

Aus der Fachrichtung Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Diabetologie und Ernährungsmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. F. Lammert)

**Bedeutung eines prädierten Leuzinzippermotivs im NS4B-Protein des
Hepatitis-C-Virus für NS4B-Proteininteraktionen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät

Der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

Vorgelegt von: Aline Katharina Meyer,
geb. am 26. Juli 1982 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	6
2	Einleitung.....	10
2.1	Epidemiologie und Transmissionswege	10
2.2	Taxonomie und Genomorganisation des Hepatitis-C-Virus	11
2.3	Klinische Bedeutung und natürlicher Verlauf	12
2.4	Diagnostik.....	13
2.5	Therapie	14
2.6	Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus.....	15
2.7	Das Nichtstrukturprotein 4B des Hepatitis-C-Virus.....	17
2.7.1	Aufbau des NS4B-Proteins.....	17
2.7.2	Bedeutung von NS4B für die Replikation.....	18
2.7.3	Interaktion zwischen NS4B und anderen zellulären Bestandteilen.....	18
2.7.4	Funktion eines basischen Leuzinzippermotivs	19
2.8	Fragestellung	20
3	Material und Methodik	21
3.1	Material.....	21
3.1.1	Geräte und Einwegmaterialien	21
3.1.2	Allgemeine Chemikalien	23
3.1.3	Molekularbiologische Chemikalien.....	24
3.1.4	Fertige Reagenziensets	24
3.1.5	Oligonukleotide	25
3.1.6	Bakterien.....	26
3.1.7	Plasmide	26
3.1.8	Zellen	26
3.1.9	Medien/Materialien für die eukaryotische Zellkultur.....	27
3.1.10	Antikörper.....	27

3.1.11	Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	27
3.2	Methoden	29
3.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
3.2.2	Sequenzanalyse.....	31
3.2.3	Messung der Konzentration von Nukleinsäuren	31
3.2.4	Herstellung der Mutanten	32
3.2.5	Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation).....	37
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	38
3.2.7	Zellkultur	38
3.2.8	Transiente Transfektion.....	40
3.2.9	Westernblot und SDS-PAGE	41
3.2.10	Koimmunpräzipitation.....	46
4	Ergebnisse	49
4.1	Sequenzanalyse.....	49
4.2	Implementierung der Erkennungsmotive	51
4.3	Mutation des bZIP-Motivs	51
4.4	Expressions-/Transfektionskontrolle	52
4.5	NS4B-Interaktion	53
4.5.1	Kotransfektion/Koexpression	53
4.5.2	Koimmunpräzipitation von NS4B+/NS4B+.....	54
4.5.3	Koimmunpräzipitation von NS4B+/NS4B-	54
4.5.4	Koimmunpräzipitation mit NS4B-Mutanten	54
5	Diskussion	56
5.1	Analyse und Nachweis des Proteinproteinbindungsmotivs.....	56
5.1.1	Entwicklung der Mutante des Proteinbindungsmotivs im NS4B	56
5.1.2	Zielgerichtete Mutagenese von HCV-Sequenzen.....	58
5.1.3	Kotransfektion und -expression der verschiedenen Expressionsplasmide	59
5.1.4	Nachweis der Bedeutung des bZIP-Motivs für Proteinproteininteraktionen	59
5.2	Mögliche Bedeutung des bZIP-Motivs für den viralen Replikationszyklus	61
5.3	Ausblick.....	64

6	Literaturverzeichnis.....	65
7	Abbildungsverzeichnis.....	77
8	Tabellenverzeichnis.....	79
9	Abkürzungsverzeichnis	80
10	Publikationen/Dank	84
10.1	Originalpublikationen	84
10.2	Kongressbeiträge	84
10.3	Dank	84

1 Zusammenfassung

Bedeutung eines prädierten Leuzinzippermotivs im NS4B-Protein des Hepatitis-C-Virus für NS4B-Proteininteraktionen

Einleitung:

Das Nichtstrukturprotein 4B (NS4B-Protein) des Hepatitis-C-Virus (HCV) initiiert am Endoplasmatischen Retikulum Veränderungen, die für die virale Replikation wesentlich sind, und wird als Membrananker für den viralen Replikationskomplex angesehen. Grundlage hierfür scheint eine primäre Interaktion zwischen verschiedenen NS4B-Proteinmolekülen zu sein. Zudem legen experimentelle Daten multiple Interaktionen zwischen NS4B und anderen viralen und zellulären Proteinen nahe. Die molekularen Grundlagen dieser Proteinproteininteraktionen des NS4B-Proteins sind weitestgehend unbekannt. Basierend auf bioinformatischen Analysen wurde im aminoterminalen Teil des NS4B-Proteins ein basisches Leuzinzippermotiv beschrieben. Hierbei handelt es sich um ein Interaktionsmotiv, das nicht-kovalent Proteinproteininteraktionen vermitteln kann.

Ziele:

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den prädierten Leuzinzipper erstmalig experimentell nachzuweisen. Dies sollte am Modell der NS4B-NS4B-Interaktion erfolgen.

Methoden:

Die Interaktion zwischen verschiedenen NS4B-Proteinen sollte in einem NS4B-Expressionsplasmidmodell untersucht werden. Hierzu war zunächst ein NS4B-Expressionsplasmidmodell zu etablieren. Dies umfasste insbesondere die Implementierung von zwei verschiedenen Aminosäureerkennungsmotiven in den Expressionsplasmiden durch zielgerichtete Mutagenese. Die Leuzinzipperregion sollte anschließend durch zielgerichtete Mutagenese dergestalt verändert werden, dass unter Erhaltung anderer Sekundärstrukturelemente, wie einer überlappenden α -Helix, die putative Leuzinzipperfunktion abgeschwächt werden sollte. Die Berechnung der neuen Sequenz erfolgte durch bioinformatische Analysen. Die Kontrolle der Mutagenese erfolgte durch

Sequenzierung. Die Interaktion zwischen NS4B-Wildtyp-Proteinen bzw. Mutanten wurde dann nach Kotransfektion in Koimmunpräzipitationsexperimenten untersucht. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Immunoblot.

Ergebnisse:

Die Nukleotidsequenz des NS4B-kodierenden Anteils des Plasmids wurde sequenziert und die Aminosäuresequenz abgeleitet. Auf dieser Basis wurde bioinformatisch eine Alternativsequenz ermittelt. Zwei verschiedene Erkennungsmotive wurden am carboxyterminalen Anteil implementiert. Danach wurde in zwei Plasmide mit verschiedenen Motiven die neue Sequenz in der Leuzinzipperregion eingeführt. Die korrekte Sequenz wurde auf Nukleotidebene jeweils bestätigt. Konsekutive Kotransfektionsexperimente zeigten, dass die verschiedenen mutierten Plasmide zusammen exprimiert werden konnten. Koimmunpräzipitationsexperimente bestätigten eine Interaktion zwischen verschiedenen NS4B-Proteinen. Diese war abgeschwächt oder aufgehoben, wenn die Interaktion zweier Plasmide mit mutierter Leuzinzipperregion oder in der Kombination Wildtyp/Mutante analysiert wurde.

Fazit:

Mit der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmalig eine experimentelle Bestätigung für ein bislang nur bioinformatisch beschriebenes Proteinproteininteraktionsmotiv im HCV-NS4B-Protein. Die Analysen weisen auf eine Bedeutung des aminoterminalen Teils des NS4B-Proteins für die NS4B-Dimerisierung hin.

Importance of a predicted leucine zipper motif of the NS4B protein of the hepatitis C virus for NS4B protein interactions

Introduction:

The non-structural protein 4B (NS4B protein) of the hepatitis C virus (HCV) initiates mutations at the endoplasmic reticulum, at which viral replication takes place, and is considered to be a membrane anchor for the viral replication complex. The basis for this seems to be a primary interaction between different NS4B protein molecules. In addition to this, experimental data suggests multiple interactions between NS4B and other viral and cellular proteins. The molecular bases of these protein-protein interactions of the NS4B proteins are largely unknown. Based on bioinformatic analyses, a basic leucine zipper motif was described in the aminoterminal part of the NS4B protein. This represents an interaction motif which may mediate non-covalent protein-protein interactions.

Objectives:

In the present study, the predicted leucine zipper should be described experimentally for the first time. This should be carried out on a model of NS4B-NS4B interaction.

Methods:

The interaction between different NS4B proteins should be examined in an NS4B expression plasmid model. For this, an NS4B expression plasmid model had to be established initially. This covered in particular the implementation of two different motifs for amino acid recognition in the expression plasmids via site-directed mutagenesis. The leucine zipper region should then be mutated via site-directed mutagenesis in a way that under conservation of other secondary structure elements such as an overlapping α -helix, the putative leucine zipper function should be weakened. The calculation of the new sequence took place via bioinformatic analyses. The monitoring of the mutagenesis took place via sequencing. The interaction between NS4B wild-type protein and/or mutants was then to be examined after cotransfection in co-immuno precipitation experiments. The detection of the proteins took place by means of immunoblot.

Results:

The nucleotide sequence of the NS4B-coding part of the plasmid was sequenced and the amino acid sequence was derived. On this basis, an alternative sequence was bioinformatically determined. Two different motifs for recognition were implemented on the carboxyterminal part. Afterwards, the new sequence was introduced into two plasmids with different motifs in the leucine zipper region. The correct sequence was confirmed in each case at nucleotide level. Consecutive cotransfection experiments showed that the different mutated plasmids could be expressed together. Co-immuno precipitation experiments confirmed an interaction between different NS4B proteins. This was weakened or nullified when the interaction of two plasmids with mutated leucine zipper regions or the combination of wild-type/mutant was analysed, respectively.

Conclusion:

With the present work, an experimental confirmation for a protein-protein interaction motif in the HCV NS4B protein, which has thus far only been described bioinformatically, was carried out for the first time. The analyses point to an importance of the aminoterminal part of the NS4B protein for the NS4B dimerisation.

2 Einleitung

Bereits in den 1970er-Jahren wurden Hepatitiden beobachtet, die typischerweise nach Bluttransfusionen auftraten, und die nicht den bis dahin bekannten Virushepatitiden vom Typ A oder Typ B (heute: Hepatitis-A-Virus, Hepatitis-B-Virus) zugeordnet werden konnten. Da schon damals ein Virus als auslösendes Agens vermutet wurde, wurde diese neue Form der Hepatitis in Analogie zu den bereits bekannten Typen als Non-A-Non-B-Hepatitis bezeichnet (Prince et al, 1974). Im Jahr 1988 gelang erstmals die Isolierung dieses Virus aus dem Serum eines infizierten Schimpansen; die komplette Sequenz des nun als Hepatitis-C-Virus (HCV) benannten Erregers konnte dann erstmals 1989 dargestellt werden (Choo et al, 1989).

2.1 Epidemiologie und Transmissionswege

Weltweit sind circa 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert, was einer Prävalenz von ungefähr 3% entspricht (Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium, 1999). In Deutschland beträgt die Prävalenz der Hepatitis C 0,4 bis 0,6%. Insgesamt wird die Zahl der Virusträger in Deutschland auf etwa 400000 bis 500000 geschätzt, die Inzidenz einer HCV-Infektion auf etwa 5000 pro Jahr (Robert-Koch-Institut, Epid Bull 2010).

Die Transmissionswege der Hepatitis C sind weitestgehend als parenteral aufgeklärt. Vor Einführung hochsensitiver Testverfahren stellte die Übertragung über kontaminierte Blutprodukte den Hauptübertragungsweg dar. Ferner stellen intravenöser Drogengebrauch, insbesondere mit Tausch der Nadel zwischen verschiedenen Konsumenten, und sexuelle Transmission anerkannte Übertragungswege dar (Bolumar et al, 1996) (Bell et al, 1990) (Patti et al, 1993) (Thomas et al, 1995) (Stark et al, 1995) (Dienstag et al, 1997). Eine sexuelle Transmission wird aufgrund der meist geringen Viruskonzentration in Vaginalsekret bzw. Ejakulat epidemiologisch aber als wenig bedeutsam eingestuft (Leruez-Ville et al, 2000). Weitere Risikofaktoren für die HCV-Akquisition stellen intranasaler Kokainkonsum und erhöhter Alkoholkonsum dar, wobei die Bedeutung eines hierdurch möglicherweise veränderten Risikoverhaltens nicht abschließend beurteilt werden kann. Bei ungefähr 45% der

Infizierten kann der Transmissionsmodus anamnestisch nicht zweifelsfrei geklärt werden; die genaue Anamnese verweist aber häufig auf stattgehabte Risikoereignisse wie z.B. iatrogene Maßnahmen (Herrine et al, 2002).

2.2 Taxonomie und Genomorganisation des Hepatitis-C-Virus

Das HCV ist ein einsträngiges, lineares, umhülltes Plusstrang-RNA-Virus und wird der Familie der *Flaviviridae*, Gattung *Hepaciviren*, zugeordnet (Francki RIB, 1991). Basierend auf genetischen Divergenzen erfolgt eine Unterteilung in mindestens 6 HCV-Genotypen und weitere Subtypen, von denen in Europa, den USA und Japan die Genotypen 1, 3 und 2 dominieren (Simmonds et al, 1993) (Ross et al, 2000). Ein einheitlicher Genotyp liegt definitionsgemäß bei einer Sequenzhomologie von mindestens 72% vor. Eine Übereinstimmung zwischen 72 und 86% definiert unterschiedliche Subtypen desselben Genotyps; bei einer Übereinstimmung von mehr als 86% wird vom Vorliegen desselben Subtyps ausgegangen (Simmonds et al, 1994). Eine unterschiedliche Virulenz der einzelnen Geno- bzw. Subtypen konnte bisher nicht sicher nachgewiesen werden (Berg et al, 1997).

Das HCV-Genom besteht aus etwa 9600 Nukleotiden und weist eine Plusstrangpolarität auf (Kato et al, 1990). Die RNA kodiert für einen offenen Leserahmen („*open reading frame*“, ORF), der beidseits von nicht kodierenden Regionen umrahmt wird. Das Translationsprodukt des ORF ist ein Vorläuferpolyprotein, dessen Länge je nach Genotyp zwischen 3010 und 3033 Aminosäuren variiert (Lohmann et al, 1999). Das Genom beginnt mit einem nicht kodierenden, hochkonservierten Bereich aus 341 Nukleotiden, der eine interne Ribosomenbindungsstelle („*internal ribosome entry site*“, IRES) aufweist. Diese spielt eine entscheidende Rolle für die Expression des Polyproteins, indem sie die Initiierung der Translation des Plusstrang-RNA-Genoms bewirkt (Bartenschlager et al, 2004). Die nicht kodierende Region am 3'-Ende umfasst je nach Genotyp 27 bis 55 Nukleotide, gefolgt von einer Polyuracilsequenz, die jedoch von Cytidinresten unterbrochen sein kann (Tanaka et al, 1996). Danach folgt ein hochkonservierter Bereich aus 98 Nukleotiden (Kolykhalov et al, 1996) mit vermutlich entscheidender Bedeutung für die Replikation *in vivo* (Yanagi et al, 1999). Neben dem offenen Leserahmen gibt es einen weiteren alternativen Leserahmen, der in

einem den ORF überlappenden Bereich in der aminoterminalen Region des Polyproteins kodiert (Walewski et al, 2001) und zur Expression zusätzlicher Proteine führt, deren Rolle bei der Virusreplikation bisher nicht eindeutig geklärt ist (Lohmann et al, 1999) (McMullan et al, 2007).

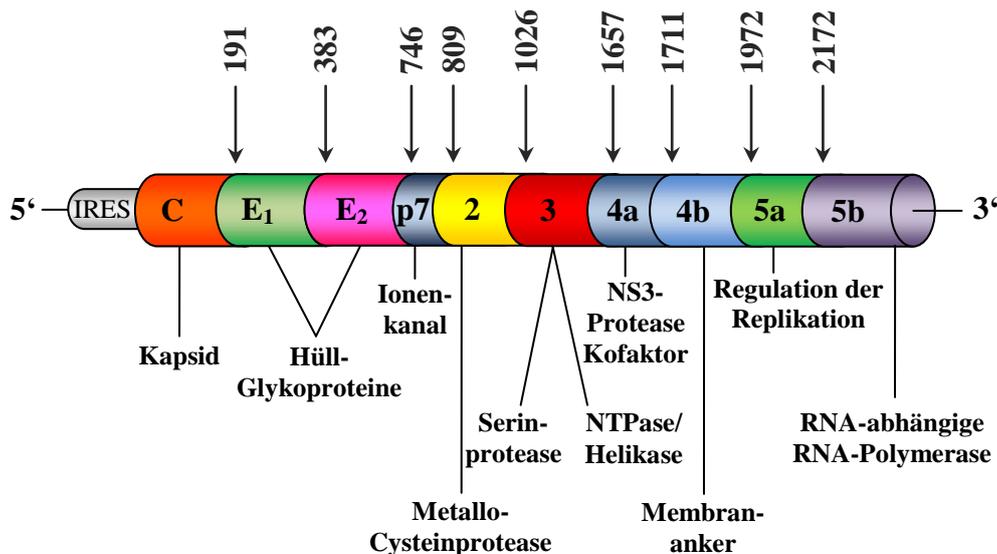


Abbildung 1 Darstellung des HCV-Genoms (modifiziert nach: Sarrazin C et al. *Hepatitis C-Virus - Viruskinetik und Resistenzmechanismen. Z Gastroenterol* 2004; 42:387-396).

2.3 Klinische Bedeutung und natürlicher Verlauf

Die Inkubationszeit beträgt 15 bis 180 Tage. Nur in etwa 25% der Fälle kommt es bei akuter HCV-Infektion zu einem ikterischen Verlauf, während sonst ein asymptomatischer Verlauf oder unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Inappetenz und gastrointestinale Beschwerden das klinische Bild prägen. Hierdurch werden Diagnostik und Therapie in einem frühen Stadium deutlich erschwert. Histologisch findet sich in diesem Stadium typischerweise eine Nekroinflammation der Leber (Alberti et al, 1991). In 15-50% der Fälle heilt die akute Hepatitis C spontan innerhalb weniger Monate (durchschnittlich 11 Wochen) aus. Dahingegen definiert der Nachweis von HCV-RNA im Serum mindestens 6 Monate nach Transmissionsereignis den chronischen Verlauf einer HCV-Infektion. Eine

spontane Ausheilung ist dann mit ca. 0,4% pro Jahr ein sehr seltenes Ereignis (Gerlach et al, 2003) (Wedemeyer et al, 2004).

Klinisch kann eine chronische Hepatitis C über viele Jahre inapparent verlaufen. Oft stehen unspezifische Symptome einer Hepatopathie wie Müdigkeit, verminderte Leistungsfähigkeit, diffuse Oberbauchschmerzen und Pruritus im Vordergrund. Laborchemisch tritt in circa 60% der Fälle eine Erhöhung der Transaminasen auf, wobei es häufig zu einem fluktuierenden Verlauf der Transaminasen kommt. Etwa 20% der Patienten mit chronischer HCV-Infektion entwickeln in der Folge, meist nach einem Zeitraum von etwa 20 bis 30 Jahren, eine Leberzirrhose. Das jährliche Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) bei Patienten mit einer HCV-induzierten Leberzirrhose liegt bei 3 bis 5% (Hoofnagle et al, 1997) (Hoofnagle et al, 2002) (Seef et al, 2002).

Als extrahepatische Manifestationen der Hepatitis C sind die Kryoglobulinämie, die vaskulitische Purpura, die membranproliferative Glomerulonephritis, das Sicca-(Sjögren-) Syndrom, die Panarteriitis nodosa und die Porphyria cutanea tarda zu nennen, die eine eigenständige Indikation zur Einleitung einer antiviralen Therapie darstellen können (Manns, Rambusch et al, 1999) (Sarrazin et al, 2010).

2.4 Diagnostik

Gemäß der aktuellen deutschen Leitlinie sollte eine HCV-Diagnostik bei unklarer Erhöhung der Transaminasen bzw. im Rahmen der Abklärung einer chronischen Lebererkrankung, bei Empfängern von Blut- und Blutprodukten vor 1992, Transplantatempfängern, Hämodialysepatienten, intravenösem Drogenkonsum, Insassen von Justizvollzugsanstalten, HIV- oder HBV-Infizierten, Familien- bzw. Haushaltsangehörigen von HCV-Infizierten, Personen aus Regionen mit erhöhter HCV-Prävalenz, medizinischem Personal sowie Blut-, Organ- und Gewebespendern durchgeführt werden (Sarrazin et al, 2010).

Die Basisdiagnostik der HCV-Infektion besteht in der Bestimmung von Antikörpern gegen HCV mittels Immunoassay. Positive Befunde sind aufgrund eines niedrigen positiv-prädiktiven Werts von circa 20% und wegen der Persistenz von anti-HCV-Antikörpern auch

bei ausgeheilter HCV-Infektion durch HCV-RNA-Bestimmung mittels eines hochsensitiven Testverfahrens (untere Nachweisgrenze mindestens 50 Internationale Einheiten/ml) zu verifizieren. Bei nicht nachweisbarer RNA sollte die Diagnostik innerhalb der nächsten 6 bis 12 Monate wiederholt werden, um eine intermittierende Virämie auszuschließen. Bei Vorliegen einer Immunkompromittierung sollte primär die Bestimmung der HCV-RNA erfolgen, wie auch bei Verdacht auf eine akute HCV-Infektion, da Antikörper bei Immunkompromittierung fehlen können und bei akuter Infektion erst circa 7 bis 8 Wochen nach Infektion nachweisbar werden (Sarrazin et al, 2010).

2.5 Therapie

Die akute Hepatitis C stellt aufgrund der hohen Chronifizierungsrate und dem guten Ansprechen auf eine Interferon-alpha basierte antivirale Therapie eine Indikation zur Einleitung der Therapie dar. Diese sollte innerhalb der ersten 3 bis 4 Monate nach Infektion begonnen werden, da ein verzögerter Therapiebeginn mit einer signifikant schlechteren Heilungschance einhergeht (Nomura et al, 2004) (Delwaide et al, 2004). Die derzeitige, leitliniengerechte Standardtherapie der akuten HCV-Infektion besteht in der Gabe von Interferon-alpha oder pegyliertem Interferon-alpha (PEG-IFN) über 24 Wochen. Das dauerhafte virologische Ansprechen, definiert als fehlender Nachweis von HCV-RNA im Serum 24 Wochen nach Therapieende, liegt bei 71-98% (Nomura et al, 2004) (Santantonio et al, 2005).

Eine chronische Hepatitis C stellt grundsätzlich eine Indikation zur antiviralen Therapie dar, die frühzeitig nach Diagnosestellung und unabhängig von einer Erhöhung der Transaminasen oder dem Vorliegen einer Fibrose initiiert werden sollte. Diverse relative und absolute Kontraindikationen sind zu beachten. Gemäß der aktuellen deutschen Leitlinie, die sich im Konsens mit internationalen Empfehlungen findet, stellt bisher die Behandlung mit PEG-IFN in Kombination mit Ribavirin die Standardtherapie dar. In Abhängigkeit von Genotyp, Ausgangsviruslast und Viruskinetik unter Behandlung erfolgt die Therapie individualisiert über 48-72 Wochen bei HCV-Genotyp 1-Infektion bzw. 24-48 Wochen bei HCV-Genotyp 2 oder 3-Infektion. Die dauerhaften virologischen Ansprechraten liegen gemäß den

Zulassungsstudien bei 48-52% (Genotyp 1) und 79-82% (Genotyp 2 oder 3) (Fried et al, 2002) (Hadziyannis et al, 2004) (Manns et al, 2001) (Zeuzem et al, 2000).

Für Patienten mit einer HCV-Genotyp 1-Infektion ist eine Erweiterung der bisherigen antiviralen Therapie mit pegyliertem Interferon-alpha und Ribavirin um die Proteaseinhibitoren Boceprevir bzw. Telaprevir mit verbesserten Heilungschancen und der Option zu einer verkürzten Therapiedauer seit Herbst 2011 möglich. Hierbei zeigt sich sowohl bei Erstbehandlung als auch bei vortherapierten Patienten unter der Triple-Therapie eine signifikante Steigerung der Raten des dauerhaften virologischen Ansprechens im Vergleich zur bisherigen Standardtherapie. Bei Erstbehandlung können dauerhafte virologische Ansprechraten von 63-75% erreicht werden, bei vortherapierten Patienten Raten von 59-66%; bei Patienten mit Leberzirrhose und *Nullresponse* in der Vortherapie liegen die Heilungsraten auch unter Triple-Therapie unter 15% (Zeuzem et al, 2011) (Jacobson et al, 2011) (Bacon et al, 2011) (Poordad et al, 2011).

2.6 Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus

Die primäre Zielzelle des HCV ist der Hepatozyt. Initial erfolgt eine Interaktion von *low-density* Lipoproteinen (LDL) der HCV-Hülle mit dem LDL-Rezeptor der Hepatozyten sowie eine Interaktion der viralen Hüllproteine E1 und E2 mit Glykosaminoglykanen an der Zelloberfläche (Agnello et al, 1999) (Germi et al, 2002). Die Hüllproteine E1 und E2 binden dann an das Tetraspanin CD81 und den *scavenger receptor B type I* (Scarselli et al, 2002) (Bartosch et al, 2003). Nach Migration dieses Komplexes zu der interhepatozellulären, junktionalen Zone kommt es nach Interaktion mit den Oberflächenproteinen Claudin-1 und Occludin zur Endozytose (Ploss et al, 2009) (Hsu et al, 2003).

Als weiterer HCV-Rezeptor wurde kürzlich der NPC1L1-Rezeptor identifiziert, ein zellulärer Cholesterolrezeptor, der ebenfalls an der Aufnahme des HC-Virions in die Wirtszelle beteiligt ist (Sainz et al, 2012). Die genauen Mechanismen der Interaktion sind derzeit Gegenstand weiterer Forschung.

Intrazellulär erfolgt eine Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran, welche durch die Proteine E1 und E2 vermittelt wird, und konsekutiv zur Freisetzung des Viruskapsids und letztendlich der HCV-RNA in das zelluläre Zytoplasma führt (Meertens et al, 2006).

Das HCV-Genom positiver Polarität wird in ein Polyprotein translatiert. Die Spaltung dieses Polyproteins erfolgt durch mehrere virale und zelluläre Proteasen in die Nichtstrukturproteine 2, 3, 4A, 4B, 5A und 5B sowie in die Strukturproteine C („*core*“), E („*envelope*“)1 und E2 und p7 (Bartenschlager et al, 2000). Es kommt nun zu Alterationen am Endoplasmatischen Retikulum (ER), an denen die virale Replikation erfolgt. Diese Alterationen werden durch das Nichtstrukturprotein 4B (NS4B) induziert (Egger et al, 2002) (Gosert et al, 2003). Das Schlüsselenzym in der viralen Replikation nimmt die RNA-abhängige RNA-Polymerase (NS5B) ein. Die HCV-RNA dient hierbei als Matrize für Minusstranggenome, von der schließlich HCV-RNA-Kopien positiver Polarität gebildet werden. Die Funktion des Nichtstrukturproteins 5A ist nicht abschließend geklärt, es scheint aber die Replikationseffizienz zu modulieren (Huang et al, 2007). Die Ausbildung neuer Viruspartikel erfolgt wahrscheinlich am Endoplasmatischen Retikulum (Gastaminza et al, 2008). Der genaue Mechanismus ist aber erst unvollständig verstanden, ebenso die Freisetzung der Viruspartikel. Hierbei erhält das die HCV-RNA umgebende Kapsid eine Hülle, die zelluläre Bestandteile wie die Zellmembran, LDL und virale Proteine, wie die Hüllproteine E1 und E2, enthält.

2.7 Das Nichtstrukturprotein 4B des Hepatitis-C-Virus

Das Nichtstrukturprotein 4B (NS4B) nimmt eine zentrale Rolle im Replikationszyklus ein, indem es die oben geschilderten Alterationen am ER induziert und wahrscheinlich zudem als Anker für den viralen Replikationskomplex fungiert (Gosert et al, 2003) (Gouttenoire et al, 2010). Die Bedeutung des NS4B-Proteins wird auch durch eine ungewöhnlich hohe Konservierung der Aminosäuresequenz sowohl innerhalb der verschiedenen Flaviviren als auch in klinischen HCV-Sequenzen unterstrichen (Welsch et al, 2007) (Welker et al, 2007). Dies ist umso bedeutsamer, da die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase aufgrund einer fehlenden Fehlerkorrekturfunktion eine hohe Rate an Mutationen erzeugt (Bartenschlager et al, 2000).

2.7.1 Aufbau des NS4B-Proteins

Bei dem NS4B-Protein handelt es sich um ein äußerst hydrophobes Nichtstrukturprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 27 kDa (Gouttenoire et al, 2010) (Welsch et al, 2007) (Lundin et al, 2003). Die Hydrophobizität ist auch deswegen bedeutsam, weil sie ein bisher unüberwindbares Hindernis bei der Herstellung von NS4B in kristalliner Struktur darstellt. Modelle zur Sekundärstrukturvorhersage stützen sich deswegen nicht auf Röntgenstrukturanalysen, sondern auf bioinformatische Verfahren und bestätigende experimentelle Daten (Lundin et al, 2003) (Lundin et al, 2006) (Welsch et al, 2007).

Auf dieser Basis wird für den mittleren Teil des NS4B-Proteins die Ausbildung von vier bis fünf transmembranären Domänen angenommen, die das NS4B-Protein im ER verankern (Hügler et al, 2001) (Lundin et al, 2003) (Lundin et al, 2006). Die Formation der ersten, zum aminoterminalen Ende gelegenen Domäne ist allerdings umstritten, da sowohl das amino- als auch das carboxyterminale Ende des Proteins primär im Cytosol lokalisiert wurden. Möglicherweise transloziert diese fünfte Domäne passager während der Replikationsphase in das ER (Gouttenoire et al, 2010). Am aminoterminalen Ende wurde des Weiteren eine amphipathische Helix beschrieben. Die genaue Lokalisation wird kontrovers diskutiert; ihre Bedeutung für die korrekte Lokalisation des NS4B im ER wurde jedoch durch Ergebnisse verschiedener Gruppen bestätigt (Elazar et al, 2004) (Cho et al, 2010) (Gouttenoire et al,

2009). Am carboxyterminalen Ende des Proteins befinden sich Palmitoylreste (Yu et al, 2006).

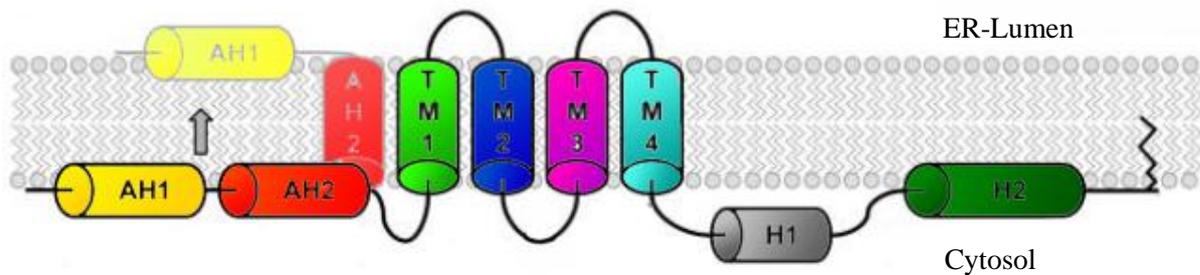


Abbildung 2 Aufbau des NS4B-Proteins (modifiziert nach: Paul et al, 2011. TM: Transmembrandomäne; AH: aminoterminal amphipathische Helix; H: carboxyterminale alpha-Helix).

2.7.2 Bedeutung von NS4B für die Replikation

Lange Zeit stand kein HCV-Zellkultursystem, sondern nur ein subgenomisches Replikonmodell zur Verfügung. In diesem Modell wurden spontane Mutationen, die mit einer erhöhten Replikationseffizienz assoziiert waren, beobachtet und selektioniert. Die effektivsten Einzelaminosäuremutationen liegen hierbei im NS4B- und NS5A-Protein (Blight et al, 2000), (Lohmann et al, 2003) (Blight et al, 2002) (Grobler et al, 2003) (Krieger et al, 2001). Der genaue Mechanismus, wie die Replikation verstärkt wird, ist insbesondere für die im NS4B gelegenen Mutationen unbekannt.

2.7.3 Interaktion zwischen NS4B und anderen zellulären Bestandteilen

In vitro wurde eine Interaktion zwischen verschiedenen NS4B-Proteinen beschrieben (Yu et al, 2006). Diese NS4B-NS4B-Interaktion scheint von zentraler Bedeutung für die Ausbildung der Alterationen am ER zu sein (Gouttenoire et al, 2009) (Aligo et al, 2009). Zudem wurde eine Interaktion zwischen NS4B und einem zellulären Faktor des *unfolded protein response*-Signalwegs beschrieben, der auch durch die Expression von NS4B alleine aktiviert wird (Tong et al, 2002). Einer weiteren beschriebenen Interaktion zwischen NS4B und der HCV-RNA, die über hochkonservierte Argininreste im NS4B vermittelt wird, wird eine entscheidende Bedeutung im viralen Replikationszyklus zugeschrieben (Dvory-Sobol et al,

2010). Bioinformatische Netzwerkanalysen legen zudem eine Interaktion zwischen NS4B und diversen zellulären Proteinen nahe (Tripathi et al, 2010). Die molekularen Grundlagen dieser bekannten und vermuteten Interaktionen sind bislang unbekannt.

2.7.4 Funktion eines basischen Leuzinzippermotivs

Ein basischer Leuzinzipper (bZIP) ist ein häufiges Strukturelement einer Supersekundärstruktur, das an Proteinproteininteraktionen via paralleler α -Helices mit ähnlichen Sequenzmotiven beteiligt ist. Ein bZIP-Motiv besteht aus einer vierfachen Wiederholung einer Folge aus sieben Aminosäuren. Hierbei ist die Konstanz physikochemischer Eigenschaften an korrespondierenden Positionen bedeutsam, so dass verschiedene, jedoch in diesen Eigenschaften ähnliche Aminosäuren an entsprechenden Positionen eines *Heptads* gefunden werden können. Ein klassisches bZIP-Motiv enthält charakteristischerweise an jeder siebten Position die Aminosäure Leuzin. Die Interaktion mit amphipathischen Helices anderer Proteine wird dabei durch die helikale Struktur des Motivs ermöglicht, bei der alle hydrophoben Leuzinreste auf einer Seite der Helix zu liegen kommen (Strauss et al, 2008).

Welsch et al. konnten 2007 mittels bioinformatischer Methoden im aminoterminalen Abschnitt des NS4B in verschiedenen HCV-Subtypen amphipathische Eigenschaften und die für ein bZIP-Motiv typische Wiederholung von bestimmten Aminosäuren an jeder siebten Position zeigen. Hierbei enthielt das Motiv zwar nur an zwei von vier erwarteten Positionen die Aminosäure Leuzin, es fanden sich jedoch an sieben von acht der Positionen apolare Aminosäuren, die an der Ausbildung des hochkonservierten, hydrophoben Kerns des Leuzinzippers beteiligt sein könnten. Zudem wurde eine Stabilisierung der hydrophoben „Wolke“ zwischen zwei bZIP-Motiven durch Wasserstoffbrückenbindung durch apolare Aminosäuren räumlich benachbarter Aminosäuren moduliert (Welsch et al, 2007). Das bioinformatisch identifizierte bZIP-ähnliche Motiv im aminoterminalen Teil des NS4B ist momentan das einzige Kandidatenmotiv, welches Proteinproteininteraktion im NS4B vermitteln könnte. Eine sichere experimentelle Bestätigung steht bislang jedoch aus.

2.8 Fragestellung

Das NS4B-Protein des Hepatitis-C-Virus ist entscheidend an der Ausbildung des viralen Replikationskomplexes beteiligt und indirekt in die Modulation der Replikation involviert. Obwohl diverse Interaktionen mit anderen Proteinen postuliert oder bereits nachgewiesen wurden, ist die molekulare Grundlage dieser Proteinproteininteraktionen unbekannt. Im aminoterminalen Teil des NS4B-Proteins wurden bereits mehrere Strukturelemente beschrieben, wobei die divergenten Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen auf eine eventuell überlappende Multifunktionalität dieser Region hindeuten könnten. Ebenso legen Interaktionsexperimente nahe, dass diese Region für Proteinproteininteraktionen wichtig ist.

Ziel dieser Arbeit war der experimentelle Nachweis der Bedeutung des bislang nur bioinformatisch beschriebenen bZIP-Motivs im NS4B-Protein für Proteinproteininteraktionen. Dies sollte anhand des Beispielmotivs von NS4B-NS4B-Interaktionen erfolgen. Die vorliegende Arbeit wurde als Teilprojekt im Rahmen einer durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Klinischen Forschergruppe (KFO 129) durchgeführt. Der experimentelle Teil erfolgte dementsprechend in enger zeitlicher und inhaltlicher Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Informatik, Abteilung für Bioinformatik und Angewandte Algorithmik, Direktor Prof. Dr. Dr. Thomas Lengauer, Saarbrücken.

Zunächst sollte ein NS4B-Expressionsmodell etabliert werden. Nach Analyse der Nukleotidstruktur und Ableitung der Aminosäuresequenz sollte dann bioinformatisch eine Sequenz für die Leuzinzipperregion bestimmt werden, die einerseits andere Sekundärstrukturelemente dieser Region möglichst nicht verändern, andererseits aber die Funktion des Leuzinzippermotivs abschwächen sollte. Diese neue Sequenz sollte dann über zielgerichtete Mutagenese in dem NS4B-Expressionsmodell implementiert werden. Die Interaktion zwischen Wildtyp und Mutante sollte dann sowohl experimentell als auch bioinformatisch analysiert werden. Durch die Verfasserin dieser Arbeit wurden die experimentellen Arbeiten durchgeführt. Aufgrund der engen Vernetzung zwischen experimentellen Versuchen und bioinformatischen Analysen werden die entsprechenden Ergebnisse der bioinformatischen Analysen der besseren Verständlichkeit halber ebenfalls aufgeführt.

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Einwegmaterialien

Materialien	Firma
96 Multiply PCR Platte	Sarstedt (Nürnberg)
96-well Optical Reaction Plate	Abbott (Des Plaines, USA)
Adhesive Cover Applicator	Abbott (Des Plaines, USA)
Analysenwaage R160P-D1	Sartorius (Göttingen)
Autoklav H1 Clave	Wolf (Bad Überkingen-Hausen)
Bakterienbrutschrank	W+C Binder (Tuttlingen)
Brutschrank (CO ₂ -begast)	W+C Binder (Tuttlingen)
Chemikalienwaage	Sartorius (Göttingen)
Einmalhandschuhe, Peha-Soft	Paul Hartmann AG (Heidenheim)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Electrophoresis Power Supply EPS 301	AmershamBiosciences (Buckinghamshire, UK)
Elektrophorese-Transformator, ST 606	Gibco BRL (Karlsruhe)
Extra thick blot paper Mini blot size	Bio Rad Laboratories GmbH (München)
Feinwaage A30	Mettler (Steinbach)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss (Göttingen)
Foto-Apparatur	Polaroid (Cambridge, England)
Fuji Film Photographic Chemicals F A,B; RD 90 1, 2, 3	Fuji Photographic Chemicals (Sint Niklas, Belgien)
Fuji Filmentwicklermaschine FPM 800A	Fujifilm (Edison, USA)
Gekühlte Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Horizontale Gelelektrophorese Apparatur	Gibco BRL (Karlsruhe)
Horizon 11.14	
Hypercassette (18x24 cm)	AmershamBiosciences (Buckinghamshire, UK)
Hyperfilm	AmershamBiosciences (Buckinghamshire, UK)
Kapillar-Elektrophorese-Sequenzierautomat Genetic Analyzer 3100	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Kühlzentrifuge Micro 22R	Hettich (Tuttlingen)
Kühlzentrifuge Rotanta TRC	Hettich (Tuttlingen)
Kühlzentrifuge Sorvall RC 28S	DuPont (Dreieich)
Mikrozentrifuge	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Mikro-Schraubröhre (2 ml)	Sarstedt (Nürnberg)
Mikrotube (1,5 ml)	Sarstedt (Nürnberg)
Mikroskop	Leica DMIL (Wetzlar)
Mikrowellenofen	Hettachi (Eschborn)

Material und Methodik

Multiply-Pro-Gefäß (0,2 ml)	Sarstedt (Nürnberg)
Optical Adhesive Cover	Abbott (Des Plaines, USA)
Parafilm	Pechiney (Chicago, USA)
PCR-System 9700 Gene Amp	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Petrischalen (Ø 10 cm)	Falcon (Hamburg)
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo (Steinbach)
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte
Pipettenspitzen (mit Filter)	Sarstedt (Nürnberg)
Präzisionswaage BASIC MCBB 100	Sartorius (Göttingen)
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman Schleicher & Schell (Dassel)
Rotilab-Minizentrifuge	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Schüttelinkubator Certomat U	B.Braun (Melsungen)
Schüttler GFL 3011	GFL GmbH (Burgwedel)
Schüttler, Vortex REAX 2000	Heidolph (Kehlheim)
Schüttelinkubator HT ZH80	Infors AG (Bottmingen)
Sequence Detection System ABI Prism 7000	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt (Nürnberg)
Spektralphotometer UV-DU 800	Beckmann Coulter
Sterilbank Hera-Safe HS 12	Heraus (Hanau)
Sterile Filterspitzen Tip One (1-10µl, 1-20µl, 1-200µl, 100-1000µl)	Starlab GmbH (Ahrensburg)
Sterilfilter	Millipore (Billerica, USA)
Thermo Denley Mag Mix	Denley (Denley, England)
Thermocycler 2400	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Thermocycler 9600	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Thermocycler 9700	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5415c/5402	Eppendorf (Hamburg)
Trans-Blot SD Semi-dry-Blotter	BioRad Laboratories GmbH (München)
Tube 15 ml	Sarstedt (Nürnberg)
Ultraschall Sonifier B-12	Branson Sonic Power Company (Danburg, Connecticut, USA)
UV-Lampe Fluolink	Biometra (Göttingen)
Waage Thermo Denley ADP	Denley (Denley, England)
Wasserbad GFL1092	GFL GmbH (Burgwedel)
Westernblot-Gelapparatur Minigel Twin G-42	Biometra Whatman (Göttingen)
Wipptisch WT12	Biometra (Göttingen)
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt (Nürnberg)
Zellkulturplatten (24-well, 6-well)	Sarstedt (Nürnberg)
Zentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5702	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge J2-21	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge Sigma 4-15	Sigma (Osterode am Harz)

Zentrifuge Varifuge 3.ORS	Heraus (Hanau)
Zentrifugenröhrchen	Nalge Company (New York, USA)

Tabelle 1 Geräte und Einwegmaterialien

3.1.2 Allgemeine Chemikalien

Materialien	Firma
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH (München)
Ammoniumperoxidisulfat	Merck AG (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH (München)
Aqua ad iniectabilia	B.Braun (Melsungen)
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
DMSO	Merck AG (Darmstadt)
DTT	Sigma-Aldrich GmbH (München)
EDTA	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Essigsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich GmbH (München)
Ethidumbromid	Merck AG (Darmstadt)
Formamid Rotipuran	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycerin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumacetat	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Manganchlorid	Merck AG (Darmstadt)
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Molecular biology Water, Accugene	BioWhittaker Molecular Applikations (Rockland ME, USA)
MOPS Natriumsalz	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid	Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)
Nonidet P40	Sigma-Aldrich GmbH(München)
PMSF	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
RNase freies Wasser	Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)
Super Signal West Pico	Pierce (Rockford, USA)
Luminol/Enhancer Solution	
Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution	Pierce (Rockford, USA)
TRIS Ultra	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Trypanblaulösung	AppliChem (Darmstadt)
Trypton	Sigma-Aldrich GmbH (München)

Tabelle 2 Allgemeine Chemikalien

3.1.3 Molekularbiologische Chemikalien

Materialien	Firma
Protein G Sepharose	Amersham (Little Chalfont, UK)
DTT, 100 mM	Promega (Madison, USA)
dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 100 mM	Invitrogen (Karlsruhe)
PfuUltra®High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene (Amsterdam, NL)
PfuUltra®Puffer, 10x	Stratagene (Amsterdam, NL)
DpnI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
N,N,N,N'-Tetramethylethylene-diamine (99%) for electrophoresis (TEMED)	Sigma-Aldrich GmbH (München)
Roti-Load 1 reduzierender Proteinauftragspuffer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
DNA-Längenstandard Lambda DNA/Eco 130I (StyI) Marker, 16 (421-19329 bp)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Prestained SDS-Page Standards	Bio Rad Laboratories GmbH (München)
GFP	

Tabelle 3 Molekularbiologische Chemikalien

3.1.4 Fertige Reagenziensets

Materialien	Firma
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (enthält Farb-ddNTPs, dNTPs, Polymerase, Puffer und MgCl ₂)	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen (Hilden)
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
QIA Shredder	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
Rneasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Jetstar Maxi Plasmid Purifikation Kit	Genomed (Löhne)

Tabelle 4 Fertige Reagenziensets

3.1.5 Oligonukleotide

Die nachfolgenden Oligonukleotide wurden von den Firmen Operon (Köln) und Biospring (Frankfurt a.M.) bezogen.

3.1.5.1 Primer für die Sequenzierungs-PCR

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Sequenzierung der Originalplasmide sowie der durch Mutationen abgewandelten Plasmide eingesetzt.

Name	Sequenz (5'→3')
pcDNA3BGHR	tagaaggcacagtcgagg
pcDNA3T7F	taatacgactcactat
PL-NS4B-F1	ggcgggaattcgccatggcttcgcacctcccttacat
PL-NS4B-R2	ccgcgaattcaacatggcgtggagcagtc

Tabelle 5 Nukleotidsequenz der Sequenzierungsprimer

3.1.5.2 Primer für die Mutagenese-PCR

Die folgenden Oligonukleotide wurden zum Einfügen der Erkennungsmotive bzw. der Mutationen im Bereich des Leuzinzipfers eingesetzt.

Name	Sequenz (5'→3')
Mut1-F	gcagaaggcgtcggttggcggcaacagccaccaagcaagcgg
Mut1-R	ccgcttgcttggtggctgttggcccaaacgagcgccttctgc
Mut2-F	gccaccaagcaagcggcggctgctgctcccgtggtgg
Mut2-R	ccaccacgggagcagcagccgccgcttgcttggtggc
Mut3-F	ggctgctgctcccgtggcggcgtccgcgtggcagcccttgag
Mut3-R	ctcaagggtcgcaccgcggacgccgccacgggagcagcagcc
Mut4-F	gcgtccgcgtggcagccgctgcgaccgctgggcaagcac
Mut4-R	gtgcttcgccagggcgtcagcggctcggcacgcggacgc
MYC-FOR	ggactgctccacgccatgtgagcagaagctcatctcggaggaggatctctgaattcc accacactgg
MYC-REW	ccagtgtggtggaattcagagatcctcctccgagatgagcttctgctcacatggcgtg gagcagtcc
MYC-1-FOR	ggactgctccacgccatgtgagcagaagctcatcttgaattccaccacactggactag tgg
MYC-1-REW	ccactagtccagtgtggtggaattcaagatgagcttctgctcacatggcgtggagcag tcc
MYC-2-FOR	gtgagcagaagctcatctcggaggtgaattccaccacactggactagtgg
MYC-2-REW	ccactagtccagtgtggtggaattcacctccgagatgagcttctgctcac

<i>MYC-3-FOR</i>	gtgagcagaagctcatctcggaggaggatctctgaattccaccactggactagtg g
<i>MYC-3-REW</i>	ccactagtccagtggtggaattcagagatcctcctccgagatgagcttctgctcac
<i>FLAG NS4B 1S</i>	ctggatatctgcagaattcgccatggactacatggcttcgcacctcccttac
<i>FLAG NS4B 1A</i>	gtaagggaggtgcgaagccatgtagtccatggcgaattctgcagatatccag
<i>FLAG NS4B 2S</i>	cagaattcgccatggactacaaggacgacatggcttcgcacctcccttacc
<i>FLAG NS4B 2A</i>	ggtaagggaggtgcgaagccatgctgcctttagtccatggcgaattctg
<i>FLAG NS4B 3S</i>	catggactacaaggacgacgatgacaagatggcttcgcacctcccttac
<i>FLAG NS4B 3A</i>	gtaagggaggtgcgaagccatctgtcatcgtcgtcctttagtccatg
<i>FLAG NS4B 4S</i>	caaggacgacgatgacaaggtgctatggcttcgcacctcccttac
<i>FLAG NS4B 4A</i>	gtaagggaggtgcgaagccatagcagccttgtcatcgtcgtccttgc
STOP <i>MYC S</i>	ggactgctccacgcatgttgagagcagaagctcatctcggagg
STOP <i>MYC A</i>	cctccgagatgagcttctgctctcaacatggcgtggagcagtcc

Tabelle 6 Nukleotidsequenz der Mutageneseprimer

3.1.6 Bakterien

Für Retransformationen wurden chemisch kompetente Bakterien des Typs DH5 α verwendet. Die der Mutagenese folgenden Transformationen wurden mit XL1-Blue superkompetenten Zellen der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 sup e44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]).

3.1.7 Plasmide

Als Vektor wurde das Plasmid pcDNA3.1(-) von Invitrogen verwendet. In dieses war eine für ein vollständiges HCV-NS4B-Protein kodierende Sequenz integriert. Dieses NS4B-Expressionsplasmid war freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Hak Hotta, Kobe Universität, Kobe, Japan, zur Verfügung gestellt worden.

3.1.8 Zellen

Für die Transfektionsversuche wurden Zellen der Linie HEK 293T verwendet, die im Labor kultiviert wurden und ursprünglich von ITCC, USA, bezogen worden waren.

3.1.9 Medien/Materialien für die eukaryotische Zellkultur

Materialien	Firma
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Gibco DMEM (+4,5 g/l Glucose, +L-Glutamine, -Pyruvat)	Invitrogen (Karlsruhe)
Gibco 0,5%-Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Gibco OptiMEM I (+ GlutaMax I)	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 7 Materialien für die eukaryotische Zellkultur

3.1.10 Antikörper

Es wurden jeweils Antikörper verwendet, die für die jeweilige Methode adäquat waren.

Name	Zielstruktur	Hersteller
<i>c-Myc</i> (9E10)	<i>MYC</i> -Motiv	Santa Cruz Biotechnology (California, USA)
<i>OctA-Probe</i> (F-tag-01)	<i>FLAG</i> -Motiv	Santa Cruz Biotechnology (California, USA)
<i>Goat Anti-Mouse HRP Conjugate</i>	Erstantikörper (c- <i>Myc</i> oder <i>OctA-Probe</i>)	Bio Rad Laboratories GmbH (München)

Tabelle 8 Antikörper

3.1.11 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

Die für die Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Merck AG (Darmstadt) und Sigma-Aldrich GmbH (München) bezogen und wie unten beschrieben zur Herstellung der Puffer bzw. Lösungen eingesetzt.

Puffer	Zusammensetzung
50x TAE-Puffer	2 M Tris-HCl, pH 8,0; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA
6x DNA-Ladungspuffer	15% Ficoll-400; 0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylencyanol in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
TFB1-Puffer (Herstellung kompetenter E.coli)	30 mM Natriumacetat, pH 5,8; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl ₂ ; 10 mM CaCl ₂ ; 15% Glycerin (v/v)
TFB2-Puffer (Herstellung kompetenter E.coli)	10 mM MOPS, pH 7,0; 75 mM CaCl ₂ ; 10 mM NaCl; 15% Glycerin (v/v)
Einfriermedium für Zellen	92,5% FCS; 7,5% DMSO
LB-Medium	10g Bacto-Trypton; 5g Hefeextrakt; 5g NaCl in 1 Liter deionisiertem Wasser, anschließend autoklavieren. Zur Herstellung von Selektionsmedien wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.
LB-Agarplatten	Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium zusätzlich 1,5% (w/v) Bacto-Agar zugesetzt.
RIPA-Zellysepuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1% Triton X100
Zellysepuffer	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,5 mM DTT; 1% Nonidet P40
TBST-Puffer	150 mM NaCl; 30 mM Tris, pH 7,4; 0,05% Tween20
SDS-Laufpuffer	1 g SDS; 3 g Tris, pH 8,4; 14,4 g Glycin; in 1 l ddH ₂ O
Blottingpuffer	25 mM Tris, pH 8,3; 190 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol

Tabelle 9 Pufferlösungen

Weitere Lösungen werden im Zusammenhang der mit ihnen durchgeführten Methode beschrieben.

3.2 Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt. Sie ist ein zyklisches Verfahren zur *in vitro* Vervielfältigung spezifischer Nukleotidsequenzen und beruht auf einer enzymatischen Amplifikation.

Am Anfang jedes Zyklus wird doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95 bis 100°C denaturiert. Im folgenden Schritt binden Oligonukleotide (Primer) an die entstandenen Einzelstränge (*Annealing*). Die Primer flankieren hierbei die Zielsequenz. Die hierzu erforderliche Temperatur wird ausgehend von der Schmelztemperatur des Primers berechnet [$T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$] und anschließend experimentell optimiert. Anschließend synthetisiert eine DNA-abhängige DNA-Polymerase (z.B. taq-Polymerase) von den Primern ausgehend in 5'→3'-Richtung jeweils einen komplementären Strang. Hierzu wird die Reaktionslösung auf die Temperatur erhitzt, bei der die verwendete DNA-abhängige DNA-Polymerase die optimale Aktivität besitzt. Der nächste Zyklus beginnt mit der darauf folgenden Denaturierung.

Während der ersten beiden Runden entstehen Einzelstränge, bei denen nur eines der beiden Enden durch einen Primer begrenzt wird. Erst ab dem dritten Zyklus findet man beiderseits durch Primersequenzen begrenzte DNA-Doppelstränge; eine exponentielle Vervielfältigung des Amplikons erfolgt ab dem vierten Zyklus.

3.2.1.1 Sequenzierung

Während der Sequenzierungs-PCR erfolgt die enzymatische Synthese von DNA-Strängen, die an einem desoxygenierten, fluoreszenzmarkierten Nukleotid abbrechen (Sanger-Methode). Bei diesen modifizierten Nukleotiden handelt es sich um 2',3'-Dideoxynukleotid-Triphosphate (ddNTPs), die am 3'-Kohlenstoffatom statt einer Hydroxygruppe ein Wasserstoffatom besitzen. Der Einbau eines solchen Nukleotids führt zum Abbruch der DNA-Synthese an dieser Stelle, da keine Phosphodiesterbindung mehr möglich ist. Da der Anteil der modifizierten Nukleotide nur ca. 1% der insgesamt verwendeten Nukleotide beträgt, erhält man als Endprodukt der PCR ein Gemisch verschieden langer DNA-Stränge,

die bei der nachfolgenden Sequenzanalyse nach ihrer Größe aufgetrennt und anhand des Fluoreszenzfarbstoffes detektiert werden können.

3.2.1.1.1 Auswahl der Primer

Die Auswahl der Primer war durch die verwendete Methode der zielgerichteten Mutagenese und die gewünschte Zielsequenz vorgegeben. Aufgrund der Ausbildung von Sekundärstrukturen in den Primern musste mehrfach eine Anpassung des Protokolls der Mutagenese-PCR durchgeführt werden, um eine ausreichende Mutageneseeffizienz zu erreichen.

3.2.1.1.2 Protokoll der Sequenzierungs-PCR

Nach Markierung der PCR-Produkte durch eine einseitige PCR im GeneAmp™ PE9700 Thermocycler (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt), die mit kommerziell erworbenen Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde (Big Dye® Deoxy Terminators, Applied Biosystems, Weiterstadt), erfolgte eine automatisierte Sequenzierung (Applied Biosystems 310 und 3100 DNA-Sequencer, Weiterstadt).

So wurde die in den Originalplasmiden enthaltene Sequenz für NS4B exakt ermittelt, sowie die mittels zielgerichteter Mutagenese eingefügten Mutationen überprüft.

Die Sequenzierungs-PCRs wurden wie folgt auf Eis in 0,2 ml Eppendorf-Cups angesetzt. Die Primer wurden hierbei in einer Konzentration von 10 µM verwendet.

Komponente	Volumen in µl
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	2
Primer	0,5
Bidest. H2O	7,5
Plasmid	1
Gesamtvolumen	11

Tabelle 10 Pipettierschema für Sequenz-PCR

Die PCR wurde unmittelbar nach Ansetzen der Proben in einem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) wie folgt durchgeführt: Nach einer initialen Denaturierung für 2 Minuten bei 96°C folgten 35 Zyklen jeweils bestehend aus Denaturierung, Primerbindung

(*Annealing*) und DNA-Synthese (Elongation). Die Denaturierung wurde hierbei für jeweils 10 Sekunden bei 96°C durchgeführt, die Primerbindung erfolgte bei 45°C für 15 Sekunden, die DNA-Synthese wurde bei 60°C für je 4 Minuten pro Zyklus durchgeführt. Anschließend erfolgte ein abschließender Elongationsschritt für 10 Minuten bei 72°C. Die DNA wurde bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.2.1.2 Aufreinigung der PCR-Produkte vor Sequenzanalyse

Nach einer Sequenzierungs-PCR wurden nicht eingebaute ddNTPs entfernt, die die Sequenzanalyse stören würden. Die Aufreinigung erfolgt hierbei mittels einer Gelsäule, die Moleküle aufgrund ihrer Größe trennt (DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen). Die nicht eingebauten Bestandteile des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits werden im Gel zurückgehalten, während der synthetisierte DNA-Strang das Gel ungehindert passieren kann und im „*Flow-through*“ aufgefangen wird.

3.2.1.2.1 Protokoll

Die Spin Säulen wurden geschüttelt und für 3 Minuten bei 2700 rpm zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417C), um den enthaltenen Puffer zu entfernen. Anschließend wurden die Säulen vorsichtig in 1,5 ml Eppendorf-*Cups* überführt und die Sequenzierungs-PCR auf die Gelsäule pipettiert. Während des folgenden dreiminütigen Zentrifugationsschrittes bei 2700 rpm wurde das PCR-Produkt in dem Gel aufgereinigt. Die aufgefangene Lösung konnte anschließend zur Sequenzanalyse weiterverwertet werden.

3.2.2 Sequenzanalyse

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte automatisiert mit Hilfe des ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer von Applied Biosystems. Während der Elektrophorese tastet hierbei ein Laserstrahl das Gel ab, ein Computer analysiert die Daten.

3.2.3 Messung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Plasmid- bzw. RNA-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt. Hierzu wurde ein DU800 Spektrophotometer (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet. Die Nukleinsäurelösung wurde für die Messung in dem Verhältnis von 1:50 mit deionisiertem Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette gefüllt.

Da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm haben, kann durch Messung der Extinktion bei dieser Wellenlänge die Konzentration der Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Dabei gilt bei einer jeweils angenommenen OD von 1 für DNA eine Konzentration von 50 µg/µl und für RNA eine Konzentration von 40 µg/µl. Eventuelle Kontaminationen durch Proteine werden durch die zusätzliche Messung bei 280 nm und Bildung des Quotienten der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm angezeigt. Reine Nukleinsäurelösungen weisen ein Verhältnis von etwa 1,8 auf. Durch eine weitere Messung bei 320 nm, deren Wert jeweils von den Messwerten bei 260 bzw. 280 nm subtrahiert wurde, wurde zusätzlich der Anteil des Streulichts korrigiert.

3.2.4 Herstellung der Mutanten

3.2.4.1 Mutagenese-PCR

Die zielgerichtete Mutagenese ist ein Verfahren, bei dem einzelne oder wenige Nukleotide inseriert oder ausgetauscht werden können und somit die DNA in ihrer gesamten Sequenz verändert werden kann. Hierzu muß zunächst ein Primerpaar synthetisiert werden, dessen Partner größtenteils komplementär zu einem Plasmidstrang sind und die die Sequenz der zu korrigierenden Nukleotidsequenz etwa in ihrer Mitte enthalten. Während der PCR werden die Primer durch die DNA-Polymerase verlängert. Im nächsten Schritt werden zu diesen Strängen komplementäre Stränge synthetisiert, die dann die neue Sequenz enthalten. Da in der vorliegenden Arbeit die zu verändernden Sequenzen teilweise mehrere Basenpaare voneinander getrennt lagen bzw. mehrere hintereinander liegende Aminosäuren ausgetauscht werden sollten, musste die Mutagenese in Einzelschritte mit jeweils neuen Primern, die die zuvor veränderten Basenpaare in ihrer Sequenz enthielten, unterteilt werden.

Mit diesem Verfahren wurden Mutationen im Leuzinzippermotiv von NS4B eingefügt. Um die korrekte Detektion des Proteins zu gewährleisten, wurden zwei unterschiedliche Oligonukleotide, kodierend für das *FLAG*-Erkennungsmotiv und das *MYC*-Erkennungsmotiv, durch mehrere repetitive zielgerichtete Mutageneseschritte in das native NS4B-Plasmid integriert. Die Erkennungsmotive wurden am carboxyterminalen Ende in das Plasmid integriert, um mögliche Wechselwirkungen mit dem am aminoterminalen Ende gelegenen bZIP-Motiv zu minimieren.

Als DNA-Polymerase wurde die PfuUltra®High-Fidelity DNA Polymerase von Stratagene verwendet.

Der Amplifikation der DNA folgte der Verdau der parentalen aus E.coli-Stämmen isolierten und somit methylierten DNA mit DpnI, einem Restriktionsenzym, das nur methylierte DNA-Sequenzen schneidet, und somit die Selektion der die Mutation enthaltenden DNA.

Im Anschluss an die Mutagenese wurde die die neue Sequenz enthaltende Vektor-DNA mittels Transformation in superkompetenten Zellen vermehrt und die korrekt erfolgte Mutation durch Sequenzierung des entsprechenden DNA-Abschnitts kontrolliert.

3.2.4.1.1 Protokoll

Als Ausgangsmaterial für die Mutagenese-PCR wurde jeweils 25 ng des entsprechenden Plasmids eingesetzt. Die Reagenzien wurden auf Eis in 0,2 ml Eppendorf-Cups zusammengegeben. Dabei wurde die DNA-Polymerase erst zum Schluss zugefügt. Die Menge an deionisiertem Wasser variierte in Abhängigkeit des verwendeten Plasmidvolumens. Die Primer wurden in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt.

Komponente	Volumen in μl
Plasmid (25 ng)	x
Pfu Ultra Puffer 10x	5
Sense-Primer (1 μ M)	10
Antisense-Primer (1 μ M)	10
dNTP Mix (10 μ M)	1
Pfu Ultra DNA Polymerase	1
Aqua bidest	ad 50

Tabelle 11 Pipettierschema für Mutagenese-PCR

Die PCR wurde unmittelbar nach Ansetzen der Proben in einem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Bedingungen für die einzelnen Mutageneseschritte variierten dabei ausgehend vom Originalprotokoll (s. Bedingungen für Mutationen im Leuzinzippermotiv von NS4B), da unter Originalbedingungen der Einbau der gewünschten Mutation nicht oder nicht effizient erfolgte. Die im Folgenden dargestellten Protokolle entsprechen den experimentell ermittelten Bedingungen, die letztlich zu den gewünschten

Ergebnissen führten. Durch Änderung der Zyklenzahl konnte eine größere Menge an Mutationen-enthaltendem Plasmid gewonnen werden, durch die Herabsetzung der *Annealing*-Temperatur von +55°C auf 53°C wurde eine unspezifischere Bindung der Primer bewirkt. Dies war erwünscht, da die Primersequenz nicht vollständig mit der Plasmidsequenz übereinstimmte. Unspezifische Amplifikationen wurden durch Sequenzierung detektiert bzw. ausgeschlossen.

Um die gewünschten Mutationen im Leuzinzippermotiv von NS4B zu erhalten, sowie um das *MYC*-Erkennungsmotiv in das NS4B-Plasmid zu implementieren, wurde die PCR wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde der Ansatz für 30 Sekunden auf +95°C erhitzt, anschließend wurden 16 Zyklen durchgeführt, bei denen zunächst die Denaturierung für jeweils 30 Sekunden erfolgte; für die Primerbindung wurde eine Temperatur von +55°C für 1 Minute gewählt. Im Anschluss erfolgte die DNA-Synthese bei +68°C für jeweils 8 Minuten pro Zyklus. Die entstandene DNA wurde bis zur Weiterverwendung bei +4°C aufbewahrt.

Temperatur	Dauer	Zyklen
+95°C	30 sec	1
+95°C	30 sec	16
+55°C	1 min	16
+68°C	8 min	16
+ 4°C		Kühlung bis zur Weiterverarbeitung

Tabelle 12 PCR-Bedingungen I für Mutagenese-PCR

Um das *FLAG*-Erkennungsmotiv in das NS4B-Motiv zu insertieren wurden die o.g. Bedingungen folgendermaßen abgeändert. Die Zyklenzahl wurde auf 20 erhöht und die *Annealing*-Temperatur auf +53°C herabgesetzt. Die übrigen Bedingungen wurden unverändert übernommen.

Temperatur	Dauer	Zyklen
+95°C	30 sec	1
+95°C	30 sec	20
+53°C	1 min	20
+68°C	8 min	20
+ 4°C		Kühlung bis zur Weiterverarbeitung

Tabelle 13 PCR-Bedingungen II für Mutagenese-PCR

3.2.4.2 Selektion von Mutanten

3.2.4.2.1 Verdau der parentalen DNA

Um die Mutationen-enthaltende DNA zu isolieren, wurde die parentale aus *E.coli*-Stämmen isolierte und somit methylierte DNA mit DpnI, einem Restriktionsenzym, das nur methylierte DNA-Sequenzen schneidet, verdaut. Somit wurden die die Mutation enthaltenden Plasmide selektiert und konnten anschließend mittels Transformation in superkompetente Zellen eingebracht, in diesen vermehrt und anschließend sequenziert werden.

Den Mutageneseprodukten wurde hierzu pro Ansatz jeweils 1 µl DpnI zugefügt; der Ansatz wurde durch Pipettieren sorgfältig gemischt, zentrifugiert und bei +37°C für eine Stunde inkubiert.

3.2.4.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Es wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Bakterienübernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,485 bei +37°C geschüttelt. Die nachfolgenden Schritte wurden alle bei +4°C durchgeführt. Zunächst wurden die Bakterien 10 Minuten bei 800g abzentrifugiert, anschließend in 20 ml eiskaltem TFB1-Puffer aufgenommen und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Bakterien wiederum für 10 Minuten zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und die Bakteriensuspension in gekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Lagerung der so hergestellten chemisch kompetenten *E.coli* erfolgte bei -80°C.

3.2.4.2.3 Transformation

Die Transformation ist ein Verfahren, bei dem rekombinante Vektoren in kompetente Bakterien eingebracht und amplifiziert werden. Um die Plasmide optimal aufnehmen zu können, müssen die verwendeten Zellen zuvor mittels Elektroporation oder chemischer Behandlung mit CaCl₂ präpariert werden. Das Verfahren der Transformation wurde zur Amplifizierung neu konstruierter sowie bereits etablierter Plasmide angewendet.

Die Transformation bereits etablierter Plasmide erfolgte mit 1 µl lyophilisiertem Plasmid unterschiedlicher Konzentrationen in 50 µl chemisch kompetenten Bakterien. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, während der die Zellen die DNA aufnehmen, wurde die Aufnahme der Plasmid-DNA mittels 1,5-minütiger Hitzeschockbehandlung im +42°C warmen Wasserbad gestoppt und die Proben einer konsekutiven Inkubation auf Eis für weitere fünf Minuten unterzogen. Anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml LB-Medium versetzt und 30 Minuten bei +37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert. Es folgte ein zweiminütiger Zentrifugationsschritt bei 6000 rpm. Der das Medium enthaltende Überstand wurde bis auf ca. 100 µl verworfen. Das entstandene Bakterienpellet wurde in dem restlichen Überstand vorsichtig resuspendiert und auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Nach 14- bis 16-stündiger Bebrütung bei +37°C wurden gut isolierbare Kolonien ausgewählt, aus denen das Plasmid aufgereinigt und isoliert wurde.

Die Transformation der mittels Mutagenese-PCR neu konstruierten Plasmide wurde mit superkompetenten Zellen der Firma Stratagene unter leicht variierten Bedingungen durchgeführt (s.u.).

3.2.4.2.3.1 Transformation der Mutageneseprodukte

Die Transformation der Mutageneseprodukte erfolgte in 50 µl superkompetenten Bakterien (XL1-Blue, Stratagene). Dazu wurde 1µl der PCR-Reaktion zu den Bakterien gegeben und sachte gemischt. Der Transformationsansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, einem konsekutiven 45-sekündigen Hitzeschock unterzogen, um die DNA-Aufnahme zu stoppen, und sofort wieder auf Eis gebracht. Den Bakterien wurde anschließend 200 µl SOC Medium zugesetzt und die Probe bei +37°C für 30 Minuten in einem Thermoschüttler inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension gleichmäßig auf zwei mit 100 µg/ml Ampicillin versetzten LB-Agarplatten verteilt und für ca. 18 h bei +37°C bebrütet. Um den Vektor direkt zu identifizieren und somit die korrekt erfolgte Mutation zu überprüfen, wurden anschließend mehrere gut isolierbare Kolonien von der Agarplatte entnommen, um damit jeweils 5 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt) zu beimpfen. Nach einer 16-stündigen Inkubation bei +37°C und 150 rpm wurden die Plasmide aufgereinigt und der entsprechende Bereich des Vektors sequenziert.

3.2.5 Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Die Präparation der Plasmid-DNA wurde üblicherweise mit dem Spin Miniprep Kit von Qiagen durchgeführt. Hierbei wurden die bei der Transformation gewonnenen Bakterien enzymatisch verdaut, ihre Überreste gebunden und die übrig bleibende Plasmid-DNA aufgefangen.

Für die DNA-Mini-Präparation wurden je 5 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt) zur weiteren Vermehrung und Selektion Plasmid-enthaltender Zellen mit einzelnen Bakterienkolonien beimpft und über Nacht bei 150 rpm und +37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Übernachtskulturen bei 4000 rpm und +20°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet aufgereinigt. Dazu wurde das Pellet in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und die Zellen wurden durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer lysiert. Der anschließenden Neutralisation mit dem Puffer N3 (350µl) folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Der Überstand wurde auf eine QIAprep-Säule überführt und wiederum für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Weitere Verunreinigungen, die nachfolgende Reaktionen stören könnten, wie z.B. Nuklease oder Carbohydrat aus den bei der Transformation verwendeten Bakterien, sowie Ethanol aus den Puffern, wurden mittels zweier Waschschriffe mit 0,5 ml PB-Puffer bzw. 0,75 ml PE-Puffer und jeweils nachfolgender einminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm entfernt. Die DNA wurde schließlich in 50 µl EB-Puffer, der zur besseren Lösung auf +50°C vorgewärmt wurde, eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Falls eine größere Menge an aufgereinigter DNA benötigt wurde, wurden zunächst 5 ml LB-Medium (incl. 100 µg/ml Ampicillin) mit einer Einzelkolonie beimpft und für einige Stunden bei 150 rpm und +37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in einen 300 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt) enthaltenden Erlenmeyerkolben überführt und nochmals über Nacht bei +37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmide aus den Bakterien erfolgte dann mit dem MaxiPrep Kit der Firma Jetstar nach Anweisung des Herstellers, dessen Arbeitsschritte mit denen der Minipräparation vergleichbar waren.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nach erfolgter Amplifikation bzw. Transformation wurde zur Kontrolle eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt hierbei nach ihrem Molekulargewicht. In Abhängigkeit von der zu untersuchenden Fragmentgröße wurden Gele unterschiedlicher Agarosekonzentration eingesetzt.

Um kleinere Fragmente (bis ca. 600 bp) nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde ein 1,5%iges Agarosegel angefertigt, größere Fragmente wurden in einem 1%igen Gel aufgetrennt. Für ein 1,5%iges Agarosegel wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellenofen gelöst, 1,5 µl Ethidiumbromid zum späteren Sichtbarmachen der DNA-Fragmente unter UV-Licht zugegeben und nach Abkühlen auf etwa 60°C in eine Gießkammer mit Probenkamm gefüllt. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Horizontal-Gelapparatur gelegt. Die DNA wurde mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker mit bekannten Fragmentgrößen aufgetragen, um die Größe der Proben abschätzen zu können. Die Proben wurden etwa 30 bis 90 Minuten mit einer Feldstärke von 1 bis 5 V/cm² aufgetrennt. Die DNA-Fragmente konnten anschließend aufgrund ihrer Interkalation mit Ethidiumbromid mittels UV-Licht (305 nm) sichtbar gemacht werden und wurden mit einer Polaroidkamera durch einen Orange-Rot-Filter fotografiert.

3.2.7 Zellkultur

3.2.7.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die Expressionsversuche wurden Zellen benötigt, die transient transfizierbar sind und das im Insert des Vektors kodierte Protein exprimieren.

Hierzu wurden HEK 293T-Zellen, immortalisierte, adhärent wachsende Zellen, verwendet, die bei +37°C, 5% CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% kultiviert wurden. Die Zellen wurden dazu in 75 ml-Zellkulturflaschen mit bakteriendichtem Filter mit etwa 25 ml Pyruvat-freiem 1x DMEM-Medium von Gibco (4,5 g/l Glucose, L-Glutamine), das mit 1/100 Vol. 100x Penicillin/Streptomycin von PAA Laboratories und 1/10 Vol. FCS versetzt wurde, für die Versuche gezüchtet. Das Zellkulturmedium wurde zwei Mal pro

Woche gewechselt. Jegliche Arbeit mit den Zellen erfolgte unter der Sterilbank, um Bakterienkontaminationen zu vermeiden.

3.2.7.2 Zellpassage

Bei Konfluenz der Zellen von circa 80% wurden diese passagiert. Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA-Lösung bis zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden inkubiert. Die gelösten, trypsinierten Zellen wurden mit Medium gewaschen, in frischem Kulturmedium resuspendiert und 1:10- bis 1:20-fach verdünnt wieder ausgesät.

3.2.7.3 Tieffrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden wie bei der Passage mit PBS gewaschen, trypsiniert, mit Medium gewaschen und in neuem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von circa 10^7 Zellen/ml eingestellt und auf Eis gekühlt. Eine Suspension aus 80% Kulturmedium und 20% DMSO wurde hergestellt, auf Eis gekühlt und im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension gemischt. Die Zellen wurden über Nacht bei -80°C aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Wiedererwärmen der Zellen auf Raumtemperatur erfolgte unter gelegentlichem Schwenken des Gefäßes bis zur vollständigen Verflüssigung der Suspension. Anschließend wurden die Zellen mit Zellkulturmedium gewaschen, in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät.

3.2.7.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 2-10 ml frischem PBS resuspendiert. 20 μl der Suspension wurden anschließend mit Trypanblaulösung versetzt und in der Neubauerzählkammer ausgezählt. Die Zelldichte Z wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$Z = nV / (Sq)$$

n : gezählte Zellen, V : Verdünnungsfaktor, S : Volumen der Suspension, q : Anzahl der ausgezählten Quadrate

Anhand des Ergebnisses konnte die gewünschte Zellzahl eingestellt werden.

3.2.8 Transiente Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA, z.B. in Form eines Plasmids, in eukaryotische Zellen. Bei einer transienten Transfektion wird die Fremd-DNA nur zeitweilig in die Wirtszelle eingebracht. Bei einer stabilen Transfektion wird die Fremd-DNA dauerhaft in das Wirtsgenom integriert. Die Transfektion kann über chemische, physikalische und biologische Verfahren erfolgen. In dieser Arbeit wurde für die Transfektion das Verfahren der Lipofektion gewählt, bei der das genetische Material mit Hilfe von Liposomen, die sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle eingebracht wird. Die negativ geladene Plasmid-DNA bindet hierbei zunächst an positiv geladene Liposomen, wobei größere Komplexe entstehen, die daraufhin von der Zielzelle aufgenommen werden.

Das Plasmid mit der cDNA der HCV-Genotyp1b-NS4B-Nukleotidsequenz wurde uns freundlicherweise von Professor Hak Hotta von der Kobe Universität in Kobe, Japan, zur Verfügung gestellt. Über zielgerichtete Mutagenese wurden zwei verschiedene Erkennungsmotive implementiert. Danach wurde in beiden verschiedenen Plasmiden, die jeweils die NS4B-Sequenz aber verschiedene Erkennungsmotive enthielten, die bZIP-Region mutiert.

Die Expression der Wildtyp-NS4B-Proteine mit intaktem bZIP und integrierten Erkennungsmotiven (NS4B-bZIP+/MYC; NS4B-bZIP+/FLAG) bzw. mutiertem bZIP und integrierten Erkennungsmotiven (NS4B-/MYC; NS4B-/FLAG) wurde für ein einzelnes Protein oder die Kombination verschiedener Proteine durchgeführt.

3.2.8.1 Protokoll

Die Transfektion wurde mit LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) durchgeführt.

Die am Vortag in 6-well-Platten etwa 30% konfluent mit jeweils 2000 µl DMEM-Zellkulturmedium pro Well ausgesäten 293T-Zellen wurden mit einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank bei +37°C und 5% CO₂-Konzentration auf die Transfektion vorbereitet und sollten zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 70-80% konfluent vorliegen.

Ungefähr 10⁶ HEK 293T-Zellen wurden mit 3 µg Plasmid-DNA in 3 µl LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) und 150 µl serumfreiem Medium (OptiMem®, Invitrogen)

gelöst und für 28 h transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in 200 µl Lysis-Puffer (1% NP-40, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5 mM DTT) lysiert, das unlösliche Zellmaterial wurde mittels Zentrifugation entfernt.

Zur Transfektionskontrolle wurde zusätzlich grün fluoreszierendes Protein transfiziert, das die Effizienz der Transfektion durch Fluoreszenz unter grünem Licht anzeigt.

Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung in der SDS-PAGE bei -20°C aufbewahrt.

3.2.9 Westernblot und SDS-PAGE

Der Westernblot –auch Immunoblot genannt– ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen mit nachfolgendem Transfer der Proteine auf eine Trägermembran und ihrem Nachweis mittels Immundetektion.

Die Bezeichnung Westernblot geht auf den Namen des Erfinders der Blottingtechnik Edwin Southern zurück, der 1971 das Southernblotting als Methode für die Auftrennung und nachfolgende Hybridisierung von DNA-Fragmenten einführte. Die Westernblot-Methode wurde von J. Renart et al. für Diazobenzylloxymethylpapier eingeführt und von H. Towbin et al. wie im Southernblot auf Nitrocellulose umgestellt. Der Name Westernblot wurde von W.N. Burnette als eine Allusion zum Southernblot eingeführt.

3.2.9.1 SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Vor dem eigentlichen Westernblot werden die Proteine in einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Hierbei handelt es sich um eine Variante der Gelelektrophorese zur Analyse von Proteinen. Das eingesetzte SDS (Natriumdodecylsulfat) dient hierbei als anionisches Detergens und überdeckt die Eigenladung der Proteine. Pro Gramm Protein binden circa 1,4 g SDS, so dass alle Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Störende Sekundär- und Tertiärstrukturen werden durch zusätzliches Erhitzen der Proben auf $+95^{\circ}\text{C}$ und durch Zusatz reduzierender Thiolverbindungen, wie beispielsweise beta-Mercaptoethanol, aufgebrochen. Die denaturierten Proben werden anschließend in dem Polyacrylamidgel, das in einen entsprechenden Laufpuffer eingelegt ist, aufgrund ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Dazu wird eine elektrische Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel bewirkt. Zur Abschätzung der Proteingröße

wird zusätzlich ein Größenmarker aufgetragen, der aus Proteinen bekannter Größe besteht. Die aufgetrennten Proteine können schließlich mittels weiterer Verfahren, beispielsweise immunologischer Art (Westernblot), sichtbar gemacht werden.

3.2.9.2 Westernblot

Beim Westernblot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt hierbei erhalten. Das an die Proteine angelagerte SDS wird ausgewaschen, weshalb die Proteine teilweise renaturieren, so dass eine spezifische Antikörperbildung ermöglicht wird. Die Bindung der Proteine an die Nitrocellulosemembran erfolgt hierbei über hydrophobe Wechselwirkungen.

Die Visualisierung der Proteine erfolgt anschließend über das Verfahren der Immundetektion. Hierbei bindet ein antigenspezifischer Antikörper an Epitope des gesuchten Proteins. An den primären Antikörper wird anschließend ein sekundärer Antikörper gekoppelt, über den letztlich die Detektion erfolgt.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein blockiert werden, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Dafür kann je nach verwendetem Antikörper Milchpulver oder bovines Serumalbumin verwendet werden.

Die Proteinbanden werden anschließend mit spezifischen Antikörpern identifiziert. Unspezifisch gebundene Antikörper werden in mehreren Waschschritten mit Detergentien enthaltenden Puffern ausgewaschen.

Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen den Fc-Bereich des Primärantikörpers gerichtet und bindet an diesen. Nicht gebundene Antikörper werden wiederum in mehreren Waschschritten von der Membran entfernt. Je nach Detektionsmethode erfolgt anschließend die Visualisierung. Ein häufiges und auch in dieser Arbeit verwendetes Prinzip ist die Chemilumineszenz. Hierbei ist der Sekundärantikörper an ein Enzym, z.B. die Meerrettich-

Peroxidase gekoppelt, das die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann.

3.2.9.3 Protokolle

3.2.9.3.1 Herstellung der Gele für die SDS-PAGE

3.2.9.3.1.1 Trenngellösung

Je nach Größe des gesuchten Proteins wurde die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels variiert. Bei kleineren Proteinen, wie NS4B, wurde ein Gel mit 12,5% Polyacrylamidkonzentration verwendet. Um die, aufgrund des sich nur um 2 bp unterscheidenden Molekulargewichts, im Gel sehr nah zusammen liegenden Banden von NS4B und der leichten IgG-Kette räumlich besser aufzutrennen, wurde für den Westernblot bei der Koimmunpräzipitation von NS4B mit NS4B ein 17,5 %iges Trenngel verwendet.

Für ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel wurden 2 ml Stammlösung aus 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid, 1,2 ml 1,88 M Tris/HCl (pH 8,8), 1,2 ml 0,5%iges SDS, 1,6 ml doppelt destilliertes Wasser, 5 µl TEMED, sowie 30µl 10%ige Ammoniumpersulfatlösung, die täglich frisch angesetzt wurde, gut miteinander vermischt und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde über das Trenngel ein 5%iges Sammelgel gegossen. Die genauen Zusammensetzungen der höher konzentrierten Gele können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Acrylamidkonzentration	10,0%	12,5%	17,5%
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid Stammlösung	2,0 ml	2,5 ml	3,5 ml
1,88 M Tris/HCl pH 8,8	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml
0,5% SDS	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml
Bidest. Wasser	1,6 ml	1,1 ml	0,1 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
Ammoniumpersulfatlg., 10%ig	30 µl	30 µl	30 µl

Tabelle 14 Pipettierschema für Acrylamidgele

3.2.9.3.1.2 Sammelgellösung

Als Sammelgel wurde ein 5% Polyacrylamid enthaltendes Gel verwendet. Hierzu wurden 0,33 ml Stammlösung aus 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid, 0,4 ml 0,625 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 ml SDS, 0,87 ml doppelt destilliertes Wasser, 2 µl TEMED und 10 µl 10-prozentige Ammoniumpersulfatlösung gut miteinander vermischt und direkt auf das bereits erstarrte Trenngel gegossen. Je nach Probenanzahl wurde ein passender Probenkamm verwendet und in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Nach Erstarren des Gels wurde dieses luftdicht verschlossen bei +4°C bis zur Verwendung gelagert.

Acrylamidkonzentration	5,0%
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid Stammlösung	0,33 ml
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	0,4 ml
0,5% SDS	0,4 ml
Bidest. Wasser	0,87 ml
TEMED	2 µl
10%ige Ammoniumpersulfatlösung	10 µl

Tabelle 15 Pipettierschema für Sammelgel

3.2.9.3.2 SDS-PAGE

Zur Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die mittels Lipofectamine™ 2000 transfizierten und dann lysierten Zellen auf Eis aufgetaut und zunächst mit Ultraschall behandelt, um die Viskosität der Proben zu verringern. Anschließend wurden nicht benötigte Zellbestandteile in einem 3-minütigen Zentrifugationsschritt bei +4°C und 13000 rpm vom Protein enthaltenden Überstand getrennt und verworfen.

Das Auftragsvolumen von 7,5 µl wurde abgenommen und mit 2,5 µl 4x konzentriertem reduzierendem Proteinauftragspuffer Roti-Load 1 von Roth versetzt, für 2 Minuten bei +95°C geschüttelt und abzentrifugiert. Das aus Trenn- und Sammelgel zuvor gegossene Gel wurde in eine mit SDS-Laufpuffer befüllte Kammer gestellt und die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Marker bekannter Proteinzusammensetzung (Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range von Bio-Rad) und jeweils eine Leerkontrolle aufgetragen. Pro Gel wurde ein Strom von 25 mA für circa 70 Minuten angelegt. Bei

Verwendung des 17,5%igen Trenngels erhöhte sich die Zeit für die Auftrennung auf etwa 120 Minuten.

3.2.9.3.3 Westernblot

Das Polyacrylamidgel wurde nach erfolgter Elektrophorese aus der Kammer entnommen, auf eine in Blottingpuffer getränkte Nitrocellulosemembran übertragen und zwischen ebenfalls in Blottingpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Während eines für 1,5 Stunden angelegten Stromflusses von 55 mA pro Gel wurden die Proteine dann durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld aus diesem auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Kontrolle des erfolgten Proteintransfers wurden die Banden anschließend auf der Membran mit Ponceau-Rot gefärbt und bei positivem Ergebnis in mehreren Waschschritten mit PBS abgespült.

Danach wurden die freien Bindungsstellen der Membran mit einem durch den Antikörper nicht zu detektierenden Protein blockiert. Hierzu wurde zunächst eine 5-prozentige Milchpulverlösung aus 2,5 g Milchpulver und 50 ml TBS-T hergestellt, von der etwa 10 ml pro Blot für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben wurden. Nach dem Blockieren der freien Bindungsstellen wurde die erste Antikörperinkubation mit dem entsprechenden, gegen eine bestimmte Aminosäuresequenz des Proteins gerichteten, monoklonalen Mausantikörper durchgeführt. Dazu wurden 10 ml einer zuvor angefertigten Antikörperlösung aus 10 µl des entsprechenden Antikörpers (*cMyc* oder *OctA-probe*) und 10 ml 5-prozentiger Milchpulverlösung (in TBS-T) auf die Membran gegeben und wiederum für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei +4°C geschüttelt.

Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch dreimalige jeweils zehnmündige Waschung mit TBS-T entfernt. Die zweite Antikörper-Inkubation erfolgte mit einem gegen den Fc-Teil des Primäantikörpers gerichteten Antikörper („*Goat anti-mouse HRP-conjugate*“, BioRad), der an Meerretichperoxidase gekoppelt ist. Von diesem wurden im Anschluss an den Waschschriff 10 ml für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:3000 in TBS-T auf die Membran gegeben. Die überschüssigen Antikörper wurden auch nach diesem Schritt durch dreimalige zehnmündige Waschung mit TBS-T entfernt.

Im letzten Schritt wurde die Membran in je 3 ml Chemilumineszenzlösung (Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution und Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution) 5 Minuten inkubiert. Dabei katalysierte die Meerrettichperoxidase die Umwandlung von Luminol in seine oxidierte Form, deren Lumineszenz anschließend mit einem Film detektiert wurde. Das Fotopapier wurde hierbei, je nach Stärke des Signals, einige Sekunden bis wenige Minuten auf den Blot gelegt und in der Dunkelkammer entwickelt.

Die Größe der detektierten Proteine wurde anhand der entstandenen Banden im Vergleich zu den Markerbanden abgeschätzt und auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Intensität des Signals erlaubte zusätzlich ein semiquantitatives Abschätzen der Expression der Proteine.

3.2.10 Koimmunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist ein *in vitro*-Verfahren zum Nachweis von Proteinproteininteraktionen. Hierbei wird in einem ersten Schritt ein Protein über einen Antikörper detektiert. Dies gelingt durch die Zugabe von mit Protein-G-Sepharose beschichteten *Beads*. Bei Protein-G-Sepharose handelt es sich um ein Protein der Zellwand bestimmter Streptokokkenstämme, das mit hoher Spezifität an die Fc-Region der verwendeten Immunglobuline bindet. Durch Zugabe dieser *Beads* werden also die Antikörper-Protein-Komplexe gebunden. Die Komplexe müssen anschließend durch Zentrifugation und Waschschriffe von unspezifischen, nicht gebundenen Proteinen isoliert werden, und können nach ihrer Denaturierung im Westernblot nachgewiesen werden. Danach kann ein weiteres Protein mit einem anderen Antikörper detektiert werden, meist mittels Westernblot. Dies gelingt nur, wenn beide Proteine im ersten Schritt in einer Stärke interagieren, die die Trennkräfte bei den Waschschriffen übersteigt. Das erste Protein kann dagegen immer im Westernblot nachgewiesen werden, da es durch den ersten Antikörper präzipitiert wurde.

Um eine Interaktion von NS4B-Proteinen untereinander nachzuweisen, erfolgte zunächst eine Kotransfektion mit zwei verschiedenen NS4B-Plasmiden, die entweder das *FLAG*- oder das *MYC*-Erkennungsmotiv enthielten. Anschließend konnte dann durch Koimmunpräzipitation und anschließenden Westernblot untersucht werden, ob die NS4B-Proteine der beiden Expressionsplasmide miteinander interagierten. Hierzu wurden verschiedene Kombinationen (intaktes bZIP-Motiv in beiden Plasmiden, mutiertes bZIP-Motiv in einem Plasmid und

mutiertes bZIP-Motiv in beiden Plasmiden) untersucht. Initial erfolgte nach Kotransfektion ein Westernblot mit Antikörpern gegen beide Erkennungsmotive, um zu untersuchen, ob die Kotransfektion zu Störungen der Expression eines der Plasmide führen würde.

Für die Immunpräzipitation wurden 293T-Zellen verwendet, die über Nacht in 6-*well*-Zellkulturplatten in DMEM mit FBS bei +37°C und 5-prozentiger CO₂-Konzentration kultiviert worden waren. Die Transfektion der Zellen erfolgte bei etwa 70-prozentiger Konfluenz mit 3 µg des entsprechenden Plasmids pro *Well* mittels Lipofectamine™ 2000.

Nach einer 24-bis 28-stündigen Inkubation bei +37 °C und 5% CO₂-Gehalt der Luft wurde das Medium entfernt, die Platten mit PBS gewaschen und die Zellen mit 210 µl RIPA-Puffer pro *Well* lysiert. Dieser sowie die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Lysate wurden in 1,5 ml *Cups* überführt, kurz mit Ultraschall behandelt und die Zellbestandteile durch einen dreiminütigen Zentrifugationsschritt bei +4°C und 13000 rpm vom Überstand getrennt und verworfen. 30 µl des Lysats wurden als Kontrolle abgenommen und bis zur weiteren Verwendung im Westernblot bei -20°C aufbewahrt. Dem restlichen Lysat wurde der geeignete Primärantikörper (10 µl MYC-Ak bzw. 10 µl FLAG-Ak) zugesetzt und die Probe unter Rotation der Gefäße bei +4°C für mindestens 2 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 140 µl 1:1 mit PBS verdünnter Protein-G-Sepharose, die zuvor fünf mal mit PBS gewaschen worden war, um störendes Ethanol zu entfernen, wurde die Inkubation bei +4°C für mindestens zwei Stunden fortgeführt. Anschließend wurden unspezifische, nicht gebundene Proteine durch fünfmaliges Waschen mit PBS entfernt und das nach dreiminütiger bei 13000 rpm und +4°C durchgeführter Zentrifugation entstandene Sediment mit jeweils 30 µl 4x konzentriertem, reduzierendem Proteinauftragspuffer versetzt und 2 Minuten bei +95°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren. Die Proben wurden schließlich in SDS-Polyacrylamidgelen geeigneter Konzentration unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen und mittels Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman Schleicher & Schell, Dassel, German) übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation in 5% entrahmter Milch in TBST-Puffer (150 mM NaCl; 30 mM Tris, pH 7,4; 0,05% Tween20) blockiert. Die Inkubation mit einem Primärantikörper erfolgte für mindestens 2 Stunden. Die Detektion der Immunkomplexe wurde unter Verwendung von

Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörpern (BioRad Laboratories GmbH, München, Germany) und verstärkter Chemilumineszenz (Pierce, Rockford) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzanalyse

Zur Ermittlung der vorliegenden NS4B-Sequenz wurde zunächst eine Sequenzanalyse durchgeführt, die die folgende Nukleotidsequenz ergab. Anschließend wurde die entsprechende Aminosäuresequenz abgeleitet.

Plasmid-Position	890
Nucleotidsequenz	AAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGA
Plasmid-Position	947
Nucleotidsequenz	TATCTGCAGAATTCGCC ATGGCTTCGCACCTCCCTTACATCGAACAAGGAATGCAGT
Plasmid-Position	1004
Nucleotidsequenz	CGCCGAGCAATTCAAGCAGAAGGCGCTCGGTTTGCTGCAAACAGCCACCAAGCAAGC
Plasmid-Position	1061
Nucleotidsequenz	<u>GGAGGCTGCTGCTCCCCTGGTGGAGTCCAAGTGGCGAGCCCTTGAGACCTTCTGGGC</u>
Plasmid-Position	1118
Nucleotidsequenz	GAAGCACATGTGGAATTTTCATCAGCGGGATACAGTACTTAGCAGGCTTGTCCACTCT
Plasmid-Position	1175
Nucleotidsequenz	GCCTGGAAACCCCGCAATAGCATCACTGATGGCATTACAGCCTCTATCACCAGCCC
Plasmid-Position	1232
Nucleotidsequenz	GCTCACCACCCAATATAACCCTCCTGTTTAAACATCTTGGGGGGATGGGTGGCCGCCA
Plasmid-Position	1289
Nucleotidsequenz	ACTCGCCCCCCCCAGTGCCGCTTCAGCCTTCGTGGGCGCCGGTATAGCTGGCGCGGC
Plasmid-Position	1346
Nucleotidsequenz	TGTTGGCAGCATAGGCCTCGGGAAGGTGCTTGTGGACATTCTGGCGGGTTATGGAGC
Plasmid-Position	1403
Nucleotidsequenz	AGGGGTGGCAGGCGCGCTCGTGGCCTTTAAGGTCATGAGCGGTGACATGCCCTCCAC
Plasmid-Position	1460
Nucleotidsequenz	CGAGGACCTGGTCAACTTACTCCCCGCCATCCTCTCTCCTGGTGCCCTGGTCGTCGG
Plasmid-Position	1517
Nucleotidsequenz	GGTCGTGTGCGCAGCAATACTGCGTCGGCATGTGGGCCAGGGGAGGGGGCTGTGCA

Ergebnisse

Plasmid-Position	1574
Nucleotidsequenz	GTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTT <u>GCTTCGCGGGGCAACCATGTCTCCCCACGCA</u>
Plasmid-Position	1631
Nucleotidsequenz	CTATGTGCCTGAAAGCGACGCCG <u>CAGCGCGTCACCCAGATCCTCTCCAACCTTAC</u>
Plasmid-Position	1688
Nucleotidsequenz	CATCACTCAGCTGTTGAAGAGGCTT <u>CACCAGTGGATTAATGAGGACTGCTCCACGCC</u>
Plasmid-Position	1745
Nucleotidsequenz	ATGTTGA <u>ATTCCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTT</u>
Plasmid-Position	1802
Nucleotidsequenz	TAAACCGCTGATCAGC

Abbildung 3 Durch Sequenzierung bestimmte Nucleotidsequenz des NS4B-kodierenden Abschnitts im NS4B-Expressionsplasmid. Die NS4B-Sequenz inklusive des diese begrenzenden Stop-Kodons ist durch Fettdruck und der bZIP-Abschnitt durch Unterstrich hervorgehoben.

AS-Position	1	10	20	30	40	50
AS-Sequenz	ASHLPYIEQGMQLAEQFKQKALGLLQTATKQAEAAAAPVVESKWRALETF					
AS-Position	60	70	80	90	100	
AS-Sequenz	AKHMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTASITSPLTTQYTLLEFNI					
AS-Position	110	120	130	140	150	
AS-Sequenz	LGGWVAAQLAPPSAASAFVAGIAGAAVGSIGLGVLDILAGYAGVAG					
AS-Position	160	170	180	190	200	
AS-Sequenz	ALVAFKVMMSGDMPSTEDLVNLLPAILSPGALVVGVVCAAILRRHVGPGE					
AS-Position	210	220	230	240	250	
AS-Sequenz	AVQWMNRLIAFASRGNHVSPTHYVPESDAAARVTQILSNLTTITQLLRLH					
AS-Position	260					
AS-Sequenz	QWINEDCSTPC					

Abbildung 4 Abgeleitete Aminosäuresequenz des NS4B-Proteins im Expressionsplasmid (AS-Position: Aminosäureposition im NS4B-Protein; AS-Sequenz: Aminosäuresequenz).

4.2 Implementierung der Erkennungsmotive

Um die korrekte Detektion des Proteins in den folgenden Versuchsreihen zu gewährleisten, wurden unterschiedliche Oligonukleotide, kodierend für zwei Erkennungsmotive, für die kommerzielle, spezifische Antikörper verfügbar sind, implementiert. Dies erfolgte über repetitive Mutagenese (s. Kap. 3.2.4). Folgende Nukleotidsequenzen, kodierend für das *FLAG*- bzw. *MYC*-Erkennungsmotiv, wurden nach der NS4B-Sequenz und unmittelbar vor dem Stop-Kodon implementiert:

<i>FLAG</i> :	GACTACAAGGACGACGACGACAAG
<i>MYC</i> :	GAGCAGAAGCTCATCTCGGAGGAGGATCTC

Abbildung 5 Nukleotidsequenz der Erkennungsmotive.

Die korrekt erfolgte Mutation wurde anschließend durch Sequenzierung des entsprechenden DNA-Abschnitts nach Transformation in superkompetenten Zellen kontrolliert.

<i>FLAG</i> :	DYKDDDDK
<i>MYC</i> :	EQKLISEEDL

Abbildung 6 Aminosäuresequenz der Erkennungsmotive.

4.3 Mutation des bZIP-Motivs

Ziel der Arbeit war es, eine Sequenz zu implementieren, für die sowohl eine negative Alteration der putativen Funktion eines basischen Leuzinzipfers anzunehmen wäre als auch ein Erhalt anderer Sekundärstrukturelemente in dieser Region. Diese Sekundärstrukturelemente sind vornehmlich alpha-Helices. Alanin wird als alpha-Helix-Bildner angesehen. Als aliphatische Aminosäure sollte Alanin dagegen nicht zu Wasserstoffbrückenbindungen beitragen. In der Wildtypsequenz kommt Alanin zudem vereinzelt an den Positionen „a“ und „d“ vor; hier ist aber im Vergleich zu Leuzin aus theoretischen Überlegungen eine etwas schlechtere Eignung zur Ausbildung eines hydrophoben Kerns zu vermuten. Durch additive Alaninimplementierungen an den Positionen

„d“, „e“ und „g“ sollte deswegen erreicht werden, dass die mögliche Funktion eines putativen Motivs eines basischen Leuzinzippermotivs verschlechtert und gleichzeitig andere Sekundärstrukturelemente in dieser Region des NS4B-Proteins erhalten bleiben sollten. Abbildung 7 zeigt die Aminosäuresequenzen des Wildtyps und der definitiven Mutante.

	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g
bZIP, HCV, Wildtyp	L	G	L	L	Q	T	A	T	K	Q	A	E	A	A	A	P	V	V	E	S	K	W	R	A	L	E	T	F
bZIP, HCV, Mutante	L	G	L	A	A	T	A	T	K	Q	A	A	A	A	P	V	A	A	S	A	W	R	A	A	A	A	T	A

Abbildung 7 Sequenz des bZIP-Motivs des Wildtyps und korrespondierende modifizierte Sequenz. Die modifizierten Positionen sind grau unterlegt. Des Weiteren sind die Aminosäureposition im NS4B-Protein (22-49) und die Position im jeweiligen Heptad (a-g) angegeben. Welker MW, Welsch C, Meyer A, Antes I, Albrecht M, Forestier N et al. Dimerization of the hepatitis C virus nonstructural protein 4B depends on the integrity of an aminoterminal basic leucine zipper. *Protein Sci* 2010; 19(7):1327-1336.

Die mutierte bZIP-Sequenz wurde durch repetitive zielgerichtete Mutagenese (s. Kap. 3.2.4) in ein *FLAG*- und ein *MYC*-markiertes NS4B-Expressionsplamid implementiert. Hierzu wurden insgesamt 9 Alaninsubstitutionen an den Positionen „d“ (n=3), „e“ (n=4) und „g“ (n=2) eingeführt. Die korrekte Durchführung der Mutagenese wurde nach jedem Schritt mittels einer PCR unter Verwendung von geeigneten Plasmidprimern überprüft. Insgesamt standen nach erfolgter Mutagenese 4 Expressionsplasmide zur Verfügung, zwei Plasmide mit *MYC*-Erkennungsmotiv und je Wildtyp [NS4B+(m)] oder Mutante [NS4B-(m)] im Leuzinzippermotiv und zwei Plasmide mit *FLAG*-Erkennungsmotiv und ebenfalls Wildtyp [NS4B+(f)] oder Mutante [NS4B-(f)] im Leuzinzippermotiv.

4.4 Expressions-/Transfektionskontrolle

Um die Rolle des bZIP-Motivs bei der NS4B-Homodimerisation zu untersuchen, wurden HEK 293T-Zellen kotransfiziert mit gleichen Mengen verschiedener Paare der exprimierten Plasmide [NS4B+(m) und NS4B+(f); NS4B+(m) und NS4B-(f); NS4B-(m) und NS4B+(f); NS4B-(m) und NS4B-(f)].

4.5 NS4B-Interaktion

4.5.1 Kotransfektion/Koexpression

Die Expression jedes Plasmids in Gegenwart des jeweils anderen exprimierten Plasmids wurde mittels Immunoblotting der Lysate mit entweder *FLAG*- oder *MYC*-spezifischen Antikörpern in aufeinanderfolgenden experimentellen Schritten nachgewiesen (s. Abb. 8). Hierbei fanden sich bei keiner Kombination Hinweise für eine Störung der Expression der Plasmide durch das jeweils andere Plasmid oder durch Einführung der Mutation. Darüberhinaus führten wir eine Immunpräzipitation der Wildtyp- und modifizierten NS4B-Proteine mit folgendem Immunoblotting durch. Diese Ergebnisse zeigten ebenfalls keine Störung der Expression von Wildtyp- und modifizierten Plasmiden durch das jeweils andere Plasmid oder durch Einfügen der Mutation.

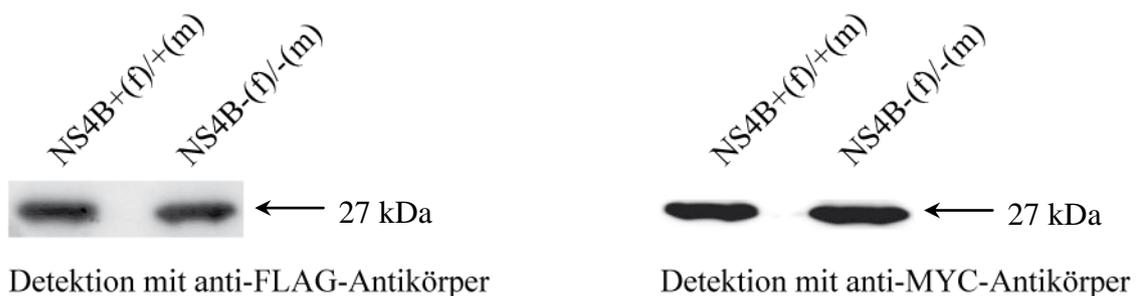


Abbildung 8 Kotransfektion/Koexpression.

Die Expression jedes Plasmids in Gegenwart des jeweils anderen exprimierten Plasmids wurde mittels Immunoblotting der Lysate mit entweder *FLAG*- oder *MYC*-spezifischen Antikörpern in aufeinanderfolgenden experimentellen Schritten nachgewiesen. Hierbei fand sich bei keiner Kombination ein Hinweis für eine Störung der Expression der Plasmide durch das jeweils andere Plasmid oder durch Einführung der Mutation. Darüberhinaus führten wir eine Immunpräzipitation der Wildtyp- und modifizierten NS4B-Proteine mit folgendem Immunoblotting durch. Diese Ergebnisse zeigten ebenfalls keine Störung der Expression von Wildtyp- und modifizierten Plasmiden durch das jeweils andere Plasmid oder durch Einfügen der Mutation.

4.5.2 Koimmunpräzipitation von NS4B+/NS4B+

Nach Kotransfektion der HEK 293T-Zellen mit zwei *full-length* NS4B exprimierenden Plasmiden des bZIP-Wildtyps, die sich nur durch ihr implementiertes Erkennungsmotiv unterschieden (*FLAG*-tag, *MYC*-tag), wurde eine Koimmunpräzipitation (Co-IP) der Lysate mit jeweils *FLAG*- oder *MYC*-spezifischen Antikörpern und mit folgendem Immunoblotting mit dem passenden Komplementärantikörper durchgeführt. Unabhängig von den Antikörpern, die für die Co-IP und das Immunoblotting verwendet wurden, wurde die Interaktion zwischen den verschiedenen NS4B-Molekülen mittels Immunoblotting des Bindungspartners mit dem komplementären Antikörper gezeigt. Die Verwendung des *MYC*-spezifischen Antikörpers für die Co-IP in Kombination mit dem *FLAG*-Antikörper für das Immunoblotting ergab hierbei die besten Ergebnisse, und wurde entsprechend in dieser Kombination für die folgenden Experimente weiter verwendet.

4.5.3 Koimmunpräzipitation von NS4B+/NS4B-

Ergänzend zu der Koimmunpräzipitation der Wildtypplasmide testeten wir verschiedene Kombinationen des *full-length* NS4B exprimierenden Plasmids, das entweder den Wildtyp oder eine modifizierte bZIP-Region enthielt. Hier zeigte sich, wenn nur ein NS4B-Molekül die mutierte bZIP-Region enthielt, wohingegen der Interaktionspartner das Wildtyp-bZIP-Motiv beinhaltete, eine schwächere Proteinproteininteraktion verglichen mit der Wildtyp/Wildtyp-Kombination (s. Abb. 9).

4.5.4 Koimmunpräzipitation mit NS4B-Mutanten

Im Vergleich mit der Kombination zweier NS4B-Moleküle mit dem Wildtyp war die Interaktion von zwei NS4B-Molekülen mit der modifizierten bZIP-Region undetektierbar in der Co-IP und dem Immunoblotting (s. Abb. 10).

Ergebnisse

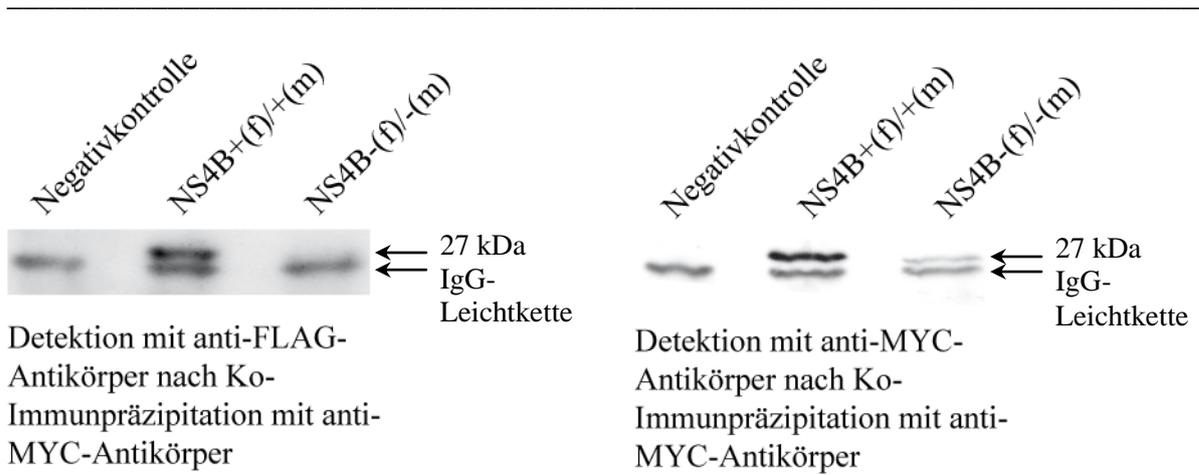


Abbildung 9 Koimmunpräzipitation I.

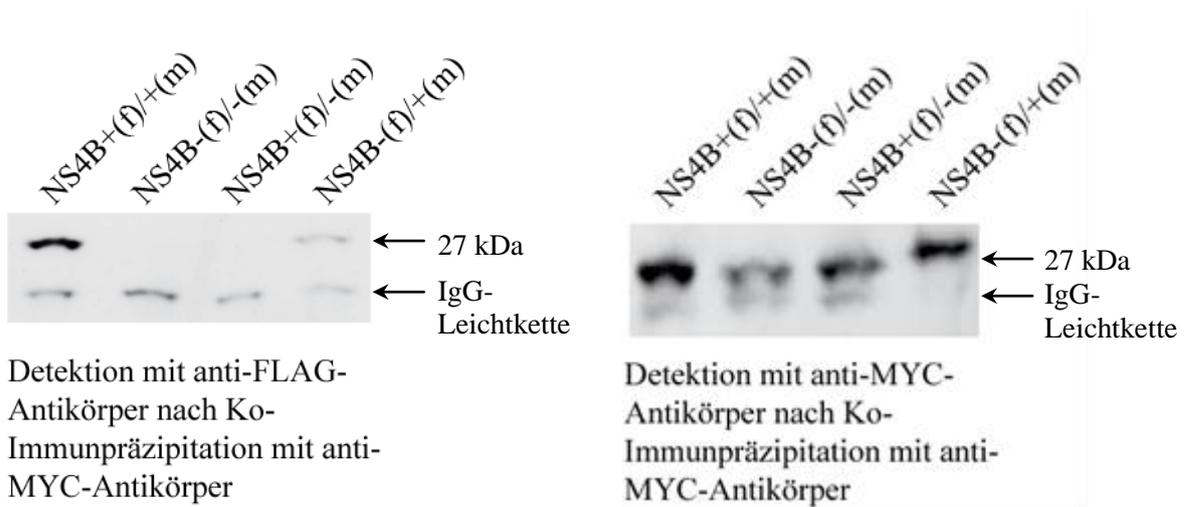


Abbildung 10 Koimmunpräzipitation II.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war der experimentelle Nachweis eines bislang nur in bioinformatischen Vorhersagemodellen prädizierten Proteinproteinbindungsmotivs im NS4B-Protein des Hepatitis-C-Virus, einem basischen Leuzinzipper (bZIP). Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Motiv, das nicht-kovalente Proteinbindungen vermitteln kann. Die Grundlage dieser bZIP-bZIP-Interaktion ist die Ausbildung eines hydrophoben Kerns zwischen interagierenden Motiven, beruhend auf aliphatischen Aminosäuren an bestimmten Positionen im bZIP-Motiv. Aminosäurepositionen außerhalb des Kerns sind vermutlich an der Bindung über mögliche Ioneninteraktionen (Salzbrücken) beteiligt.

5.1 Analyse und Nachweis des Proteinproteinbindungsmotivs

Es wurde ein Proteinexpressionssystem etabliert, bei dem eine Interaktion zwischen NS4B-Proteinen untereinander nachgewiesen werden konnte. Mit Hilfe von Mutationen in dem zu untersuchenden Strukturmotiv wurde dann die Bedeutung dieses Motivs für die NS4B-Dimerisation untersucht.

5.1.1 Entwicklung der Mutante des Proteinbindungsmotivs im NS4B

Bezogen auf HCV scheint das bZIP-Motiv am besten im HCV-Genotyp 1 konserviert zu sein, wohingegen es in den Genotypen 4 und 6 weniger konserviert ist (Welsch et al, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sequenz des Genotyps 1b verwendet (Welker et al, 2010). Das bZIP-Motiv ist im aminoterminalen Teil des NS4B-Proteins gelegen und überlappt mit einer amphipathischen Helix, deren Bedeutung für die subzelluläre Lokalisation des NS4B-Proteins von verschiedenen Gruppen gezeigt wurde (Hügler et al, 2001) (Gosert et al, 2003) (Egger et al, 2002) (Gouttenoire et al, 2010). Ziel war deswegen, die bZIP-Funktion abzuschwächen, aber die Struktur einer amphipathischen alpha-Helix zu erhalten. Basierend auf einem Strukturmodell und einer umfangreichen *in silico*-Sequenzanalyse wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Bioinformatik eine Aminosäuresequenz im bZIP-Motiv moduliert, die beiden Anforderungen gerecht wurde. Nicht-konservative Aminosäureaustausche an kritischen Positionen im bZIP-Motiv hätten wahrscheinlich zu

einer Alteration der bZIP-Funktion, aber eben auch der Helix, geführt. Deswegen sollte eine Abschwächung der bZIP-bZIP-Interaktion durch den Summationseffekt mehrerer Aminosäureaustausche erfolgen, die allein und zusammen Helix-erhaltend waren, in der Summe aber die bZIP-bZIP-Interaktion deutlich abschwächen würden. Deswegen wurde an verschiedenen Positionen, an denen das bZIP-Motiv eine hydrophile Aminosäure benötigt, Alanin eingeführt, da es sich hierbei um eine hydrophobe Aminosäure handelt, die häufig in amphipathischen Helices vorkommt (Welker et al, 2010). Ebenfalls in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut wurde dann eine dreidimensionale Struktur des bZIP-Motivs in der Wildtypform und der mutierten Form in einem Homologie-Modell kalkuliert und die 3D-Proteinstruktur des bZIP-Motivs simuliert. Basierend auf diesem Modell erfolgte zudem eine Berechnung der Interaktionsenergien für ein NS4B-bZIP-Homodimer aus zwei Wildtyp-Sequenzen, einer Wildtyp- und einer Mutationssequenz und zwei Mutationssequenzen. Die Differenz der Interaktionsenergien zum Wildtyp-Homodimer lag für das Wildtyp-Mutant-Heterodimer bei 302,76 kJ/mol und für das Mutant-Homodimer bei 596,01 kJ/mol. Aufgrund dieser Grundlage wurde entschieden, die Interaktion vollständiger NS4B-Proteine mit nativer und mutierter bZIP-Sequenz experimentell zu überprüfen.

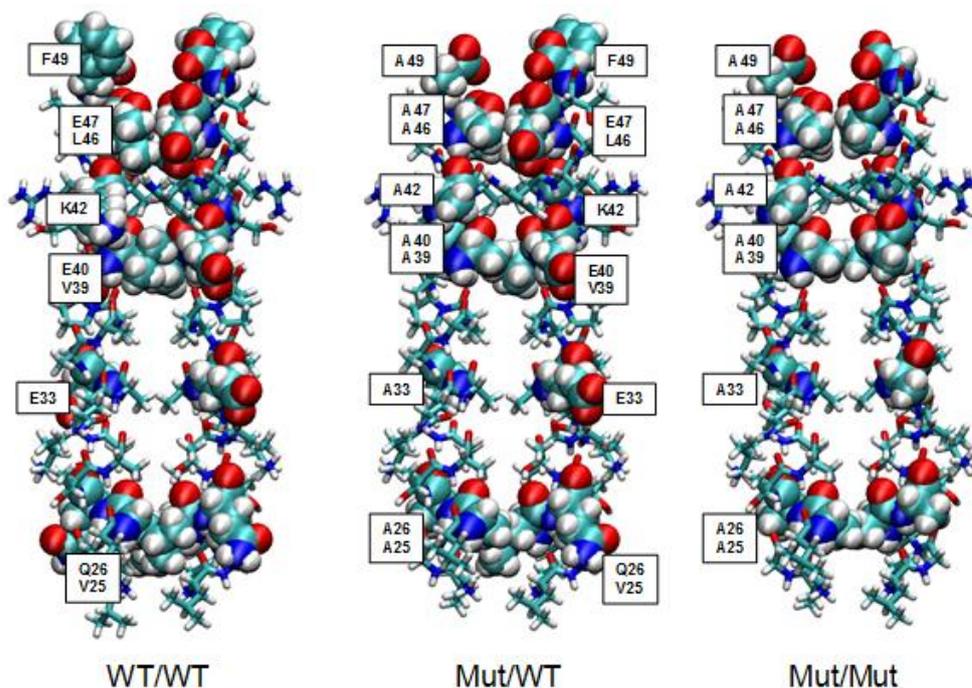


Abbildung 11 Modell der bZIP-bZIP-Interaktion für das Wildtyp(WT)-homodimer, das Wildtyp-Mutant(Mut)-Heterodimer und das Mutanten-Homodimer.

5.1.2 Zielgerichtete Mutagenese von HCV-Sequenzen

Als Grundlage für die Expressionsversuche wurde ein NS4B-Expressionsplasmid verwendet, das für das vollständige NS4B-Protein kodiert (Tong et al, 2002). Dieses Expressionplasmid enthielt kein Erkennungsmotiv. Um die korrekte Detektion des Proteins zu gewährleisten, wurden deswegen zusätzlich unterschiedliche Oligonukleotide, kodierend für das *FLAG*-Motiv und das *MYC*-Motiv implementiert. Die Erkennungsmotive wurden anschließend an das carboxyterminale Ende des NS4B-Proteins mittels zielgerichteter Mutagenese eingeführt, um eventuelle Wechselwirkungen mit dem am aminoterminalen Ende gelegenen bZIP-Motiv zu minimieren. Die in bioinformatischen Analysen entwickelte Mutationssequenz wurde ebenfalls über zielgerichtete Mutagenese implementiert.

Das Hepatitis-C-Virus weist eine komplexe RNA-Architektur mit Sekundärstrukturelementen auf (Ashfaq et al, 2011). Hierdurch ist die Primerbindung oftmals erschwert und für diagnostische Verfahren werden deswegen Regionen mit geringerer Sekundärstrukturbildung gewählt. Bei der hier vorliegenden Arbeit erfolgten alle Mutageneseschritte in einem DNA-Expressionsplasmid. Auch bei Vervielfältigung von DNA können jedoch Sekundärstrukturen ein Problem bei der Primerbindung darstellen. Zudem sind bei der Generation von Primern weitere Besonderheiten zu beachten. So sollten alle 4 Basen gleich häufig vertreten sein, Sequenzen mit repetitiven Motiven sollten vermieden werden und die Primerenden sollten weder intra- noch intermolekular komplementäre Sequenzen aufweisen (Newton, Graham, 1994). Bei der hier vorliegenden Arbeit waren die Primerbindungsregionen hingegen durch die Lage des bZIP-Motivs vorgegeben. Obwohl die zielgerichtete Mutagenese eine etablierte molekularbiologische Methode darstellt, wurden deswegen hohe technische Anforderungen an die Durchführung jedes einzelnen Mutageneseschritts gestellt. Da eine Veränderung der Primersequenz respektive der Primerlage aus dargelegten Gründen nicht möglich war, musste mehrfach die Modifikation der Versuchsbedingungen erfolgen, um die Mutagenese erfolgreich durchführen zu können. Zur unspezifischeren Bindung wurde die *Annealing*-Temperatur herabgesetzt, zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid die Zyklenzahl erhöht. Zudem erfolgte eine Erfolgskontrolle nach jedem Mutageneseschritt durch Sequenzierung. Insbesondere wurden unspezifische Amplifikationen nach Transformation in superkompetenten Zellen durch Sequenzierung detektiert bzw. ausgeschlossen.

5.1.3 Kotransfektion und -expression der verschiedenen Expressionsplasmide

Zur Transfektion wurde das Verfahren der Lipofektion gewählt, ein biologisches Verfahren, das im Vergleich zu chemischen Verfahren eine bis zu hundertfach gesteigerte Transfektionsrate erreicht. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde zunächst die Konzentration der Plasmide gemessen und jeweils 3µg der Plasmid-DNA zur Transfektion eingesetzt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurden zudem Zellen mit GFP transfiziert, das die Effizienz der Transfektion durch Fluoreszenz unter grünem Licht anzeigt. Für die Transfektionsversuche wurden Zellen der Linie HEK 293T verwendet, da die Transfektion für diese adhärent wachsenden, humanen, embryonalen Nierenzellen sehr gut standardisiert ist.

Um eine Störung der Expression der Plasmide in den Zellen durch die eingefügte Mutation auszuschließen, wurden Expressionskontrollen durchgeführt, die keine Beeinflussung der Expressionseffizienz durch Einfügen der Mutation bzw. der Erkennungsmotive zeigten. Ebenso konnte durch gleichzeitige Transfektion verschiedener Plasmide in einer Zelle keine Beeinflussung der Expressionseffizienz nachgewiesen werden. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurden zudem Negativkontrollen aufgetragen, die lediglich ein Zelllysat mit GFP transfizierten Zellen enthielten.

5.1.4 Nachweis der Bedeutung des bZIP-Motivs für Proteinproteininteraktionen

Der Nachweis von Proteinproteininteraktionen kann über verschiedene Verfahren erfolgen, z.B. über eine Koimmunpräzipitation oder über das Förster-Resonanz-Energietransferverfahren (Truong et al, 2001). Bei letzterem kann eine Beobachtung der Proteinproteininteraktion *in vivo* und in Echtzeit erfolgen. Hierzu sind jedoch aufwendige Softwareprogramme und Auswertungen nötig. Bei der Koimmunpräzipitation handelt es sich um ein etabliertes und allgemein anerkanntes Verfahren. Ein wichtiger Aspekt bei der Auswahl dieser Methode ist, dass Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins im Regelfall erhalten sind.

Mögliche Fehlerquellen bei der Koimmunpräzipitation sind Modifikation oder sogar ein Abbau der Proteine im Rahmen der Zellyse. Zudem können Proteine direkt an die Sepharose

oder die Oberfläche der Reaktionsgefäße binden, so dass sowohl falsch negative als auch falsch positive Ergebnisse möglich sind. Zum sicheren Nachweis des NS4B-Proteins erfolgte deswegen eine Detektion über das Erkennungsmotiv und eine Kontrolle über Längenmarker in der Immunoblotanalyse. Aufgrund eines Molekulargewichts des NS4B-Proteins von 27 kDa lag die entsprechende Bande im Immunoblot sehr nahe der leichten Kette der Gammaglobulinantikörper mit einem Molekulargewicht von 25 kDa. Entsprechend war eine Variierung des Protokolls mit geänderter Zusammensetzung des Trenngels und längerer Laufzeit nötig, um eine optimale Auftrennung der Banden zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit konnte in mehreren unabhängigen Versuchsreihen eine Interaktion von NS4B-Proteinen in der Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden. Dies ist zudem plausibel, weil eine NS4B-NS4B-Interaktion auch von anderen Gruppen gezeigt wurde (Tong et al 2002) (Paul et al, 2011). Formal konnte durch den Versuchsaufbau aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion zwischen den NS4B-Proteinen über einen dritten Bindungspartner vermittelt wurde. Zudem beruhte die bioinformatische Modellierung auf einem NS4B-Dimer. Obwohl diese Interaktion durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche experimentell bestätigt wurde, ist nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen, dass mehr als zwei NS4B-Proteine an der Interaktion beteiligt waren.

Bedeutsam ist der Nachweis einer verminderten NS4B-NS4B-Interaktion für Wildtyp-Mutant- und insbesondere Mutant-Mutant-Kombinationen. Unabhängig davon, ob die NS4B-NS4B-Interaktion wie im bioinformatischen Modell vorhergesagt direkt erfolgt oder ob ein weiterer Bindungspartner existiert, konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein intaktes bZIP-Motiv entscheidend für diese Interaktion ist. Eine Alteration anderer Motive im aminoterminalen Anteil durch die Mutationen kann zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, erscheint aber aufgrund der den Mutationen zugrunde liegenden bioinformatischen Analysen unwahrscheinlich (Welker et al, 2010). In der Modellierung der Interaktionsenergien (Welker et al, 2010) zeigte sich ein gradueller Anstieg ausgehend von dem Wildtyp-Homodimer über das Wildtyp-Mutanten-Heterodimer und das Mutanten-Homodimer. Dementsprechend stellte das NS4B-bZIP-Wildtyp-Homodimer das dreidimensionale Strukturmodell mit der niedrigsten Interaktionsenergie dar, wohingegen das Mutantenhomodimer in der Modellierung hinsichtlich der Interaktionsenergien am

instabilsten war. Das Heterodimer aus Wildtyp und einem Mutanten-NS4B-bZIP-Motiv zeigte einen mittleren Energiewert. Bei näherer Betrachtung der verschiedenen Strukturmodelle konnte beobachtet werden, dass die Seitenketten im hydrophoben Kern des bZIP bei dem Wildtyp-Homodimer am dichtesten gepackt waren, verbunden mit der größten Interaktionsoberfläche, wohingegen beides über die Heterodimere zu den Mutanten-Homodimeren graduell geringer wurde (Welker et al, 2010).

Passend hierzu fand sich bei dem Wildtyp-Mutanten-Heterodimer in einigen Versuchen eine aufgehobene und in einigen eine im Vergleich zum Wildtyp-Homodimer deutlich reduzierte NS4B-NS4B-Interaktion, während zwischen zwei mutierten Proteinen in keinem Versuch eine Interaktion nachweisbar war.

Zusammenfassend konnte mit dem bei dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau die Bedeutung des HCV NS4B-bZIP-Motivs für die biologisch bedeutsame NS4B-NS4B-Interaktion gezeigt werden. Es handelt sich zudem um die erste experimentelle Bestätigung des HCV-NS4B-bZIP-Motivs *in vitro*.

5.2 Mögliche Bedeutung des bZIP-Motivs für den viralen Replikationszyklus

Die Bedeutung des HCV-NS4B-Proteins war lange Zeit unklar. Es handelt sich um ein hydrophobes Protein, weswegen es bisher nicht gelungen ist, eine für Röntgenstrukturanalysen notwendige Kristallisationsstruktur herzustellen. Modelle zu Sekundärstrukturelementen beruhen deswegen auf bioinformatischen Vorhersagen mit zusätzlicher experimenteller Bestätigung (Lundin et al, 2003).

Am Endoplasmatischen Retikulum (ER) induziert NS4B netzartige Veränderungen, den Ort der viralen Replikation (Egger et al, 2002) (Gosert et al, 2003) (Einav et al, 2004). Die Verankerung des NS4B im ER erfolgt über 4-5 transmembranäre Domänen im mittleren Abschnitt des NS4B-Proteins (Lundin et al, 2003). Deswegen wird NS4B als Membrananker für den Replikationskomplex angesehen. Die Interaktion zwischen verschiedenen NS4B-Proteinen ist entscheidend für die Ausbildung der Veränderungen am ER (Paul et al, 2011).

Neuere Untersuchungen legen weiterhin nahe, dass NS4B während des Replikationszyklus mit Proteinen verschiedener intrazellulärer Netzwerke interagiert (Tripathi et al, 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen experimentell die bioinformatisch modulierte NS4B-Interaktion auf dem Boden einer bZIP-bZIP-Interaktion. Das bZIP-Motiv des NS4B-Proteins von HCV befindet sich in einer Region aus einer amphipathischen alpha-Helix, die die Membranassoziation vermittelt (Elazar et al, 2004) (Gouttenoire et al, 2009). Gouttenoire et al. postulierten die transmembranäre Orientierung der amphipathischen alpha-Helix zwischen Aminosäure 42 und 66, wahrscheinlich assoziiert mit einer Oligomerisierung, und eine potentielle Multifunktionalität dieser Region (Gouttenoire et al, 2009). Zudem wurde in einer aktuellen Arbeit gezeigt, dass auch der carboxyterminale Teil von NS4B für die NS4B-NS4B-Interaktion von Bedeutung ist (Paul et al, 2011). Da die NS4B-Dimerisation mit folgender Alteration des ER *in vivo* ein komplexer Prozess sein dürfte, ist es nicht unwahrscheinlich, dass verschiedene Regionen in diesen Prozess involviert sind. Deswegen stellen diese Ergebnisse keinen Widerspruch, sondern eine Ergänzung zu unseren Ergebnissen dar.

Darüber hinaus wird diskutiert, dass das aminoternale Ende des HCV-NS4B, das die ersten 33 Aminosäuren enthält, die Fähigkeit besitzt, wenigstens zu einem Teil ins ER-Lumen zu translozieren (Lundin et al, 2003) (Lundin et al, 2006). So wäre eine Interaktion des NS4B-bZIP-Motivs auch mit Proteinen des ER denkbar. In der Tat wurde eine Interaktion zwischen NS4B und den aktivierenden Translokationsfaktoren ATF6- α und - β beschrieben, die ebenfalls ein bZIP-Motiv enthalten (Tong et al, 2002). Hierbei handelt es sich um zelluläre Proteine, die im ER lokalisiert sind und in den Kern translozieren und somit den „*unfolded protein response*“ (UPR) modulieren können. Dieser stellt eine Reaktion der Zelle auf ER-Stress dar, wie er z.B. bei Virusinfektionen mit Replikation am ER - wie der HCV-Infektion - entsteht. Es existieren verschiedene Theorien, wie der UPR moduliert werden kann (Zheng et al, 2005) (Lai et al, 2007) (Li et al, 2009). Um die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER zu verhindern, kommt es u.a. zur Aktivierung von ATF6. Der UPR wird durch HCV aktiviert und insbesondere NS4B stellt einen Aktivator dar (Li et al, 2009). Ob die NS4B-induzierte UPR-Aktivierung über eine bZIP-vermittelte Interaktion mit ATF6- α oder - β erfolgt, sollte in Folgearbeiten untersucht werden. Zumindest für das Zytomegalievirus ist bekannt, dass eine

viral bedingte Modulation des UPR zur Steigerung der viralen Replikationseffizienz möglich ist (Isler et al, 2005).

Einzelne Aminosäuremutationen im NS4B beeinflussen zudem die Replikationseffizienz in (subgenomischen) Replikonsystemen (Krieger et al, 2001) (Kato et al, 1990) (Namba et al, 2004). So führt beispielsweise der Austausch einzelner Aminosäuren im carboxyterminalen Teil von NS4B durch die Aminosäure Alanin zu einer Abschwächung der Replikationseffizienz (Jones et al, 2009). Zudem konnte eine Modifikation der Replikationseffizienz in einem Zellkultursystem gezeigt werden (Paredes et al, 2008). Anhand von Mutationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass durch Substitution von Glutamin durch Histidin im Bereich des vermuteten Leuzinzipers die Funktion von NS4B und die Entwicklung einer Interferonresistenz mit beeinflusst werden konnte (Namba et al, 2004). Hierbei ermöglichte der Austausch eines neutralen Glutaminrests durch die basische Aminosäure Histidin die Bildung von zusätzlichen Salzbrücken an einer Schlüsselposition der bZIP-Domäne, die möglicherweise zu einer effektiveren Heterodimerbildung mit potentiellen Interaktionspartnern führt. Insgesamt legen diese Daten eine mögliche Bedeutung des bZIP-Motivs für die virale Replikationseffizienz nahe. Eine Messung der viralen Replikationseffizienz im Replikonmodell für verschiedene Mutationen wird derzeit von Welker et al. untersucht. Erste Ergebnisse lassen hierbei auf eine Modulation der Replikationseffizienz durch Mutationen in der bZIP-Region von NS4B schließen (Welker et al, 2012). Hier sind jedoch weitere Arbeiten erforderlich, bevor endgültige Schlussfolgerungen gezogen werden können.

Momentan stellt das in dieser Arbeit erstmals experimentell bestätigte bZIP-Motiv das einzige Kandidatenmotiv im HCV-NS4B-Protein dar, das Proteinproteininteraktionen vermitteln könnte. Interaktionspartner könnten deswegen auch über die Suche und Identifikation von bZIP-Motiven in viralen und zellulären Proteinen erfolgen.

5.3 Ausblick

Die bisherige Standardtherapie in der Behandlung der chronischen Hepatitis C besteht in einer Kombination aus pegyliertem Interferon-alpha und Ribavirin. Hiermit ist eine Heilung im Sinne eines anhaltenden virologischen Ansprechens 24 Wochen nach Therapieende bei knapp der Hälfte aller Patienten mit Genotyp 1 und bei etwa 80% der Patienten mit Genotyp 2 oder 3-Infektion möglich (Sarrazin et al, 2010). Aufgrund dessen sind derzeit Medikamente in Entwicklung, die unmittelbar in den HCV-Replikationszyklus eingreifen, um eine Verbesserung der Heilungsraten sowie eine Verminderung therapieassoziierter Nebenwirkungen zu erreichen (Lange, Sarrazin, Zeuzem, 2010). Am weitesten fortgeschritten in der klinischen Entwicklung sind die Proteaseinhibitoren. Aus dieser Stoffklasse wurden 2011 die beiden Medikamente Boceprevir und Telaprevir durch die amerikanische und europäische Zulassungsbehörde zur Behandlung der HCV-Genotyp 1-Infektion zugelassen (Poordad et al, 2011) (Bacon et al, 2011) (Jacobson et al, 2011) (Sherman et al, 2011) (Zeuzem et al, 2011).

Einen neuen Therapieansatz stellen NS4B-Inhibitoren dar. Diese wurden bislang nur in vitro untersucht und binden im aminoterminalen Teil von NS4B (Cho et al, 2010) (Dvory-Sobol et al, 2010) (Bryson et al, 2010) (Einav et al, 2008). Zwei Mutationen, A48Q und Q26R, die als Resistenz-assoziiert identifiziert wurden, sind innerhalb des HCV-NS4B-bZIP-Motivs lokalisiert. Die Kenntnis dieses Motivs könnte zu einem gerichteten Design neuer NS4B-Inhibitoren beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. **Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor.** Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96:12766-71.
2. Alberti A. **Diagnosis of hepatitis C. Facts and perspectives.** J Hepatol. 1991; 12:279-82.
3. Aligo J, Jia S, Manna D, Konan KV. **Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein.** Virology. 2009; 393:68-83.
4. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. **An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses.** Virol J. 2011; 8:161.
5. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, Goodman ZD, Sings HL, Boparai N, Burroughs M, Brass CA, Albrecht JK, Esteban R; HCV RESPOND-2 Investigators. **Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection.** N Engl J Med. 2011; 364:1207-17.
6. Bartenschlager R, Lohmann V. **Replication of hepatitis C virus.** J Gen Virol. 2000; 81:1631-48.
7. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. **Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence.** Adv Virus Res. 2004; 63:71-180.
8. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. **Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor.** J Biol Chem. 2003; 278:41624-30.
9. Bell J, Batey RG, Farrell GC, Crewe EB, Cunningham AL, Byth K. **Hepatitis C virus in intravenous drug users.** Med J Aust. 1990; 153:274-6.

10. Berg T, Hopf U, Stark K, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E. **Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters.** J Hepatol. 1997; 26:484-91.
11. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. **Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture.** Science. 2000; 290:1972–74.
12. Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. **Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication.** J Virol. 2002; 76:13001–14.
13. Bolumar F, Hernandez-Aguado I, Ferrer L, Ruiz I, Aviño MJ, Rebagliato M. **Prevalence of antibodies to hepatitis C in a population of intravenous drug users in Valencia, Spain, 1990-1992.** Int J Epidemiol. 1996; 25:204-9.
14. Bryson PD, Cho NJ, Einav S, Lee C, Tai V, Bechtel J, Sivaraja M, Roberts C, Schmitz U, Glenn JS. **A small molecule inhibits HCV replication and alters NS4B's subcellular distribution.** Antiviral Res. 2010; 87:1-8.
15. Cho NJ, Dvory-Sobol H, Lee C, Cho SJ, Bryson P, Masek M, Elazar M, Frank CW, Glenn JS. **Identification of a class of HCV inhibitors directed against the nonstructural protein NS4B.** Sci Transl Med. 2010; 2:15.
16. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. **Isolation of a c-DNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.** Science. 1989; 244:359-62.
17. Delwaide J, Bourgeois N, Gerard C et al. **Treatment of acute hepatitis C with interferon alpha-2b: early initiation of treatment is the most effective predictive factor of sustained viral response.** Aliment Pharmacol Ther. 2004; 20: 15-22.
18. Dienstag JL. **Sexual and perinatal transmission of hepatitis C.** Hepatology. 1997; 26:66-70.
19. Dvory-Sobol H, Pang PS, Glenn JS. **The Future of HCV Therapy: NS4B as an Antiviral Target.** Viruses. 2010; 2:2481-92.

20. Egger D, Wölk B, Gosert L, Bianchi H, Blum E, Moradpour D and Bienz K. **Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex.** J Virol. 2002; 76: 5974-84.
21. Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS. **A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication.** J Virol. 2004; 78:11288–95.
22. Einav S, Gerber D, Bryson PD, Sklan EH, Elazar M, Maerkl, SJ, Glenn JS, Quake SR. **Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis.** Nat Biotechnol. 2008; 26:1019-27.
23. Einav S, Sklan EH, Moon HM, Gehrig E, Liu P, Hao Y, Lowe AW, Glenn JS. **The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection.** Hepatology. 2008; 47:827-35.
24. Einav S, Sobol HD, Gehrig E, Glenn JS. **The hepatitis C virus (HCV) NS4B RNA binding inhibitor clemizole is highly synergistic with HCV protease inhibitors.** J Infect Dis. 2010; 202:65-74.
25. Elazar M, Liu P, Rice CM, Glenn JS. **An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication.** J Virol. 2004; 78:11393–400.
26. Francki RIB, Fauquet C, Knudson D. **Classification and Nomenclature of Viruses: 5th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Springer. 1991.
27. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. **Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection.** N Engl J Med. 2002; 347:975-82.

28. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. **Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion.** J Virol. 2008; 82:2120-9.
29. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R et al. **Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance.** Gastroenterology. 2003; 125:80-88
30. Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E. **Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption.** J Med Virol. 2002; 68:206-15.
31. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D. **Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons.** J Virol. 2003; 77:5487–92.
32. Gouttenoire J, Castet V, Montserret R, Arora N, Raussens V, Ruyschaert JM, Diesis E, Blum HE, Penin F, Moradpour D. **Identification of a novel determinant for membrane association in hepatitis C virus nonstructural protein 4B.** J Virol. 2009; 83:6257–68.
33. Gouttenoire J, Penin F, Moradpour D. **Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory.** Rev Med Virol. 2010; 20:117-29.
34. Grobler JA, Markel EJ, Fay JF, Graham DJ, Simcoe AL, Ludmerer SW, Murray EM, Migliaccio G, Flores OA. **Identification of a key determinant of hepatitis C virus cell culture adaptation in domain II of NS3 helicase.** J Biol Chem. 2003; 278:16741–46.
35. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM; PEGASYS International Study Group. **Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose.** Ann Intern Med. 2004; 140:346-55.

36. Herrine SK. **Approach to the patient with chronic hepatitis C virus infection.** Ann Intern Med. 2002; 136:747-57.
37. Hoofnagle JH. **Course and outcome of hepatitis C.** Hepatology. 2002; 36:521-29.
38. Hoofnagle JH. **Hepatitis C: the clinical spectrum of disease.** Hepatology. 1997; 26:15-20.
39. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA. **Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles.** Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100:7271-6.
40. Huang Y, Staschke K, De Francesco R, Tan SL. **Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication?** Virology. 2007; 364:1-9.
41. Hügle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Kräusslich HG, Rice CM, Blum HE and Moradpour D. **The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmatic reticulum membrane protein.** Virology. 2001; 284:70-81.
42. Isler J, Skalet AH, Alwine JC. **Human Cytomegalovirus Infection Activates and Regulates the Unfolded Protein Response.** J Virol. 2005; 79:6890-6899.
43. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, Muir AJ, Ferenci P, Flisiak R, George J, Rizzetto M, Shouval D, Sola R, Terg RA, Yoshida EM, Adda N, Bengtsson L, Sankoh AJ, Kieffer TL, George S, Kauffman RS, Zeuzem S; ADVANCE Study Team. **Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection.** N Engl J Med. 2011; 364:2405-16.
44. Jones DM, Patel AH, Targett-Adams P, McLauchlan J. **The hepatitis C virus NS4B protein can transcomplement viral RNA replication and modulates production of infectious virus.** J Virol. 2009; 83:2163-77.

45. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. **Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis.** Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87:9524–28.
46. Kato N, Yokosuka O, Omata M, Hosoda K, Ohto M. **Detection of hepatitis C virus ribonucleic acid in the serum by amplification with polymerase chain reaction.** J Clin Invest. 1990; 86:1764-7.
47. Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM, **Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA.** J Virol. 1996; 70:3363-71.
48. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. **Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations.** J Virol. 2001; 75:4614–24.
49. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. **Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response.** Physiology. 2007; 22:193-201.
50. Lange CM, Sarrazin C, Zeuzem S. **Review article: specifically targeted anti-viral therapy for hepatitis C - a new era in therapy.** Aliment Pharmacol Ther. 2010; 32:14-28.
51. Leruez-Ville M, Kunstmann JM, De Almeida M, Rouzioux C, Chaix ML. **Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men.** Lancet. 2000; 356:42-3.
52. Li S, Ye L, Yu X, Xu B, Li K, Zhu X, Liu H, Wu X, Kong L. **Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF- κ B activation.** Virology. 2009; 391:257-64.
53. Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, Penin F, Bartenschlager R. **Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture.** J Virol. 2003; 77:3007–19.

54. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. **Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line.** Science. 1999; 285:110-3.
55. Lundin M, Lindstrom H, Gronwall C, Persson MA. **Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein.** J Gen Virol. 2006; 87:3263–72.
56. Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA. **Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B.** J Virol. 2003; 77:5428–38.
57. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC et al. **Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial.** Lancet. 2001; 358: 958–65.
58. Manns MP, Rambusch EG. **Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection.** J Hepatol. 1999; 31:39-42.
59. McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM, **Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene.** Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104:2879-84.
60. Meertens L, Bertaux C, Dragic T. **Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles.** J Virol. 2006; 80:11571-8.
61. Namba K, Naka K, Dansako H, Nozaki A, Ikeda M, Shiratori Y, Shimotohno K, Kato N. **Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype.** Biochem Biophys Res Commun. 2004; 323:299–309.
62. Newton CR, Graham A. **PCR.** Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 1994; Heidelberg; Berlin, Oxford. S. 40-45.).

63. Nomura H, Sou S, Tanimoto H, Nagahama T, Kimura Y, Hayashi J, Ishibashi H, Kashiwagi S. **Short-term interferon-alpha therapy for acute hepatitis C: a randomized controlled trial.** *Hepatology.* 2004; 39:1213-19.
64. Paredes AM, Blight KJ. **A genetic interaction between hepatitis C virus NS4B and NS3 is important for RNA replication.** *J Virol.* 2008; 82:10671–83.
65. Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. **Hepatitis C virus non-structural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway.** *J Biol Chem.* 2009; 284:9237-46.
66. Park JS, Yang JM, Min MK. **Hepatitis C virus nonstructural NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 267:581-7.
67. Patti AM, Santi AL, Pompa MG, Giustini C, Vescia N, Mastroeni I, Fara GM. **Viral hepatitis and drugs: a continuing problem.** *Int J Epidemiol.* 1993; 22:135-9.
68. Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, Moradpour D, Bartenschlager R. **NS4B Self-Interaction through Conserved C-Terminal Elements Is Required for the Establishment of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes.** *J Virol.* 2011; 85:6963-76.
69. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. **Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells.** *Nature.* 2009; 457:882-6.
70. Poordad F, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki JP; SPRINT-2 Investigators. **Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection.** *N Engl J Med.* 2011; 364:1195-206.

71. Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, Millian SJ. **Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus.** Lancet. 1974; 2:241-6.
72. Robert-Koch-Institut, **Epid Bull 2010**; 20:183-4.
73. Ross RS, Viazov S, Renzing-Köhler K, Roggendorf M. **Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes.** J Med Virol. 2000; 60:122-5.
74. Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. **Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor.** Nat Med. 2012; 18:281-5.
75. Santantonio T, Fasano M, Sinisi E et al. **Efficacy of a 24-week course of PEG-interferon alpha-2b monotherapy in patients with acute hepatitis C after failure of spontaneous clearance.** J Hepatol. 2005; 42:329-33.
76. Sarrazin C, Berg T, Dollinger MM, Zeuzem S et al. **Update der S3-Leitlinie Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis C-Infektion.** Z Gastroenterol. 2010; 48:289-351.
77. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. **The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus.** EMBO J. 2002; 21:5017-25.
78. Seef LB. **Natural history of chronic hepatitis C.** Hepatology. 2002; 36:535-46.
79. Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH. **Response-Guided Telaprevir Combination Treatment for Hepatitis C Virus Infection.** N Engl J Med. 2011; 365:1014-24.
80. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B et al. **Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of**

- subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region.** J Gen Virol. 1993; 74:2391-9.
81. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. **Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions.** J Gen Virol. 1994; 75:1053-61.
82. Stark K, Schreier E, Müller R, Wirth D, Driesel G, Bienzle U. **Prevalence and determinants of anti-HCV seropositivity and of HCV genotype among intravenous drug users in Berlin.** Scand J Infect Dis. 1995; 27:331-7.
83. Strauss HM, Keller S. **Pharmacological interference with protein-protein interactions mediated by coiled-coil motifs.** Handb Exp Pharmacol. 2008; 186:461-82.
84. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K, **Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome.** J Virol. 1996; 70:3307-12.
85. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV, Quinn TC. **Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore—an analysis of 309 sex partnerships.** J Infect Dis. 1995; 171:768-75.
86. Thompson AA, Zou A, Yan J, Duggal R, Hao W, Molina D, Cronin CN, Wells PA. **Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus non-structural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity.** Biochemistry. 2009; 48:906-16.
87. Tong WY, Nagano-Fujii M, Hidajat R, Deng L, Takigawa Y, Hotta H. **Physical interaction between hepatitis C virus NS4B protein and CREB-RP/ATF6-beta.** Biochem Biophys Res Commun. 2002; 299:366-72.

88. Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K. **Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions.** Mol Biosyst. 2010; 6:2539-53.
89. Truong K, Ikura M. **The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo.** Curr Opin Struct Biol. 2001; 11:573-8.
90. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD, **Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame.** RNA. 2001; 7:710-21.
91. Wang AG, Moon HB, Kim JM et al. **Expression of hepatitis C virus nonstructural 4B in transgenic mice.** Exp Mol Med. 2006; 38:241-246.
92. Wedemeyer H, Jackel E, Wiegand J et al. **Whom? When? How? Another piece of evidence for early treatment of acute hepatitis C.** Hepatology. 2004; 39:1201-3.
93. Welker MW, Hofmann WP, Welsch C, von Wagner M, Herrmann E, Lengauer T, Zeuzem S, Sarrazin C. **Correlation of amino acid variations within nonstructural 4B protein with initial viral kinetics during interferon-alpha-based therapy in HCV-1b-infected patients.** J Viral Hepat. 2007; 14:338-49.
94. Welker MW, Welsch C, Meyer A, Antes I, Albrecht M, Forestier N et al. **Dimerization of the hepatitis C virus nonstructural protein 4B depends on the integrity of an aminoterminal basic leucine zipper.** Protein Science. 2010; 19:1327-1336.
95. Welker MW, Susser S, Welsch C, Perner D, Füller C, Kronenberger B, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C. **Modulation of replication efficacy of the hepatitis C virus replicon Con1 by site-directed mutagenesis of an NS4B aminoterminal basic leucine zipper.** Submitted to J Viral Hepat. 2012.

96. Welsch C, Albrecht M, Maydt J, Herrmann E, Welker MW, Sarrazin C, Scheidig A, Lengauer T, Zeuzem S. **Structural and functional comparison of the non-structural protein 4B in flaviviridae.** J Mol Graph Model. 2007; 26:546–57.
97. WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. **Global surveillance and control of hepatitis C.** J Viral Hepat. 1999; 6:35-47.
98. Xu J, Lu S, Xu Y et al. **Identification of the non-structural protein 4B of hepatitis C virus as a factor that inhibits the antiviral activity of interferon-alpha.** Virus Res. 2009; 141:55-62.
99. Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J, **In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone.** Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96:2291-5.
100. Yu GQ, Lee KJ, Gao L and Lai MM. **Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein.** J Virol. 2006; 80:6013-23.
101. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, Younossi Z, Foster GR, Horban A, Ferenci P, Nevens F, Müllhaupt B, Pockros P, Terg R, Shouval D, van Hoek B, Weiland O, Van Heeswijk R, De Meyer S, Luo D, Boogaerts G, Polo R, Picchio G, Beumont M; REALIZE Study Team. **Telaprevir for retreatment of HCV infection.** N Engl J Med. 2011; 364:2417-28.
102. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J et al. **Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C.** N Engl J Med. 2000; 343: 1666–72.
103. Zheng Y, Gao B, Ye L et al. **Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response.** J Microbiol. 2005; 43:529-36.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Darstellung des HCV-Genoms (modifiziert nach: <i>Sarrazin C et al. Hepatitis C-Virus - Viruskinetik und Resistenzmechanismen. Z Gastroenterol 2004; 42:387-396</i>).	12
Abbildung 2	Aufbau des NS4B-Proteins (modifiziert nach: <i>Paul et al, 2011. TM: Transmembrandomäne; AH: aminoternale amphipathische Helix; H: carboxyterminale alpha-Helix</i>).	18
Abbildung 3	Durch Sequenzierung bestimmte Nukleotidsequenz des NS4B-kodierenden Abschnitts im NS4B-Expressionsplasmid. Die NS4B-Sequenz inklusive des diese begrenzenden Stop-Kodons ist durch Fettdruck und der bZIP-Abschnitt durch Unterstrich hervorgehoben.	50
Abbildung 4	Abgeleitete Aminosäuresequenz des NS4B-Proteins im Expressionsplasmid (AS-Position: Aminosäureposition im NS4B-Protein; AS-Sequenz: Aminosäuresequenz).	50
Abbildung 5	Nukleotidsequenz der Erkennungsmotive.	51
Abbildung 6	Aminosäuresequenz der Erkennungsmotive.	51
Abbildung 7	Sequenz des bZIP-Motivs des Wildtyps und korrespondierende modifizierte Sequenz. Die modifizierten Positionen sind grau unterlegt. Des Weiteren sind die Aminosäureposition im NS4B-Protein (22-49) und die Position im jeweiligen Heptad (a-g) angegeben. <i>Welker MW, Welsch C, Meyer A, Antes I, Albrecht M, Forestier N et al. Dimerization of the hepatitis C virus nonstructural protein 4B depends on the integrity of an aminoterminal basic leucine zipper. Protein Sci 2010; 19(7):1327-1336</i>	52
Abbildung 8	Kotransfektion/Koexpression.	53
Abbildung 9	Koimmunpräzipitation I.	55
Abbildung 10	Koimmunpräzipitation II.	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 11	Modell der bZIP-bZIP-Interaktion für das Wildtyp(WT)-homodimer, das Wildtyp-Mutant(Mut)-Heterodimer und das Mutanten-Homodimer.....	57
--------------	---	----

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Geräte und Einwegmaterialien	23
Tabelle 2	Allgemeine Chemikalien	23
Tabelle 3	Molekularbiologische Chemikalien	24
Tabelle 4	Fertige Reagenziensets	24
Tabelle 5	Nukleotidsequenz der Sequenzierungsprimer	25
Tabelle 6	Nukleotidsequenz der Mutageneseprimer	26
Tabelle 7	Materialien für die eukaryotische Zellkultur	27
Tabelle 8	Antikörper	27
Tabelle 9	Pufferlösungen	28
Tabelle 10	Pipettierschema für Sequenz-PCR	30
Tabelle 11	Pipettierschema für Mutagenese-PCR	33
Tabelle 12	PCR-Bedingungen I für Mutagenese-PCR	34
Tabelle 13	PCR-Bedingungen II für Mutagenese-PCR	34
Tabelle 14	Pipettierschema für Acrylamidgele	43
Tabelle 15	Pipettierschema für Sammelgel	44

9 Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bZIP	Basischer Leuzinzipper
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
c-terminal	Carboxyterminal
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dGTP	Desoxyguanositriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate

Abkürzungsverzeichnis

DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O	Wasser
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEK	Human embryonic kidney
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horseradish peroxidase
IP	Immunpräzipitation
IRES	Internal ribosome entry site
KFO	Klinische Forschergruppe
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1
NS	Nichtstrukturprotein
n-terminal	aminoterminal
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame, offener Leserahmen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG-IFN	Pegyliertes Interferon
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris Buffer Saline Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPR	Unfolded protein response

Abkürzungsverzeichnis

UV	ultraviolett
WHO	World Health Organization
γ -GT	Gamma-Glutamyl-Transferase

10 Publikationen/Dank

10.1 Originalpublikationen

- Welker MW, Welsch C, **Meyer AK**, Antes I, Albrecht M, Forestier N et al. Dimerization of the hepatitis C virus nonstructural protein 4B depends on the integrity of an aminoterminal basic leucine zipper. *Protein Science* 2010; 19: 1327-1336.

10.2 Kongressbeiträge

- Welker MW, Welsch C, **Meyer AK**, Forestier N, Kronenberger B, Lengauer T et al. Homodimerization of the Hepatitis C Virus Non-Structural 4B Protein Requires An Intact Basic Leucine Zipper. *Journal of Hepatology* 2009; 50:S133-S134. Präsentation auf der 44. Jahrestagung der European Association for the Study of the Liver (EASL) 2009, Kopenhagen, Dänemark.
- Welker MW, Welsch C, **Meyer AK**, Plotz G, Forestier N, Kronenberger B et al. Hepatitis C Virus Non-Structural 4B Protein-Protein Interaction Depends on An Intact Basic Leucine Zipper Localized Within the Aminoterminal Part. *Hepatology* 2008; 48(4):754A. Präsentation auf der 59. Jahrestagung der American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 2008, San Francisco, USA (Presidential Poster of Distinction).

10.3 Dank

Zunächst möchte ich Herrn Professor Zeuzem danken, der diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte.

Herrn Professor Sarrazin danke ich für die Überlassung des überaus interessanten und anspruchsvollen Themas, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Labor.

Ein besonderer Dank gilt Albrecht Piiper und Guido Plotz, die mir bei vielen fachlichen Fragen geholfen haben und immer ein Ohr für mich hatten. Des Weiteren danke ich Barbara Schöneberger und Reinhild Göbel, die mir die praktische Durchführung der verschiedenen Techniken näher brachten.

Weiterhin möchte ich mich bei Martin Welker bedanken, der mich während des Projekts betreute und stets ansprechbar war und mir mit wertvollen Tipps und Ratschlägen zur Seite stand.

Vielen Dank.