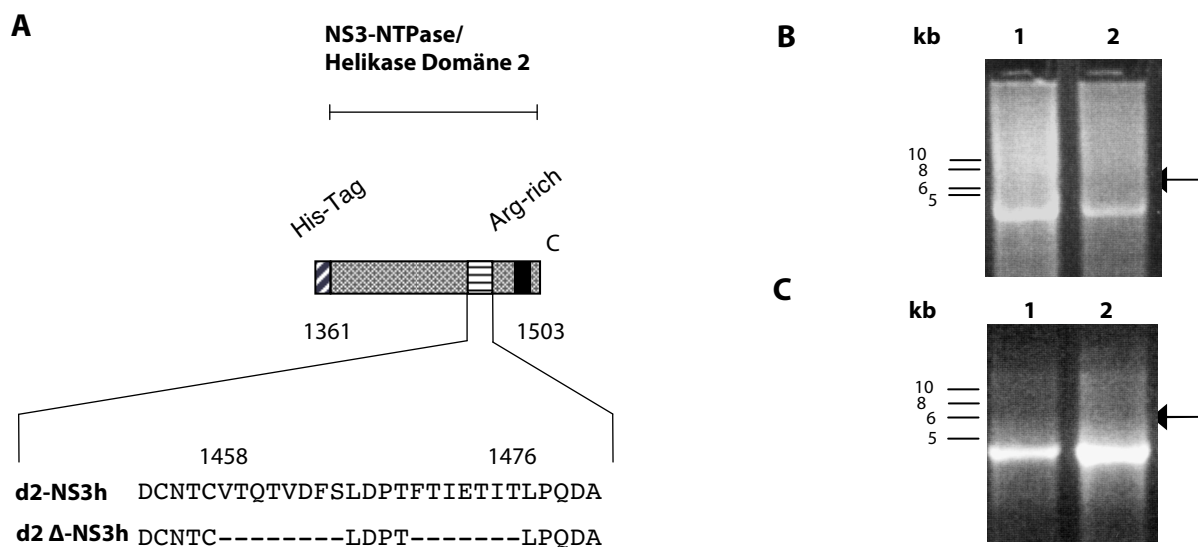


Abbildung 3-4. Herstellung eines Vektors für die prokaryotische Expression einer Deletionsmutante der Domäne 2 der HCV-Helikase mit N-terminalem His-Tag. Zwei Abschnitte im C-terminalen Bereich von Domäne 2 der HCV NTPase/Helikase wurden durch erweiterte *Quikchange* Mutagenese deletiert. **A)** Die deletierten Sequenzabschnitte bilden in wt-NS3 einen langen β -Hairpin dessen Schleifenboden aus den vier nicht deletierten Aminosäuren besteht. In zwei aufeinander folgenden *Quikchange* Runden wurden für AS 1458–1465 und 1470–1476 des HCV Polyproteins codierenden Nukleotidsequenzen deletiert. **B)** Ein Teil der Ansätze der ersten Deletionsrunde wurde vor (Spur 1) bzw. nach dem Verdau mit Dpn I (Spur 2) in einem Agarosegel aufgetrennt. Durch den DpnI Verdau wird die für die Mutagenese verwendete (methylierte) DNA-Matrize abgebaut, während die (nicht-methylierten) Mutagenese Produkte erhalten bleiben. Die PCR-Produkte (schwarzer Pfeil) haben die erwartete Größe von ca. 6 kb und wurden durch Transformation in E.coli Zellen vermehrt. **C)** Zeigt analog die Ansätze der zweiten Deletionsrunde. Der erzeugte Vektor wurde pET16b-d2Δ-NS3h genannt. Analytische TAE-Agarosegele (1%).

3.3.3 pET102D-NS3h und pET102D-NS3h-D1316A – Vektoren für die prokaryotischen Expression von NS3h und NS3h-D1316A als Trx-StrepTag-Fusionsprotein

Die Aufreinigung der HCV-NTPase/Helikase (AS 1193–1658 des HCV Polyproteins) als lösliches Histag-Fusionsprotein bis zu dem für die geplanten Versuche erforderlichen hohen Reinheitsgrad erwies sich als überaus schwierig. Daher wurden die entsprechenden cDNAs so in den Vektor pET102/D-TOPO® (Invitrogen) umkloniert, dass NS3h und NS3h-D1316A als His-Patch-Thioredoxin-Fusionsproteine (Lu et al. 1996) exprimiert und über ein Strep-Tag II affinitätschromatografisch aufgereinigt werden konnten. Prokaryotisch exprimierte heterologe Proteine sind als Thioredoxin(Trx)-Fusionsproteine häufig besser löslich (LaVallie et al. 1993, Williams et al. 1995, Czupryn et al. 1995). Die codierenden Sequenzen für die NTPase/Helikase (NS3h), und die Mutante NS3h-D1316A wurden durch gerichtete „TOPO®-Klonierung“ (siehe Abschnitt 2.3.7, S. 31) in den Vektor pET102/D-TOPO® (Invitrogen) eingebracht. Als Template für die PCR dienten das Plasmid pET21b-NS3HCV, das von J. Choe zur Verfügung gestellt wurde (Kim et al. 1995) bzw. das durch *Quikchange* Mutagenese erzeugte Plasmid pET21b-NS3HCV-D1316A. Über den Reverseprimer wurde die codierende Sequenz für ein StrepTag II (Aminosäuresequenz: WSHPQFEK) an das 3'-Ende der HCV-NTPase/Helikasesequenz fusioniert, gefolgt von einem Stopcodon. Der Erfolg der Klonierung wurde durch vollständige Sequenzierung der proteincodierenden Sequenz sowie der die „TOPO-Cloning Site“ flankierenden Bereiche bestätigt. Abbildung 3-5 veranschaulicht die resultierenden Fusionsproteine.

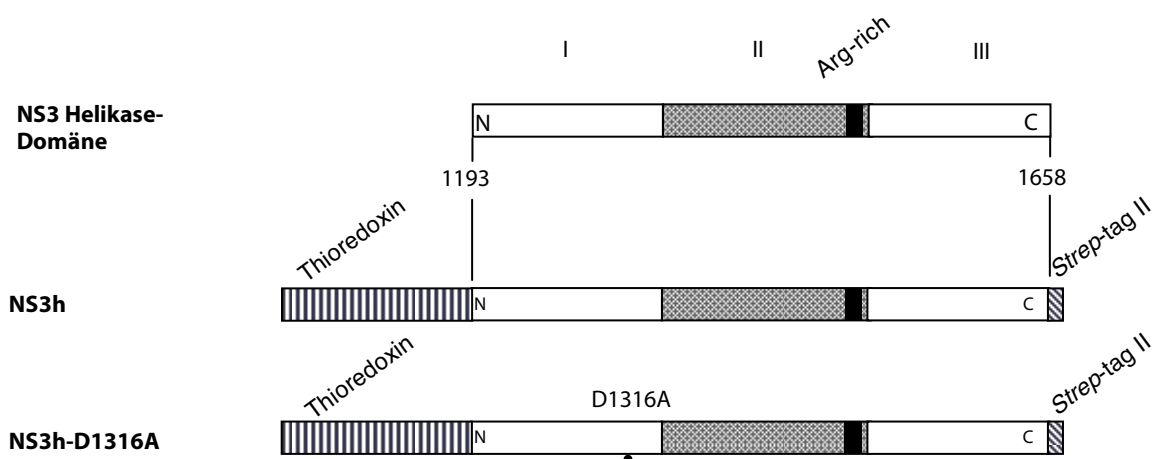


Abbildung 3-5. Subklonierung der HCV NS3 NTPase/Helikase und der Mutante NS3h-D1316A in den Vektor pET102D-Topo. Die für die HCV NS3-Helikase und die für die Mutante codierende Sequenz (AS 1193–1658 des HCV Polyproteins) wurden in einer *Pfu*-PCR amplifiziert und durch gerichtete „TOPO®-Klonierung“ in den Vektor eingebracht. Über den Reverseprimer wurde die codierende Sequenz für ein StrepTag II an das 3'-Ende der HCV-Helikasesequenz fusioniert.

3.4 Herstellung von Vektoren für die Expression von HCV-NS3-Konstrukten in Säugerzellen

Für die eukaryotische Expression von Fusionsproteinen mit C-terminalem V5 Epitop wurde der Vektor pEF5/FRT/V5-DEST (Invitrogen) gewählt. Dieser Vektor ist sowohl für die stabile Transfektion von Flp-In™-Host-Zellen zur eleganten Generierung von stabilen Zelllinien, als auch für die transiente Transfektion von Säugerzellen geeignet. Die Transkription des Transgens steht in diesem Vektor unter der Kontrolle eines EF-1 α Promotors. Da es sich bei diesem Vektor um einen *destination vector* des *Gateway Systems* von Invitrogen handelt (siehe Abschnitt 2.3.8, S. 32), wurden die zu exprimierenden cDNAs zunächst in den *entry vector* pENTR3C zwischenkloniert und anschließend durch LR-Rekombination in den Zielvektor transferiert.

3.4.1 Subklonierung der NS3-Konstrukte in den *Gateway entry vector* pENTR3C

pENTR3C-d2-NS3h und *pENTR3C-d2 Δ -NS3h*

Für die Subklonierung von Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase (d2-NS3h, AS 1361–1503 des HCV Polyproteins) und der Mutante d2 Δ -NS3h (siehe Abschnitt 3.2, S. 55) in den *entry vector* pENTR3C wurde eine Klonierungsstrategie mit den Restriktionsschnittstellen für BamHI und EcoRI gewählt. Beide Schnittstellen sind in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors, nicht aber in der restlichen Vektorsequenz und den zu klonierenden NS3-Sequenzen vorhanden. Durch eine PCR wurde unter Wahrung des Leserasters (im *destination vector* pEF5/FRT/V5-DEST) eine EcoRI Schnittstelle am 5'-Ende und eine BamHI Schnittstelle am 3'-Ende der codierenden Sequenz von NS3 eingefügt. Als Template dienten die Plasmide pET16b-d2-NS3h und pET16b-d2 Δ -NS3h (siehe Abschnitt 3.3.1 ff, S. 58). Über den Forward-primer wurde eine Kozak-Sequenz eingeführt, wodurch sich die erste codierte Aminosäure von Asn zu Asp änderte. Das Amplifikat enthielt kein Stopcodon so dass im *destination vector* pEF5/FRT/V5-DEST die codierende Sequenz für ein V5-Epitop-Fusionsprotein zustande kommt. In der PCR entstanden Produkte von der erwarteten Größe von ca. 450 bp, die mit BamHI und EcoRI verdaut und gereinigt wurden wie Abbildung 3-6 zeigt. Die verdauten PCR-Produkte wurden aus dem Gel extrahiert und durch Ligation mit dem entsprechend verdauten und gereinigten Vektor pENTR3C kloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch einen analytischen Verdau des erhaltenen Vektors bestätigt (siehe Abbildung 3-6). Zusätzlich wurde der proteincodierende Sequenzbereich jeweils vollständig sequenziert, um in der PCR ungewollt erzeugte Mutationen auszuschließen. Die erzeugten Vektoren wurden pENTR3C-d2-NS3h und pENTR3C-d2 Δ -NS3h genannt.

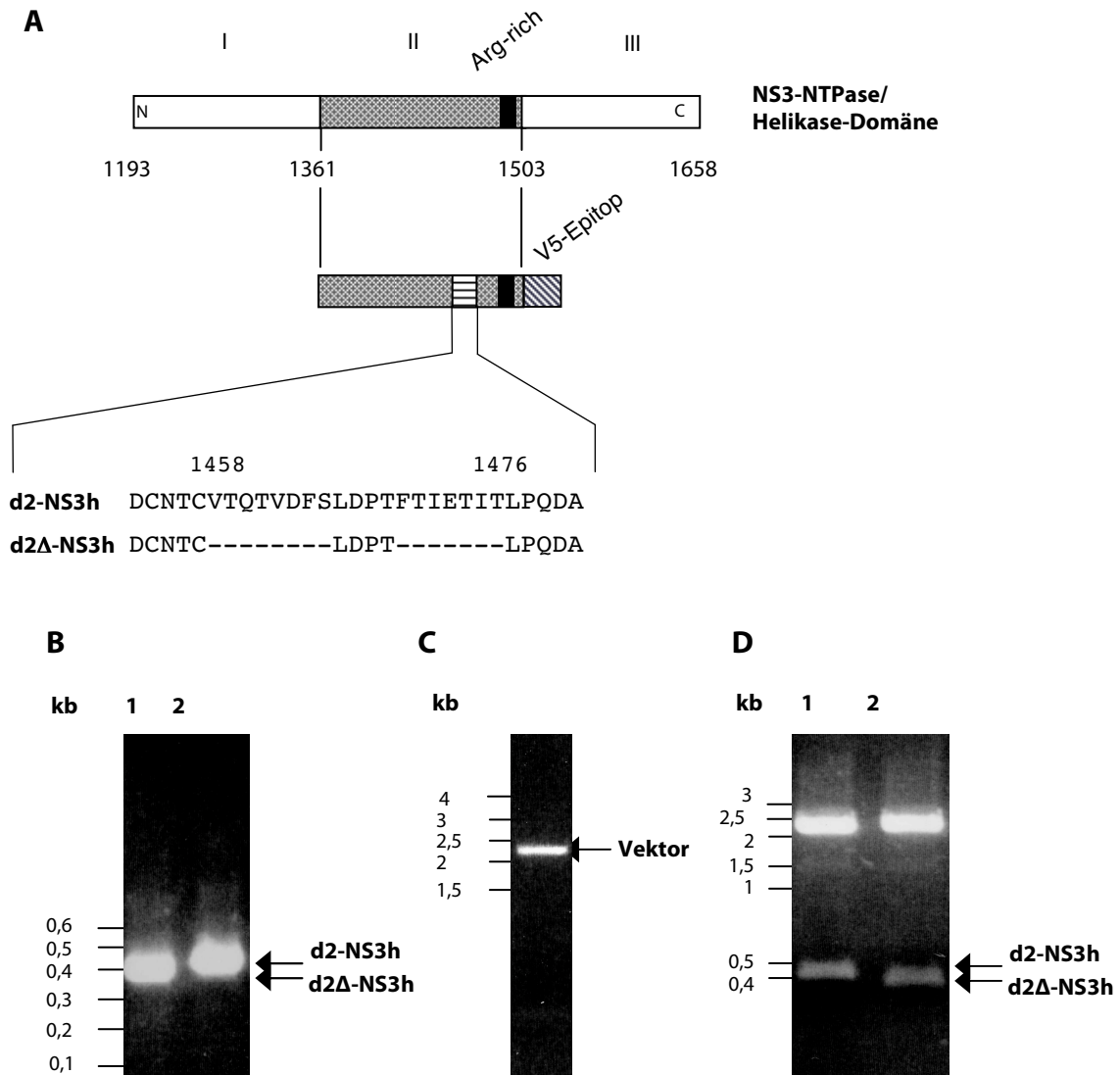
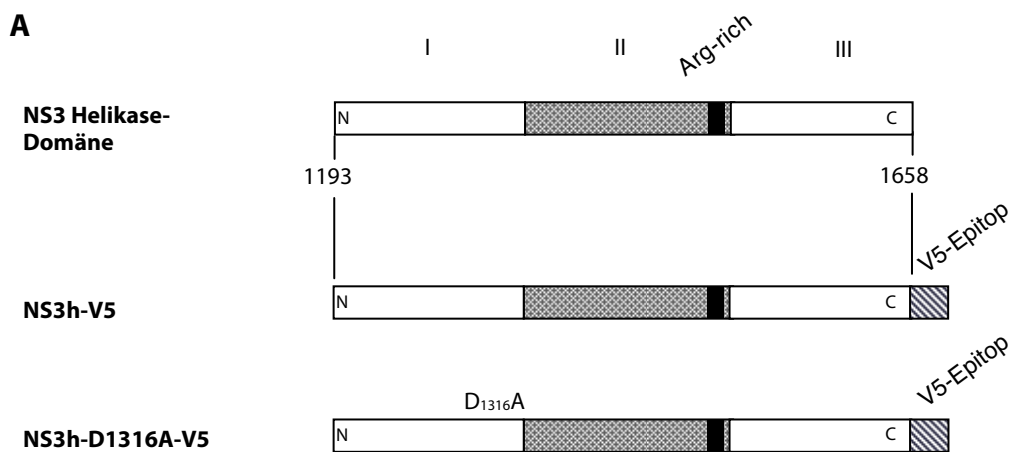
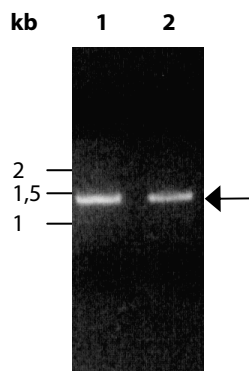


Abbildung 3-6. Subklonierung von Domäne 2 der HCV-Helikase und der Deletionsmutante d2Δ-NS3h in den gateway entry vector pENTR3C. **A)** Die für die Domäne 2 der HCV-Helikase und die für die Mutante codierende Sequenz (AS 1361–1503 des HCV Polyproteins) wurden in den Vektor pENTR3C subkloniert. Das eingezeichnete C-terminale V5-Epitop ist im *destination vector* pEF5/FRT/V5-DEST vorhanden. **B)** Die codierenden Sequenzen wurden in einer *Pfu*-PCR amplifiziert wobei Produkte der erwarteten Grössen von ca. 450 bp entstanden. In der PCR wurde am 5'-Ende eine EcoRI- und am 3'-Ende eine BamHI Schnittstelle eingefügt. Die PCR-Produkte wurden entsprechend verdaut, gelgereinigt und nach Ligation mit dem entsprechend verdauten und gelgereinigten Vektor **C)** zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. **D)** Minipräparationsprodukte der durch Ligation gebildeten Vektoren wurden zur Kontrolle mit EcoRI und BamHI verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt, wobei sich das erwartete Bandenmuster zeigte: Leerer Vektor bei ca. 2,3 kb und die cDNA-Inserts bei je ca. 450 bp.

pENTR3C-NS3h und pENTR3C-NS3h-D1316A

Die Subklonierung der HCV NS3 NTPase/Helikase (NS3h, AS 1193–1658 des HCV-Polyproteins) und der Mutante NS3h-D1316A in den *entry vector* pENTR3C erfolgte analog zur oben beschriebenen Klonierung über die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI. Als Template dienten das Plasmid pET21b-NS3HCV (Kim et al. 1995) bzw. das durch *Quikchange* Mutagenese erzeugte Plasmid pET21b-NS3HCV-D1316A. Der Forwardprimer wurde so gestaltet, dass unter Wahrung der codierenden Sequenz eine Kozak-Sequenz entstand.

**B****Abbildung 3-7. Subklonierung der HCV NS3 NTPase/Helikase und der Mutante NS3h-D1316A in den gateway entry vector pENTR3C.**

A) Die für die HCV NS3 NTPase/Helikase und die für die Mutante codierende Sequenz (AS 1193–1658 des HCV Polyproteins) wurden in den Vektor pENTR3C subkloniert. Das eingezeichnete C-terminale V5-Epitop ist erst im *destination vector* pEF5/FRT/V5-DEST vorhanden. Die codierenden Sequenzen wurden in einer *Pfu*-PCR amplifiziert wobei Produkte der erwarteten Grösse von ca. 1,4 kb entstanden. Dabei wurde am 5'-Ende eine EcoRI- und am 3'-Ende eine BamHI Schnittstelle eingefügt. Die PCR-Produkte wurden entsprechend verdaut, gelgereinigt und nach Ligation zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. **B)** Gezeigt sind die PCR-Produkte von NS3h (Spur 1) und NS3h-D1316A (Spur 2) nach Verdau und Gelreinigung in einem analytischen 1 % Agarosegel. Die Laufhöhe der PCR-Produkte ist mit einem Pfeil markiert.

pENTR3C-EGFP

Die Subklonierung der für EGFP (enhanced green fluorescent protein) codierenden cDNA erfolgte ebenfalls analog zur oben beschriebenen Klonierung über die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI. Als Template wurde der Vektor pEGFP-C2 (Clontech) verwendet. Bei dem in diesem Vektor codierten EGFP handelt es sich um die GFP-Variante GFPmut1 (Cormack et al. 1996), die sich durch eine hohe Expressionsrate in Säugerzellen sowie helle Fluoreszenz auszeichnet (Exzitationsmaximum: 488 nm; Emissionsmaximum: 507 nm). EGFP behält als Fusionsprotein seine Fluoreszenzeigenschaften. Die Kozak-Sequenz von pEGFP-C2 (Basen 606–616) wurde übernommen.

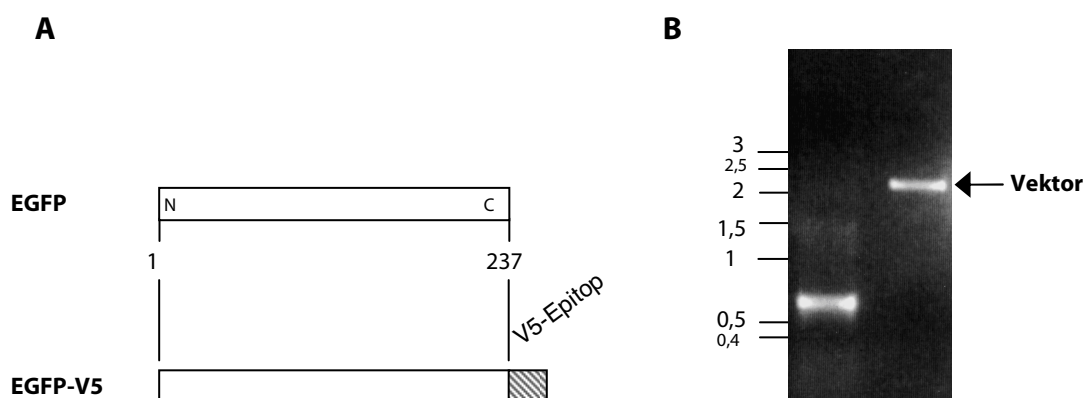


Abbildung 3-8. Subklonierung von EGFP in den gateway entry vector pENTR3C. A) Die für EGFP codierende Sequenz wurde in den Vektor pENTR3C subkloniert. Das eingezeichnete C-terminale V5-Epitop ist erst im *destination vector* pEF5/FRT/V5-DEST vorhanden. **B)** Die codierende Sequenz wurde in einer *Pfu*-PCR mit pEGFP-C2 (Clontech) als Template amplifiziert, wobei am 5'-Ende eine EcoRI- und am 3'-Ende eine BamHI Schnittstelle eingefügt wurden. Das PCR-Produkt hatte die erwartete Größe von ca. 750 bp. Das entsprechend verdauten und gelgereinigten PCR-Produkt (Spur 1) wurde nach Ligation mit dem entsprechend verdauten und gelgereinigten Vektor (Spur 2) zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

3.4.2 Subklonierung der NS3-Konstrukte in den Gateway destination vector pEF5/FRT/V5-DEST

Die NS3-Konstrukte wurden schließlich durch LR-Rekombination (siehe Abschnitt 2.3.8, S. 32), aus dem *entry vector* pENTR3C in den *destination vector* pEF5/FRT/V5-DEST transferiert. Die resultierenden Expressionsvektoren wurden durch Sequenzierung der die Rekombinationsstellen (*attR1* und *attR2*) umgebenden Bereiche auf ihre Integrität überprüft.

3.5 Prokaryotische Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

3.5.1 Expression und Aufreinigung von d2-NS3h und d2Δ-NS3h

Das unter Verwendung des Plasmids pET-16b-d2-NS3h exprimierbare, rekombinante Protein beinhaltet die Domäne 2 der HCV NS3 NTPase/Helikase (AS 1361–1503 des HCVPolyproteins) und wird im Folgenden als d2-NS3h bezeichnet. d2Δ-NS3h ist eine auf d2-NS3h basierende Mutante. Hier wurde ein langer β -Hairpin (AS 1458–1476) durch *in vitro* Mutagenese so verkürzt, dass nur der Schleifenboden (AS 1466–1469) erhalten blieb (siehe Abschnitt 3.2, S. 55). Unter den gewählten Bedingungen (Expressionsstamm: *E. coli*-BL21(DE3), Inkubation bei 37°C, Induktion mit 1 mM IPTG) ließ sich die Expression beider Konstrukte gut induzieren. Die Aufreinigung der His-Tag Fusionsproteine aus *E. coli* Lysat durch Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatografie erfolgte gemäß der in Abschnitt 2.4.7 auf S. 42 angegebenen Vorschrift. Aufgrund der bekanntermaßen schlechten Löslichkeit von in *E. coli* exprimierten, dem Protein d2-NS3h entsprechenden rekombinanten Proteinen (Gesell et al. 2001) wurde die Chromatografie unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt die Eluate einer Chromatografie exemplarisch für d2Δ-NS3h.

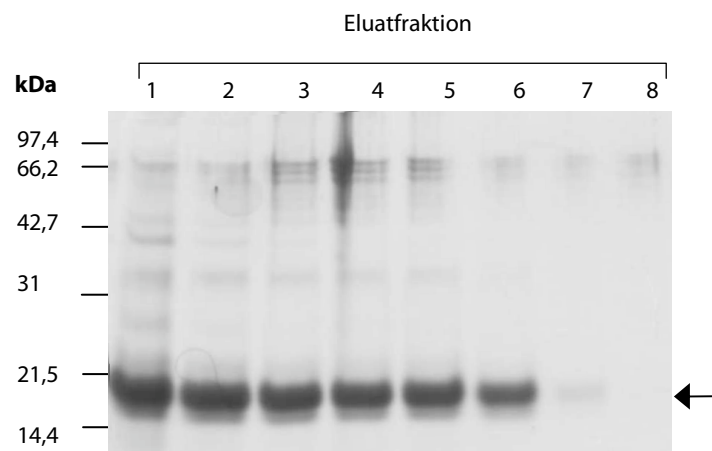


Abbildung 3-9. Ni-NTA-Affinitätschromatografie von d2Δ-NS3h. Gezeigt ist das Elutionsprofil einer Säulenchromatografie mit Matrix- und Eluatvolumina von je 1 ml. Die Laufhöhe des rekombinanten Proteins ist mit einem Pfeil markiert. Aufgetragen wurden je 20 μ l Eluat. 10% SDS-PAGE, Coomassiefärbung.

Die Eluate sind nahezu frei von kontaminierenden Fremdproteinen. Allerdings waren die so gereinigten rekombinanten Proteine stark mit Polynukleotiden verunreinigt, die sich nach einer Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid anfärben ließen, wie in Abbildung 3-10 gezeigt ist. Sie zeigten zudem ein nichthomogenes Laufverhalten in der Grössenausschluss-Chromatografie. Daher wurden diese Proteine durch präparative SDS-PAGE mit nach-

folgender Elektroelution der entsprechenden Banden von Polynukleotiden befreit (siehe Abbildung 3-10). Gereinigtes d2-NS3h neigt im Gegensatz zu d2 Δ -NS3h zur Präzipitation (gelegentlich war in konzentrierten Lösungen ein Niederschlag erkennbar), was durch die in Abschnitt 3.2 auf S. 55 angestellten Überlegungen erklärt werden kann.

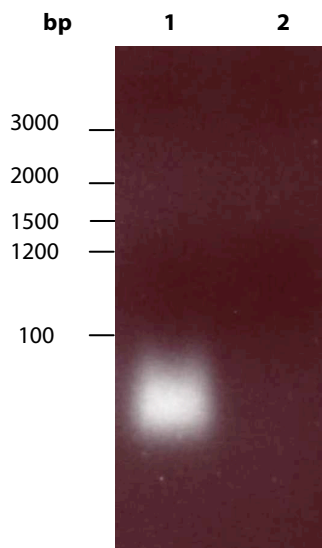


Abbildung 3-10. Bakteriell exprimiertes d2 Δ -NS3h ist nach Ni-NTA-Agarose-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen stark mit Polynukleotiden verunreinigt. Je 30 μ g Protein von d2 Δ -NS3h vor (Lane 1) und nach der Elektroelution (Lane 2) wurden in einem analytischen TAE-Agarosegel (1 % Agarose, 1 μ g/ml Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Nukleinsäuren werden durch das Ethidiumbromid angefärbt.

3.5.2 Expression und Aufreinigung von NS3h und Ns3h-D1316A

Nach der Umklonierung der längeren, für Ns3h und Ns3h-D1316A codierenden cDNAs zur prokaryotischen Expression mit einem C-terminalen StrepTag II ließen sich die Fusionsproteine in einer Einstufenreinigung isolieren. Dazu wurden die löslichen Fraktionen der Lysate entsprechend transformierter und induzierter *E. coli* BL21-(DE3)-Star durch Streptactin-Sepharose-Affinitätschromatografie aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.4.6, S. 41). Je nach aufzureinigender Menge wurden Matrixvolumina von 1 ml bis 4 ml eingesetzt; für das wt-Protein sowie die Mutanten war die Gewinnung von ca. 2 mg aus einem Kulturvolumen von 3 l möglich. Abbildung 3-11 zeigt die Eluate einer StrepTactin-Sepharose-Chromatografie exemplarisch am Beispiel NS3h-wt. (Matrixvolumen 1 ml, aufgetragen wurden jeweils 20 μ l der einzelnen, jeweils 1 ml umfassenden Eluatfraktionen). Es ist zu erkennen, dass die Eluate nahezu frei von kontaminierenden Fremdproteinen sind. die größten Mengen an rekombinantem Protein waren stets in den Fraktionen 1 bis 4 zu detektieren.

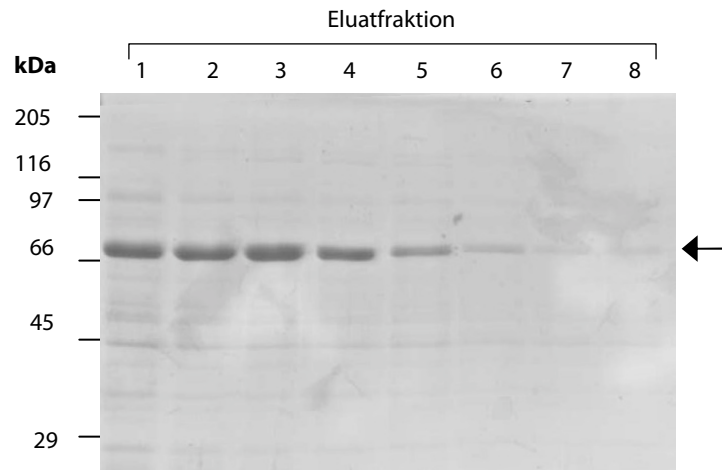


Abbildung 3-11. StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatografie von NS3h. Gezeigt ist das Elutionsprofil einer Säulenchromatografie mit Matrix- und Eluatvolumina von je 1 ml. Die Laufhöhe des rekombinanten Proteins ist mit einem Pfeil markiert. Aufgetragen wurden je 20 μ l. 10% SDS-PAGE, Coomassiefärbung.

3.6 Enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Potentiell enzymatisch aktive Proteine wurden enzymatisch charakterisiert. Die beobachtete ATPase Aktivität von NS3h und deren deutliche Steigerung durch Poly(U) ab etwa 1,8 μ M (Nukleotid) stimmen gut mit den Beobachtungen von Tai et al. und Wardell et al. überein (Tai et al. 1996, Wardell et al. 1999) und lassen auf eine native Konformation des Enzyms schließen (siehe Abbildung 3-12 NS3h-D1316A, eine auf NS3h basierende Punktmutante ohne NTPase/Helikaseaktivität, wurde generiert um die spezifische PKC-Inhibition durch NS3 *in vitro* einfacher charakterisieren zu können. Die NTPase-Aktivität des wildtyp Proteins stört die Bestimmung der PKC-Aktivität in Gegenwart des Proteins im radioaktiven Assay massiv durch Hydrolyse von ATP. Der Austausch von Aspartat 1316 des HCV Polyproteins gegen Alanin führt nach Wardell et al. 1999 zu einer kompletten Inaktivierung der NS3 NTPase/Helikaseaktivität (Wardell et al. 1999), was hier bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 3-12). In den hier eingesetzten Konzentrationen kann NS3h-D1316A also problemlos im radioaktiven PKC-Assay eingesetzt werden um die durch Protein-Protein-Wechselwirkung vermittelte PKC-Inhibition durch NS3 zu bestimmen.

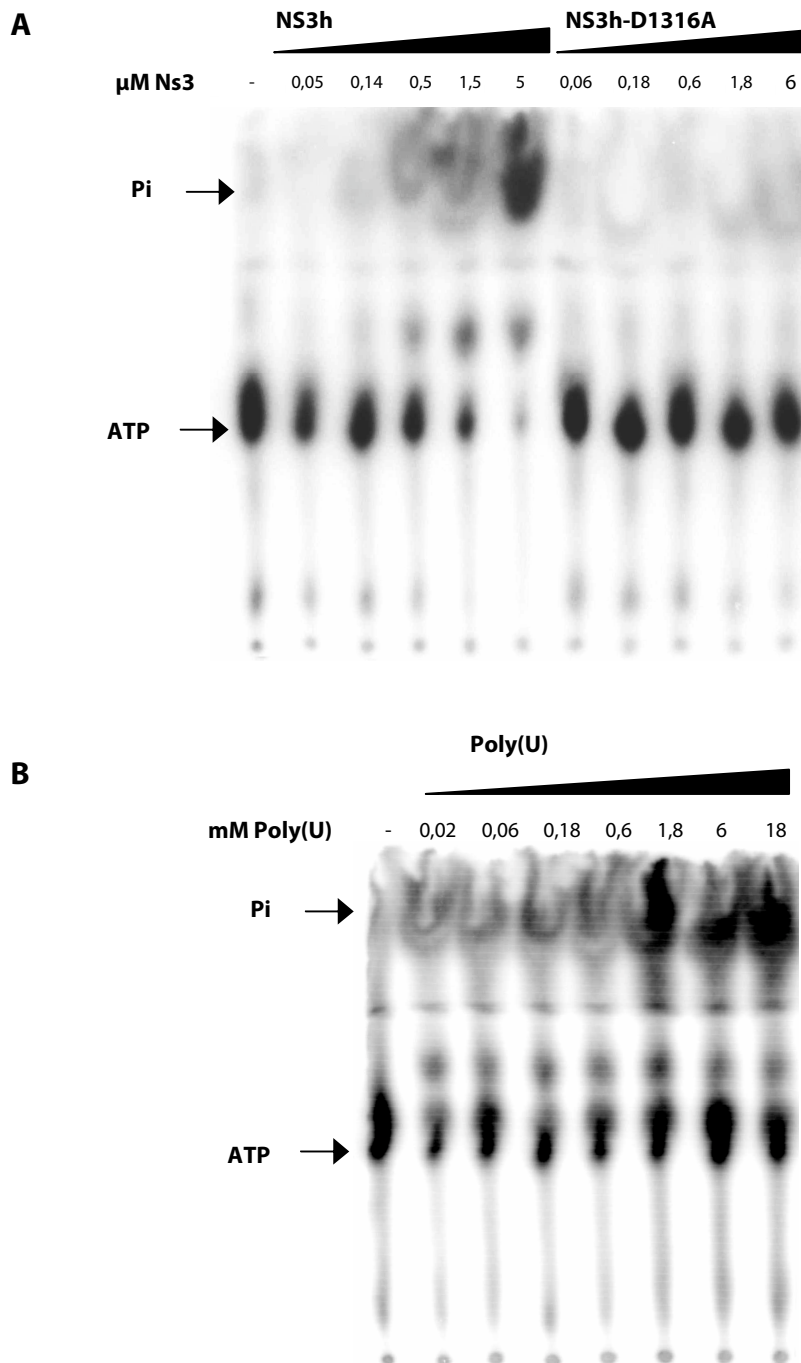


Abbildung 3-12. ATPase Aktivität von NS3h und der Mutante NS3h-D1316. Die rekombinanten Proteine wurden im ATPase-Assay mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Die entstandenen Hydrolyseprodukte wurden anschließend dünnenschichtchromatografisch aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne rekombinantes Protein. **A**) Das wt-Protein NS3h besitzt erwartungsgemäß ATPase-Aktivität. Für die Mutante NS3h-D1316A war im getesteten Konzentrationsbereich (bis $6\ \mu\text{M}$) keine ATPase Aktivität detektierbar. PKC-Inhibition durch NS3h-D1316A im *in vitro* PKC-Assay kann also nicht durch ATP-Hydrolyse verursacht werden. Der Versuch wurde $3 \times$ wiederholt. **B**) zeigt dass die ATPase-Aktivität des wt-Proteins NS3h durch Zugabe von Poly(U) stimulierbar ist. Zu jeweils $0,5\ \mu\text{M}$ NS3h wurde Poly(U) in steigender Konzentration in die Ansätze gegeben. Ab etwa $1,8\ \text{mM}$ (Nukleotid) Poly(U) ist eine deutliche Steigerung der ATP-Hydrolyse erkennbar, was auf eine native Konformation des Enzyms schließen lässt.

3.7 Inhibition der enzymatischen Aktivität von Proteinkinase C Isoformen durch NS3 *in vitro*

Da die bisher veröffentlichten Daten zur PKC-Inhibition durch NS3 auf Untersuchungen mit nichtphysiologischen NS3 Fragmenten beruhen, sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob auch das NS3 NTPase/Helikase Holoenzym ein PKC-Inhibitor ist. Zudem sollte überprüft werden, ob die Inhibition aus einer Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen der argininreichen Region HCV(1487–1500) und der PKC resultiert. Zusätzlich wurde die Untersuchung auf alle PKC-Isoformen ausgedehnt.

Abbildung 3-13 zeigt die Inhibition von PKC- α durch verschiedene NS3-Konstrukte, gemessen im radiometrischen PKC-Assay. Das wildtyp Protein NS3h Inhibiert PKC- α mit einem apparenten IC_{50} von 5 nM, die Messung wird allerdings eindeutig stark durch ATP-Hydrolyse durch die NS3h-NTPase-Aktivität gestört (siehe Abschnitte 3.6 und 0, S. 67 bzw. S. 73). Die NTPase-defiziente Mutante NS3h-D1316A hemmt PKC- α mit einem IC_{50} von 0,7 μ M, was einen guten Näherungswert für die PKC- α -Inhibition durch Protein-Protein-Wechselwirkung mit der NS3 NTPase/Helikase darstellen sollte.

Die Inhibition von PKC- α durch d2-NS3h ($IC_{50} = 1,7 \mu$ M) fällt geringfügig schwächer aus als die Inhibition durch d2 Δ -NS3h ($IC_{50} = 0,6 \mu$ M). Erwartungsgemäß wird nicht nur die Phosphorylierung des Substrats Histon HIIIS, sondern auch die Autophosphorylierung von PKC- α durch NS3h-D1316A und d2 Δ -NS3h inhibiert ($IC_{50} = 0,7 \mu$ M bzw. 0,2 μ M).

Abbildung 3-14 zeigt die grafische Auswertung der radiometrischen Messungen zur Bestimmung der Inhibition der weiteren PKC-Isoformen durch NS3h-D1316A und d2 Δ -NS3h. Die IC_{50} -Werte für die einzelnen Isoformen und Rattenhirn PKC, eine Mischung der Isoformen α , β und γ , sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Alle PKC-Isoformen werden durch beide NS3-Konstrukte stark inhibiert. Für NS3h-D1316A liegen alle IC_{50} -Werte zwischen 0,3 und 3,4 μ M, für d2 Δ -NS3h (Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase) zwischen 0,6 und 15 μ M.

Die PKC-Isoformen δ und ϵ , denen bei Karzinogenese Prozessen vermutlich eine besondere Bedeutung zukommt (siehe Abschnitt 1.8 auf S. 19), werden durch NS3h-D1316A mit IC_{50} -Werten von 0,4 μ M respektive 0,6 μ M inhibiert, durch d2 Δ -NS3h mit IC_{50} -Werten von 14 μ M respektive 0,9 μ M.

Es ist wichtig, festzuhalten dass alle Messungen zur Bestimmung von IC_{50} für die Inhibition von PKC-Isoformen durch NS3-Konstrukte unter identischen Bedingungen (gleiches Assayvolumen, gleiche Temperatur, gleiche Menge Substrat Histon HIIIS) durchgeführt wurden und die gewonnenen Daten daher miteinander vergleichbar sind.

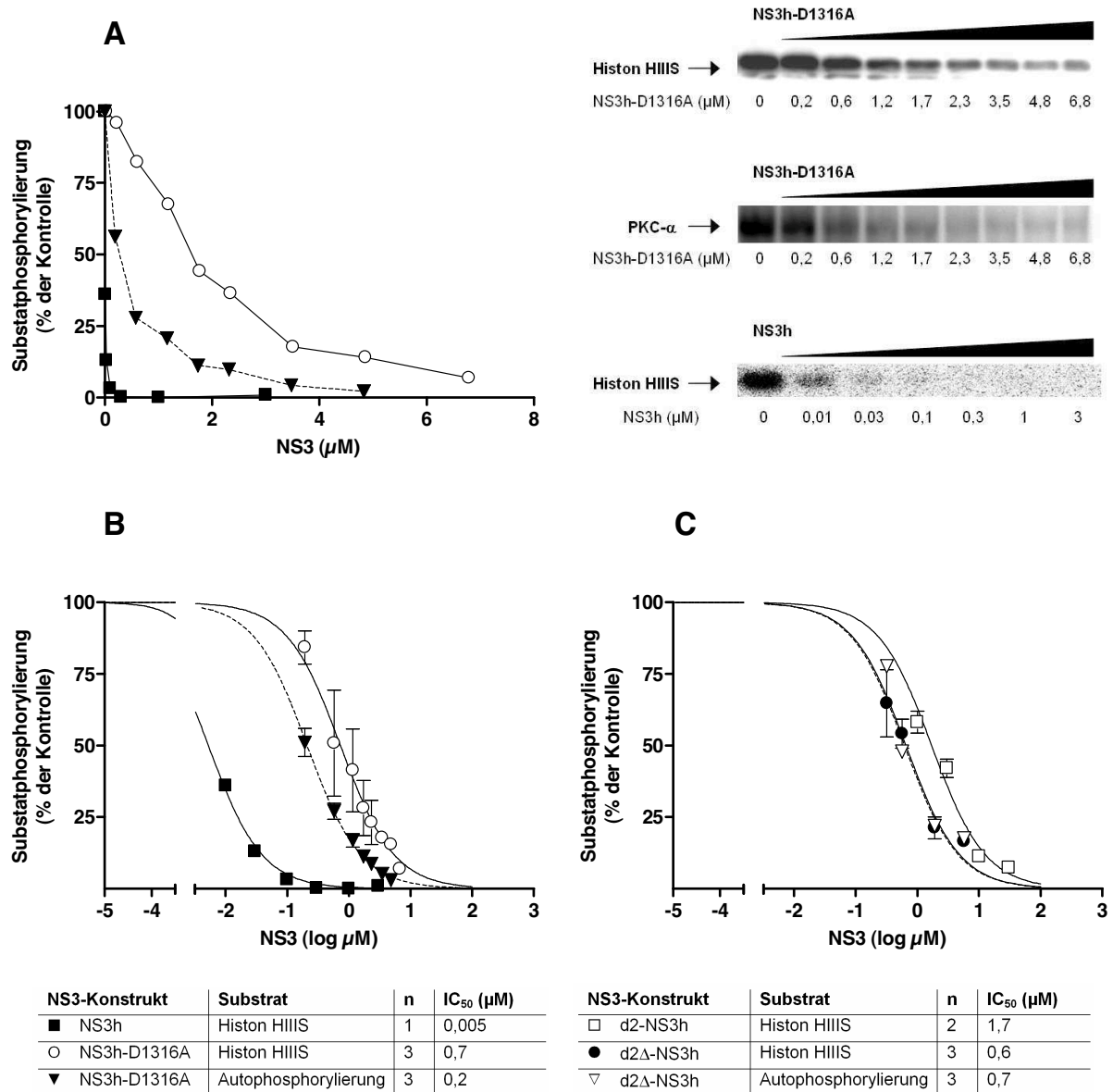
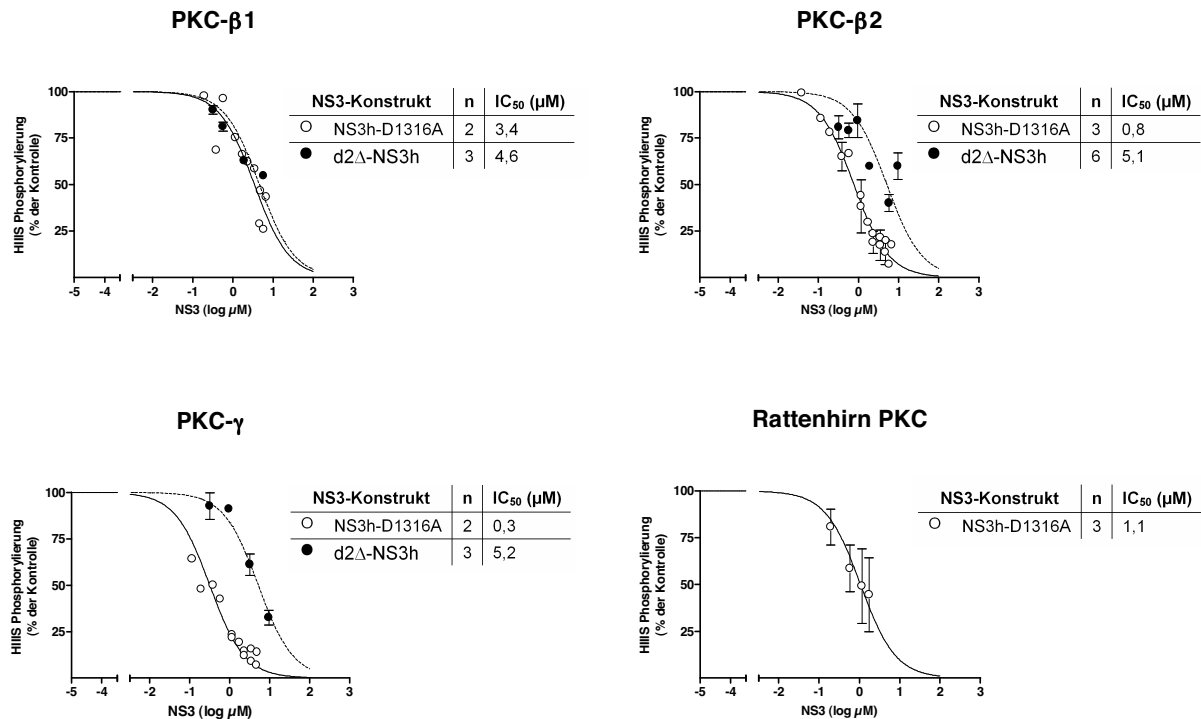


Abbildung 3-13. Inhibition von PKC- α durch NS3-Fragmente im radiometrischen PKC-Assay. **A)** Zeigt eine lineare Auftragung exemplarischer Messreihen und die dazu gehörigen Autoradiogramme. **B)** Zeigt halblogarithmisch aufgetragene Mittelwerte \pm SEM und durch nichtlineare Regression ermittelte Kurven zur Bestimmung von IC₅₀. Dargestellt ist die Phosphorylierung des Substrats Histon HIIS (als % der Phosphorylierung von Kontrollansätzen ohne NS3) in Anwesenheit von NS3h (■), der NTPase-defizienten Mutante NS3h-D1316A (○), sowie die PKC- α Auto-phosphorylierung (▼) in Anwesenheit von NS3h-D1316A und Histon HIIS. In **C)** sind analog Mittelwerte für die HIIS Phosphorylierung in Gegenwart der SubDomäne 2 Konstrukte d2 Δ -NS3h (●) und d2-NS3h (□) aufgetragen. Beide Konstrukte besitzen keine NTPase-Aktivität. Mittelwerte wurden aus jeweils *n* unabhängigen Messungen gebildet (siehe Tabellen zu B und C).

Inhibition von cPKCs



Inhibition von nPKCs

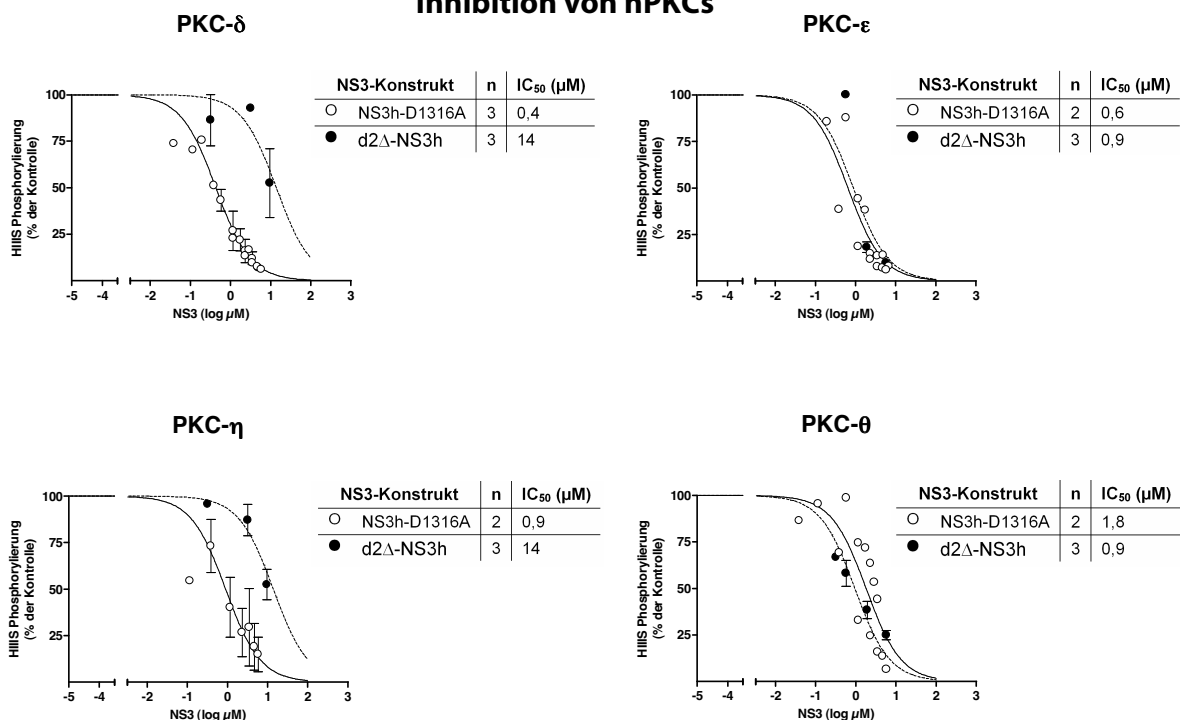


Abbildung 3-14. Inhibition von cPKC-, nPKC- und aPKC-Isoformen durch NS3-Fragmente im radio-metrischen PKC-Assay. Gezeigt sind halblogarithmisch aufgetragene Mittelwerte \pm SEM und durch nicht-lineare Regression ermittelte Kurven zur Bestimmung von IC₅₀. Dargestellt ist die Phosphorylierung des Substrats H11S (Bei 0,05 μ g/ μ l als % der H11S-Phosphorylierung in Kontrollansätzen ohne NS3) in Anwesenheit von NS3h-D1316A (○) bzw. d2Δ-NS3h (●). Mittelwerte wurden aus je n unabhängigen Messungen gebildet (siehe Tabellen). Die Abbildung wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.

Inhibition von aPKCs

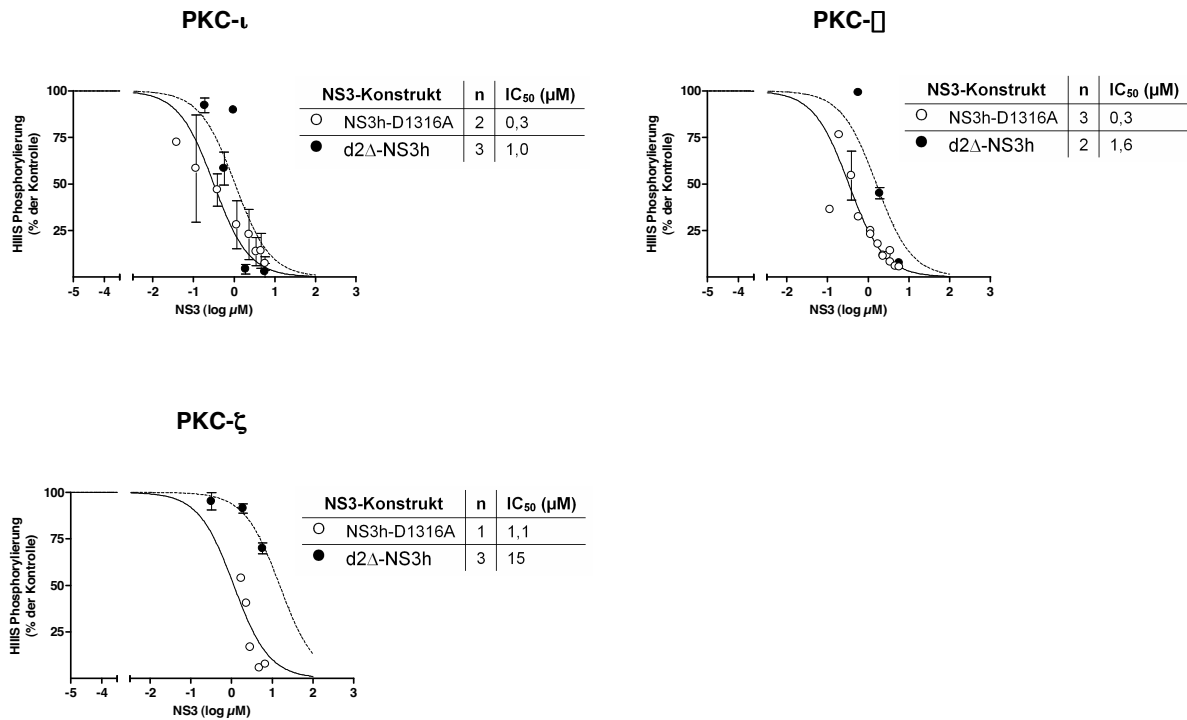


Abbildung 3-14, Fortsetzung. Legende siehe vorherige Seite.

Klasse	Isoform	IC ₅₀ (μ M)	
		NS3h-D1316A	d2 Δ -NS3h
cPKC	α	0,7	0,6
	β I	3,4	4,6
	β II	0,8	5,1
	γ	0,3	5,2
	Rattenhirn-PKC*	1,1	
nPKC	δ	0,4	14
	ϵ	0,6	0,9
	η	0,9	14
	θ	1,8	0,9
aPKC	ι	0,3	1,0
	μ	0,3	1,6
	ζ	1,1	15

Tabelle 3-1. Inhibition von cPKC-, nPKC- und aPKC-Isoformen durch NS3-Fragmente im radiometrischen PKC-Assay.

*Aus Rattenhirn präparierte PKC ist eine Mischung der Isoformen α , β und γ .

3.7.1 NS3h inhibiert PKC auch bei konstanter ATP-Konzentration

Da nicht auszuschließen ist, dass die Punktmutation in NS3h-D1316A die Wechselwirkung zwischen der argininreichen Region HCV(1487–1500) und der PKC, und damit die PKC-Inhibition beeinflusst, wurde zusätzlich ein PKC-Assay durchgeführt, in dem die ATP-Konzentration in den Ansätzen durch ein ATP regenerierendes System (Creatinphosphat und Creatinkinase) konstant gehalten wird. Mögliche ATPase-Aktivitäten in den Proteinpräparationen werden dadurch kompensiert. Da die ATP-Regeneration aus ADP während des Assays die spezifische Radioaktivität von [γ - ^{32}P]ATP reduzieren würde, wurde ein nichtradio-metrisches Assay-System (PepTag, Promega) gewählt (Siehe Legende zu Abbildung 3-15). In diesem Assay konnte der mit NS3h-D1316A im radioaktiven PKC-Assay erbrachte Befund bestätigt werden (siehe Abbildung 3-15). Die Gegenwart von 1,2 μM NS3h bewirkt eine deutliche Hemmung (>50%) der PKC-Aktivität, was gut mit dem für NS3h-D1316A im radioaktiven PKC- α Assay gemessenen IC_{50} von 0,73 μM übereinstimmt. Wenn Komponenten des ATP-regenerierenden Systems fehlen, fällt die Hemmung durch 1,2 μM NS3h erwartungsgemäß quantitativ aus.

Die unterschiedlich starke PKC-Inhibition in den Ansätzen mit bzw. ohne das vollständige ATP-regenerierende System demonstriert auch das Funktionieren der ATP-Regeneration. d2 Δ -NS3h (Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase) führt in der getesteten Konzentration von 6 μM zu kompletter Inhibition der PKC- α -Aktivität, auch in Anwesenheit des ATP-regenerierenden Systems, was ebenfalls mit den Erwartungen übereinstimmt ($\text{IC}_{50} = 0,6 \mu\text{M}$ im radiometrischen PKC-Assay). Da der Assay bei recht hoher Creatinphosphat-Konzentration (16 mM) durchgeführt wurde, was Einfluss auf die NS3-Funktion (ATPase Aktivität) gehabt haben könnte, wurden Kontrollansätze ohne Creatinkinase durchgeführt. Die PKC Inhibition ist hier quantitativ, das Creatinphosphat hat also keinen erkennbaren Einfluss.

Zusammengenommen mit den Ergebnissen aus dem radiometrischen PKC-Assay ergeben diese Daten den schlüssigen Nachweis einer potenten PKC-Inhibition durch das NS3 NTPase/Helikase Holoenzym *in vitro*, die unabhängig von der ATPase Aktivität, durch Interaktion zwischen der argininreichen Region und der PKC zustandekommt.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
PKC- α	-	+	+	+	+	+	+	+
NS3-Konstrukt	-	-	NS3h	NS3h	NS3h	d2 Δ -NS3h	d2 Δ -NS3h	d2 Δ -NS3h
Creatinphosphat	+	+	-	+	+	-	+	+
Creatinkinase	+	+	-	+	-	-	+	-
Peptag TM								
Peptag TM -P								

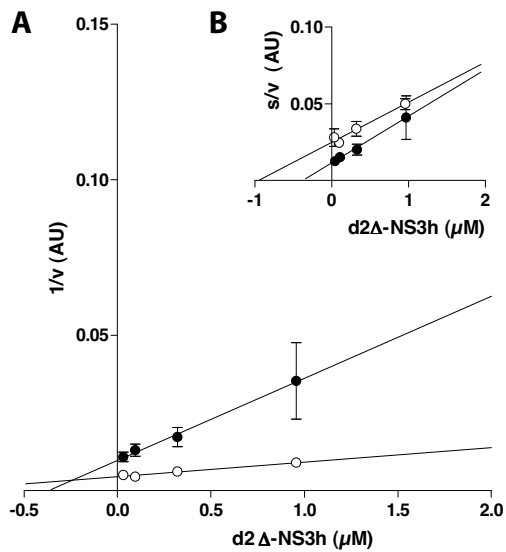
Abbildung 3-15. NS3h inhibiert PKC- α bei konstanter ATP-Konzentration. In einem PKC-Assay mit ATP-regenerierendem System [basierend auf dem „PepTag“-System (Promega) und Phosphocreatin/Creatin Phosphokinase (Kholodenko et al. 1987)] wurde die relative PKC- α Aktivität in Gegenwart von NS3h (1,2 μ M) bzw. d2 Δ -NS3h (6 μ M) überprüft. Die ATP-Konzentration betrug 2,5 mM. Das fluoreszenzmarkierte Peptid „C1“ trägt bei pH 8 eine Nettoladung von +1. Wird dieses Peptid durch Protein Kinase C phosphoryliert, ändert sich seine Nettoladung zu -1. Dadurch lässt es sich durch Elektrophorese in einem Agarose-Gel von nicht phosphoryliertem Peptid trennen. Wie erwartet, ist die durch NS3h bewirkte PKC-Inhibition in Abwesenheit des ATP-regenerierenden Systems vollständig (Lane 3 und 5). In Anwesenheit des ATP-regenerierenden Systems (Lane 4) stimmt die beobachtete Inhibition mit den für die ATPase-defiziente Mutante NS3h-D1316A beobachteten Ergebnissen aus dem radioaktiven PKC-Assay überein (IC₅₀ = 0,7 μ M). Die unterschiedlich starke PKC-Inhibition durch NS3h bei An- bzw. Abwesenheit des ATP-regenerierenden Systems zeigt auch das Funktionieren der ATP-Regeneration. Das Konstrukt d2 Δ -NS3h inhibiert PKC- α in diesem Assay in Abwesenheit (Lane 6 und 8) sowie in Anwesenheit (Lane 7) des ATP-regenerierenden Systems erwartungsgemäß vollständig.

3.8 Modus der Inhibition

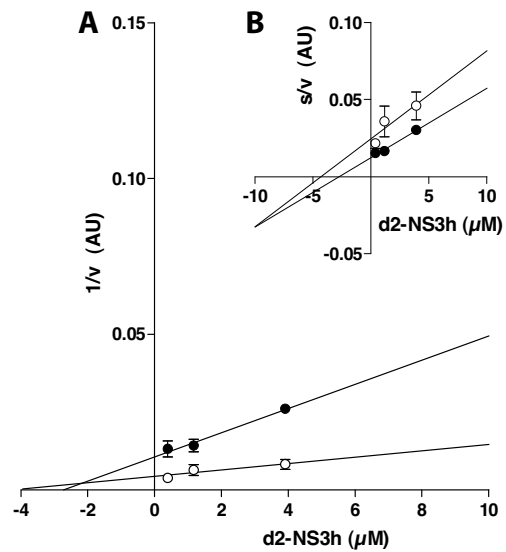
Zur kinetischen Analyse der PKC-NS3-Wechselwirkung wurden initiale Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substrat- und NS3-Konzentrationen bestimmt und in Plots nach Dixon (Dixon 1953) sowie nach Cornish-Bowden (Cornish-Bowden 1974) aufgetragen. Abbildung 3-16 zeigt die Plots zu den im radioaktiven PKC-Assay ermittelten kinetischen Daten. Das durch Protein-Engineering gewonnene d2 Δ -NS3h hemmt PKC- α in Bezug auf das Substrat Histon HIIIS rein kompetitiv, wie an dem Schnittpunkt der Regressionsgraden oberhalb der X-Achse im Dixon Plot und den parallel verlaufenden Regressionsgraden im Cornish-Bowden Plot erkennbar ist. Dieser Inhibitionsmodus stimmt mit dem von (Borowski et al. 2000) festgestellten Modus für die Inhibition von Rattenhin PKC durch das 14-AS-Peptid mit der Sequenz der argininreichen Region der NS3 NTPase/Helikase (AS 1487–1500 des HCV Polyproteins) überein. Der Wert für K_i (die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes) beträgt 0,25 μM . Für d2-NS3h und NS3h-D1316A ergibt sich der Modus einer *mixed-type* Hemmung (Schnittpunkt der Graden oberhalb der X-Achse in Dixon Plot und unterhalb der X-Achse im Cornish-Bowden Plot). Neben der reinen Substratkompetition muss in beiden Fällen zusätzliche Interaktion zwischen den NS3-Konstrukten und der Kinase und/oder ihrem Substrat vorliegen.

d2-NS3h unterscheidet sich von d2 Δ -NS3h durch das Vorhandensein des langen β -Hairpins (AS 1458–1476). Dieser ist hier allerdings, anders als in nativem NS3 nicht in Tertiärstrukturelemente eingebettet – daher neigt d2-NS3h zur Aggregation (Siehe Abschnitt 3.5.1 auf S. 65). Eine unspezifische Aggregation des flexiblen loops mit Bereichen auf der Oberfläche der PKC oder dem Substrat ist wahrscheinlich, die Inhibitor-Konstanten sind hier wenig aussagekräftig. NS3h-D1316A hingegen sollte in einer Konformation vorliegen, die der von nativem NS3 sehr nahe kommt. An der hier festgestellten zusätzlichen Interaktion sind höchstwahrscheinlich Bereiche auf der Oberfläche von Domäne 1 und/oder Domäne 3 der NS3 NTPase/Helikase beteiligt. K_i beträgt 0,5 μM , K_i' (die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes) beträgt 1,5 μM . Der deutlich kleinere Wert für K_i zeigt an, dass die beobachtete Inhibition hauptsächlich aus der spezifischen Interaktion mit dem aktiven Zentrum der PKC resultiert.

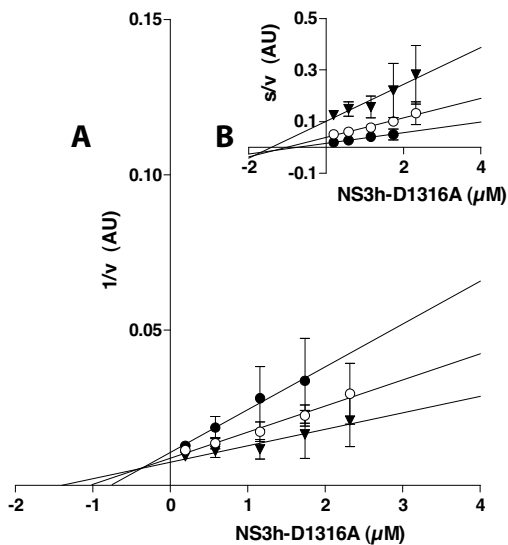
d2Δ-NS3h



d2-NS3h



NS3h-D1316A



NS3-Konstrukt	K_i (μM)	K_i' (μM)
NS3h-D1316A	0,5	1,5
d2Δ-NS3h	0,25	-
d2-NS3h	2	10

Abbildung 3-16. Grafische Analyse zur Bestimmung der Inhibitionsmodi der PKC-Inhibition durch d2Δ-NS3h, d2-NS3h und NS3h-D1316A. Gezeigt sind Plots nach Dixon **A)** und nach Cornish-Bowden **B)**. Die Schnittpunkte der Regressionsgeraden ergeben $-K_i$ im Dixon Plot bzw. $-K_i'$ im Cornish-Bowden Plot. Die Inhibitorkonstanten sind in einer Tabelle zusammengefasst. \circ , $0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Histon HIIS; \bullet , $0,14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Histon HIIS; \blacktriangledown , $0,34 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Histon HIIS. In (1) und (2) wurde PKC- α verwendet, in (3) Rattenhirn-PKC. Da eine relative Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten erfolgte, sind die Y-Werte in „arbitrary units“ (AU) angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus je 3 unabhängigen Experimenten (radiometrischer PKC-Assay mit Histon HIIS als Substrat).

3.9 Generierung von NIH 3T3 Zellen mit stabiler Expression von HCV-NS3-Konstrukten

Zur Analyse NS3-vermittelter, transformierender Effekte wurden NIH 3T3 Zellen mit stabiler Expression der NS3 NTPase/Helikase sowie der in Abschnitt 3.2 erläuterten NS3-Konstrukte generiert. Mit Hilfe der gewonnenen Zelllinien sollte auch die Frage beantwortet werden, inwieweit die *in vitro* nachgewiesene Interaktion von NS3 mit Kinasen der PKC-Familie in intakten Zellen relevant ist. Zur stabilen Transfektion wurde das Flp-In™-System (Invitrogen) eingesetzt (siehe Abschnitt 2.5.4, S. 49). In diesem System ist die Expression rekombinanter Proteine mit einer Hygromycin-B-Resistenz gekoppelt, so dass die kontinuierliche Zugabe dieses Antibiotikums die stabile Expression sicherstellt. Die stabile Expression der viralen Proteine wurde zusätzlich mit Hilfe eines gegen das V5-Epitop der Fusionsproteine gerichteten Antikörpers durch Detektion der Banden auf der erwarteten Laufhöhe im Western Blot nachgewiesen (siehe Abbildung 3-17).

Die Verwendung des Flp-In™-Systems garantiert die singuläre Integration der cDNAs am gleichen genomischen Locus. Somit erfolgt die Expression der verschiedenen Konstrukte mit geringer Variation im Expressionsniveau, was auch an den sehr ähnlichen Signalintensitäten im Western Blot erkennbar ist (siehe Abbildung 3-17). Dadurch wird ein Vergleich der unterschiedlichen Expressionskonstrukte im Hinblick auf ihren Einfluss in Zellkulturassays ermöglicht.

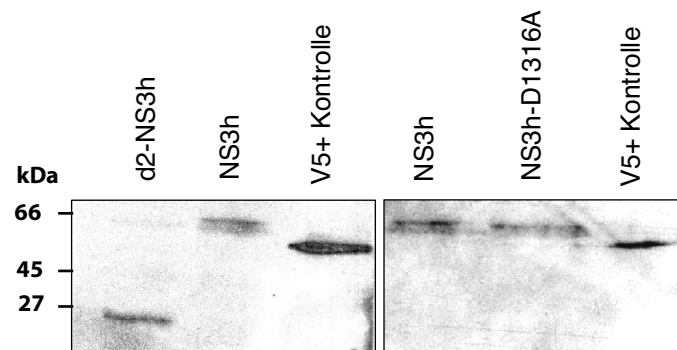


Abbildung 3-17. Nachweis der Expression rekombinanter Proteine in stabil transfizierten NIH 3T3 Zellen. Zur Detektion der V5-Epitop-Fusionsproteine wurde ein gegen das V5-Epitop gerichteter Antikörper im Western Blot verwendet. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtprotein aus lysierten Zellen (300 µg). NS3h, NS3h-D1316A und d2-NS3h haben als V5-Epitop-Fusionsproteine Molekulargewichte von etwa 56 respektive 21 kDa. Als Positivkontrolle wurde ein in *E. coli* exprimiertes, ca. 50 kDa schweres Protein mit V5-Epitop verwendet. Der Vergleich der Signalintensitäten von Banden auf demselben Blot zeigt deutlich, dass die verschiedenen NS3-Konstrukte ähnlich stark exprimiert werden. Die Expression des hier nicht gezeigten Konstruktes d2Δ-NS3h wurde ebenfalls im Western Blot nachgewiesen. Allerdings erfolgte hier die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers nicht wie für die gezeigten Blots mit Hilfe eines Chemolumineszenz-substrates, sondern es wurde ein Farbsubstrat eingesetzt, dessen Farbe mit der Zeit verblasst ist. Die Signalintensität von d2Δ-NS3h war mit der von d2-NS3h vergleichbar, das parallel auf demselben Blot untersucht wurde.

3.10 Einfluss der NS3 NTPase/Helikase auf die intrazelluläre Proteinkinase C Aktivität von NIH 3T3 Zellen

Zur Aufklärung der Relevanz der Interaktion zwischen NS3 und Kinasen der PKC-Familie in intakten Zellen, wurde ein Assay zur Bestimmung der intrazellulären PKC-Aktivität an stabil mit NS3-Konstrukten transfizierten NIH 3T3 Zellen durchgeführt. Die Behandlung mit TPA (siehe Abschnitt 1.7.5, S. 18) aktiviert in vielen Zellkultursystemen kurzzeitig die intrazelluläre PKC Aktivität und führt zu einer raschen Phosphorylierung des PKC-Substrats p80/MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) (Rodriguez-Pena und Rozengurt 1985). p80/MARCKS ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 80 kD, das hitzestabil und daher leicht zu isolieren ist. Nach metabolischem Labeling mit $[^{32}\text{P}]$ -Orthophosphat, Präparation und SDS-PAGE der hitzestabilen Proteine kann die intrazelluläre PKC-Aktivität durch Quantifizierung der p80/MARCKS-Bandenintensität bestimmt werden. Abbildung 3-18 veranschaulicht die Methode.

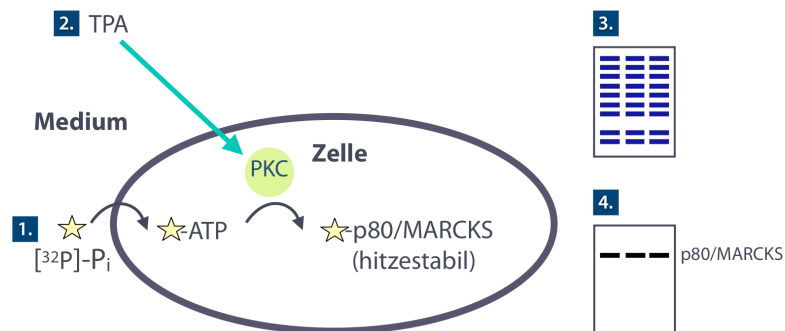


Abbildung 3-18. Assay zur Bestimmung der intrazellulären PKC-Aktivität. 1) Metabolisches Labeling mit $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ 2) TPA-Stimulation 3) SDS-PAGE nach Präparation hitzestabiler Proteine 4) Phosphor-Imager-Autoradiographie mit anschließender Quantifizierung der p80/MARCKS-Bandenintensität.

Abbildung 3-19 auf der folgenden Seite zeigt den Einbau von $[^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$ in p80/MARCKS in die verschiedenen stabil transfizierten Zellen (relativ zum $[^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$ -Einbau in p80/MARCKS in Kontrollzellen). Die Zunahme der Bandenintensität der Kontrollzellen nach TPA-Behandlung zeigt, dass unter den gewählten Assaybedingungen intrazelluläre PKC-Aktivität messbar ist. Ein signifikanter Einfluss der NS3-Konstrukte auf die p80/MARCKS-Phosphorylierung ist hier jedoch nicht erkennbar. Die Zellen mit stabiler Expression von NS3-Konstrukten unterscheiden sich weder im Grad des $[^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$ -Einbaus, noch in dessen Stimulierbarkeit durch TPA von den Kontrollzellen. Gleichwohl streuen die einzelnen Messwerte stark, so dass möglicherweise vorliegende geringfügige Einflüsse auf die p80/MARCKS-Phosphorylierung anhand der vorliegenden Daten nicht erkennbar sind.

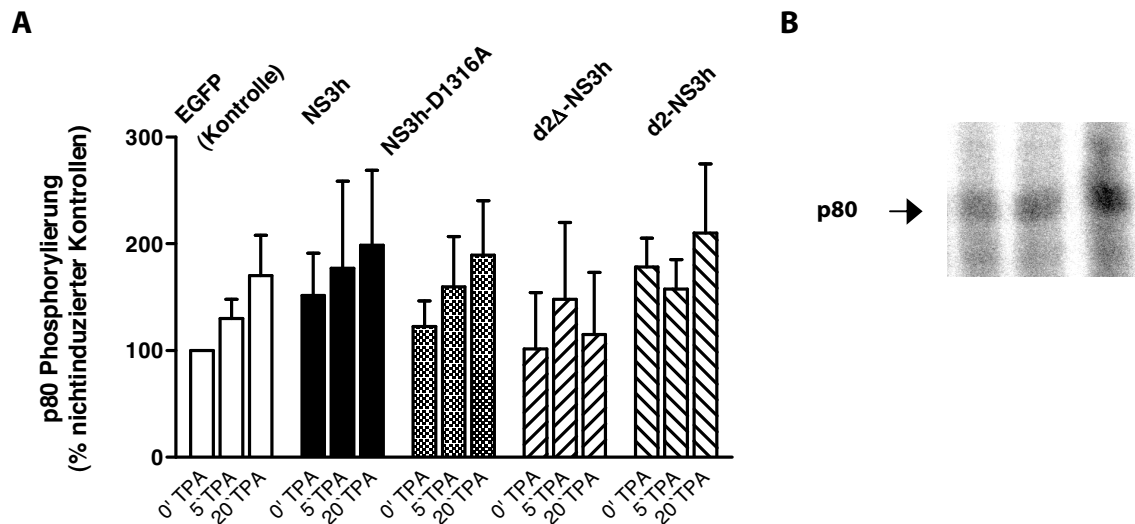


Abbildung 3-19. p80-Phosphorylierung in stabil mit NS3-Fragmenten transfizierten NIH 3T3 Zellen. A) Gezeigt sind Intensitäten der p80 Bande (Mittelwerte \pm SEM) von stabil mit NS3h, der NTPase-defizienten Mutante NS3h-D1316A, d2 Δ -NS3h oder EGFP (Kontrolle) transfizierten Flp-InTM-3T3 Zellen nach metabolischem Labeling mit [³²P]-Orthophosphat und Behandlung mit TPA (400 nM) für 0, 5 oder 20 min. Die Bestimmung der Bandenintensität erfolgte nach Phosphorimaging mit Hilfe der Software ImageQuant. Mittelwerte und SEM wurden aus jeweils 3 unabhängigen Messungen gebildet. **B)** Zeigt exemplarisch die Zunahme der p80 Bandenintensität in Kontrollzellen nach TPA-Stimulierung im Autoradiogramm.

3.11 Einfluss der NS3 NTPase/Helikase auf zelluläre Eigenschaften im Zusammenhang mit neoplastischer Transformation

Zur Untersuchung möglicher transformierender, sowie tumorpromovierender Effekte durch die HCV NS3 NTPase/Helikase wurden verschiedene Assays zur Bestimmung zellulärer Eigenschaften durchgeführt, die im Zusammenhang mit neoplastischer Transformation stehen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden nachfolgend im Einzelnen erläutert.

3.11.1 Stabil mit NS3 NTPase/Helikase transfizierte NIH 3T3 Zellen sind morphologisch verändert

Ein augenscheinliches Merkmal von NIH 3T3 Zellen mit stabiler Expression der NS3 NTPase/Helikase ist ihre veränderte Morphologie. Wie in Abbildung 3-20 gezeigt ist, erscheinen sie in phasenkontrastmikroskopischer Aufnahme rundlicher und kompakter als die länglichen, EGFP-exprimierenden Kontrollzellen. Sie sind von zylindrischer Gestalt und besitzen nicht mehr die für Fibroblasten typische Spindelform. Mit zunehmender Zelldichte ordnen sie sich, wie die Kontrollzellen, parallel zueinander an. Dass die Expression der enzymatisch inaktiven Mutante NS3h-D1316A eine gleichartige Morphologieveränderung bewirkt, zeigt dass der Effekt unabhängig von NS3 NTPase/Helikase assoziierter enzymatischer Aktivität zustandekommt. Die Expression der isolierten Domäne 2 der NS3-NTPase/Helikase (d2 Δ -NS3h oder d2-NS3h) hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Morphologie der Zellen. Da d2 Δ -NS3h und d2-NS3h im *in vitro* PKC-Assay zu vergleichbar starker PKC-Inhibition führen wie die NS3 NTPase/Helikase, folgt daraus, dass der Effekt sehr wahrscheinlich nicht durch eine Inhibition der enzymatischen Aktivität von Kinasen der PKC-Familie verursacht wird.

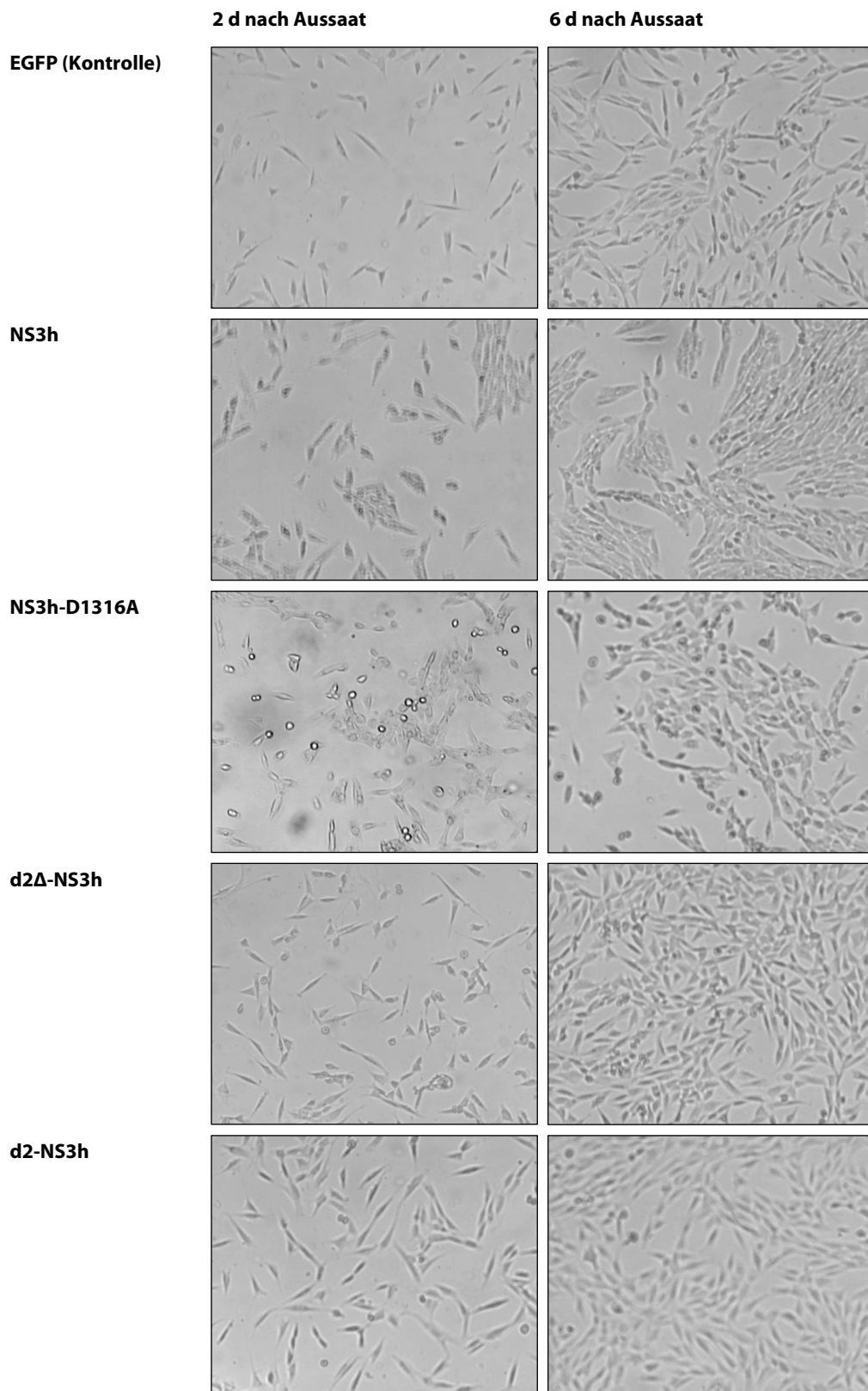


Abbildung 3-20. Veränderte Morphologie von NIH 3T3 Zellen mit stabiler Expression der NS3-NTP-ase/Helikase. Gezeigt sind phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von stabil mit NS3-Konstrukten transfizierten NIH 3T3 Zellen. Die 2 bzw. 6 Tage nach der Aussaat erstellten Aufnahmen zeigen repräsentativ den Kulturverlauf.

3.11.2 Die NS3 NTPase/Helikase hat keinen Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen in Soft Agar

Verschiedene, mit NS3-Konstrukten transfizierte Zelllinien wurden im Soft Agar Assay untersucht, einer klassischen Methode zur Evaluierung transformierender Einflüsse auf kultivierte Zellen. Je mehr Kolonien in Soft Agar gebildet werden, desto höher ist der Grad der Transformation. Im Einzelnen wurden stabil transfizierte NIH 3T3 Zellen, sowie transient transfizierte JB6-Cl41-5a-Zellen, und c-Src überexprimierenden 3Y1-Rattenfibroblasten getestet. Dabei ist es wichtig festzuhalten, dass die stabil transfizierten NIH 3T3 Zellen nach mindestens 50facher Verdoppelung ihrer Zellzahl (*population doubling*) untersucht wurden. Wie Abbildung 3-21 zeigt, führt die Expression der NS3 NTPase/Helikase, oder ihrer isolierten Domäne 2, in keiner der untersuchten Zelllinien zu erhöhtem matixunabhängigem Wachstum. Die als Positivkontrolle eingesetzten, mit dem Tumorpromotor TPA behandelten, JB6-Cl41-5a-Zellen zeigen wie erwartet eine stark erhöhte Koloniebildungsrate. Durch Betrachtung der verschiedenen untersuchten Zelllinien lassen sich aus diesem Ergebnis differenziertere Aussagen treffen (siehe Abschnitt 4.3.1. auf S. 91).

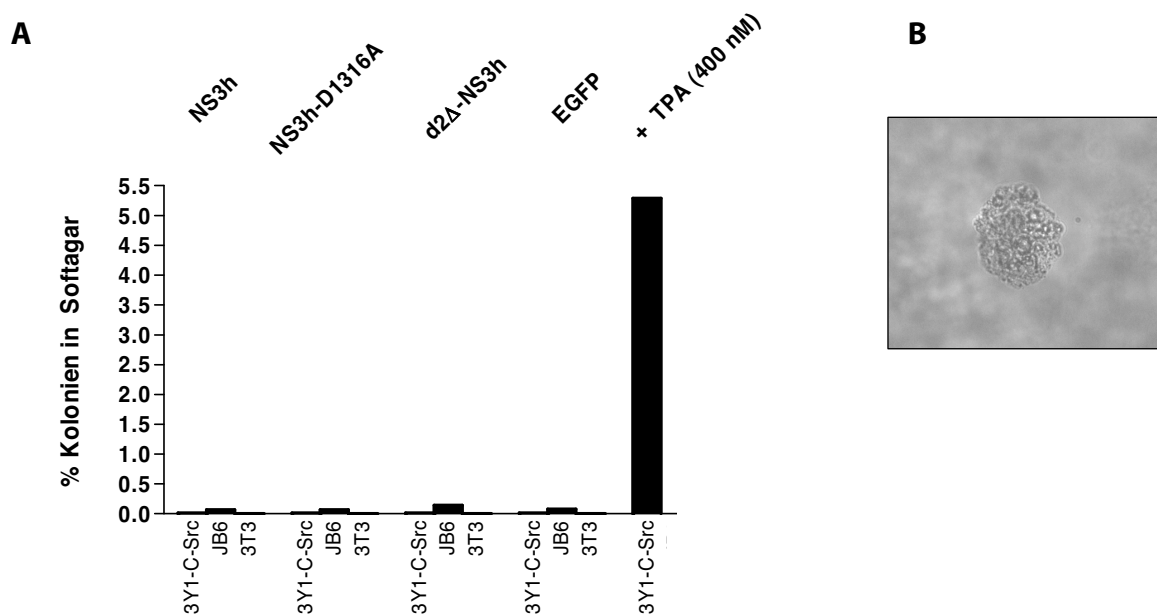


Abbildung 3-21. Transient mit NS3-Fragmenten transfizierte JB6-Cl41-5a- und 3Y1-c-Src Zellen besitzen keine erhöhte Koloniebildungsfähigkeit in Soft Agar. **A)** Gezeigt ist die Koloniebildungsrate von transient mit NS3h, der NTPase-defizienten Mutante NS3h-D1316A, d2Δ-NS3h transfizierten JB6 und c-Src überexprimierenden 3Y1 Zellen (Mittelwerte, % ausgesähter Zellen). Transfizierte Zellen wurden nach Co-transfektion mit dem Vektor pEF5/FRT/V5-DEST-EGFP durchflusszytometrisch sortiert, nur Zellen mit EGFP-Fluoreszenz wurden ausgesäht. Mittelwerte wurden aus jeweils mindestens 2 unabhängigen Messungen mit Vierfachbestimmung gebildet. Stabil mit den o.g. Konstrukten transfizierte NIH 3T3 Zellen bilden keine Kolonien in Soft Agar. **B)** zeigt eine typische Kolonie (3Y1-c-Src, transfiziert mit NS3h).

3.11.3 Die NS3 NTPase/Helikase hat keinen Einfluss auf die DNA Syntheserate konfluenter Zellen

Zellproliferation und DNA-Synthese laufen nicht unbedingt parallel. Proliferation bedeutet Zellteilung und Zunahme der Zellzahl, die DNA-Synthese kann aber auch ohne anschließende Mitose ablaufen. Eine erhöhte DNA-Syntheserate in konfluenten Zellen deutet auf eine gestörte Zellzyklusregulation hin, die charakteristisch für transformierte Zellen ist (Lu et al. 1997). In einem Assay nach (Lu et al. 1997) sollte daher an stabil transfizierten NIH 3T3 Zellen geprüft werden, ob die NS3 NTPase/Helikase die DNA-Syntheserate konfluenter Zellen beeinflusst. Abbildung 3-22 zeigt, dass weder die NS3 NTPase/Helikase, noch ihre isolierte Domäne 2 (d2Δ-NS3h oder d2-NS3h) hier einen signifikanten Einfluss haben. Mögliche geringfügige Einflüsse auf die DNA-Syntheserate sind allerdings anhand der vorliegenden Daten nicht erkennbar, da die einzelnen Messwerte stark streuen.

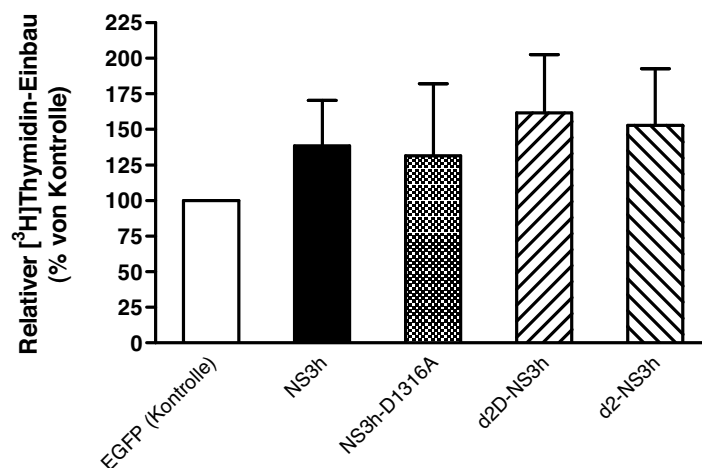


Abbildung 3-22. DNA-Synthese in konfluenter, stabil mit NS3-Fragmenten transfizierten NIH 3T3 Zellen. Gezeigt ist [³H]-Thymidin-Einbau (Mittelwerte ±SEM) in stabil mit NS3h, der NTPase-defizienten Mutante NS3h-D1316A, d2Δ-NS3h transfizierten NIH 3T3 Zellen, relativ zum Einbau in Kontrollzellen. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz wachsen gelassen, dann wurde das Medium gegen *low serum* Medium ausgetauscht, so dass die Zellen in einen Ruhezustand übergehen (*quiescence*) und sich in der G0-Phase des Zellzyklus ansammeln. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Radioaktivität der unlöslichen Zellbestandteile gemessen. Mittelwerte und SEM wurden aus jeweils mindestens 3 unabhängigen Messungen gebildet.

3.11.4 Die NS3 NTPase/Helikase bewirkt eine gesteigerte Zellproliferation

Viele nichtgenotoxische Karzinogene, darunter auch Tumorpromotoren beschleunigen die Zellproliferation (Shaw und Jones 1994, Fukushima et al. 2005). Um festzustellen, ob die NS3 NTPase/Helikase proliferationsfördernd wirkt, wurde die Proliferationsrate von stabil mit NS3-Konstrukten transfizierten NIH 3T3 Zellen bestimmt (siehe Abbildung 3-23). Die Expression von NS3h oder NS3h-D1316A führt zu einer deutlich erhöhten Proliferationsrate.

Die Expression der isolierten Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase (d2Δ-NS3h) hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation.

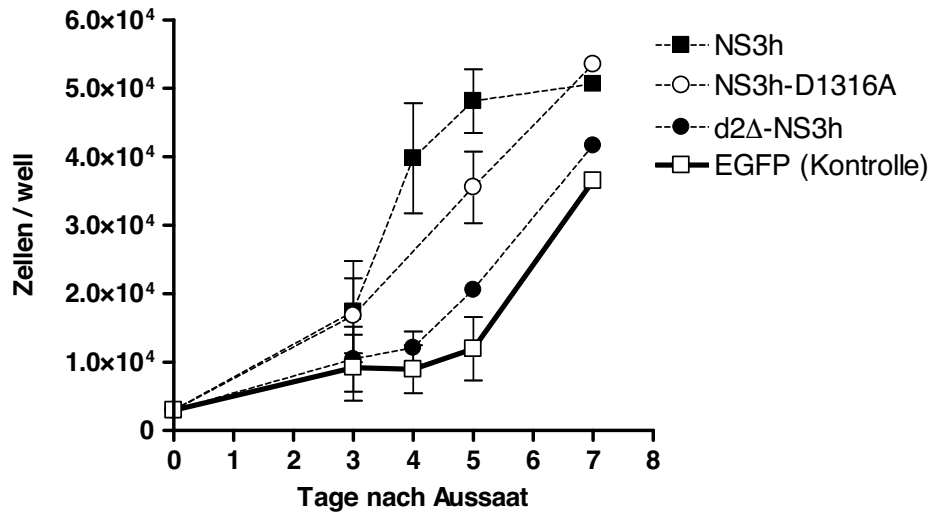


Abbildung 3-23. Proliferation von stabil mit NS3-Fragmenten transfizierten NIH 3T3 Zellen. Gezeigt sind Wachstumskurven (Mittelwerte \pm SEM) von stabil mit NS3h, der NTPase-defizienten Mutante NS3h-D1316A, d2Δ-NS3h oder EGFP (Kontrolle) transfizierten NIH 3T3 Zellen. Mittelwerte und SEM wurden aus jeweils 4 unabhängigen Messungen mit Vierfachbestimmung gebildet.

4 Diskussion

4.1 PKC-Inhibition durch die HCV NS3 NTPase/Helikase *in vitro*

Zu den relevantesten Resultaten dieser Arbeit gehört der Nachweis einer potenten Inhibition von Proteinkinasen der PKC-Familie durch das NS3 NTPase/Helikase Holoenzym *in vitro*. Die halbmaximal inhibierenden NS3-Konzentrationen (IC_{50}) liegen für die meisten PKC-Isoformen im submikromolaren Bereich. Die Inhibition kommt spezifisch durch Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen der argininreichen Region HCV(1487–1500) und den PKCs zustande und ist unabhängig von der NS3-NTPase-Aktivität. Da die NS3-NTPase-Aktivität durch ATP-Hydrolyse mit der PKC-Aktivitätsmessung im radiometrischen Assay interferiert, wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze zur Aufklärung der Inhibition verfolgt. Dabei konnte die NTPase-unabhängige PKC-Inhibition durch NS3 sowohl durch den Einsatz eines ATP-regenerierenden Systems in einem nichtradiometrischen PKC-Assay belegt werden, als auch durch die Verwendung einer ATPase-defizienten Mutante im radiometrischen Assay.

Der Befund ist wichtig, da die bisher veröffentlichten Daten zur PKC-Inhibition durch NS3 auf Untersuchungen mit nichtphysiologischen NS3 Fragmenten beruhen (Borowski et al. 1999a, Borowski et al. 1999c, Borowski et al. 2000). Es war deshalb nicht geklärt, ob die argininreiche Region im Kontext katalytisch aktiver NS3 NTPase/Helikase für die PKC zugänglich ist. Zwar wurde auch in in dieser Arbeit kein Vollängen-NS3/4A-Komplex eingesetzt, doch es kann davon ausgegangen werden, dass die hier fehlende Proteasedomäne und ihr Cofaktor NS4A keinen Einfluss auf die sterische Zugänglichkeit der argininreichen Region haben. Aus der Kristallstruktur des NS3/4A-Komplexes von (Yao et al. 1999) wird deutlich, dass sich die argininreiche Region und die Proteasedomäne auf entgegengesetzten Seiten des Vollängenenzym befinden und räumlich weit voneinander entfernt sind (siehe Abbildung 4-1).

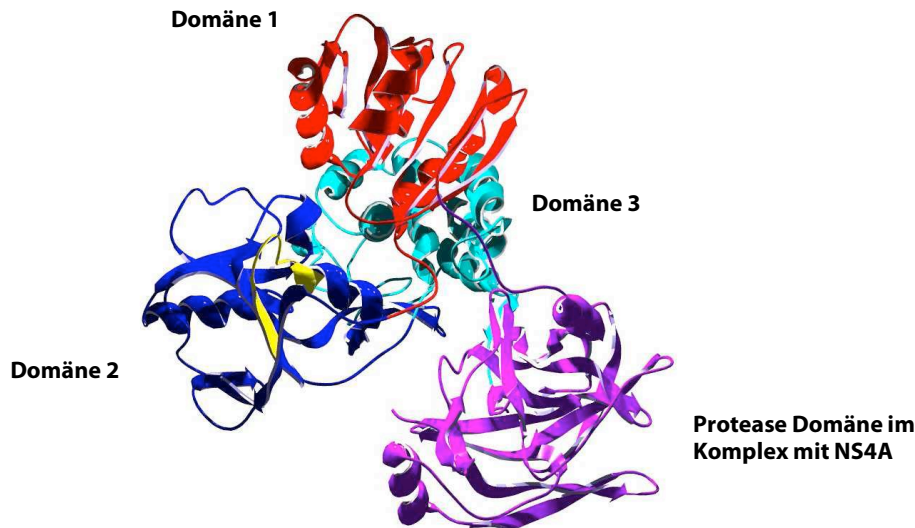


Abbildung 4-1. Die argininreiche NS3-Region ist räumlich weit von der NS3 Proteasedomäne entfernt. Aus dem Ribbon Diagramm des NS3/4A-Komplexes (PDB 1CU1 (Yao et al. 1999)) ist ersichtlich, dass die Proteasedomäne keinen Einfluss auf die Zugänglichkeit der argininreichen Region (gelb markiert) für die PKC hat. Der diesem Ribbondiagramm zugrundeliegende Datensatz wurde durch Röntgenstrukturanalyse von scNS3/4A, „single-chain NS3/4A“ gewonnen. scNS3/4A ist ein designtes Protein, in dem das NS4A-core Peptid mit dem N-Terminus von NS3 fusioniert wurde (Taremi et al. 1998). Das Ribbondiagramm wurde mit dem Swiss-PdbViewer (Guex und Peitsch 1997) erstellt und mit POV-Ray (POV-Ray-Team 2004) gerendert.

Die native Konformation des verwendeten Wildtyp-Proteins wurde durch enzymatische Charakterisierung bestätigt. In seiner ATPase-Aktivität und ihrer Stimulierbarkeit durch Poly(U) stimmt NS3h gut mit den Beobachtungen von (Tai et al. 1996) und (Wardell et al. 1999) überein. Zusätzlich zur etwa gleichstarken Inhibition von PKC- α durch die ATPase-defiziente Mutante im radiometrischen Assay und durch das Wildtyp-Protein im Assay mit ATP-Regeneration, sprechen die Ergebnisse von Aoubala et al. dafür, dass die Mutante ein gutes Modell zur Untersuchung der ATPase-unabhängigen PKC-Inhibition durch NS3h darstellt. Aoubala et al. haben festgestellt, dass die sehr ähnliche Mutante NS3/4A-C1318A-H1319A die gleiche Affinität zu Poly(U)-Sephrose besitzt wie das entsprechende Wildtyp-Protein (Aoubala et al. 2001). Da NS3 über die argininreiche, PKC inhibierende Region mit Poly(U) interagiert (Pause et al. 1993), muss diese in der Mutante vergleichbar exponiert, und daher ähnlich zugänglich für das aktive Zentrum der PKC sein wie im Wildtyp-Protein. Die kinetischen Daten für die PKC-Inhibition durch die Mutante sollten also weitestgehend mit denen für die PKC-Inhibition durch die argininreiche Region im wt-Enzym übereinstimmen.

Die mit Thioredoxin(Trx)-Fusionsproteinen (NS3h, NS3h-D1316A) im *in vitro* PKC-Assay erzielten Ergebnisse sollten aller Erwartung nach nicht wesentlich durch die Trx-Fusion verfälscht sein. Eine Interaktion von Trx mit PKC wurde von Borowski et al. ausgeschlossen (Borowski et al. 1999c). Zudem besitzt Trx eine kompakte Domänenstruktur (Katti et al. 1990) und ist N-terminal fusioniert, sollte also nach der Kristallstruktur von (Yao et al. 1999)

räumlich weit von der argininreiche Region lokalisiert sein (siehe Abbildung 4-1) und die Zugänglichkeit der NS3-Konstrukte für PKC nicht beeinflussen.

Alle PKC-Isoformen werden durch NS3h-D1316A stark gehemmt, was den Erwartungen aus dem Sequenzvergleich zwischen der argininreichen NS3-Region und den Pseudosubstratsequenzen der PKC-Isoformen entspricht. Die halbmaximal inhibierenden Konzentrationen (IC_{50}) liegen für die meisten Isoformen im engen Bereich zwischen 0,3 und 1,1 μ M. Nur PKC- θ und PKC- β 1 werden mit höheren IC_{50} von 1,8 bzw. 3,4 μ M gehemmt. Die unterschiedlichen IC_{50} , u.a. auch für PKC-Isoformen mit identischer Pseudosubstratsequenz (PKC- β I und β II mit IC_{50} -Werten von 3,4 respektive 0,8 μ M), und die Tatsache, dass PKC- μ , der eine typische Pseudosubstratsequenz fehlt, inhibiert wird ($IC_{50} = 0,3 \mu$ M) überraschen nicht. Der Vergleich eines Sequenzabschnittes mit der Pseudosubstratsequenz einer PKC-Isoform erlaubt nur grobe Schätzungen zur Affinität homologer Polypeptide zum aktiven Zentrum und somit auf ihre Fähigkeit, die enzymatische Aktivität von PKC zu inhibieren. Im Allgemeinen lässt sich aus der Pseudosubstratsequenz einer PKC-Isoform nämlich nicht das optimale Substratpeptid für dieselbe Isoform generieren (Pears 1995). Dies ist vermutlich auf die Notwendigkeit einer Pseudosubstratsequenz mit moderater Affinität zum aktiven Zentrum der Kinasen zurückzuführen. Eine zu starke Bindung der Pseudosubstratsequenz an die katalytische Domäne der PKC könnte eine Aktivierung verhindern.

Das durch Protein-Engineering gewonnene d2 Δ -NS3h (Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase) inhibiert ebenfalls alle PKC-Isoformen mit IC_{50} -Werten zwischen 0,6 und 15 μ M. Einige Isoformen werden schwächer gehemmt als durch NS3h-D1316A, was vermutlich auf das Fehlen der zusätzlichen Interaktion zwischen PKC und NS3h-D1316A zurückzuführen ist (siehe Abschnitt 3.8, S. 75). Die etwas höheren IC_{50} könnten aber auch durch Interaktionen zwischen Bereichen auf der Oberfläche des rekombinanten Proteins, die in NS3h-D1316A von Tertiärstrukturelementen verdeckt sind, mit den PKC-Isoformen oder dem Substrat zustandekommen. Diese Interaktionen könnten mit der Bindung von d2 Δ -NS3h an die PKC-Substratbindungsstelle konkurrieren.

Die etwas schwächere Inhibition von PKC- α durch die nicht modifizierte Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase, d2-NS3h, ist vermutlich auf unspezifische Aggregation des Proteins zurückzuführen. d2-NS3h unterscheidet sich von d2 Δ -NS3h durch das Vorhandensein des langen β -Hairpins (AS 1458–1465 und 1470–1476 des HCV Polyproteins). Dieser ist hier allerdings, anders als in nativem NS3 nicht in Tertiärstrukturelemente eingebettet – daher neigt d2-NS3h zu Aggregation (siehe Abschnitt 3.2, S. 55). Diese Vermutung wird durch Ergebnisse von Gesell et al. gestützt (Gesell et al. 2001). Sie zeigen, dass ein ähnlich wie d2 Δ -NS3h modifiziertes, aber längeres NS3-Fragment (bestehend aus den Domänen 1 + 2) besser löslich ist als das entsprechende nicht modifizierte Protein, in seinen enzymatischen Eigenschaften aber mit diesem übereinstimmt.

Vergleich der Inhibitionsparameter mit der Literatur

Die Inhibitionsparameter IC_{50} und K_i für die PKC-Inhibition durch das NS3 NTPase/Helikase Holoenzym *in vitro* fallen niedriger aus als die zuvor von Borowski et al. für kürzere NS3-Fragmente bestimmten Werte (Borowski et al. 1999c, Borowski et al. 2000). Die Inhibition erfolgt also bereits bei geringerer NS3-Konzentration. IC_{50} - und K_i für NS3h-D1316A liegen bei 0,7 μ M respektive 0,5 μ M (PKC- α). Für das C- und N-terminal trunkierte NS3-Fragment HCV Polyprotein-(1189–1525), das grob die NS3 NTPase/Helikase Domänen 1 und 2 umfasst, liegt IC_{50} bei 8 μ M (Rattenhirn PKC), K_i ist nicht bekannt (Borowski et al. 1999c). Die schwächere Inhibition durch HCV Polyprotein-(1189–1525) könnte aus dem Fehlen von Domäne 3 resultieren, welches Einfluss auf die Aggregationsneigung des Proteins, und vermutlich auf die Exposition des argininreichen Motivs hat (siehe Abschnitt 3.2, S. 55). Das synthetische Peptid mit der Aminosäuresequenz des argininreichen Motivs des NS3-Proteins (AS 1487–1500 des HCV Polyproteins) hemmt Rattenhirn PKC mit einem IC_{50} von 7 μ M und einem K_i von 3,5 μ M (Borowski et al. 2000). Hier könnte die schwächere Inhibition durch die andersartige Konformation zustandekommen, die zu erwarten ist, wenn die Sequenz nicht in ein längeres NS3-Fragment eingebettet ist.

Die in (Borowski et al. 1999c) angestellten Vermutungen, nach denen die Interaktion zwischen physiologisch relevantem NS3 und PKC komplex verlaufen sollte, werden bestätigt. Für die Inhibition der katalytischen PKC-Aktivität durch NS3h-D1316A *in vitro* wurde der Modus einer *mixed-type* Hemmung nachgewiesen. Das durch Protein-Engineering gewonnene d2 Δ -NS3h (Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase) hemmt die Kinaseaktivität hingegen rein kompetitiv, wie auch synthetische Peptide mit der Aminosäuresequenz des Argininreichen Motivs des NS3-Proteins (AS 1487–1500 des HCV Polyproteins) (Borowski et al. 2000). Dies legt eine zusätzliche Interaktion zwischen NS3 und PKC und/oder ihrem Substrat nahe, die wahrscheinlich hauptsächlich durch Bereiche auf der Oberfläche von Domäne 1 vermittelt wird. Borowski et al. beobachteten für das C- und N-terminal trunkierte NS3-Fragment HCV Polyprotein(1189–1525), das grob die NS3 NTPase/ Helikase Domänen 1 und 2 umfasst ebenfalls eine *mixed-type* Inhibition von PKC (Borowski et al. 1999c).

Die beobachtete Inhibition der Autophosphorylierung aller PKC-Isoformen durch NS3h-D1316A und d2 Δ -NS3h unter den getesteten Bedingungen stimmt mit den Erwartungen überein. Auch in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurde die Inhibition der Autophosphorylierung von PKC- α , β und γ bei Substratkonzentrationen $<S_{opt}$ durch ein NS3-Fragment beobachtet, das die Domänen 1 und 2 der HCV-NTPase/Helikase umfasst (Borowski et al. 1999a).

Auch im Hinblick auf eine mögliche Inhibition der Proteinkinase A (PKA), einer PKC-verwandten Proteinkinase, durch HCV-NS3 sind die gewonnenen Daten interessant. Die Interaktion zwischen NS3 und PKA wurde in unserer Arbeitsgruppe in *in vitro* Kinase-Assays und Lokalisationsstudien nachgewiesen (Borowski et al. 1996, Borowski et al. 1997). In diesen

Studien wurden das schon erwähnte NS3-Fragment aus den Domänen 1 und 2 der HCV-NTPase/Helikase, sowie synthetische Peptide mit der Aminosäuresequenz der argininreichen Region (AS 1487–1500 des HCV Polyproteins) eingesetzt. In einer neueren Untersuchung führen Aoubala et al. die PKA-Inhibition durch das Vollängen NS3-Protein im Komplex mit dem Kofaktor NS4A ausschließlich auf ATP-Hydrolyse zurück (Aoubala et al. 2001). Abgesehen davon, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit für PKC eindeutig eine ATPase-unabhängige Inhibition nachgewiesen wurde, muss diese Aussage kritisch gesehen werden. Die maximale von Aoubala et al. getestete NS3-Konzentration betrug nämlich nur 0,6 μM . Sollte NS3h zu einer Inhibition von PKA führen, die im Bereich der, für die verschiedenen PKC-Isoformen gemessenen, Inhibitionsparameter liegt (IC_{50} zwischen 0,3 und 3,4 μM), ist diese Inhibition so nur unter Umständen detektierbar. Insbesondere zumal die PKA-Inhibition durch NS3 stark substratabhängig ist (Borowski et al. 1996) und Aoubala et al. nur ein PKA-Substrat (Kemptid) getestet haben.

4.2 Einfluss von NS3 auf die Proteinkinase C Aktivität in intakten Zellen

Der Befund einer potenten PKC-Inhibition durch die NS3 NTPase/Helikase *in vitro* wirft die Frage auf, inwieweit die NS3-PKC-Interaktion in intakten Zellen, und damit potentiell auch *in vivo* eine Rolle spielt. Zu ihrer Beantwortung wurden stabil mit NS3-Konstrukten transfizierte NIH 3T3 Zellen in einem Assay zur Bestimmung ihrer intrazellulären PKC-Aktivität untersucht. Dabei wurde kein signifikanter Einfluss der NS3-Konstrukte auf die TPA-induzierte Phosphorylierung des PKC-Substrats p80/MARCKS festgestellt.

Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muss zunächst beachtet werden, dass keineswegs alle PKC-Isoformen an der Phorbolster-induzierten Phosphorylierung von p80/MARCKS beteiligt sind. TPA ist ein starker Aktivator der cPKCs und der nPKCs, führt aber nicht zu einer Aktivierung der aPKCs (Kazaniets et al. 1993). Infolgedessen erlaubt dieser Assay keine Aussagen über mögliche Einflüsse auf aPKCs (die Isoformen ζ , ι und μ).

Auch muss die Komplexität der PKC-vermittelten Signaltransduktion und ihrer möglichen Beeinflussung durch das virale Protein NS3 berücksichtigt werden. Es gibt 11 PKC-Isoformen, die sich in ihrer Responsivität auf allosterische Aktivatoren (Azzi et al. 1992, Marquez et al. 1992), ihrer Affinität für die Substrate (Kiley et al. 1996), sowie ihrer Lokalisation (Goodnight et al. 1995, Wang et al. 1995) unterscheiden. Zudem wird in jeder Gewebs- und Zellart ein individuelles Muster an Isoformen exprimiert (Furness et al. 2006). Der Phosphatbau in p80/MARCKS muss folglich als grober Indikator für die intrazelluläre Gesamtaktivität der meisten PKC-Isoformen in einem gegebenen Kontext angesehen werden.

In 3T3 Zellen werden die PKC Isoformen α , δ , ϵ , ζ (Olivier und Parker 1992) und λ (Akimoto et al. 1994) (PKC- λ ist die zur humanen PKC- ι orthologe Isoform) exprimiert. Es ist

also möglich, dass starke Einflüsse der untersuchten NS3-Konstrukte auf einzelne PKC-Isoformen, insbesondere die α -PKC-Isoformen ζ und λ in diesem Assay nicht erfasst wurden. In Ratten-Hepatocyten wurde bisher die Expression der Isoformen α , β II, δ und ζ demonstriert (Perletti 1994, Croquet et al. 1996), eine Inhibition von PKC- ζ durch NS3 *in vivo* kann also nicht ausgeschlossen werden.

Auch sind möglicherweise vorliegende geringfügige Einflüsse auf die p80/MARCKS-Phosphorylierung wegen der recht starken Streuung der einzelnen Messwerte anhand der vorliegenden Daten nicht erkennbar.

Das Ausbleiben eines signifikanten Effektes der stabilen Expression von NS3-Konstrukten auf die Phosphorylierung des PKC-Substrats p80/MARCKS in intakten NIH 3T3 Zellen steht in Kontrast zu früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe. Nach der Introduction eines rekombinanten NS3-Fragments (Domäne 1 und 2 der NS3 NTPase/Helikase) in permeabilisierte neutrophile Granulozyten wurde eine stark geminderte TPA-Stimulierbarkeit der p80/MARCKS-Phosphorylierung beobachtet (Borowski et al. 1999c). Diese ging mit einer Störung der TPA-induzierten PKC-Translokation und einer Verminderung des *respiratory burst* (Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite) nach TPA Behandlung einher. Zu beachten ist, dass wesentliche methodische Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten und den Untersuchungen von Borowski et al. bestehen. So wurden von Borowski et al. permeabilisierte Zellen untersucht, in die bakteriell exprimierte Proteine introduziert wurden, während hier stabil transfizierter Zellen zum Einsatz kamen. Es ist festzuhalten, dass letztere Methode besser mit der *in vivo* Situation in HCV-infizierten Hepatozyten vergleichbar ist. Auch wurden unterschiedliche Zelllinien untersucht (Fibroblasten respektive Neutrophile Granulozyten).

Ein wichtiger Aspekt bei der Diskussion dieser unterschiedlichen Resultate ist die von Borowski et al. beobachtete Störung der TPA-induzierten PKC-Translokation, die zur Immobilisierung der PKC im zytosolischen Zellkompartiment führt. Ohmori et al. haben nachgewiesen, dass die Translokation der Kinase zur Plasmamembran für die Phosphorylierung des PKC-Substrats p80/MARCKS in intakten Zellen unbedingt erforderlich ist (Ohmori et al. 2000). Daher ist anzunehmen, dass die geminderte TPA-Stimulierbarkeit der p80/MARCKS-Phosphorylierung zumindest teilweise auf die Translokationsstörung zurückzuführen ist, und nicht allein auf die Inhibition katalytischer PKC-Aktivität. Dafür spricht auch, dass ein synthetisches Peptid mit der Aminosäuresequenz der argininreichen NS3-Region (AS 1487–1500 des HCV Polyproteins) weder die TPA-induzierte Phosphorylierung von p80/MARCKS, noch die PKC-Translokation inhibiert, wohl aber die PKC-katalysierte Phosphorylierung von Histon HIIIS *in vitro* (Borowski et al. 1999c). Da die TPA-induzierte PKC-Translokation in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, bleibt offen, ob sie auch durch das NS3-NTPase/Helikase Holoenzym und so potentiell auch *in vivo* gestört wird.

4.3 Mögliche Beteiligung der NS3 NTPase/Helikase an der HCV-assoziierten Karzinogenese

4.3.1 Die NS3 NTPase/Helikase bewirkt keine direkte Transformation und keine Tumorpromotion *in vitro*

Es ist schon länger bekannt, dass N-terminale Bereiche von NS3 eine direkte Transformation von NIH 3T3 Zellen (Sakamuro et al. 1995) und Rattenfibroblasten (Zemel et al. 2001) bewirken können. In Anbetracht der bekannten Rolle der PKC bei der zellulären Regulation von Proliferation, Morphologie und Differenzierung (siehe Abschnitt 1.8, S. 19) gab der Befund, dass der NTPase/Helikase Anteil von NS3 *in vitro* einen potenten PKC-Inhibitor darstellt (siehe Abschnitt 3.7, S. 69), Anlass zur Frage nach einer Beteiligung auch dieses NS3-Bereichs an der HCV induzierten Karzinogenese.

Zunächst wurden Transformationsassays an NIH 3T3 Zellen durchgeführt. Die Zelllinie NIH 3T3 ist in der Aufklärung der Mechanismen neoplastischer Transformation gut etabliert (Hanahan und Weinberg 2000, Rubin 2001). NIH 3T3 Zellen gelten nach dem Mehrstufenmodell der Karzinogenese als initiiert und werden schon durch einzelne onkogene Stimuli transformiert, die bei „normalen“ von Embryonalzellen abgeleiteten Zellen noch nicht zur Transformation führen. Transformierte NIH 3T3 Zellen besitzen, wie auch viele Tumorzellen, die Fähigkeit zur Koloniebildung in semisoliden Medien. Sie können also nicht nur ohne Matrixkontakt überleben, sondern auch proliferieren (Freedman und Shin 1974, Shin et al. 1975). Man spricht von „anchorage independent growth“. Diese zelluläre Eigenschaft ist bei NIH 3T3 Zellen die am engsten mit der Tumorigenizität assoziierte – matrixunabhängig wachsende NIH 3T3 Zellen bilden Tumore in Nacktmäusen (Shin et al. 1975). Die Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit in Soft Agar gilt daher als der stringenteste *in vitro* Test auf Tumorigenizität von NIH 3T3 Zellen.

Stabil mit der NS3 NTPase/Helikase transfizierte NIH 3T3 Zellen bilden keine Kolonien in Soft Agar. Auch bewirkt die Expression dieses NS3 Bereiches keine erhöhte DNA-Syntheserate bei Konfluenz, die auf eine gestörte Zellzyklusregulation hindeuten würde – ein weiteres Charakteristikum transformierter Zellen (Lu et al. 1997). Vom NTPase/Helikase-Bereich von NS3 geht also offensichtlich keine direkt transformierende Wirkung aus. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen den Befund von Sakamuro et al. dass die C-terminale Hälfte von NS3 keine Transformation von NIH 3T3 Zellen bewirkt (Sakamuro et al. 1995).

Auch tumorpromovierende Wirkungen durch die NS3 NTPase/Helikase wurden nicht beobachtet. In dieser Arbeit kamen zwei verschiedene, zum Nachweis tumorpromovierender Effekte geeignete Zellkulturmodelle zum Einsatz. Die Untersuchung transient transfizierter Zellen ergab, dass die NS3 NTPase/Helikase weder in JB6-Cl41-5a-Zellen, noch in c-Src überexprimierenden 3Y1-Rattenfibroblasten eine gesteigerte Koloniebildungsfähigkeit in Soft Agar bewirkt. Die erstgenannte Zelllinie stellt ein gut etabliertes Modell für die Untersuchung

von tumorpromoterinduzierter neoplastischer Transformation *in vitro* dar (Colburn et al. 1980), letztere lässt sich durch Inhibition von PKC- δ zu matrixunabhängiger Proliferation in Soft Agar anregen (Lu et al. 1997) (siehe Abschnitt 1.8.2, S. 21). Die im *in vitro* PKC-Assay beobachtete PKC- δ -Inhibition durch NS3 ($IC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ für NS3h-D1316A) reicht dafür aber offensichtlich nicht aus. In Abbildung 4-2 sind die hier zur Evaluierung transformierender Effekte durchgeführten Experimente schematisch zusammengefasst.

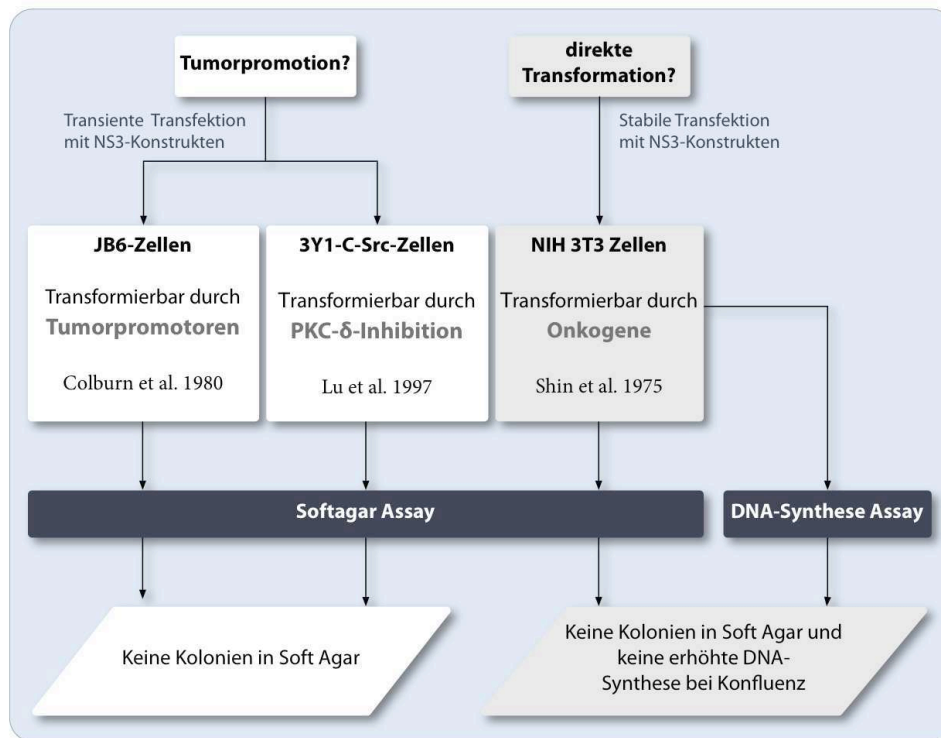


Abbildung 4-2. Schematische Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Bestimmung direkt transformierender und tumorpromovierender Einflüsse der NTPase/Helikase.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur eingangs gestellten Hypothese, nach der NS3 durch die Inhibition zellulärer PKC-Aktivität zu Tumorpromotion oder neoplastischer Transformation führen kann. Bei ihrer Beurteilung muss berücksichtigt werden, dass die Assays zum Nachweis tumorpromovierender Wirkungen mit transient transfizierten Zellen durchgeführt wurden. Nach transienter Transfektion erfolgt die Expression rekombinanter Proteine (hier: der NS3-Konstrukte) nur temporär für die Dauer weniger Tage. Die EGFP-Fluoreszenz transient mit EGFP transfizierter Kontrollzellen nahm 5 Tage nach der Transfektion deutlich ab. Tumorpromotionsprozesse nehmen einige Zeit in Anspruch; für die Induktion der Koloniebildungsfähigkeit von P+ JB6-Zellen in Soft Agar ist eine ungefähr viertägige Exposition mit Tumorpromotoren notwendig (Dion et al. 1988). Allerdings spricht das JB6-Modell äusserst empfindlich auf tumorpromovierende Substanzen an. So induziert hier bereits eine Konzentration von 1 ng/ml des Tumorpromotors TPA eine erhöhte Koloniebildungsrate in Soft Agar (Dion et al. 1988). Zusammengefasst ist festzustellen, dass stark

tumorpromovierende Effekte und eine starke PKC- δ Inhibition durch die NS3 NTPase/-Helikase nach Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse als sehr unwahrscheinlich angesehen werden müssen.

4.3.2 Die NS3 NTPase/Helikase bewirkt gesteigerte Proliferation und eine veränderte Morphologie

Die bei der Untersuchung weiterer zellulärer Eigenschaften erzielten Ergebnisse sprechen aber durchaus für eine Beteiligung der NS3 NTPase/Helikase an der Entwicklung des HCV-assoziierten HCC. So sind stabil mit der NS3 NTPase/Helikase transfizierte NIH 3T3 Zellen morphologisch verändert und weisen eine starke Steigerung ihrer Proliferationsrate auf. Derartige zelluläre Veränderungen werden häufig im Verlauf der Induktion eines transformierten Phänotyps beobachtet (Riedel 2002).

Die hier erstmalig nachgewiesene starke Steigerung der Proliferationsrate von NIH 3T3 Zellen mit stabiler NS3 NTPase/Helikase-Expression ist ein wichtiger Befund. Viele virale Onkogene wirken proliferationsfördernd (Lavia et al. 2003), und der Verlust der Proliferationskontrolle ist ein wesentlicher Schritt im Mehrstufenmodell der neoplastischen Transformation (Riedel 2002). In dieser Arbeit wurde erstmalig demonstriert, dass vom isolierten NS3 NTPase/Helikase-Anteil eine Mitogenaktivität ausgeht. Diese kommt unabhängig von assoziierten Enzymaktivitäten zustande; eine enzymatisch inaktive NS3 NTPase/Helikase-Mutante und das entsprechende wt-Protein führen zu vergleichbarer Proliferationssteigerung. Auch Kwun et al. und Smirnova et al. beobachteten eine gesteigerte Proliferation von stabil mit HCV-NS3 transfizierten NIH 3T3 Zellen (Kwun et al. 2001, Smirnova et al. 2006). Stabil mit NS3 transfizierte HepG2 und HeLa Zellen bzw. Rattenfibroblasten weisen ebenfalls eine gesteigerte Proliferation auf (Hassan et al. 2005, Zemel et al. 2001). Aber in keiner der oben genannten Studien wurde die isolierte NS3 NTPase/Helikase untersucht, sondern das Vollängen-Protein und/oder die isolierte NS3 Proteasedomäne. Siavoshian et al. hingegen beobachteten eine Proliferationsinhibition durch NS3 an transient transfizierten Huh7 und Hep3B Zellen.

Die Mechanismen der mitogenen NS3-Wirkungen sind nicht geklärt. Kwun et al. führen die Proliferationssteigerung auf eine Transkriptionsrepression von p21^{waf1} zurück, die möglicherweise durch eine NS3-vermittelte Inhibition der Aktivität von p53 verursacht wird (Kwun et al. 2001). Hassan et al. konnten zeigen, dass eine Aktivierung von JNK, einer MAPKinase (mitogen activated protein kinase) für die NS3-vermittelte Mitogenaktivität essentiell ist (Hassan et al. 2005). Nach den Ergebnissen von Zemel et al. ist für die Proliferationssteigerung durch die isolierte NS3 Protease-Domäne ihre enzymatische Aktivität notwendig (Zemel et al. 2001). Dem widersprechen allerdings die Ergebnisse von Kwun et al., die eine starke Proliferationssteigerung durch eine enzymatisch inaktive NS3 Protease-Mutante beobachteten. Dass die in dieser Arbeit nachgewiesene Mitogenaktivität durch die

NS3 NTPase/Helikase unabhängig von assoziierten Enzymaktivitäten zustande kommt deutet stark darauf hin, dass ihr eine Protein-Protein-Interaktion zu Grunde liegt.

Auch die Beobachtung, dass der NTPase/Helikase-Anteil von NS3 zur Morphologieveränderung von NIH 3T3 Zellen führt ist wichtig. Smirnova et al. beobachteten eine ähnliche Morphologieveränderung im Verlauf der Transformation von stabil mit Vollängen-NS3 transfizierten NIH 3T3 Zellen (Smirnova et al. 2006). Smirnova et al. stellten zudem fest, dass die phänotypischen Veränderungen während der NS3-induzierten Transformation von NIH3T3 Zellen in einer zeitlichen Abfolge auftreten. Die Morphologieveränderung und die Steigerung der Proliferation wurden bereits ca. 5 bis 10 Passagen nach der Transfektion beobachtet, während die Fähigkeit zur Koloniebildung in Soft Agar erst später, nach 30 bis 50acher Verdoppelung der Zellzahl (*population doubling*) nachweisbar war. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass mehrere zelluläre Veränderungen erfolgen müssen, bis die NS3-induzierte Fähigkeit zur Koloniebildung in Soft Agar zustande kommt. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die NS3 NTPase/Helikase eine Proliferationssteigerung und Morphologieveränderungen hervorruft, aber auch 50–70 *population doublings* nach der Transfektion nicht die Fähigkeit zur Koloniebildung in Softagar induziert.

Im Hinblick auf die Ausgangshypothese, nach der die NS3 NTPase/Helikase durch Störung von PKC-Funktionen an der HCV-induzierten Karzinogenese beteiligt ist, ist festzuhalten, dass weder die Proliferationssteigerung, noch die Morphologieveränderung durch die NS3 NTPase/Helikase auf eine Inhibition der katalytischen Aktivität von PKCs zurückgeführt werden können. Die isolierte Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase bewirkt keine Morphologieveränderung und keine Proliferationssteigerung obwohl sie im *in vitro* Kinase Assays zu vergleichbarer PKC-Inhibition führt wie die komplette NS3 NTPase/Helikase.

4.4 Biologische Relevanz der erzielten Ergebnisse und Ausblick

Wie lassen sich die in dieser Arbeit erbrachten Befunde im Kontext der *in vivo* Situation einer chronischen Hepatitis C einordnen? Die hier nachgewiesene starke PKC-Inhibition durch die HCV NTPase/Helikase *in vitro* konnte in intakten Zellen nicht detektiert werden, allerdings kann die durchgeführte Messung der p80/MARCKS-Phosphorylierung aus den in Abschnitt 4.2 auf S. 89 dargelegten Gründen nur als grober Indikator für die intrazelluläre Gesamtaktivität der meisten PKC-Isoformen angesehen werden. Daher ist nicht auszuschließen, dass die PKC-Inhibition durch NS3 eine Rolle in der Pathogenese der HCV-Infektion spielt. Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang, dass eine Entdeckung von Fimia et al. eine plausible Erklärungsmöglichkeit dafür anbietet, warum NS3 die stark inhibitorische Wirkung auf PKC evolviert haben könnte. Fimia et al. konnten zeigen, dass in einem Zellbasierten HCV Replicon System die Interferon- α -(IFN- α)-vermittelte HCV-Clearance

durch cPKC-Inhibitoren verhindert wird (Fimia et al. 2004). Das Interferon System stellt die erste Verteidigungslinie gegen virale Infektionen in Säugetieren dar. Die meisten Viren haben molekulare Mechanismen evolviert, durch die sie der IFN-vermittelten, antiviralen Reaktion entgehen. HCV ist ein wichtiges Beispiel: In einem hohen Anteil (70 bis 80%) infizierter Patienten entgeht das Virus sowohl dem angeborenen als auch dem adaptiven Immunsystem und es kommt zur chronischen Infektion. cPKC-Inhibitoren bewirken in Replikon-tragenden Zellen eine breite Verminderung der Genexpression IFN- α -induzierter Gene infolge gestörter STAT1- und STAT3-Tyrosinphosphorylierung. Dadurch kommt auch die IFN- α induzierte HCV RNA Degradation zum Erliegen. Eine Störung der IFN- α Genexpression durch NS3-vermittelte cPKC-Inhibition würde dem angeborenen Immunsystem entgegenwirken und so zur Entstehung einer persistenten HCV-Infektion beitragen. Die weitere Erforschung der Interaktion von NS3 mit PKC-Signalwegen in intakten Zellen ist also für die weitere Aufklärung der Hepatitis C Pathogenese von grossem Interesse.

Eine weitere zentrale Frage, zu deren Beantwortung diese Arbeit beitragen sollte, war die nach der Rolle von NS3 in der HCV-assoziierten Karzinogenese. Es konnte gezeigt werden, dass der NTPase/Helikase-Anteil von NS3 in Zellkulturmodellen nicht zu direkter Transformation oder Tumorpromotion führt, wohl aber zelluläre Eigenschaften beeinflusst, die im Zusammenhang mit neoplastischer Transformation stehen. Diese Effekte kommen jedoch unabhängig von inhibitorischen Einflüssen auf die katalytische Aktivität von Kinasen der PKC-Familie zustande. Ein wichtiges Charakteristikum der HCV-assoziierten Karzinogenese ist die lange Zeitspanne zwischen HCV-Infektion und der Entstehung des HCC bei chronischer Hepatitis C. Sie liegt im Allgemeinen in der Grössenordnung von Jahrzehnten (siehe Abschnitt 1.3, S. 7). Bei einer derart langfristigen, chronischen Einwirkung ist es durchaus wahrscheinlich, dass proliferationsfördernde Faktoren maßgeblich an der Karzinogenese beteiligt sind. Sie begünstigen einen erhöhten Zell-Umsatz, und damit die Akkumulation initialer und nachfolgender genetischer sowie epigenetischer Veränderungen, die dem Prozess der malignen Transformation zugrunde liegen (Frowein 2000).

Unter Einbeziehung der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen ergibt sich ein Modell, in dem von NS3 mehrere verschiedene potentiell onkogene Effekte ausgehen (siehe Abbildung 4-3). Neben der in dieser Arbeit nachgewiesenen Mitogenaktivität durch den NTPase/Helikase-Anteil von NS3 und die NS3-Proteasedomäne (Kwun et al. 2001, Zemel et al. 2001), ist vor allem die Interaktion der NS3-Proteasedomäne mit dem Tumorsuppressorprotein p53 von Bedeutung (siehe Abschnitt 1.6, S. 14). Im Mehrstufenmodell der neoplastischen Transformation gilt die funktionelle Inaktivierung von p53 als der am häufigsten beobachtete und wichtigste Schritt in der Karzinogenese (Halazonetis 2004). Eine gestörte p53-Funktion führt häufig zu verminderter Zellzykluskontrolle (Iliakis et al. 2003, Eastman 2004). Durch die Interaktion der NS3-Proteasedomäne mit p53 kommt es u.a. zu einer antiapoptotischen Wirkung *in vitro* (Fujita et al. 1996, Tanaka et al. 2006). Mehrere Studien legen zudem eine direkt transformierende Wirkung durch die NS3 Proteasedomäne nahe, die möglicherweise

auf die Interaktion mit p53 zurückzuführen ist (Smirnova et al. 2006). So konnte die direkte Transformation von Zellen nach stabiler Transfektion mit der NS3 Proteasedomäne oder Vollängen-NS3 nachgewiesen werden (Sakamuro et al. 1995, Zemel et al. 2001, Smirnova et al. 2006).

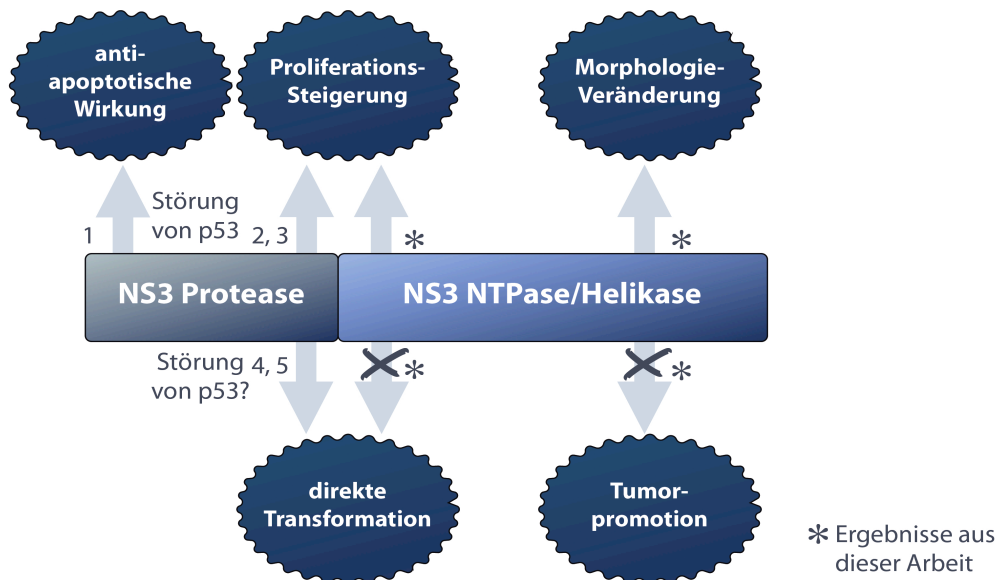


Abbildung 4-3. Von NS3 ausgehende, potentiell onkogene Effekte. Dargestellt ist eine schematische Zusammenfassung von Befunden aus *in vitro* Untersuchungen, die aufzeigen wie NS3 möglicherweise an der Entstehung des HCV assoziierten HCC beteiligt sein könnte. 1) (Fujita et al. 1996), 2) (Kwun et al. 2001), 3) (Zemel et al. 2001), 4) (Sakamuro et al. 1995), 5) (Smirnova et al. 2006), *) in dieser Arbeit wurde erstmalig demonstriert, dass der NTPase/Helikase-Anteil von NS3 keine Tumorpromotion bewirkt, aber proliferationssteigernd wirkt und zu Morphologieveränderungen führt. Zudem wurden die Ergebnisse von Sakamuro et al. bestätigt, nach denen die C-Terminale Hälfte von NS3 keine direkte Transformation von NIH 3T3 Zellen auslösen kann (Sakamuro et al. 1995). Die den in dieser Abbildung gezeigten Effekten zu Grunde liegenden Mechanismen sind weitestgehend ungeklärt.

Abschliessend ist es wichtig hervorzuheben, dass fast alle Befunde zu putativ transformierenden Effekten durch NS3 und ihren molekularen Mechanismen auf Untersuchungen an artifiziellen Zellkultursystemen basieren und nicht direkt auf die *in vivo* Situation übertragbar sind. Die Überprüfung ihrer biologischen Relevanz im Tiermodell steht noch aus. Weiterhin ist nicht bekannt welche HCV-Genprodukte *in vivo* zur Induktion eines HCC notwendig sind (Levrero 2006). Ein wichtiger, neuer Befund ist daher, dass transgene Mäuse mit hepatischer NS3-Expression kein HCC entwickeln (Frelin et al. 2006). Das spricht dafür, dass NS3 *in vivo* wahrscheinlich nicht direkt transformierend wirkt, sondern eher synergistisch, im Zusammenspiel mit anderen Faktoren zur HCV-assoziierten Karzinogenese beiträgt.

5 Zusammenfassung

Die Störung zellulärer Proteinkinase C (PKC) Aktivität kann *in vitro* zu Tumorpromotion führen und ist möglicherweise ursächlich an Karzinogenese Prozessen *in vivo* beteiligt. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Fragmente des Nichtstrukturproteins 3 (NS3) des Hepatitis C Virus (HCV) mit dem katalytischen Zentrum der PKC interagieren, wodurch es zur Inhibition der enzymatischen Aktivität der Kinase kommt (Borowski et al. 1999c). Die Inhibition wird von einem auf der Oberfläche von Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase gelegenen, argininreichen Sequenzabschnitt vermittelt, der starke Sequenzhomologie zur autoinhibitorischen Pseudosubstratregion der PKC aufweist. Diese Beobachtungen gaben Anlass zur Frage, ob eine NS3-vermittelte PKC-Inhibition an der molekularen Pathogenese der HCV-Infektion, insbesondere an der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese beteiligt ist; ihre Aufklärung war Ziel dieser Arbeit.

Es konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur NS3-Fragmente, sondern auch die katalytisch aktive NS3 NTPase/Helikase *in vitro* zu starker PKC-Inhibition führt. Die IC_{50} -Werte für die Inhibition der PKC katalysierten Phosphorylierung von Histon H1 durch verschiedene NS3 Konstrukte wurden für alle 11 PKC-Isoformen bestimmt. Sie liegen für die NTPase/Helikase defiziente Mutante und die isolierte Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase, für die meisten Isoformen, im submikromolaren Bereich.

Die PKC-Inhibition kommt unabhängig von der enzymatischen NTPase-Aktivität zustande, wie anhand einer NTPase/Helikase defizienten Mutante und durch den Einsatz eines ATP-regenerierenden Systems im PKC-Assay demonstriert werden konnte. Die kinetische Analyse der PKC-NS3-Wechselwirkung ergab, dass die Inhibition im Modus einer *mixed type* Hemmung erfolgt und hauptsächlich aus der spezifischen Interaktion von Domäne 2 der NS3 NTPase/Helikase mit dem aktiven Zentrum der PKC resultiert.

Um die biologische Relevanz dieser Ergebnisse in intakten Zellen zu überprüfen, sowie generelle onkogene Einflüsse von der NS3 NTPase/Helikase zu untersuchen, wurden NIH 3T3 Zellen mit stabiler Expression von NS3-Konstrukten generiert. Zur Bestimmung von Einflüssen der rekombinanten Proteine auf ihre intrazelluläre PKC-Aktivität wurde der Phosphateinbau in das PKC-Substratprotein p80/MARCKS in diesen Zellen nach Stimulation mit dem PKC-Aktivator TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) gemessen. Die NS3-

Expression hatte hier keinen signifikanten Einfluss; der gemessene Parameter kann jedoch nur als grober Indikator für die intrazelluläre Gesamtaktivität der meisten PKC-Isoformen angesehen werden, so dass nicht auszuschließen ist, dass die PKC-Inhibition durch NS3 eine Rolle in der Pathogenese der HCV-Infektion spielt.

Zur Prüfung möglicher onkogener Effekte durch die NS3 NTPase/Helikase wurden verschiedene zelluläre Eigenschaften transfizierter Zellen untersucht, die im Zusammenhang mit neoplastischer Transformation stehen. Stabil mit der NS3 NTPase/Helikase transfizierte Zellen besitzen keine Koloniebildungsfähigkeit in Soft Agar und auch keine erhöhte DNA-Syntheserate bei Konfluenz. Demzufolge weist die NS3 NTPase/Helikase keine direkt transformierenden Eigenschaften auf. Zur Untersuchung tumorpromovierender Effekte durch die NS3 NTPase/Helikase kamen zwei verschiedene Zellkulturmodelle zum Einsatz. Die Untersuchung transient transfizierter Zellen ergab, dass die NS3 NTPase/Helikase weder in JB6-Cl41-5a-Zellen, noch in c-Src überexprimierenden 3Y1-Rattenfibroblasten eine gesteigerte Koloniebildungsfähigkeit in Soft Agar bewirkt. Die erstgenannte Zelllinie stellt ein gut etabliertes Modell für die Untersuchung von tumorpromoterinduzierter neoplastischer Transformation *in vitro* dar (Colburn et al. 1980), letztere lässt sich durch Inhibition von PKC- δ zu matrixunabhängiger Proliferation in Soft Agar anregen (Lu et al. 1997). Folglich verursacht die NS3 NTPase/Helikase keine Tumorpromotion und die Ausgangshypothese, nach der sie durch Störung von PKC-Funktionen tumorpromovierend wirkt, wurde nicht bestätigt.

Wie in dieser Arbeit erstmalig gezeigt wurde, führt die NS3 NTPase/Helikase jedoch zu Morphologieveränderungen und einer starken Steigerung der Zellproliferation. Diese Einflüsse kommen allerdings unabhängig von einer Inhibition der katalytischen Aktivität von Kinasen der PKC-Familie zustande. Derartige phänotypische Veränderungen werden häufig im Verlauf der Induktion eines Tumorphänotyps beobachtet. Bei der sehr langfristigen, chronischen Einwirkung von NS3 auf Hepatocyten im Verlauf einer chronischen Hepatitis C ist es durchaus wahrscheinlich, dass proliferationsfördernde Faktoren maßgeblich an der Karzinogenese beteiligt sind.

6 Abstract

A broad range of biological and biochemical studies document that disturbing protein kinase C (PKC) function induces tumor promotion and may promote carcinogenesis *in vivo*. In foregoing works it has been demonstrated that fragments of the NTPase/helicase domain of the nonstructural protein 3 (NS3) of hepatitis C virus (HCV) interact with the active site of PKC and reduce catalytic activity of the enzyme (Borowski et al. 1999c). The inhibition is mainly mediated by a short arginine rich amino acid stretch localized on the surface of Domain 2 of the NS3-NTPase/helicase. The HCV amino acid sequence of this motif strongly resembles the pseudosubstrate sequence within the autoregulatory domain of PKC. Thus, NS3-mediated PKC-inhibition may be involved in the molecular pathogenesis of the HCV-infection, particularly in regard to HCV-associated carcinogenesis leading to hepatocellular carcinoma. The presented thesis sets out to scrutinize this hypothesis.

The acquired data clearly demonstrates, that not only fragments of NS3, but catalytically active NS3-NTPase/helicase acts as a potent PKC-inhibitor *in vitro*. IC_{50} -values for the inhibition of PKC-catalyzed Histone HIII phosphorylation by an NTPase/helicase-inactive mutant (NS3h-D1316A) or the isolated domain 2 of the NS3-NTPase/helicase were determined for all 11 PKC-isoforms. They fall within the submicromolar range for the inhibition of most PKC-isoforms. A PKC-activity assay comprising an ATP-regenerating System was applied to confirm these results for wildtype NS3-NTPase/helicase and consequently rule out influences of the D1316A point mutation on the accessibility of the arginine rich stretch. PKC-inhibition by NS3h-D1316A displays a *mixed type* kinetic pattern and mainly results from a specific interaction between domain 2 and the PKC active site.

To elucidate the biological relevance of these findings in intact cells, NIH 3T3 cells with stable expression of the NS3-constructs were generated. These cells were subjected to an assay for intracellular PKC-activity, that employed measuring phosphorylation of the PKC-substrate p80/MARCKS after stimulation with the PKC-activator TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate). The NS3-expression had no significant effect in this assay. However, the possibility that PKC inhibition plays an important role in HCV pathogenesis can not be ruled out, as the employed method must be regarded as a rough measurement of the overall activity of most PKC isoforms.

To scrutinize possible oncogenic effects caused by the NS3-NTPase/helicase, NS3-transfected cells were assayed for several cellular properties that are commonly associated with neoplastic transformation. Stably transfecting NIH 3T3 cells with NS3-constructs did not confer the ability to form colonies in soft agar and did not lead to an elevated DNA-synthesis rate in cells that were grown to confluence. Thus NS3-NTPase/helicase does not exhibit directly transforming properties. To address the question if the NS3-NTPase/helicase exerts tumorpromoting effects, two different cell culture models were utilized. The determination of colony formation of JB6-Cl41-5a cells is commonly used to assay general tumorpromoting effects *in vitro*, whereas in c-Src overexpressing 3Y1 cells, anchorage independent growth can specifically be induced by inhibition of PKC- δ activity (Lu et al. 1997). Transient transfection with NS3-constructs did not confer the ability to form colonies in softagar to neither of the two cell lines. These findings strongly suggest that NS3-NTPase/helicase does not cause tumorpromotion.

Nonetheless it was shown, that NS3-NTPase/helicase expression in NIH 3T3 cells causes morphological alterations and strongly stimulates cell proliferation, albeit independently from PKC inhibition. To date, this is the first report that attributes the induction of these phenotypic changes to the NTPase/helicase portion of HCV-NS3. Proliferative and morphological changes are often observed in the course of neoplastic transformation. Considering the long term exposure of hepatocytes to NS3 during chronic hepatitis C, it seems eminently reasonable, that proliferation-promoting factors substantially contribute to HCV-associated hepatocarcinogenesis.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham C, Scaglione-Sewell B, Skarosi SF, Qin W, Bissonnette M, Brasitus TA. 1998. Protein kinase C alpha modulates growth and differentiation in Caco-2 cells. *Gastroenterology*, 114 (3):503-509.
- Akashi M, Osawa Y, Koeffler HP, Hachiya M. 1999. p21WAF1 expression by an activator of protein kinase C is regulated mainly at the post-transcriptional level in cells lacking p53: important role of RNA stabilization. *Biochem J*, 337 (Pt 3):607-616.
- Akimoto K, Mizuno K, Osada S, Hirai S, Tanuma S, Suzuki K, Ohno S. 1994. A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J Biol Chem*, 269 (17):12677-12683.
- Alcami A, Koszinowski UH. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Mol Med Today*, 6 (9):365-372.
- Aoubala M, Holt J, Clegg RA, Rowlands DJ, Harris M. 2001. The inhibition of cAMP-dependent protein kinase by full-length hepatitis C virus NS3/4A complex is due to ATP hydrolysis. *J Gen Virol*, 82 (Pt 7):1637-1646.
- Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C. 1992. The protein kinase C family. *Eur J Biochem*, 208 (3):547-557.
- Becker KP, Hannun YA. 2005. Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell Mol Life Sci*, 62 (13):1448-1461.
- Benn J, Schneider RJ. 1995. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (24):11215-11219.
- Bernard P, Couturier M. 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol*, 226 (3):735-745.
- Black JD. 2000. Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci*, 5:D406-423.
- Borowski P, Oehlmann K, Heiland M, Laufs R. 1997. Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Virol*, 71 (4):2838-2843.
- Borowski P, Heiland M, Feucht H, Laufs R. 1999a. Characterisation of non-structural protein

- 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC: evidences for action on the level of substrate and enzyme. *Arch Virol*, 144 (4):687-701.
- Borowski P, Resch K, Schmitz H, Heiland M. 2000. A synthetic peptide derived from the non-structural protein 3 of hepatitis C virus serves as a specific substrate for PKC. *Biol Chem*, 381 (1):19-27.
- Borowski P, Kuhl R, Laufs R, Schulze zur Wiesch J, Heiland M. 1999b. Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus. *J Clin Virol*, 13 (1-2):61-69.
- Borowski P, zur Wiesch JS, Resch K, Feucht H, Laufs R, Schmitz H. 1999c. Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus. *J Biol Chem*, 274 (43):30722-30728.
- Borowski P, Heiland M, Oehlmann K, Becker B, Kornetzky L, Feucht H, Laufs R. 1996. Non-structural protein 3 of hepatitis C virus inhibits phosphorylation mediated by cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem*, 237 (3):611-618.
- Bosch FX, Ribes J, Borrás J. 1999. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis*, 19 (3):271-285.
- Bouchard MJ, Wang L, Schneider RJ. 2006. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication. *J Virol*, 80 (9):4406-4414.
- Brandlin I, Hubner S, Eiseler T, Martinez-Moya M, Horschinek A, Hausser A, Link G, Rupp S, Storz P, Pfizenmaier K, Johannes FJ. 2002. Protein kinase C (PKC)eta-mediated PKC mu activation modulates ERK and JNK signal pathways. *J Biol Chem*, 277 (8):6490-6496.
- Brass V, Moradpour D, Blum HE. 2006. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. *Int J Med Sci*, 3 (2):29-34.
- Brechot C, Jaffredo F, Lagorce D, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde K, Papakonstantinou A, Hadziyannis S, Romeo R, Colombo M, Rodes J, Bruix J, Williams R, Naoumov N. 1998. Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: results of a European concerted action. *J Hepatol*, 29 (2):173-183.
- Brose N, Rosenmund C. 2002. Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci*, 115 (Pt 23):4399-4411.
- Bullock W, Fernandez J, Short J. 1987. XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques*, 5:376-379.
- Cacace AM, Ueffing M, Philipp A, Han EK, Kolch W, Weinstein IB. 1996. PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase. *Oncogene*, 13 (12):2517-2526.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*, 257 (13):7847-7851.
- Cerda SR, Mustafi R, Little H, Cohen G, Khare S, Moore C, Majumder P, Bissonnette M. 2006. Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene*, 25 (22):3123-3138.

- Cheng C, Shuman S. 2000. Recombinogenic flap ligation pathway for intrinsic repair of topoisomerase IB-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 20 (21):8059-8068.
- Chiba T, Matsuzaki Y, Abei M, Shoda J, Aikawa T, Tanaka N, Osuga T. 1996. Multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related liver cirrhosis. *J Gastroenterol*, 31 (4):552-558.
- Cho HS, Ha NC, Kang LW, Chung KM, Back SH, Jang SK, Oh BH. 1998. Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus. A feasible mechanism of unwinding duplex RNA. *J Biol Chem*, 273 (24):15045-15052.
- Choi PM, Tchou-Wong KM, Weinstein IB. 1990. Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol Cell Biol*, 10 (9):4650-4657.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244 (4902):359-362.
- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. 1998. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol*, 8 (19):1069-1077.
- Colburn NH, Koehler BA, Nelson KJ. 1980. A cell culture assay for tumor-promoter-dependent progression toward neoplastic phenotype: detection of tumor promoters and promotion inhibitors. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1 (1):87-96.
- Colburn NH, Former BF, Nelson KA, Yuspa SH. 1979. Tumour promoter induces anchorage independence irreversibly. *Nature*, 281 (5732):589-591.
- Colburn NH, Lerman MI, Hegamyer GA, Gindhart TD. 1985. A transforming activity not detected by DNA transfer to NIH 3T3 cells is detected by JB6 mouse epidermal cells. *Mol Cell Biol*, 5 (4):890-893.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173 (1 Spec No):33-38.
- Cornish-Bowden A. 1974. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem J*, 137 (1):143-144.
- Coussens L, Rhee L, Parker PJ, Ullrich A. 1987. Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family. *DNA*, 6 (5):389-394.
- Croquet F, Brehier A, Gil S, Davy J, Feger J. 1996. Five isoenzymes of protein kinase C are expressed in normal and STZ-diabetic rat hepatocytes: effect of phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochim Biophys Acta*, 1315 (3):163-168.
- Cudmore S, Cossart P, Griffiths G, Way M. 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature*, 378 (6557):636-638.
- Czupryn M, Bennett F, Dube J, Grant K, Scoble H, Sookdeo H, McCoy JM. 1995. Alanine-scanning mutagenesis of human interleukin-11: identification of regions important for biological activity. *Ann N Y Acad Sci*, 762:152-164.

- Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, Farmachidi JP, Degott C, Guettier C, Trinchet JC, Beaugrand M, Chevret S. 2000. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut*, 47 (1):131-136.
- Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M, Kato N, Sada K, Hotta H. 2006. NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol*, 87 (Pt 6):1703-1713.
- Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. 2002. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*, 36 (5 Suppl 1):S121-127.
- DiGiovanni J. 1992. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther*, 54 (1):63-128.
- Dion LD, Gindhart TD, Colburn NH. 1988. Four-day duration of tumor promoter exposure required to transform JB6 promotion-sensitive cells to anchorage independence. *Cancer Res*, 48 (24 Pt 1):7126-7131.
- Dixon M. 1953. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J*, 55 (1):170-171.
- Dumont S, Cheng W, Serebrov V, Beran RK, Tinoco I, Jr., Pyle AM, Bustamante C. 2006. RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature*, 439 (7072):105-108.
- Dutil EM, Toker A, Newton AC. 1998. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol*, 8 (25):1366-1375.
- Eastman A. 2004. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *J Cell Biochem*, 91 (2):223-231.
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, 76 (12):5974-5984.
- El-Serag HB. 2002. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology*, 36 (5 Suppl 1):S74-83.
- Fattovich G. 1998. Progression of hepatitis B and C to hepatocellular carcinoma in Western countries. *Hepatology*, 45 Suppl 3:1206-1213.
- Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. 1997. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*, 112 (2):463-472.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*, 292 (15):767-770.
- Fimia GM, Evangelisti C, Alonzi T, Romani M, Fratini F, Paonessa G, Ippolito G, Tripodi M, Piacentini M. 2004. Conventional protein kinase C inhibition prevents alpha interferon-mediated hepatitis C virus replicon clearance by impairing STAT activation. *J Virol*, 78 (23):12809-12816.
- Foy E, Li K, Sumpter R, Jr., Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T,

- Lemon SM, Gale M, Jr. 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (8):2986-2991.
- Freedman VH, Shin SI. 1974. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell*, 3 (4):355-359.
- Frelin L, Brenndorfer ED, Ahlen G, Weiland M, Hultgren C, Alheim M, Glaumann H, Rozell B, Milich DR, Bode JG, Sallberg M. 2006. The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumour- necrosis factor-a-mediated liver disease. *Gut*,
- Frey MR, Clark JA, Leontieva O, Uronis JM, Black AR, Black JD. 2000. Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*, 151 (4):763-778.
- Frowein J. 2000. Hypothesis: chemical carcinogenesis mediated by a transiently active carcinogen receptor. *Cytogenet Cell Genet*, 91 (1-4):102-104.
- Fujita T, Ishido S, Muramatsu S, Itoh M, Hotta H. 1996. Suppression of actinomycin D-induced apoptosis by the NS3 protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 229 (3):825-831.
- Fukushima S, Kinoshita A, Puatanachokchai R, Kushida M, Wanibuchi H, Morimura K. 2005. Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis*, 26 (11):1835-1845.
- Furness JB, Hind AJ, Ngui K, Robbins HL, Clerc N, Merrot T, Tjandra JJ, Poole DP. 2006. The distribution of PKC isoforms in enteric neurons, muscle and interstitial cells of the human intestine. *Histochem Cell Biol*,
- Gale M, Jr., Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. 1999. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol*, 73 (8):6506-6516.
- Gallina A, Rossi F, Milanese G. 2001. Rack1 binds HIV-1 Nef and can act as a Nef-protein kinase C adaptor. *Virology*, 283 (1):7-18.
- Gesell JJ, Liu D, Madison VS, Hesson T, Wang YS, Weber PC, Wyss DF. 2001. Design, high-level expression, purification and characterization of soluble fragments of the hepatitis C virus NS3 RNA helicase suitable for NMR-based drug discovery methods and mechanistic studies. *Protein Eng*, 14 (8):573-582.
- Gillespie S, Zhang XD, Hersey P. 2005. Variable expression of protein kinase C epsilon in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 4 (4):668-676.
- Goodnight JA, Mischak H, Kolch W, Mushinski JF. 1995. Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem*, 270 (17):9991-10001.
- Gordon SC, Bayati N, Silverman AL. 1998. Clinical outcome of hepatitis C as a function of mode of transmission. *Hepatology*, 28 (2):562-567.

- Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*, 77 (9):5487-5492.
- Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, 535 (1-3):34-38.
- Griner EM, Kazanietz MG. 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer*, 7 (4):281-294.
- Guex N, Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18 (15):2714-2723.
- Halazonetis TD. 2004. Constitutively active DNA damage checkpoint pathways as the driving force for the high frequency of p53 mutations in human cancer. *DNA Repair (Amst)*, 3 (8-9):1057-1062.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166 (4):557-580.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1):57-70.
- Hassan M, Ghozlan H, Abdel-Kader O. 2005. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology*, 333 (2):324-336.
- Heintges T, Wands JR. 1997. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology*, 26 (3):521-526.
- Heit I, Wieser RJ, Herget T, Faust D, Borchert-Stuhltrager M, Oesch F, Dietrich C. 2001. Involvement of protein kinase Cdelta in contact-dependent inhibition of growth in human and murine fibroblasts. *Oncogene*, 20 (37):5143-5154.
- Higgins RC, Dahmus ME. 1979. Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 93 (2):257-260.
- Hornia A, Lu Z, Sukezane T, Zhong M, Joseph T, Frankel P, Foster DA. 1999. Antagonistic effects of protein kinase C alpha and delta on both transformation and phospholipase D activity mediated by the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*, 19 (11):7672-7680.
- House C, Kemp BE. 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*, 238 (4834):1726-1728.
- Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*, 284 (1):70-81.
- Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, Kumada H, Kawanishi M. 1993. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology*, 18 (1):47-53.
- Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. 2003. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, 22 (37):5834-5847.

- Ishido S, Hotta H. 1998. Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *FEBS Lett*, 438 (3):258-262.
- Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ. 2005. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *Embo J*, 24 (22):3834-3845.
- Jackson DN, Foster DA. 2004. The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival. *Faseb J*, 18 (6):627-636.
- Jaken S. 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol*, 8 (2):168-173.
- Janz S, Gawrisch K, Lester DS. 1995. Translocation and activation of protein kinase C by the plasma cell tumor-promoting alkane pristane. *Cancer Res*, 55 (3):518-524.
- Kahl-Rainer P, Sedivy R, Marian B. 1996. Protein kinase C tissue localization in human colonic tumors suggests a role for adenoma growth control. *Gastroenterology*, 110 (6):1753-1759.
- Katti SK, LeMaster DM, Eklund H. 1990. Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J Mol Biol*, 212 (1):167-184.
- Kazanietz MG. 2000. Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol Carcinog*, 28 (1):5-11.
- Kazanietz MG, Areces LB, Bahador A, Mischak H, Goodnight J, Mushinski JF, Blumberg PM. 1993. Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol Pharmacol*, 44 (2):298-307.
- Kholodenko B, Zilinskiene V, Borutaite V, Ivanoviene L, Toleikis A, Praskevicius A. 1987. The role of adenine nucleotide translocators in regulation of oxidative phosphorylation in heart mitochondria. *FEBS Lett*, 223 (2):247-250.
- Kikkawa U, Takai Y, Tanaka Y, Miyake R, Nishizuka Y. 1983. Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*, 258 (19):11442-11445.
- Kiley SC, Welsh J, Narvaez CJ, Jaken S. 1996. Protein kinase C isozymes and substrates in mammary carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1 (2):177-187.
- Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J. 1995. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 215 (1):160-166.
- Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, Lin C, Caron PR. 1998. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure*, 6 (1):89-100.
- Kischel T, Harbers M, Stabel S, Borowski P, Muller K, Hilz H. 1989. Tumor promotion and depletion of protein kinase C in epidermal JB6 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 165 (3):981-987.
- Krauss G. 1997. Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. VHC-Verlag, Weinheim
- Kwon HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. 2001. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol*, 82 (Pt 9):2235-2241.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM. 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology (N Y)*, 11 (2):187-193.
- Lavia P, Mileo AM, Giordano A, Paggi MG. 2003. Emerging roles of DNA tumor viruses in cell proliferation: new insights into genomic instability. *Oncogene*, 22 (42):6508-6516.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. 1998. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*, 281 (5385):2042-2045.
- Leach KL, James ML, Blumberg PM. 1983. Characterization of a specific phorbol ester aporeceptor in mouse brain cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (14):4208-4212.
- Levin MK, Gurjar M, Patel SS. 2005. A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase. *Nat Struct Mol Biol*, 12 (5):429-435.
- Levrero M. 2006. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*, 25 (27):3834-3847.
- Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Jr., Lemon SM. 2005. 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*, 102 (8):2992-2997.
- Liang TJ, Heller T. 2004. Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127 (5 Suppl 1):S62-71.
- Lin C, Kim JL. 1999. Structure-based mutagenesis study of hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol*, 73 (10):8798-8807.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 309 (5734):623-626.
- Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM. 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (10):3805-3809.
- Liu WS, Heckman CA. 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal*, 10 (8):529-542.
- Lu Z, Hornia A, Jiang YW, Zang Q, Ohno S, Foster DA. 1997. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol Cell Biol*, 17 (6):3418-3428.
- Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA. 1998. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*, 18 (2):839-845.
- Lu Z, DiBlasio-Smith EA, Grant KL, Warne NW, LaVallie ER, Collins-Racie LA, Follettie MT, Williamson MJ, McCoy JM. 1996. Histidine patch thioredoxins. Mutant forms of thioredoxin with metal chelating affinity that provide for convenient purifications of thioredoxin fusion proteins. *J Biol Chem*, 271 (9):5059-5065.

- Macdonald A, Harris M. 2004. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol*, 85 (Pt 9):2485-2502.
- Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, Sung VM, Lai MM. 2006. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol*, 80 (14):7199-7207.
- Malcolm BA, Liu R, Lahser F, Agrawal S, Belanger B, Butkiewicz N, Chase R, Gheyas F, Hart A, Hesk D, Ingravallo P, Jiang C, Kong R, Lu J, Pichardo J, Prongay A, Skelton A, Tong X, Venkatraman S, Xia E, Girijavallabhan V, Njoroge FG. 2006. SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 50 (3):1013-1020.
- Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. 2006. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*, 55 (9):1350-1359.
- Marquez C, Martinez C, Kroemer G, Bosca L. 1992. Protein kinase C isoenzymes display differential affinity for phorbol esters. Analysis of phorbol ester receptors in B cell differentiation. *J Immunol*, 149 (8):2560-2568.
- Meisel H, Reip A, Faltus B, Lu M, Porst H, Wiese M, Roggendorf M, Kruger DH. 1995. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet*, 345 (8959):1209-1211.
- Mellor H, Parker PJ. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, 332 (Pt 2):281-292.
- Meyer AN, Xu YF, Webster MK, Smith AE, Donoghue DJ. 1994. Cellular transformation by a transmembrane peptide: structural requirements for the bovine papillomavirus E5 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (11):4634-4638.
- Michielsen PP, Francque SM, van Dongen JL. 2005. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*, 3:27.
- Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaehtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF. 1993. Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem*, 268 (9):6090-6096.
- Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J. 1991. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (9):3997-4000.
- Montalbano M, Neff GW. 2005. An update in liver transplantation in patients with hepatitis B and hepatitis C. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 51 (1):109-126.
- Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. 1997. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol*, 78 (Pt 7):1527-1531.
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*, 4 (9):1065-1067.
- Mosior M, Newton AC. 1996. Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters

- causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry*, 35 (5):1612-1623.
- Muranyi W, Haas J, Wagner M, Krohne G, Koszinowski UH. 2002. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science*, 297 (5582):854-857.
- Nelson M, McClelland M. 1992. Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol*, 216:279-303.
- Newton AC. 1995. Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr Biol*, 5 (9):973-976.
- Newton AC. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, 101 (8):2353-2364.
- Newton AC, Johnson JE. 1998. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta*, 1376 (2):155-172.
- Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. 2001. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol*, 75 (21):10348-10358.
- Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, Morimoto H, Takeda T, Nakajima S, Shiomi S, Seki S, Kobayashi K, Otani S. 1995. Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet*, 346 (8982):1051-1055.
- Ogawa Y, Takai Y, Kawahara Y, Kimura S, Nishizuka Y. 1981. A new possible regulatory system for protein phosphorylation in human peripheral lymphocytes. I. Characterization of a calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J Immunol*, 127 (4):1369-1374.
- Ohmori S, Sakai N, Shirai Y, Yamamoto H, Miyamoto E, Shimizu N, Saito N. 2000. Importance of protein kinase C targeting for the phosphorylation of its substrate, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. *J Biol Chem*, 275 (34):26449-26457.
- Olivier AR, Parker PJ. 1992. Identification of multiple PKC isoforms in Swiss 3T3 cells: differential down-regulation by phorbol ester. *J Cell Physiol*, 152 (2):240-244.
- Ornstein L. 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci*, 121:321-349.
- Orr JW, Newton AC. 1994a. Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *J Biol Chem*, 269 (44):27715-27718.
- Orr JW, Newton AC. 1994b. Intrapeptide regulation of protein kinase C. *J Biol Chem*, 269 (11):8383-8387.
- Otsuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, Kawabe T, Omata M. 2005. Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology*, 41 (5):1004-1012.
- Parker PJ, Murray-Rust J. 2004. PKC at a glance. *J Cell Sci*, 117 (Pt 2):131-132.
- Pause A, Methot N, Sonenberg N. 1993. The HRIGRXXXR region of the DEAD box RNA

- helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol*, 13 (11):6789-6798.
- Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (10):6104-6108.
- Pears C. 1995. Structure and function of the protein kinase C gene family. *J Biosci*, 20 (3):311-332.
- Pears CJ, Kour G, House C, Kemp BE, Parker PJ. 1990. Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur J Biochem*, 194 (1):89-94.
- Pellicano R, Mladenova I, Dimitrova SM, Bruno CM, Sciacca C, Rizzetto M. 2004. The epidemiology of hepatitis C virus infection. An update for clinicians. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 50 (1):1-7.
- Perletti GP. 1994. Partial purification of protein kinase C isoenzymes from rat liver. *J Biochem Biophys Methods*, 28 (3):195-204.
- Perletti GP, Marras E, Concari P, Piccinini F, Tashjian AH, Jr. 1999. PKCdelta acts as a growth and tumor suppressor in rat colonic epithelial cells. *Oncogene*, 18 (5):1251-1256.
- Polywka S, Feucht H, Zollner B, Laufs R. 1997. Hepatitis C virus infection in pregnancy and the risk of mother-to-child transmission. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 16 (2):121-124.
- POV-Ray-Team T. 2004. Persistence of Vision Raytracer (Version 3.6) [Computer software], <http://www.povray.org/download/>.
- Richardson JS, Richardson DC. 2002. Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (5):2754-2759.
- Riedel H. 2002. Models for tumour growth and differentiation. *The Cancer Handbook*, Vol. 2, D: Pre-Clinical Models for Human Cancer MA A (ed):953-970.
- Rodriguez-Pena A, Rozengurt E. 1985. Serum, like phorbol esters, rapidly activates protein kinase C in intact quiescent fibroblasts. *Embo J*, 4 (1):71-76.
- Ron D, Mochly-Rosen D. 1995. An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (2):492-496.
- Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. 2005. Protein kinase D signaling. *J Biol Chem*, 280 (14):13205-13208.
- Rubin H. 2001. The role of selection in progressive neoplastic transformation. *Adv Cancer Res*, 83:159-207.
- Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. 1995. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol*, 69 (6):3893-3896.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12):5463-5467.

- Schmidt-Mende J, Bieck E, Hugle T, Penin F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. 2001. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem*, 276 (47):44052-44063.
- Schreier E, Höhne M. 2001. Hepatitis C – Epidemiologie und Prävention. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, 44:554-561.
- Schulze zur Wiesch J, Schmitz H, Borowski E, Borowski P. 2003. The proteins of the Hepatitis C virus: their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. *Arch Virol*, 148 (7):1247-1267.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 31 (13):3381-3385.
- Shaw IC, Jones HB. 1994. Mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis. *Trends Pharmacol Sci*, 15 (3):89-93.
- Shin SI, Freedman VH, Risser R, Pollack R. 1975. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72 (11):4435-4439.
- Smirnova IS, Aksenov ND, Vonsky MS, Isaguliants MG. 2006. Different transformation pathways of murine fibroblast NIH 3T3 cells by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *Cell Biol Int*, 30 (11):915-919.
- Smith BL, Krushelnycky BW, Mochly-Rosen D, Berg P. 1996. The HIV nef protein associates with protein kinase C theta. *J Biol Chem*, 271 (28):16753-16757.
- Tai CL, Chi WK, Chen DS, Hwang LH. 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol*, 70 (12):8477-8484.
- Tanaka M, Nagano-Fujii M, Deng L, Ishido S, Sada K, Hotta H. 2006. Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that impair p53 interaction and anti-apoptotic activity of NS3. *Biochem Biophys Res Commun*, 340 (3):792-799.
- Tardif M, Savard M, Flamand L, Gosselin J. 2002. Impaired protein kinase C activation/translocation in Epstein-Barr virus-infected monocytes. *J Biol Chem*, 277 (27):24148-24154.
- Taremi SS, Beyer B, Maher M, Yao N, Prosser W, Weber PC, Malcolm BA. 1998. Construction, expression, and characterization of a novel fully activated recombinant single-chain hepatitis C virus protease. *Protein Sci*, 7 (10):2143-2149.
- Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, 285 (5424):107-110.
- Tellinghuisen TL, Rice CM. 2002. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol*, 5 (4):419-427.
- Todd C, Reynolds NJ. 1998. Up-regulation of p21WAF1 by phorbol ester and calcium in human keratinocytes through a protein kinase C-dependent pathway. *Am J Pathol*, 153 (1):39-45.
- Toker A. 1998. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci*, 3:D1134-1147.

- Verstovsek G, Byrd A, Frey MR, Petrelli NJ, Black JD. 1998. Colonocyte differentiation is associated with increased expression and altered distribution of protein kinase C isozymes. *Gastroenterology*, 115 (1):75-85.
- Volmer R, Monnet C, Gonzalez-Dunia D. 2006. Borna disease virus blocks potentiation of presynaptic activity through inhibition of protein kinase C signaling. *PLoS Pathog*, 2 (3):e19.
- Vousden KH, Lu X. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2 (8):594-604.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 11 (7):791-796.
- Wang F, Naik UP, Ehrlich YH, Osada S, Ohno S, Kornecki E. 1995. Stimulatory antibody-induced activation and selective translocation of protein kinase C isoenzymes in human platelets. *Biochem J*, 311 (Pt 2):401-406.
- Wang W, Malcolm BA. 1999. Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques*, 26 (4):680-682.
- Wardell AD, Errington W, Ciaramella G, Merson J, McGarvey MJ. 1999. Characterization and mutational analysis of the helicase and NTPase activities of hepatitis C virus full-length NS3 protein. *J Gen Virol*, 80 (Pt 3):701-709.
- Williams G, Ruegg N, Birch A, Weber C, Hofstadter K, Robinson JA, Aguet M, Garotta G, Schlatter D, Huber W. 1995. Dissection of the extracellular human interferon gamma receptor alpha-chain into two immunoglobulin-like domains. Production in an *Escherichia coli* thioredoxin gene fusion expression system and recognition by neutralizing antibodies. *Biochemistry*, 34 (5):1787-1797.
- Yao N, Reichert P, Taremi SS, Prosis WW, Weber PC. 1999. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure*, 7 (11):1353-1363.
- Yao N, Hesson T, Cable M, Hong Z, Kwong AD, Le HV, Weber PC. 1997. Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol*, 4 (6):463-467.
- Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, Yoshimura A. 2002. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med*, 196 (5):641-653.
- Young S, Parker PJ, Ullrich A, Stabel S. 1987. Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem J*, 244 (3):775-779.
- Yuspa SH, Poirier MC. 1988. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv Cancer Res*, 50:25-70.
- Zaman SN, Melia WM, Johnson RD, Portmann BC, Johnson PJ, Williams R. 1985. Risk factors in development of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: prospective study of 613 patients. *Lancet*, 1 (8442):1357-1360.
- Zemel R, Gerechet S, Greif H, Bachmatove L, Birk Y, Golan-Goldhirsh A, Kunin M,

- Berdichevsky Y, Benhar I, Tur-Kaspa R. 2001. Cell transformation induced by hepatitis C virus NS3 serine protease. *J Viral Hepat*, 8 (2):96-102.
- Zeng YX, el-Deiry WS. 1996. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene*, 12 (7):1557-1564.
- Zezula J, Sexl V, Hutter C, Karel A, Schutz W, Freissmuth M. 1997. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21cip1 mediates the growth inhibitory effect of phorbol esters in human venous endothelial cells. *J Biol Chem*, 272 (47):29967-29974.
- Zhang B, Spandau DF, Roman A. 2002. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol*, 76 (1):220-231.
- Zhang G, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hurley JH. 1995. Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell*, 81 (6):917-924.
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2 (5):342-350.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCL-XL	B-cell leukemia/lymphoma-XL (ein anti-apoptotisches Bcl-2 protein)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
Da	Dalton
DCS	donor calf serum
ddH ₂ O	Aqua bidest
DMEM	Dulbeco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	enhanced chemoluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanosin
g	Gramm
G418	Geneticinsulfat
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IC ₅₀	Der IC ₅₀ -Wert gibt die Konzentration eines Inhibitors an, die <i>in vitro</i> zur Hemmung einer Enzymaktivität um 50% führt
JAK	Jun activating kinase
JNK	C-Jun-N-terminal kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
MAPK oder MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase
MARCKS	myristoylated alanine-rich C kinase substrate
MCS	Multiple cloning site
MEK	MAP kinase kinase
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μF	Mikro-Farrad

mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano
nM	nanomolar
ng	Nanogramm
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec, s	Sekunde
SEM	Standard Error of the Means
Src	Membran-assoziierte Tyrosinkinase
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	Thymidin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin
TNF	tumor necrosis factor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat

TRAIL	tumor necrosis factor (TNF) related apoptosis inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (enzymatische Einheit)
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
v/v	Volumen/Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

9 Danke!

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben. Peter Borowski danke ich für die Überlassung des Themas und für alles was ich in seinem Labor gelernt habe. Besonderer Dank gilt auch Prof. Chris Meier für die Betreuung der externen Promotion. Vielen Dank! Dr. Edzard Spillner und Prof. Ulrich Hahn danke ich sehr für die Disputationsteilnahme. Christina Deschermeier gilt grosser und herzlicher Dank für Rat und Tat, die sehr geholfen haben. Ich danke auch meiner Brigade aus dem Labor mit dem menschlichen Antlitz sehr herzlich für alles, insbesondere das mehr als kollegiale Arbeitsklima → vielen Dank an Rett Reinholz, Sgt. Bastian Höchst, Henning von der Kammer, Judith Lucke, Berthe Kamdem, Anna Schoof, Roman Schüssler! Julian Schulze zur Wiesch möchte ich sehr herzlich für seinen fulminanten Einsatz danken. Claudia Sander-Jülch danke ich für ihren sehr hilfreichen Support. Sarah Elsayed danke ich von Herzen für Rückhalt und Unterstützung in jeder Hinsicht. Meiner Familie, besonders Veronika danke ich dafür, dass ich das alles überhaupt machen konnte - D A N K E !

10 Anhänge

10.1 Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge

für besonders gefährliche Stoffe die bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit verwendet wurden:

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Acrylamid	T	45-46-E24/25-E48/23/24/25	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Dithiothreitol	Xn	22-36/38	24-25
Eisessig	C	10-35	23.2-26-45
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
2-Mercaptoethanol	T, N	22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45

Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	Xn	22-36/38	26-36
Salzsäure	C	34-37	26-36/37/39-45
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Xi	38	36/37

10.2 Lebenslauf

Person

Name: Jan Philip Hartjen
 Geburtsdatum: 26.6.1974
 Geburtsort: Hamburg
 Familienstand: Ledig
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schule und Wehrersatzdienst

1991/92 1 Jahr an der Thornapple-Kellog High School in Middleville, Michigan, USA, Abschluss: *Senior Highschool Diploma*
 06/1994 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Hummelsbüttel in Hamburg, Note 1,2
 1994-1995 Zivildienst in der Altenpflegestation Fuhlsbüttel, Hamburg

Studium

1995-2001 Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der Universität Hamburg
 10/2002 Abschluss des Studiums mit dem Diplom, Note sehr gut

Wissenschaftlicher Werdegang

1999- 2001 Arbeit im Labor von Prof. Dr. Georg W. Mayr am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (UKE, Hamburg), Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion: „Construction of a chimera of inositol-(1,4,5)-trisphosphate-3-kinase (IP3K)-A catalytic subunit and IP3K-B calmodulin-binding domain, characterization of enzymic properties.“ als studentische Hilfskraft
 9/2001-10/2002 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg W. Mayr: „Einfluss von Phosphorylierungen auf die katalytischen Eigenschaften von Inositol-(1,4,5)-trisphosphat-3-Kinase B“.
 10/2002-2007 Promotionsarbeit „Inhibition von Proteinkinasen der Proteinkinase C Familie durch das Nichtstrukturprotein 3 des Hepatitis C Virus“ in der Arbeitsgruppe von Peter Borowski in der Virologie des Bernhard-Nocht Institutes für Tropenmedizin in Hamburg

10.3 Kongressbeiträge

Philip Hartjen and Peter Borowski: „Inhibition of protein kinase C by the NTPase/helicase domain of hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3)” Falk Research Workshop Morphogenesis and Cancerogenesis of the Liver, January 25–26, 2007, Göttingen, Germany

Philip Hartjen, Michael Reinholz, Andrea Baier and Peter Borowski: “Mechanism of inhibition of the protein kinase C by nonstructural protein 3 of Hepatitis C virus”, 4th International Conference on Inhibitors of Protein Kinases, June 25 - 29, 2005, Warsaw, Poland

Peter Borowski and Philip Hartjen: “The inhibition of proteinkinase C by hepatitis C virus non-structural protein 3 depends on its conformational status”, 3rd International Conference on Inhibitors of Protein Kinases, June 22 - 27, 2003, Warsaw, Poland

10.4 Selbständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und die benutzten wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde zuvor keiner Prüfungsbehörde in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt.

Hamburg, den