

**Charakterisierung des Lipidbindungsverhaltens und der Proteinfaltung  
von HCV NS5A unter Einfluss des NS5A-Inhibitors Daclatasvir**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Christian Grimm

aus Miltenberg

Frankfurt (2021)

(D 30)

Vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Tampé
2. Gutachter: PD Dr. Christoph Welsch

Datum der Disputation: 15.07.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Kooperationspartner</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hepatitis C-Virusinfektion.....	1
1.1.1. Epidemiologie.....	1
1.1.2. Übertragung und Krankheitsverlauf.....	3
1.1.3. Entwicklung in Forschung, Diagnose und Therapie.....	3
1.2. HCV.....	5
1.2.1. <i>Flaviviridae</i> .....	5
1.2.2. Genom und Proteinprozessierung.....	6
1.2.3. Lebenszyklus.....	9
1.3. NS5A.....	16
1.3.1. Aufbau von NS5A.....	16
1.3.2. NS5A-D1-Kristallstrukturen.....	17
1.3.3. Aufgaben von NS5A.....	18
1.4. Polyphosphoinositide (PPIs).....	20
1.4.1. Struktur und Verteilung von PPIs.....	20
1.4.2. Aufgaben von PPIs.....	23
1.4.3. NS5A und PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> .....	24
1.5. DAAs.....	25
1.5.1. Übersicht von DAAs.....	26
1.5.2. Daclatasvir (DCV).....	27
1.5.3. Wirkweisen von DCV.....	29
1.5.4. Resistenz gegen DCV.....	32
1.6. Ziele der Arbeit.....	33
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>35</b>
2.1. Material.....	35
2.1.1. Chemikalien.....	35
2.1.2. Zellkultur-Reagenzien.....	36
2.1.3. Detergenzien.....	37
2.1.4. Säulenmaterial.....	37
2.1.5. Puffer, Nährmedien und Lösungen.....	37
2.1.6. Reaktionskits.....	38
2.1.7. Bakterienstämme.....	38
2.1.8. Eukaryotische Zelllinien.....	39
2.1.9. Antibiotika und Arzneimittel.....	39

2.1.10.	Vektoren und rekombinante Plasmide	39
2.1.11.	Oligonukleotide	41
2.1.12.	Lipide	42
2.1.13.	Proteine und Peptide	42
2.1.14.	Enzyme	43
2.1.15.	Primäre und sekundäre Antikörper	43
2.1.16.	Molekulargewichtstandards	44
2.1.17.	Verbrauchsmaterialien	45
2.1.18.	Gebrauchsgegenstände	46
2.1.19.	Geräte	46
2.1.20.	Software	48
2.2.	Methoden	49
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	49
2.2.1.1.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	49
2.2.1.2.	Kultivierung von <i>E. coli</i>	49
2.2.1.3.	Plasmid-DNA-Präparation	50
2.2.1.4.	Konzentrationsbestimmung von DNA	51
2.2.1.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
2.2.1.6.	Restriktion von DNA	52
2.2.1.7.	Agarose-Gelelektrophorese	53
2.2.1.8.	DNA-Gelextraktion	53
2.2.1.9.	Ligation von DNA-Fragmenten	53
2.2.1.10.	Klonierung neuer DNA-Konstrukte	54
2.2.1.11.	DNA-Sequenzierung	55
2.2.2.	Arbeiten mit Zellkulturen	55
2.2.2.1.	Kultivierung und Passagierung von Säugetierzellen	55
2.2.2.2.	Transfektion von Säugetierzellen	57
2.2.2.3.	Kultivierung und Passagierung von Insektenzellen	58
2.2.2.4.	Infektion von Insektenzellen mit Baculovirus	58
2.2.3.	Biochemische Methoden	59
2.2.3.1.	Proteinproduktion in <i>E. coli</i> und Zellernte	59
2.2.3.2.	Proteinproduktion in Säugetier- und Insektenzellen und Zellernte	60
2.2.3.3.	Zellfraktionierung von Säugetier- und Insektenzellen	64
2.2.3.4.	Proteinreinigung	66
2.2.3.4.1.	Bakterielles System	67
2.2.3.4.2.	Säugetierzellsystem	71
2.2.3.4.3.	Baculovirus-vermitteltes Insektenzellsystem	74
2.2.3.5.	Protein-Dialyse	75
2.2.3.6.	Abspaltung des GST-tags mittels Thrombin-Protease	76
2.2.3.7.	Herstellung von Lipidkuchen	76
2.2.3.8.	Proteinanalyse	78
2.2.3.8.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	78

2.2.3.8.2.	Präparation von Proteinproben.....	78
2.2.3.8.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	79
2.2.3.8.4.	Coomassie-Blue-Färbung.....	80
2.2.3.8.5.	Western Blot.....	80
2.2.3.8.6.	Chemilumineszenz-Immundetektion.....	81
2.2.3.8.7.	<i>Thermal shift assay</i> (TSA).....	82
2.2.3.8.8.	<i>Protein lipid overlay assay</i> (PLOA).....	84
2.2.3.8.9.	NS5A-Rekonstitution in Liposomen.....	85
2.2.3.8.10.	<i>In silico</i> -Strukturanalyse von NS5A.....	88
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>90</b>
3.1.	Expression und Reinigung von NS5A in verschiedenen Systemen.....	90
3.1.1.	Bakterielles System.....	90
3.1.2.	Säugetierzellsystem.....	95
3.1.3.	Baculovirus-vermitteltes Insektenzellsystem.....	109
3.2.	Protein-Stabilität und Einfluss des NS5A-Inhibitors DCV und des Zink-Chelators EDTA auf die Faltung von NS5A.....	115
3.3.	Untersuchung der Lipidinteraktion von NS5A.....	118
3.3.1.	Lipidbindungspartner im PLOA.....	119
3.3.2.	Lipidinteraktion der AH von NS5A.....	120
3.3.3.	Vergleich der Lipidbindung von NS5A fl und NS5A $\Delta$ D2+3 mit und ohne Inhibitor Daclatasvir.....	121
3.3.4.	Rekonstitution von NS5A in Liposomen verschiedener Zusammensetzung.....	123
3.3.5.	<i>In silico</i> -Strukturanalyse zur Identifizierung von PPI-Bindestellen in NS5A.....	128
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>130</b>
4.1.	Vergleich der Expression und Reinigung von NS5A in verschiedenen Systemen.....	131
4.2.	Auswirkungen von DCV und EDTA auf die NS5A-Stabilität im TSA.....	134
4.3.	Charakterisierung der NS5A-Lipidbindung.....	137
4.3.1.	Identifizierung neuer Lipidinteraktionspartner.....	137
4.3.2.	Bedeutung der NS5A-Domänenarchitektur für die Lipidbindung.....	144
4.3.3.	Einfluss des NS5A-Inhibitors Daclatasvir.....	146
4.3.4.	<i>In silico</i> -Charakterisierung möglicher Phospholipid-Bindestellen in NS5A.....	148
<b>5.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>151</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>153</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>157</b>

# Zusammenfassung

Mit 71 Millionen chronisch erkrankten Patienten im Jahr 2015 stellt die chronische Hepatitis C-Virusinfektion eine wichtige Ursache für Zirrhose, Leberdekomensation und Leberkrebs dar.

Eine grundlegende Eigenschaft des Hepatitis C-Virus (HCV) ist die Biogenese modifizierter intrazellulärer Membranen. Das dabei aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER) gebildete, sogenannte membranöse Netz (MW, *membranous web*) dient im Rahmen des HCV-Lebenszyklus als Gerüst für die Assemblierung eines Multi-Protein-Replikase-Komplexes. Das MW wird durch virale nicht-strukturelle Proteine wie NS5A induziert.

Das Multidomänen-Metalloprotein NS5A ist über seine verschiedenen Domänen sowohl bei der Replikation am MW als auch bei der viralen Assemblierung und Freisetzung in der Nähe von Lipidtropfen (LD, *lipid droplet*) maßgeblich beteiligt. Seine N-terminale amphipathische Helix (AH) spielt dabei über die vermittelte Assoziation von NS5A mit Membranen eine wichtige Rolle. Damit verbundene spezifische Lipidinteraktionen von NS5A unterliegen molekularen Umstrukturierungen, die benötigt werden, um NS5A für seine verschiedenen Aufgaben im viralen Lebenszyklus anzupassen. Es liegen zwar Röntgenstrukturmodelle von Domäne 1-Dimeren und NMR-Strukturen zur AH vor, allerdings keine experimentellen Strukturen des NS5A-Proteins vollständiger Länge (NS5A fl) in seinem natürlichen Lipidmilieu. Trotz der essentiellen Bedeutung von NS5A für den HCV-Lebenszyklus und langjähriger Forschung ist bisher nur wenig zur molekularen Funktionsweise von NS5A bekannt.

Dennoch konnten durch *Screening* hochpotente NS5A-Inhibitoren entdeckt und weiterentwickelt werden. NS5A-Inhibitoren tragen als direkt wirkende antivirale Arzneimittel (DAA, *direct-acting antiviral*) entscheidend zum Therapieerfolg bei der Behandlung der Hepatitis C bei. Trotz ihrer Bedeutung in der Therapie und intensiver Forschung ist der Wirkmechanismus von NS5A-Inhibitoren bisher ungeklärt. Eine durch NS5A-Inhibitoren induzierte intrazelluläre Umverteilung von NS5A und das ausschließliche Auftreten von Resistenz-assoziierten Mutationen (RAM) nahe der NS5A-Lipid-Interaktionsbereiche weisen jedoch auf einen Effekt der Inhibitoren auf die Lipid-NS5A-Interaktion hin.

Als grundlegende Hypothese dieser Arbeit wurde somit vermutet, dass abhängig vom NS5A umgebenden Lipidmilieu (MW oder LD) spezifische Lipid-Protein-Interaktionen

Einfluss auf die Struktur und Funktion von NS5A nehmen und NS5A-Inhibitoren über eine Inhibition dieser Interaktionen wirken. Polyphosphoinositide (PPI) könnten dabei als Lipidinteraktionspartner eine besondere Rolle spielen, da sie bedeutend für die Membran-Kennzeichnung verschiedener Zellkompartimente sind und auch die Funktion von Membranproteinen regulieren können. Eine Interaktion von NS5A mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wurde bereits publiziert.

Um basierend auf der postulierten Hypothese die mechanistischen Details im Wechselspiel von NS5A und intrazellulären Membranen sowie den dabei möglichen Effekt von NS5A-Inhibitoren zu untersuchen, musste zunächst NS5A in ausreichender Menge, Reinheit und Qualität rekombinant hergestellt werden. Hierfür wurde ein entsprechendes Protokoll zur Proteinexpression durch Baculovirus-vermittelte Expression in Sf9-Insektenzellen und Strep-Tactin-Reinigung für das *full length* Protein und trunkierte Varianten etabliert. In Kooperation mit einem Partner konnte unter Verwendung von *giant unilamellar vesicles* (GUVs) und konfokaler Mikroskopie gezeigt werden, dass unser *full length* Protein die Struktur von Membranen verändert (Membran-Remodellierung).

Die Stabilität des gereinigten Proteins und damit Effekte auf die Proteinfaltung wurden mittels *Thermal shift assay* (TSA) untersucht und dabei auch Effekte des NS5A-Inhibitors Daclatasvir (DCV) und des Metall-Chelators EDTA überprüft. Die Bindung des Inhibitors hatte einen stabilisierenden Effekt auf die Proteinstruktur zur Folge.

Potentielle Interaktionsmuster mit Membranlipiden wurden mit Hilfe eines *Protein lipid overlay assays* (PLOA) detektiert. Zusätzlich zum in der Literatur bereits beschriebenen Interaktionspartner PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> konnten weitere Lipid-Bindungspartner für NS5A identifiziert werden. Dabei legen die gewonnenen Daten nahe, dass die Interaktion über die Domäne 1 von NS5A vermittelt wird, wobei die Domänen 2 und 3 die Affinität zu den Lipidbindungspartnern erhöht, aber nicht das Phospholipid-Bindungsmuster verändert. DCV hatte im PLOA keine qualitativen Auswirkungen auf das Lipid-Bindungsmuster. Die Lipidinteraktionen wurden mittels eines Liposomen-Rekonstitutionsmodells validiert. *In silico* konnten basierend auf verfügbaren, experimentellen Strukturdaten und einem dynamischen Modell drei *Cluster* basischer Aminosäuren in NS5A-D1-AH als mögliche PPI-Bindungsstellen identifiziert werden. Basierend auf dem Strukturmodell wurde eine Mutationsstrategie zur Charakterisierung der potentiellen PPI-Bindungsstellen entwickelt.

Aufbauend auf den Ergebnissen des PLOAs und der etablierten Liposomen-Rekonstitution von NS5A sollen über die Promotion hinaus NS5A-Interaktionen in artifiziellen Membransystemen charakterisiert werden. Dabei soll durch gezielte Veränderung der Lipidzusammensetzung und/oder Proteinvarianten mit gezielten Mutationen die Interaktion mit subzellulären Kompartimenten und potentielle Struktur-Funktionszusammenhänge in NS5A aufgeklärt werden.

Die auf diese Arbeit aufbauenden weiterführenden Untersuchungen sollen dabei helfen, die mechanistischen Details der Lipidinteraktion von NS5A besser zu verstehen und auf diese Weise essentielle Prinzipien der Replikation von HCV und verwandter RNA-Viren aufzuklären. Außerdem soll der Wirkmechanismus von NS5A-Inhibitoren charakterisiert werden.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ΔD2+3</b>	Trunkierte Version von NS5A mit deletierten Domänen 2 und 3
<b>AH</b>	Amphipathische $\alpha$ -Helix
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>ARFP</b>	<i>Alternative reading frame protein</i>
<b>ATTO-DOPE</b>	ATTO-550-1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
<b>BAAPP</b>	<i>Basic amino acid PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> pincer</i>
<b>BAP</b>	<i>Bacterial alkaline phosphatase</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>BVDV</b>	Bovines Virusdiarrhoe-Virus
<b>CCV</b>	<i>Clathrin-coated vesicle</i>
<b>CHO</b>	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
<b>cLD</b>	<i>Cytosolic lipid droplet</i>
<b>CLDN1</b>	Claudin-1
<b>CMC</b>	<i>Critical micelle concentration</i>
<b>CRE</b>	<i>cis-acting replication element</i>
<b>CSFV</b>	<i>Classical swine fever virus</i>
<b>CypA</b>	Cyclophilin A
<b>D1</b>	Domäne 1
<b>D2</b>	Domäne 2
<b>D3</b>	Domäne 3
<b>DAA</b>	<i>Direct-acting antiviral</i>
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DCV</b>	Daclatasvir
<b>DDM</b>	n-Dodecyl $\beta$ -D-maltosid
<b>DENV</b>	Dengue-Virus
<b>DGAT1/2</b>	Diacylglycerol-Acyltransferase 1/2

<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DMV</b>	Doppelmembran-Vesikel
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EE</b>	<i>Early endosome</i>
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FAPP2</b>	<i>Four-phosphate adaptor protein 2</i>
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum
<b>fl</b>	<i>Full length</i>
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>GT</b>	Genotyp
<b>GUV</b>	<i>Giant unilamellar vesicle</i>
<b>HCV</b>	Hepatitis-C-Virus
<b>HEK</b>	<i>Human embryonic kidney cells</i>
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HRP</b>	<i>Horseradish-peroxidase</i>
<b>HSC70</b>	<i>Heatshock cognate protein 70</i>
<b>IAC</b>	Immun-Affinitätschromatographie
<b>iBAQ</b>	<i>Intensity based absolute quantification</i>
<b>IC</b>	Ionenaustauschchromatographie
<b>IFN</b>	Interferon- $\alpha$

<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>IRES</b>	<i>Internal ribosome entry site</i>
<b>JEV</b>	Japanische Enzephalitis-Virus
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i>
<b>LC-MS/MS</b>	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
<b>LCS</b>	<i>Low complexity sequence</i>
<b>LD</b>	<i>Lipid droplet</i>
<b>LDLP</b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b>LDLR</b>	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
<b>IN<sub>2</sub></b>	Flüssigstickstoff
<b>LPA</b>	Lysophosphatidsäure
<b>LPC</b>	Lysophosphocholin
<b>MOA</b>	<i>Mode of action</i>
<b>MTP</b>	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
<b>MVB</b>	<i>Multivesicular bodies</i>
<b>MW</b>	<i>Membranous web</i>
<b>MWCO</b>	<i>Molecular weight cutoff</i>
<b>NaBu</b>	Natriumbutyrat
<b>NCR</b>	Nicht codierende Region
<b>NI</b>	Nukleos(t)id-analoge Inhibitoren
<b>Ni-NTA-AC</b>	Nickel-Nitrilotriacetat-Affinitätschromatographie
<b>NMR</b>	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
<b>NNI</b>	Nicht-Nukleos(t)id-analoge Inhibitoren
<b>NP-40</b>	Nonoxinol 40
<b>NS</b>	nicht-strukturell
<b>NS5A</b>	Nicht-strukturelles Protein 5A

<b>NTA</b>	Nitrilotriacetat
<b>OCLN</b>	Occludin
<b>OD<sub>600 nm</sub></b>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
<b>OG</b>	n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>OSBP</b>	<i>Oxysterol binding protein</i>
<b>p56</b>	Basaler Phosphorylierungszustand von NS5A
<b>p58</b>	Hyperphosphorylierungszustand von NS5A
<b>PA</b>	<i>Phosphatidic acid</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PC</b>	Phosphatidylcholin
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PDB-ID</b>	Protein Data Bank-Identifikationsnummer
<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamin
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PEI</b>	Polyethylenimin
<b>Pen-Strep</b>	Penicillin-Streptomycin
<b>PG</b>	Phosphatidylglycerol
<b>pH</b>	<i>Pondus hydrogenii</i>
<b>PH</b>	<i>Pleckstrin homology</i>
<b>PHD</b>	<i>Plant homeodomain</i>
<b>pI</b>	Isoelektrischer Punkt
<b>PI4KIII<math>\alpha</math></b>	Phosphatidylinositol-4-Kinase III $\alpha$
<b>PLOA</b>	<i>Protein lipid overlay assay</i>
<b>POPC</b>	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
<b>POPE</b>	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
<b>PPI</b>	Polyphosphoinositid

<b>PROPPIN</b>	<i>β-propellers that bind polyphosphoinositides</i>
<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>PtdIns</b>	Phosphatidylinositol
<b>PtdIns(3)P</b>	L-α-Phosphatidylinositol-3-phosphat
<b>PtdIns(3,4)P<sub>2</sub></b>	L-α-Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
<b>PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub></b>	L-α-Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
<b>PtdIns(3,5)P<sub>2</sub></b>	L-α-Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat
<b>PtdIns(4)P</b>	L-α-Phosphatidylinositol-4-phosphat
<b>PtdIns(4,5)P<sub>2</sub></b>	L-α-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b>PtdIns(5)P</b>	L-α-Phosphatidylinositol-5-phosphat
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>QCM-D</b>	<i>Quartz crystal microbalance-dissipation</i>
<b>RAM</b>	Resistenz-assozierte Mutation
<b>RAS</b>	Resistenz-assozierte Substitution
<b>RE</b>	Recycling-Endosom
<b>RK</b>	Replikationskomplex
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>S1P</b>	Sphingosin(1)phosphat
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SE</b>	Sortierendes Endosom
<b>SOC</b>	<i>Super optimal broth</i>
<b>SP</b>	Sulfopropyl-
<b>SRB1</b>	<i>Scavenger</i> Rezeptor Klasse B Typ1
<b>Strep-AC</b>	Strep-Tactin-Affinitätschromatographie
<b>SV</b>	Säulenvolumen
<b>SVR</b>	<i>Sustained virological response</i>
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA

<b>TBEV</b>	<i>Tic-born encephalitis virus</i>
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TEV</b>	<i>Tobacco etch virus</i>
<b>TGN</b>	Trans-Golgi-Netzwerk
<b>T<sub>m</sub></b>	Schmelztemperatur
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TSA</b>	<i>Thermal shift assay</i>
<b>U2OS</b>	<i>Human bone osteosarcoma epithelial cells</i>
<b>VAPA</b>	<i>human vesicle-associated membrane protein-associated protein</i>
<b>VLDLP</b>	<i>Very low density lipoproteins</i>
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>WNV</b>	West-Nil-Virus
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>YFV</b>	<i>Yellow fever virus</i>
<b>ZIKV</b>	<i>Zika-Virus</i>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Länder und ihr häufigster HCV-GT .....	2
Abbildung 2:	Meilensteine in der Hepatitis-C-Forschung und -Therapie .....	4
Abbildung 3:	<i>Flaviviridae</i> -Familienbaum .....	6
Abbildung 4:	HCV-Genomorganisation, Polyprotein-Prozessierung und .....	7
	Membrantopologie gespaltener viraler Proteine	
Abbildung 5:	HCV-Lebenszyklus .....	9
Abbildung 6:	Modell eines HCV-induzierten Doppelmembran-Vesikels (DMV) .....	12
Abbildung 7:	Hypothetisches Modell der HCV-Assemblierung .....	14
Abbildung 8:	Schematische Struktur von HCV-NS5A .....	16
Abbildung 9:	Zwei verschiedene Kristallstrukturen von HCV-GT 1b-NS5A-D1 .....	17
Abbildung 10:	Verbreitung von PPIs in verschiedenen Membrankompartimenten .....	21
	einer typischen Zelle	
Abbildung 11:	Funktionale Prinzipien PPI-regulierter Proteinfunktion .....	23
Abbildung 12:	HCV-NS5A-AH bindet spezifisch Lipidvesikel mit PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> .....	24
Abbildung 13:	Übersicht von DAAs zur Behandlung von HCV .....	26
Abbildung 14:	Strukturformel von DCV (BMS-790052) .....	28
Abbildung 15:	3D-Interaktion und detaillierte Darstellung des stabilsten .....	28
	vorhergesagten Bindungsmodells von DCV an HCV-GT 1b-NS5A	
Abbildung 16:	Vorgeschlagener Mechanismus der DCV-Aktivität .....	31
Abbildung 17:	NS5A-Kristallstruktur mit Resistenz-assoziierten Mutationsstellen .....	32
	gegen DCV	
Abbildung 18:	Molekulargewichtsstandards .....	44
Abbildung 19:	Grundprinzip einer Membranprotein-Reinigung .....	66
Abbildung 20:	Schematischer Aufbau des Schwerkraft-Waschschriffs .....	68
Abbildung 21:	Grundprinzip des <i>Thermal shift assays</i> .....	82
Abbildung 22:	Grundprinzip des <i>Protein lipid overlay assays</i> .....	84
Abbildung 23:	Schema Nycodenzgradient .....	86

Abbildung 24: Ni-NTA-AC von NS5A (pTM023-NS5A H54Q) exprimiert in ..... 91 <i>E. coli</i> und Abspaltung des GST-tags durch Thrombin-Protease	91
Abbildung 25: Ni-NTA-AC nach Sólyom und Valdau von NS5A (pCG10)..... 94 exprimiert in <i>E. coli</i>	94
Abbildung 26: Vergleich der Expression von NS5A (pCMV-tag4-NS5A H54Q) in ..... 96 HEK 293 T- und U2OS-Zellen sowie zu verschiedenen Erntezeiten nach der Transfektion	96
Abbildung 27: FLAG-IAC von NS5A (pCMV-tag4-NS5A H54Q) exprimiert in ..... 97 HEK 293 T-Zellen	97
Abbildung 28: Ni-NTA-AC von NS5A (pCG01) exprimiert in HEK 293 T-Zellen ..... 98	98
Abbildung 29: Ni-NTA-AC von NS5A (pCG01) aus HEK 293 T-Membranfraktion..... 101	101
Abbildung 30: Einfluss des Proteasominhibitors MG-132 auf die Expression von..... 102 NS5A (pCG01) in HEK 293 T-Zellen	102
Abbildung 31: Ni-NTA-AC von NS5A $\Delta$ D2+3 (pCG07) aus HEK 293 T- ..... 104 Membranfraktion	104
Abbildung 32: Ni-NTA-AC von NS5A $\Delta$ D2+3 (pCG07) aus HEK 293 F- ..... 105 Membranfraktion	105
Abbildung 33: Einfluss von Natriumbutyrat auf die Expression von NS5A $\Delta$ D2+3..... 106 (pCG07) in HEK 293 F-Zellen zu verschiedenen Erntezeiten	106
Abbildung 34: IC von NS5A $\Delta$ D2+3 (pCG07) aus HEK 293 F-Membranfraktion..... 107	107
Abbildung 35: IC und Ni-NTA-AC von NS5A $\Delta$ D2+3 (pCG07) aus HEK 293 F- ..... 108 Membranfraktion	108
Abbildung 36: StrepTactin-AC von NS5A fl (pVL941 Strep-NS5A-V5) exprimiert in ... 110 Sf9-Zellen	110
Abbildung 37: StrepTactin-AC von NS5A $\Delta$ D2+3 (pVL941 Strep-NS5A $\Delta$ D2+3) ..... 111 exprimiert in Sf9-Zellen	111
Abbildung 38: Bestimmung der Proteinkonzentrationen von NS5A fl..... 113 (pVL941 Strep-NS5A-V5-His) und NS5A $\Delta$ D2+3 (pVL941 Strep-NS5A $\Delta$ D2+3)	113
Abbildung 39: Übersicht zur Herstellung von NS5A fl und $\Delta$ D2+3 im Baculovirus-..... 114 vermittelten Sf9-Insektenzellsystem und Folgeversuchen	114
Abbildung 40: Schmelzkurven von NS5A fl und NS5A $\Delta$ D2+3 mit und ohne ..... 116 Zugabe von EDTA sowie NS5A-Inhibitor DCV	116

Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurven von NS5A $\Delta$ D2+3 mit und ohne Zugabe .. 117 von EDTA sowie von NS5A-Inhibitor DCV und Vergleich der Schmelztemperaturen	117
Abbildung 42: Lipidbindung von NS5A fl und $\Delta$ D2+3 aus Sf9-Zellen sowie von ..... 120 NS5A $\Delta$ D2+3 aus <i>E. coli</i> im PLOA	120
Abbildung 43: Lipidbindung der amphipathischen $\alpha$ -Helix von NS5A im PLOA..... 121	121
Abbildung 44: Vergleich der Lipidbindungen von NS5A fl und NS5A $\Delta$ D2+3 im ..... 122 PLOA sowie Untersuchung des Effekts von NS5A-Inhibitor DCV	122
Abbildung 45: Liposomen verschiedener Zusammensetzung bei Rekonstitution von ..... 124 NS5A fl und NS5A $\Delta$ D2+3	124
Abbildung 46: Rekonstitution von NS5A fl und $\Delta$ D2+3 in Liposomen ..... 125 verschiedener Zusammensetzung	125
Abbildung 47: Vermutete PPI-Bindestellen in NS5A..... 128	128
Abbildung 48: Nachweis von Membran-Remodellierung an GUVs nach Zugabe ..... 134 von NS5A fl und Hemmung der Remodellierung durch Daclatasvir	134

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Chemikalien .....	35
Tabelle 2:	Verwendete Zellkultur-Reagenzien .....	36
Tabelle 3:	Verwendete Detergenzien .....	37
Tabelle 4:	Verwendetes Säulenmaterial .....	37
Tabelle 5:	Verwendete Reaktionskits .....	38
Tabelle 6:	Verwendete Bakterienstämme .....	38
Tabelle 7:	Verwendete eukaryotische Zelllinien .....	39
Tabelle 8:	Verwendete Antibiotika und Arzneimittel .....	39
Tabelle 9:	Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide .....	39
Tabelle 10:	Verwendete Primer .....	41
Tabelle 11:	Verwendete Lipide .....	42
Tabelle 12:	Verwendete Proteine und Peptide .....	42
Tabelle 13:	Verwendete Enzyme .....	43
Tabelle 14:	Verwendete primäre und sekundäre Antikörper .....	43
Tabelle 15:	Verwendete Molekulargewichtsstandards .....	44
Tabelle 16:	Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	45
Tabelle 17:	Verwendete Gebrauchsgegenstände .....	46
Tabelle 18:	Verwendete Geräte .....	46
Tabelle 19:	Verwendete Software .....	48
Tabelle 20:	Eigenschaften von Lipidkomponenten bei der Herstellung von Lipidkuchen .....	77
Tabelle 21:	Molarverhältnisse der Lipidkomponenten hergestellter Lipidkuchen in mol % .....	77
Tabelle 22:	Ansatzschema für zwei Polyacrylamidgele .....	79
	(10 % Trenngel, 5 % Sammelgel)	
Tabelle 23:	Verdünnung von Antikörpern und verwendete Blockierlösungen .....	82

Tabelle 24:	Massenspektrometrische Untersuchung der 100 kD- und 50 kD-Bande.....	99
	von NS5A (pCG01)-Eluat, gereinigt mit Ni-NTA-AC aus HEK 293 T-Zellen	
Tabelle 25:	Überblick zu Lipidinteraktionen von NS5A fl und $\Delta$ D2+3 im PLOA .....	123
Tabelle 26:	Finale Lipid- und NS5A-Mengen, NS5A/Lipid-Molarverhältnisse und .....	127
	Rekonstitutionserfolge von NS5A fl und NS5A $\Delta$ D2+3 in Liposomen verschiedener Zusammensetzung	

# Kooperationspartner

Die vorliegende Arbeit wurde, falls nicht anders durch Nachweise belegt oder in der Danksagung angegeben, von mir selbst unter der Aufsicht meiner Betreuer während meiner Doktorarbeit angefertigt. Auf alle Beteiligungen von Kollegen wird in der Doktorarbeit explizit hingewiesen. Das unten aufgelistete Material wurde im Rahmen kollaborativer Forschung gewonnen:

Tab. 24: Massenspektrometrische Untersuchung der 100 kD- und 50 kD-Bande von NS5A (pCG01)-Eluat, gereinigt mit Ni-NTA-AC aus HEK 293 T-Zellen, Anshu Bhattacharya (Goethe-Universität, Institut für Biochemie II), Trypsinverdau von Proteinproben, LC-MS/MS und Auswertung mit MaxQuant; Expression und Reinigung des Proteins, Auftrennung durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung, Ergänzung der iBAQ-Werte mit Daten zu Zelllokalisation und molekularen Massen der identifizierten Proteine;

Abb. 47: Vermutete PPI-Bindestellen in NS5A. James H. Nettles (Emory University School of Medicine (USA), Pediatrics and Biomedical Informatics), Programmierung eines dynamischen NS5A-Dimer-Strukturmodells; *In-silico*-Identifikation möglicher PPI-Bindestellen in NS5A und deren Darstellung mittels Chimera 1.14;

Abb. 48: Nachweis von Membran-Remodellierung an GUVs nach Zugabe von NS5A fl und Hemmung der Remodellierung durch Daclatasvir, MinKyung Yi (The University of Texas Medical Branch (USA), Department of Microbiology and Immunology), konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Membranveränderung von GUVs durch NS5A fl und dessen Inhibition durch DCV; Expression und Reinigung von NS5A fl;

# 1. Einleitung

## 1.1. Hepatitis C-Virusinfektion

Die Hepatitis C-Infektion ist eine Infektionskrankheit der Leber, die durch das Hepatitis C-Virus (HCV) verursacht wird (s. 1.2.). Dabei kann sich eine akute zu einer chronischen Hepatitis entwickeln. Etwa 60-85 % der HCV-Infektionen gehen in eine chronische Form über (definiert als eine länger als 6 Monate fortbestehende Infektion mit HCV) (WHO, 2020), verbunden mit dem Risiko eine Leberzirrhose und daraus resultierende Komplikationen zu entwickeln, insbesondere Leberdekomensation und primären Leberkrebs (Jacobson et al., 2010).

Die Behandlung mit direkt wirkenden antiviralen Arzneimitteln (*direct-acting antiviral*, DAA) (1.5.) kann mittlerweile bis zu 95 % der erkrankten Patienten heilen und die Wahrscheinlichkeit von Zirrhose und Leberkrebs reduzieren (WHO, 2020). Allerdings besteht insbesondere in Entwicklungsländern ein geringer Zugang zu Diagnose- und Therapiemöglichkeiten. Bisher gibt es keinen effektiven Impfstoff gegen Hepatitis C (WHO, 2020).

### 1.1.1. Epidemiologie

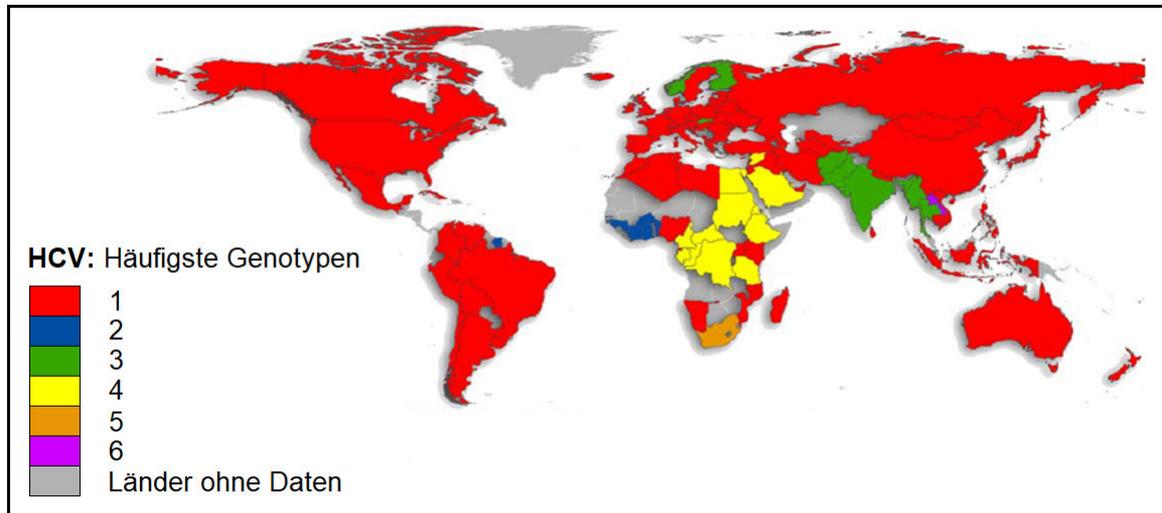
Nach dem globalen Hepatitis-Report 2017 der WHO wurde die weltweite Verbreitung von Hepatitis C im Jahr 2015 auf 71 Millionen Patienten mit chronischer HCV-Infektion geschätzt. Die Anzahl geschätzter HCV-Neuinfektionen belief sich im selben Jahr auf 1,75 Millionen.

Auf Basis von phylogenetischen Untersuchungen und Sequenzanalysen können bei HCV sieben verschiedene Genotypen (GT) und darunter 67 bestätigte und ggf. 20 weitere Subtypen unterschieden werden (Smith et al., 2014). HCV-Stämme verschiedener GT weisen einen Unterschied von bis zu 35 % in Bezug auf die Nukleotidsequenz auf. Innerhalb der Subtypen eines GT liegt der Unterschied bei <15 % (Smith et al., 2014). Dies weist auf die hohe genetische Diversität von HCV hin. Diese großen Unterschiede spielen eine bedeutende Rolle in weltweiter Verbreitung, Krankheitsverlauf und Therapieerfolg verschiedener HCV-GT (Lindenbach et al., 2006).

Die globale Verbreitung und Prävalenz verschiedener HCV-GT wurden von Messina et al. (2015) näher betrachtet. Der mit 46,2 % weltweit am häufigsten verbreitete GT ist GT 1. Zweithäufigster Typ mit weltweit 30,1 % ist GT 3. GT 2, 4 und 6 sind für den Großteil der

restlichen HCV-Infektionen mit 9,1 %, 8,3 % und 5,4 % verantwortlich. GT 5 war mit < 1 % für die wenigsten HCV-Fälle weltweit verantwortlich.

Die je Land häufigsten GT sind in Abbildung 1 bearbeitet nach Messina et al. (2015) dargestellt:



**Abbildung 1: Länder und ihr häufigster HCV-GT.** Bearbeitet nach Messina et al. (2015). Es wurden Publikationen zu den Stichworten „HCV“, „hepatitis C virus“, „genotype“ und „subtype“ für den Zeitraum 1989-2013 bei PubMed ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)) recherchiert und die beschriebenen Fallzahlen der verschiedenen HCV-Genotypen (GT) der einzelnen Länder festgehalten. Unter Berücksichtigung der Schätzungen des „Global Burden of Disease“-Projekts der WHO wurden alle HCV-Fälle der jeweiligen GT je Land aufsummiert. Der je Land häufigste GT wurde mit dem Programm ArcGIS 9.3 ([www.esri.com](http://www.esri.com)) dargestellt: GT 1 (rot), 2 (blau), 3 (grün), 4 (gelb), 5 (orange), 6 (violett), ohne Daten (grau).

GT 1 (rot) war weltweit am häufigsten der dominierende GT. GT 2 (blau) herrschte in Westafrika vor, wohingegen GT 3 (grün) der häufigste GT in Südasien und Skandinavien war. GT 4 (gelb) dominierte Nord- und Zentralafrika sowie den mittleren Osten. GT 5 (orange) war als häufigster GT in Südafrika zu finden und GT 6 (violett) in Südostasien. Der beschriebene GT 7 weist eine geringe Bedeutung auf, da es sich um den gemeldeten Fall eines afrikanischen Immigranten in Kanada handelt (Murphy et al., 2007).

Falls in den einzelnen Studien die Subtypen der verschiedenen HCV-GT bestimmt worden waren, wurden diese ebenfalls ausgewertet. So handelte es sich z.B. bei GT 1 in 99 % der Fälle um Subtyp 1a (31 %) und 1b (68 %). Die HCV-Subtypen 1a, 1b, 2a und 3a wiesen global die größte Verbreitung auf und machten den höchsten Anteil an HCV-Infektionen aus. Aus diesem Grund werden sie auch als epidemische Subtypen bezeichnet.

### **1.1.2. Übertragung und Krankheitsverlauf**

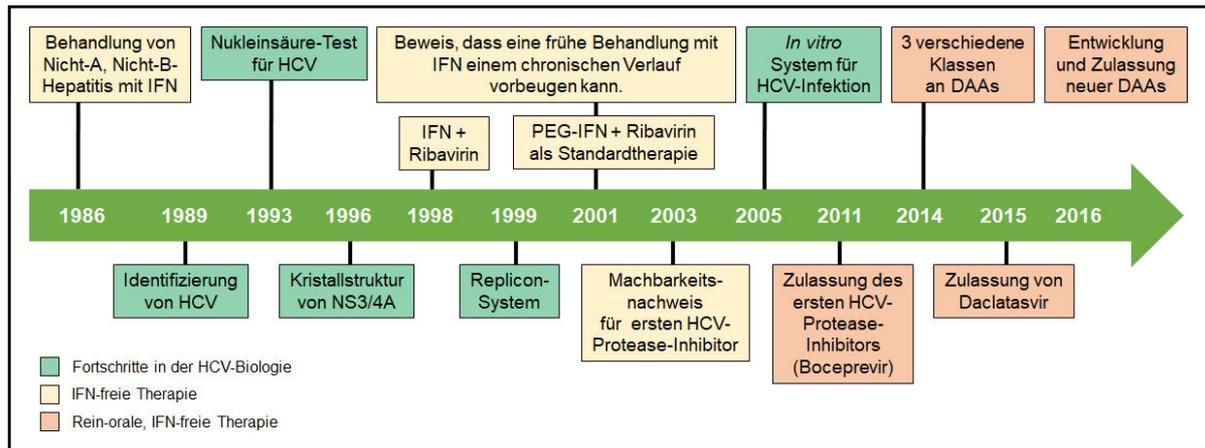
Bei HCV handelt es sich um einen durch Blut übertragenen Krankheitserreger: Die Übertragung erfolgt dabei meist durch kleinste Blutmengen, z.B. bei injizierendem Drogenmissbrauch durch Teilen von Injektionsnadeln, allgemeine schlechte Injektionspraktiken z.B. schlechte Sterilisation von Spritzen und Nadeln im Gesundheitsgewerbe, beim Tätowieren oder bei sexuellen Praktiken mit Blutkontakt. Eine weitere Übertragungsmöglichkeit besteht bei der Transfusion von kontaminiertem Blut. Eine Übertragung bei allgemeinen Sexualpraktiken oder bei der Geburt tritt deutlich seltener auf (WHO, 2020).

Neuinfektionen verlaufen in der Regel asymptomatisch oder mild. Bei ~30 % der infizierten Personen tritt innerhalb von 6 Monaten eine Spontanheilung ohne Behandlung auf. Bei den verbliebenen ~70 % entsteht eine chronische Hepatitis C. Während deren Verlauf entwickeln innerhalb von 20 Jahren ~15-30% der chronisch Infizierten eine Zirrhose (Lauer, 2001). Mögliche Symptome bei einer akuten HCV-Infektion sind z.B. Müdigkeit, Schwindel und Gelbsucht. Bei der Entstehung einer chronischen Infektion tritt zunächst eine lange Phase ohne Symptome auf. Mit zunehmendem Grad der Hepatitis und Fibrose treten unspezifische Symptome wie Müdigkeit auf (Lauer, 2001).

Ob sich aus einem akuten ein chronischer Krankheitsverlauf entwickelt, ist von der Anzahl der HCV-Varianten (Komplexität) und nicht-synonymer Nukleinsäure-Substitutionen (Diversität) im HCV-Genom abhängig (Farci, 2000). Durch die hohe Variabilität von HCV kommt es zu komplexen HCV-Populationen mit genetischer Heterogenität an HCV-Genomen, die im Infizierten koexistieren, sogenannten Quasispezies (Simmonds et al., 2005). Diese ermöglichen Mechanismen der Immunevasion und virale Persistenz. Resistenzmutationen gegen in der antiviralen Therapie verwendete Arzneimittel spielen dabei ebenfalls eine bedeutende Rolle (s. 1.5.4.).

### **1.1.3. Entwicklung in Forschung, Diagnose und Therapie**

Eine kurze Zusammenfassung zu wichtigen Entwicklungen in der Forschung, Diagnose und Therapie von Hepatitis C sind nach Manns und von Hahn (2013) und Manns et al. (2017) bearbeitet in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Meilensteine in der Hepatitis-C-Forschung und -Therapie.** Bearbeitet nach Manns et al. (2013) und Manns et al. (2017). HCV: Hepatitis C-Virus, IFN: Interferon- $\alpha$ , PEG: Polyethylenglykol, DAA: *direct-acting antiviral*.

Bereits bevor HCV 1989 entdeckt wurde (Choo et al., 1989), wurde für die später als Hepatitis C bezeichnete Nicht-A, Nicht-B-Hepatitis rekombinantes Interferon- $\alpha$  (IFN) zur Behandlung von Patienten eingesetzt. Die Behandlung mit IFN wurde schrittweise durch Anpassung der Dosierung und Behandlungsdauer sowie Ergänzung mit Ribavirin optimiert. Schließlich wurde eine Kombination aus langwirkendem PEGyliertem IFN und Ribavirin zwischen 2001 und 2011 als Standardtherapie eingesetzt. Tieferes Verständnis des HCV-Lebenszyklus, Kristallographie der HCV-Protease NS3 und ihres Kofaktors NS4A (s. 1.2.2.) sowie die Entwicklung von HCV-Replicon-Systemen ermöglichten den Weg zur Entwicklung von DAAs (s. 1.5.), die mit verschiedenen Stellen des HCV-Lebenszyklus wechselwirken. Somit konnte mit dem ersten entwickelten NS3/4A-Protease-Inhibitor im Jahr 2003 eine signifikante Reduzierung der viralen Replikation im Menschen gezeigt werden. Schließlich wurde der erste HCV-Protease-Inhibitor (Boceprevir) 2011 zugelassen und die Wirkziele der DAAs wurden in den Folgejahren auf NS5A (s. 1.3.) und Polymerase NS5B (s. 1.2.2.) ausgeweitet. Es wurde eine Vielzahl an neuen DAAs, darunter der erste NS5A-Inhibitor Daclatasvir (DCV) (s. 1.5.2.), entwickelt und zugelassen. Zu Beginn der Behandlung mit DAAs war noch eine Kombinationstherapie mit PEG-IFN und Ribavirin notwendig. Durch die Möglichkeit DAAs mit verschiedenen Wirkzielen zu kombinieren, konnte zu einer rein oralen, IFN-freien Therapieform mit 90 bis 100 %-iger Heilungsrate gewechselt werden.

Die Diagnose umfasst einen serologischen Test mit anti-HCV-Antikörpern. Bei dessen positivem Ergebnis folgt zusätzlich ein Nukleinsäuretest gegen HCV-RNA, um eine chronische Infektion zu bestätigen oder auszuschließen. Genotyp- und Subtypbestimmung sowie ggf. im späteren Therapieverlauf die Feststellung Resistenz-assoziiierter Substitutionen (RAS) ermöglichen eine personalisierte Therapie (Manns et al., 2017).

Seit 2018 wird von der WHO eine pan-genotypische Therapie empfohlen, die bis zu 95 % Heilchance bei gleichzeitig kurzer Behandlungsdauer von 12-24 Wochen aufweist. Die Behandlungsdauer hängt dabei u.a. vom Vorliegen einer Zirrhose ab (WHO, 2020). Von einer Heilung wird ausgegangen, wenn im Blut keine feststellbare Menge an HCV-RNA (= *sustained virological response*, SVR) 24 Wochen nach Ende der Therapie vorliegt (Pearlman and Traub, 2011).

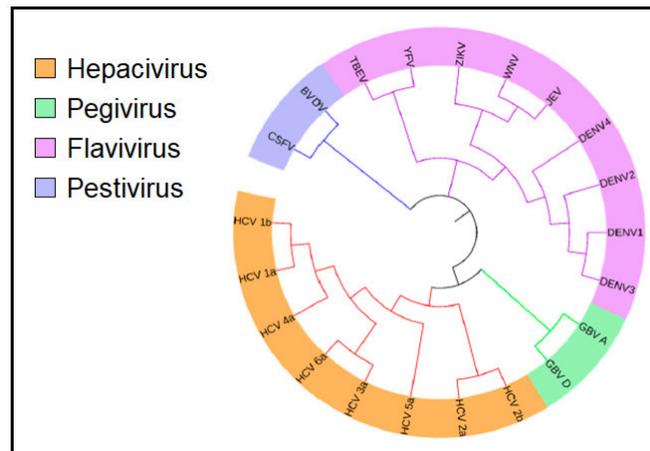
## **1.2. HCV**

HCV wurde 1989 durch Expressionsklonierung von immunoreaktiver cDNA aus infektiösem Nicht-A, Nicht-B-Hepatitis-Wirkstoff entdeckt (Choo et al., 1989) und stellt die Hauptursache der transfusionsassoziierten Hepatitis dar (Lindenbach et al., 2006). Die *Flaviviridae* als Familie von HCV (s. 1.2.1.), das HCV-Genom, die HCV-Proteine und deren Prozessierung (s. 1.2.2.) sowie die einzelnen Abschnitte des Lebenszyklus von HCV (s. 1.2.3.) werden folgend näher erläutert.

### **1.2.1. *Flaviviridae***

Bei den *Flaviviridae* handelt es sich um eine Familie behüllter, positiv-strängiger RNA-Viren, die Ähnlichkeiten in Virion-Morphologie, Genom-Organisation und Replikationsstrategie aufweisen (Lindenbach et al., 2006). Diese werden später näher beschrieben (s. 1.2.2. und 1.2.3.).

Die *Flaviviridae* umfassen die vier Gattungen *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Flavivirus* und *Pestivirus* und sind verantwortlich für viele wichtige Krankheiten, die die öffentliche Gesundheit weltweit betreffen (Chen et al., 2017). Exemplarisch sind verschiedene Human- und Tierpathogene der vier Gattungen in Abbildung 3 bearbeitet nach Chen et al. (2017) aufgeführt.



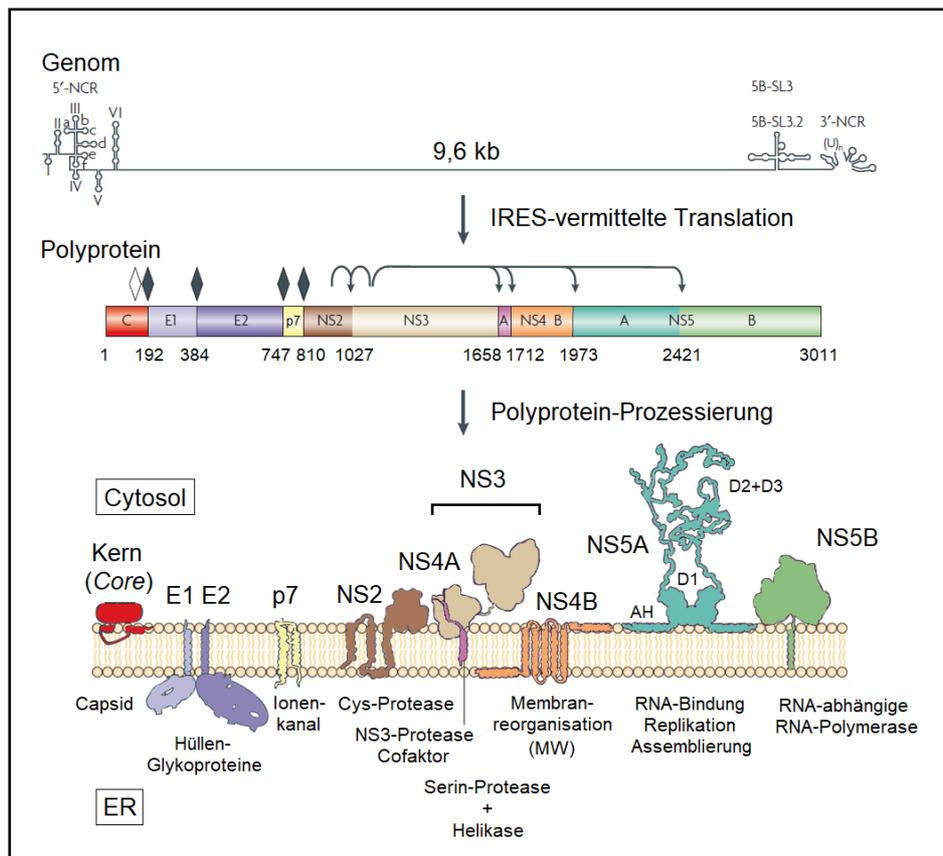
**Abbildung 3: Flaviviridae-Familienbaum.** Bearbeitet nach Chen et al. (2017). Exemplarisch sind verschiedene Human- und Tierpathogene der vier Gattungen *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Flavivirus* und *Pestivirus* gezeigt. *Hepacivirus*: Hepatitis C Virus (HCV) und verschiedene Genotypen; *Pegivirus*: GB-Virus A und GB-Virus-D; *Flavivirus*: Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (*Tick-born encephalitis virus*, TBEV), Gelbfieber-Virus (*Yellow fever virus*, YFV), Zika-Virus (ZIKV), West-Nil-Virus (WNV), Japanische Enzephalitis-Virus (JEV) und Dengue-Virus (DENV) mit seinen verschiedenen Serotypen 1-4; *Pestivirus*: Klassisches Schweinepest-Virus (*classical swine fever virus*, CSFV) und Bovines-Virusdiarrhoe-Virus (BVDV).

So gehören zu den *Flaviviridae* Humanpathogene wie z.B. HCV, Gelbfieber-Virus, Zika-Virus, West-Nil-Virus und Dengue-Virus, aber auch Tierpathogene wie z.B. das klassische Schweinepest-Virus (Chen et al., 2017). Insbesondere die globale Bedeutung der durch HCV verursachten Hepatitis C-Infektion wurde bereits unter 1.1. ausgeführt.

### 1.2.2. Genom und Proteinprozessierung

Das HCV-Genom und die Proteinprozessierung sind nach Moradpour et al. (2007) wie folgt beschrieben:

Es handelt sich beim HCV-Genom, um eine 9,6 kb große, positiv-strängige RNA ohne 5'-Kappe und 3'-Poly-A-Abschnitt, aber mit hochstrukturierten, nicht codierenden Regionen (NCR) am 5'- und 3'-Ende der RNA (s. Abb. 4). Die 5'-NCR ist bei verschiedenen HCV-Isolaten hoch konserviert und weist sechs hochstrukturierte Domänen (I-VI) auf. Die Domänen II, III und IV bilden zusammen mit den ersten 24-40 für das Kern-Protein codierenden Nukleotiden eine interne Ribosom-Eintrittsstelle (*internal ribosome entry site*, IRES). Diese IRES ist entscheidend für die Translation der viralen RNA (Honda et al., 1996). Die 3'-NCR besitzt eine kurze variable Region und einen Poly-(U/UC)-Abschnitt am 3'-Ende. Konservierte Elemente, darunter ein minimaler Poly-U-Abschnitt, sind essentiell für die Replikation in der Zellkultur und *in vivo*. So spielt auch ein *cis*-wirkendes Element (*cis-acting replication element*, CRE) innerhalb der Sequenz, welche für die C-terminale Region des HCV-Proteins NS5B codiert, eine Rolle.



**Abbildung 4: HCV-Genomorganisation, Polyprotein-Prozessierung und Membrantopologie gespaltener viraler Proteine.** Bearbeitet nach Moradpour et al. (2007) und Bartenschlager et al. (2013). Aminosäurenummern sind unter jedem Protein aufgeführt (HCV H-Stamm, GT 1a; GenBank-Zugangsnummer AF009606). NCR: 5'- und 3'-nicht-codierende Regionen, 5B-SL3: NS5B-Stammsschleife (*stem loop*) 3 *cis*-Replikationselement, IRES: Interne Ribosom-Eintrittsstelle, NS: Nichtstruktur(protein), ◆: Spaltstellen der ER-Signalpeptidase im HCV-Polyprotein, ◇: C-terminale Prozessierung des Kern-Proteins durch Signalpeptid-Peptidase, Pfeile: Spaltungen durch HCV NS2-3- und NS3-4A-Proteasen.

Bei der IRES-vermittelten Translation am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) wird durch einen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) ein Polyprotein-Vorläufer gebildet. Dieser wird ko- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen in strukturelle und nicht-strukturelle (NS) Proteine von HCV prozessiert (s. Abb. 4). Dabei werden Strukturproteine, ein Kern-Protein und die zwei Hüllenproteine E1 und E2, sowie das Protein p7 durch ER-Signalpeptidase gespalten (◆). Das Kern-Protein wird zusätzlich C-terminal durch eine Signalpeptid-Peptidase prozessiert (◇). Die Prozessierung der NS-Proteine erfolgt durch die viralen Proteasen NS2/3 und NS3/4A-Serinprotease (Pfeile).

Strukturelle Proteine, die das virale Partikel bilden, umfassen das Kern-Protein und die Hüllen-Glykoproteine E1 und E2. Zu den NS-Proteinen zählen der Ionenkanal p7, die NS2/3-Protease, NS3-Serin-Protease und NS3-RNA-Helikase mit dem Kofaktor NS4A, die Proteine NS4B und NS5A sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B. Die einzelnen HCV-Proteine sind nach Bartenschlager et al. (2013) wie folgt beschrieben:

Das Kernprotein (*Core*, auch C-Protein) ist Bestandteil des viralen Nukleocapsids. Über seine N-terminale hydrophile Domäne D1 erfolgt die RNA-Bindung und Homo-Oligomerisierung. Mit Hilfe einer  $\alpha$ -Helix ist es an die Membran des ERs und des membranösen Netzes (*membranous web*, MW) gebunden. Die Interaktion mit Lipidtropfen (*lipid droplet*, LD) findet über die hydrophobe Domäne D2 statt. Das Kern-Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Virus-Assemblierung (s. 1.2.3.).

Die Hüllproteine E1 und E2 sind glykosyliert und zur Innenseite des ER hin an dessen Membran gebunden. Sie bilden nicht-kovalente Komplexe und dienen als wichtige Bausteine der viralen Hülle.

Das Protein p7 ist in der Lage, Oligomere zu bilden und weist Kationenkanal-Eigenschaften auf. Es wird der Viroporin-Familie zugeordnet (Steinmann and Pietschmann, 2010). Nach Wozniak et al. (2010) verhindert es möglicherweise eine frühzeitige pH-Senkung beim Austritt virushaltiger Vesikel nach der Assemblierung. Zusätzlich bildet es Komplexe mit E1, E2 und Protein NS2 aus, welche als „Hüllenkomplexe“ bezeichnet werden (Bartenschlager et al., 2011). Somit spielt p7 wahrscheinlich eine weitere Rolle bei der Assemblierung viraler Partikel und deren Freisetzung (Steinmann und Pietschmann, 2010).

Das Protein NS2 weist in seiner C-terminalen Hälfte eine katalytische Aktivität auf und kann sich mit Hilfe des N-terminalen Drittels von NS3 innerhalb des Polyprotein-Vorläufers selbst von NS3 abspalten. Die Dimerisierung von NS2 ist dabei wichtig für die Bildung einer aktiven NS2/3-Protease. Wie andere HCV-Proteine auch, liegt NS2 membranassoziiert vor. Ferner spielt es eine wichtige Rolle bei der viralen Assemblierung (s. 1.2.3.).

Bei NS3 handelt es sich um ein multifunktionales Protein. Sein N-terminales Drittel ist als Serinprotease aktiv, wohingegen die restlichen C-terminalen zwei Drittel als RNA-Helikase/NTPase tätig sind. NS4A ist ein essentieller Kofaktor von NS3 und interkaliert in die NS3-Protease-Domäne. Es unterstützt die Membranbindung, aktiviert die Proteaseaktivität durch Stabilisierung von NS3 und leistet seinen Beitrag an der Substrat-Erkennungsstelle. Ferner interagiert es auch mit der NS3-Helikase-Domäne und spielt somit eine Rolle bei der Replikation. Aufgaben der NS3-Helikase sind dabei das Entwinden der Sekundärstruktur der einzelsträngigen HCV-RNA und ATP-Hydrolyse. NS3/4A ist auch bei der Immunabwehr beteiligt und spaltet Signalmoleküle der Interferonantwort (Li et al., 2005 und Meylan et al., 2005). Im Rahmen der Entwicklung von DAAs wurde eine Vielzahl von Arzneimitteln mit NS3/4A-Serinprotease als Ziel etabliert (s. 1.5.).

NS4B ist in Kooperation mit NS5A bei der Induktion und Ausbildung des für die HCV-Replikation essentiellen MWs beteiligt (Egger et al., 2002 und Romero-Brey et al., 2012). Es weist vier mobile Transmembransegmente auf und bildet Oligomere aus. Ferner wurde RNA-Bindung von NS4B beobachtet und es ist auch bei der Replikation und Bildung infektiöser Partikel beteiligt (Jones et al., 2009).

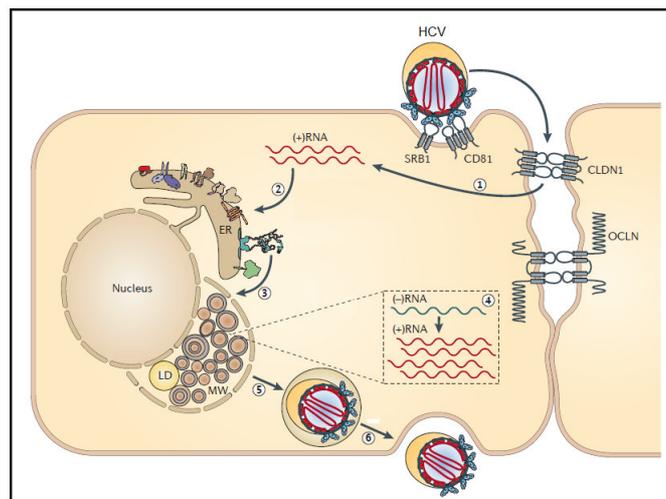
Das bei der vorliegenden Promotion im Fokus stehende HCV-Protein NS5A ist unter 1.3. im Detail beschrieben.

NS5B ist als RNA-abhängige RNA-Polymerase das Schlüsselenzym der HCV-Replikation und ist durch diese Rolle auch ein Ziel von DAAs (s. 1.5.). Seine fehlende Korrekturlesefunktion (Penin et al., 2004a) trägt wesentlich zur Vielfalt von HCV bei (vgl. 1.1.1. und 1.1.2.).

Zur Vollständigkeit ist auch das ARFP (*alternative reading frame protein*) oder F-Protein (nach *frameshift*) zu nennen, welches durch einen alternativen Leserahmen (*alternative reading frame*) innerhalb der Codierungsregion für das Kern-Protein entsteht. Das Protein wird während der Infektion exprimiert, aber scheint keine Bedeutung für die Replikation *in vitro* und *in vivo* zu spielen.

### 1.2.3. Lebenszyklus

Der HCV-Lebenszyklus nach Bartenschlager et al. (2013) ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: HCV-Lebenszyklus.** Bearbeitet nach Bartenschlager et al. (2013). ① Rezeptorvermittelte Endozytose des HCV-Partikels, ② Translation viraler RNA und Prozessierung des Polyproteins, ③ Ausbildung des membranösen Netzes (MW), ④ Replikation viraler RNA, ⑤ Assemblierung von HCV-Partikeln, ⑥ Partikel-Freisetzung; HCV: Hepatitis C-Virus, SRB1: *scavenger*-Rezeptor Klasse B Typ 1, CLDN1: Claudin 1, OCLN: Occludin, ER: Endoplasmatisches Reticulum, MW: Membranöses Netz (*membranous web*), LD: Lipidtropfen (*lipid droplet*).

Die einzelnen Schritte, Bindung und Zelleintritt des Virus-Partikels ①, die Translation und Prozessierung der HCV-Proteine ②, die Ausbildung des MWs und die Replikation ③+④, Assemblierung ⑤ und virale Freisetzung ⑥, werden folgend näher erklärt.

### **Bindung und Zelleintritt (①)**

Bei der Aufnahme von HCV in Zellen handelt es sich um einen feinregulierten Prozess unter Beteiligung einer Vielzahl an Wirtsfaktoren, Virion-assoziiierter Lipoproteine und weiterer zellassoziierter Faktoren. Die Aufnahme erfolgt mit hoher Spezifität in Leberzellen und mit einer hohen Wirtsspezifität (Ding et al., 2014). Nach Moradpour et al. (2007) umfassen die Virionbestandteile die genomische HCV-RNA, Kern-Proteine und die Hüll-Glykoproteine E1 und E2. Die Viriongröße beträgt ~ 55 nm (Wakita et al., 2005). Die Proteine E1 und E2 sind in eine Doppelschicht-Lipidhülle eingebettet und umgeben ein Nukleocapsid mit mehrfachen Kern-Proteinen (Wakita et al., 2005). Frei zirkulierendes HCV liegt in verschiedenen Formen vor. So gibt es HCV in Interaktion mit Lipoproteinen niedriger Dichte (*low density lipoproteins*, LDLP) und mit Lipoproteinen sehr niedriger Dichte (*very low density lipoproteins*, VLDLP). Es gibt aber auch HCV als freie Virionen oder an Immunglobulinen gebundene Varianten (André et al., 2005).

Nach Ding et al. (2014) verläuft die HCV-Aufnahme als rezeptorvermittelte Endozytose unter Beteiligung mehrerer Eintrittsfaktoren. Diese sind LDLR (*low density lipoprotein receptor*) (Agnello et al., 1999), das Tetraspanin-Familienmitglied CD81 (Pileri, 1998), *scavenger*-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SRB1) (Scarselli et al., 2002) und die *tight junction*-Proteine Claudin-1 (CLDN1) (Evans et al., 2007) und Occludin (OCLN) (Liu et al., 2009).

Eine erste Bindung geschieht durch Interaktion der Lipoprotein-assoziierten Viruspartikel mit LDLR und Heparansulfat-Proteoglykanen. Die Bindung an SRB1 hat eine Konformationsänderung von E2 und eine mögliche Bindung an CD81 zur Folge. Unter Aktivierung mehrerer Signalwege kommt es zu einer lateralen Membrandiffusion Richtung *tight junctions*. Hier erfolgt eine Interaktion mit Claudin-1 und Occludin sowie die Internalisierung über Clathrin-vermittelte Endozytose (Blanchard et al., 2006). Schließlich fusioniert in der Zelle die E2-Hülle durch pH-Senkung mit der Endosomenmembran. Dadurch wird die virale RNA freigesetzt. Neben der beschriebenen Zell-Aufnahme ist auch eine Ausbreitung von Zelle zu Zelle möglich (Zeisel et al., 2013).

## **Translation und Proteinprozessierung (②)**

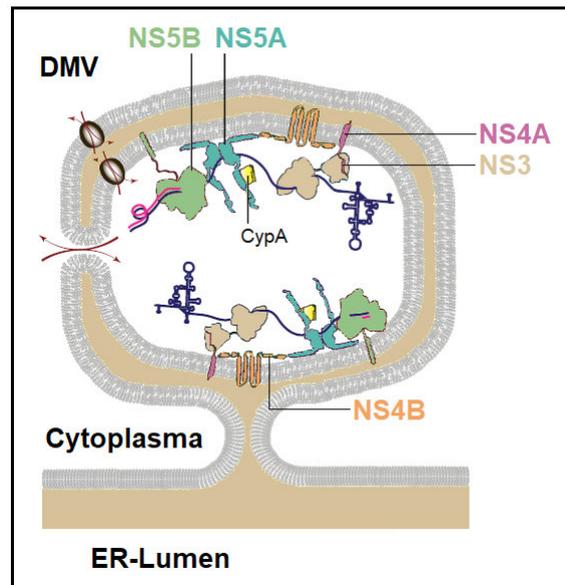
Die Translation und Prozessierung der HCV-Proteine wurden bereits unter 1.2.2. beschrieben.

## **Ausbildung des MW und Replikation (③+④)**

Die Bildung eines membranassoziierten Replikationskomplexes (RK) aus viralen Proteinen, viraler RNA und veränderter Membran gilt als gemeinsames Kennzeichen von allen positiv-strängigen RNA-Viren (Mackenzie, 2005). Aufgaben der Membranen nach Moradpour et al. (2007) sind die Organisation des RK, Kompartimentierung und lokale Konzentrierung von viralen Produkten, Bindung entwundener RNA, Bereitstellung von Lipidkomponenten und der Schutz viraler RNA vor der Wirtsabwehr.

Von Egger et al. (2002) wurde eine Induktion bestimmter Membranveränderungen bei der Expression von HCV-Proteinen beschrieben. Die veränderten Membranstrukturen wurden als membranöses Netz (*membranous web*, MW) bezeichnet. Ferner konnten Egger et al. (2002) beobachten, dass NS4B allein in der Lage war, solche Membranveränderungen zu induzieren. Eine solche Induktion der MW-Bildung durch NS4B konnte auch durch Gosert et al. (2003) in Huh-7-Repliconzellen nachgewiesen werden. Das MW wurde als Ort der HCV-RNA-Replikation vermutet.

Romero-Brey et al. (2012) konnten schließlich belegen, dass das MW vom ER abstammt und hauptsächlich aus Einfach- und Doppelmembran-Vesikeln (DMV) besteht. Bei den DMV handelt es sich um Membranprotrusionen des ER, welche zum ER bestehende regelmäßige Verbindungen über halsartige Strukturen aufweisen. Im späteren Infektionsstadium kann es auch zur Ausbildung von Multimembranvesikeln als Antwort auf Stress kommen (Romero-Brey et al., 2012). Romero-Brey et al. (2012) stellten fest, dass die DMV v.a. durch NS5A und die Einfach-Membranvesikel durch NS4B induziert werden. Dennoch kann man von einer konzertierten Aktion aller Replikasfaktoren (NS3-5B) bei der MW-Bildung ausgehen (Wang and Tai, 2016). In Abbildung 6 nach Paul et al. (2014) ist das Modell eines HCV-induzierten DMVs mit RK gezeigt.



**Abbildung 6: Modell eines HCV-induzierten Doppelmembran-Vesikels (DMV).** Bearbeitet nach Paul et al. (2014). Virus-induzierte DMV beinhalten HCV-Nichtstruktur-Proteine und RNA und sind der Ort der viralen RNA-Replikation. Das DMV enthält möglicherweise eine (vorübergehende) Öffnung oder bestimmte Transporter, um einen Austausch von Nukleotiden und viraler RNA zwischen dem Inneren des DMVs und dem Cytoplasma zu erlauben. Es wird angenommen, dass sich der virale Replikationskomplex, bestehend aus NS3 mit Kofaktor NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und verschiedenen Wirtszellfaktoren (exemplarisch gezeigt Cyclophilin A (CypA)) auch auf der äußeren Oberfläche des DMVs befinden kann (nicht gezeigt).

Das Virus-induzierte DMV beinhaltet die HCV-Proteine NS3 mit Kofaktor NS4A, NS4B, NS5A und NS5B sowie HCV-RNA. Es ist der Ort der viralen RNA-Replikation: Zunächst wird mit dem Genom als Musterstrang eine komplementäre negativ-strängige RNA synthetisiert. Mit diesem negativ-strängigen Musterstrang kann die Synthese weiterer genomischer, positiv-strängiger RNA erfolgen (Moradpour et al., 2007). Diese neue HCV-RNA kann für weitere Translation von HCV-Proteinen, erneute Replikation oder den Einbau in neue Viruspartikel genutzt werden (Bartenschlager et al., 2013). Die Translation und Replikation werden möglicherweise über Zirkularisierung von RNA, Blockieren vom 5'- und 3'-Ende der viralen RNA durch virale Proteine oder Wirtspoteine oder durch die Ausbildung alternativer RNA-Strukturen reguliert (Paul et al., 2014).

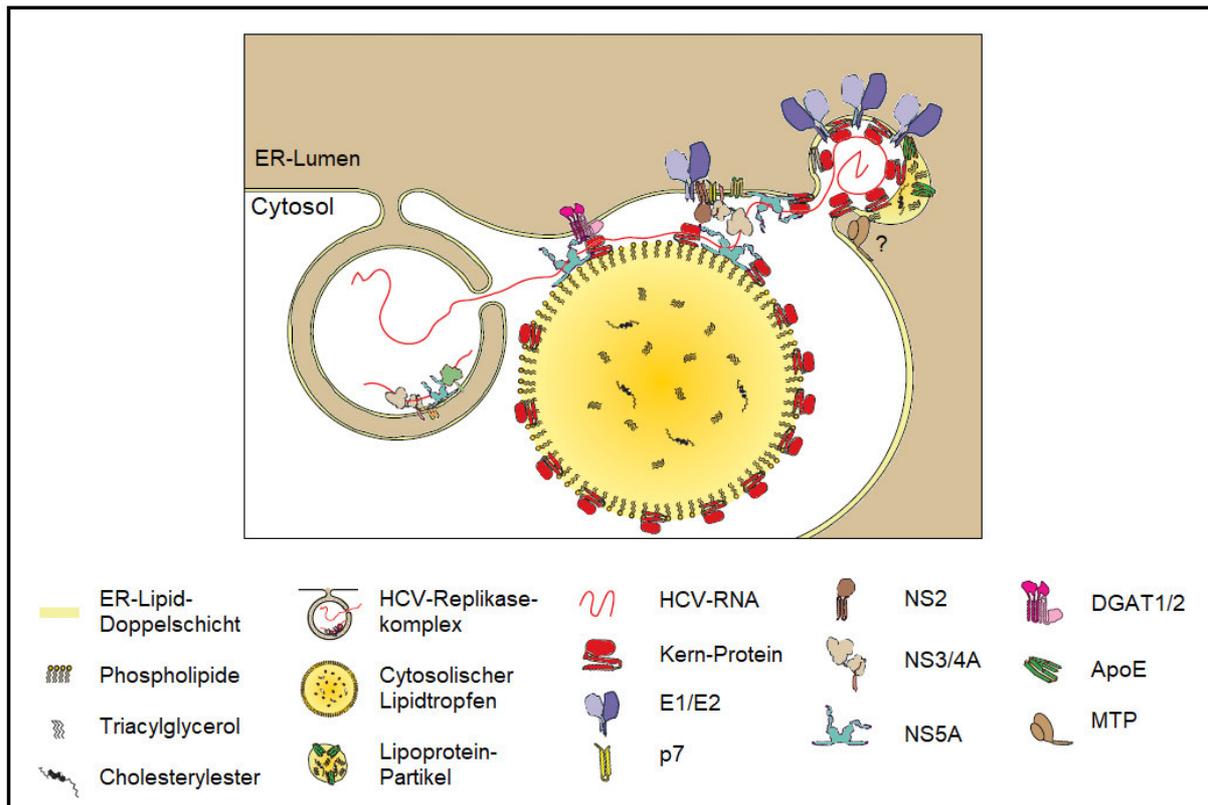
Bei der Bildung des MW, der Ausbildung des RKs und der Replikation spielen neben viralen Proteinen auch eine Vielzahl an Wirtszellfaktoren eine Rolle (Paul et al., 2014). Cyclophilin A (CypA) ist exemplarisch als ein solcher Wirtszellfaktor in Abbildung 6 gezeigt. Die Prolyl-*cis-trans*-Isomerase CypA nimmt über die Interaktion mit NS5A möglicherweise Einfluss auf die Interaktion von NS5A und NS5B oder auf die RNA-Bindung von NS5A (Hanouille et al., 2009a). Auch bei der Bildung des RKs ist CypA wichtig (Madan et al., 2014). CypA bildet somit einen essentiellen Kofaktor für die HCV-Infektion (Yang et al., 2008). Weitere Beispiele für wichtige Wirtszellfaktoren bei der Replikation sind

Cyclophilin B, welches mit NS5B interagiert und dessen RNA-Bindung verstärkt (Watashi et al., 2005) oder miR-122. Diese microRNA ist stark in der Leber exprimiert und steigert die HCV-Replikation (Jopling, 2005).

Eine entscheidende Rolle bei der MW-Bildung spielt auch die lokale Lipidzusammensetzung. Dabei ist die Interaktion von NS5A und Phosphatidylinositol-4-Kinase III  $\alpha$  (PI4KIII $\alpha$ ) von großer Bedeutung (Reiss et al., 2011). Bei einer HCV-Infektion wird auf diese Weise die Lokalisation von PI4KIII $\alpha$  geändert (Reiss et al., 2011) und es kommt zu einer Erhöhung von Phosphatidylinositol-4-phosphat (PtdIns(4)P) im MW sowie zu einer Senkung des PtdIns(4)P-Gehalts in der Plasmamembran (Bianco et al., 2012). Cholesterin ist ebenfalls eine wichtige Komponente der HCV-remodellierten Membran (Paul et al., 2014). Es kommt zu einem OSBP (*oxysterol binding protein*) -vermittelten Cholesterintransport (Wang et al., 2014). Dabei bindet OSBP an PtdIns(4)P (Wang et al., 2014) und tritt auch in Interaktion mit VAPA (*human vesicle-associated membrane protein-associated protein*) und VAPB (Evans et al., 2004 und Gao et al., 2004). Zusätzlich ist auch die Erhöhung von Glykosphingolipiden unter Beteiligung von FAPP2 (*four-phosphate adaptor protein 2*) wichtig (Khan et al., 2014).

### **Assemblierung und Zellaustritt (⑤+⑥)**

Die Assemblierung neuer viraler Partikel ist eng mit der Replikation verknüpft (Bartenschlager et al., 2011). Da es sich bei HCV um ein Lipoviropartikel handelt, ist die Assemblierung ebenfalls eng mit der Lipoproteinbiogenese verbunden (André et al., 2005). LDs spielen für die HCV-Produktion eine wichtige Rolle (Miyanari et al., 2007). Ein hypothetisches Modell der HCV-Assemblierung ist nach (Paul et al., 2014) in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Hypothetisches Modell der HCV-Assemblierung.** Bearbeitet nach Paul et al. (2014). Virale Tochter-RNA wird vom Replikasekomplex mittels NS3 und NS5A zu cytosolischen Lipidtröpfchen (cLD) gebracht. Es wird angenommen, dass Kern-Protein nach seiner Rekrutierung von den cLDs zum ER die Nukleocapsid-Bildung und Knospung in das ER-Lumen auslöst. Durch Interaktion von NS2 und NS3-Protease-Domäne, bringt NS2 Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine zusammen. Entstehende Virionen bauen zelluläre Lipoproteine, v.a. ApoE, ein. Diese werden vermutlich für die Lipidierung der Viruspartikel benötigt.

Nach Gentzsch et al. (2013) kann die Assemblierung in die Einzelschritte der Rekrutierung von Kern-Protein zu cytosolischen Lipidtröpfchen (cLD), der Entladung von Kern-Protein von cLDs, der Assemblierung des Nukleocapsids und des Einhüllens des Nukleocapsids mit Membran unterteilt werden.

Eine Akkumulation des Kern-Proteins auf cLDs wurde von Miyanari et al. (2007) festgestellt. Durch die Bindung von Kern-Protein an die cLDs kommt es mit Hilfe von Mikrotubuli und Dynein zu einer Umverteilung der cLDs. Ausgehend von einer gleichmäßigen Verteilung im Cytosol aggregieren die cLDs in der Peripherie des Zellkerns bzw. des ER (Boulant et al., 2008). NS5A kolokalisiert mit dem Kern-Protein auf cLDs (Appel et al., 2008). Für die Rekrutierung von NS5A zu den cLDs ist dessen Caseinkinase 1-abhängige Hyperphosphorylierung wichtig (Masaki et al., 2014). Die Rekrutierung von NS5A ist essentiell für die Interaktion mit dem Kern-Protein und die folgende Nukleocapsid-Assemblierung. Dazu passt auch, dass die Phosphorylierung eines C-terminalen Serin-Clusters der Domäne 3 von NS5A durch Caseinkinase 2 wichtig für die Assemblierung ist (Tellinghuisen et al., 2008).

Bei der Lokalisierung von Kern-Protein und NS5A auf cLDs sind auch Wirtsfaktoren beteiligt. Diacylglycerol-Acyltransferase 1/2 (DGAT1/2) ist exemplarisch in Abbildung 7 gezeigt. DGAT1/2 spielt eine Rolle bei der Lokalisierung von NS5A an cLDs und damit auch bei der Interaktion von NS5A und Kern-Protein (Camus et al., 2013). Es ist aber auch wichtig für die Lokalisierung von Kern-Protein auf cLDs (Herker et al., 2010). Ein weiterer an cLDs kolokalisierender Wirtsfaktor ist HSC70 (*heat shock cognate protein 70*), welches die Größe der cLDs regelt und auch bei der Bildung von Viruspartikeln beteiligt ist (Parent et al., 2009).

Es wird angenommen, dass Detergens-resistente Membranen als Assemblierungsplattformen dienen (Boyer et al., 2019). Diese *lipid rafts* ähnelnden Strukturen der ER-Membran befinden sich in der Nähe von cLDs und assoziieren mit E1, E2, p7, NS2, NS3 und Kern-Protein (Ma et al., 2011). Für NS2 als Gerüststruktur wird dabei eine koordinierende Vereinigung der viralen Proteine vermutet (Boyer et al., 2019). Der notwendige Transport von Kern-Protein von cLDs zur Assemblierungsstelle erfolgt vermutlich durch NS5A (Boyer et al., 2019). Eine mögliche zusätzliche Rolle von NS5A an der Assemblierungsplattform ist noch unklar (Boyer et al., 2019). Beim Entladen des Kern-Proteins von cLDs ist auch p7 wichtig. Bei dessen *Knockout* findet eine Nukleocapsid-Assemblierung an den cLDs statt, es kommt aber nicht zum Transfer zur ER-Membran und zu keiner Knospung (Gentsch et al., 2013). Es wird angenommen, dass im Normalfall das Kern-Protein nach seinem Transfer zur Assemblierungsstelle an der ER-Membran die Nukleocapsid-Bildung und Knospung in das ER-Lumen induziert (Paul et al., 2014). Beide Ereignisse sind wahrscheinlich eng räumlich und zeitlich miteinander verknüpft (Paul et al., 2014).

Die Knospung und Umhüllung des Nukleocapsids erfolgt unter großer Beteiligung von Apoproteinen, v.a. ApoE (Paul et al., 2014, Benga et al., 2010 und Shi et al., 2002). Bei der Knospung in das ER-Lumen spielt die Interaktion des E1-E2-Hüllenkomplexes mit ApoE auch eine mögliche Rolle (Boyer et al., 2019). Außerdem steht der Erhalt der Virionhülle auch in enger Verbindung mit VLDLs (Huang et al., 2007a). Aus diesem Grund wird auch vermutet, dass MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) wichtig ist. MTP ist bedeutend für die Bildung von VLDLs und vermittelt vermutlich den Triglycerid-Einbau in neue ER-luminale LDs (Paul et al., 2014). Die neuen viralen Partikel verlassen die Zelle über den konstitutiven sekretorischen Signalweg, wobei es beim Weg über den Golgi-Apparat noch zu komplexen Modifikationen der Hüllenproteine E1 und E2 kommt (Vieyres et al., 2014).

Zusammenfassend ist zu betonen, dass der gesamte HCV-Lebenszyklus in seinen einzelnen Schritten eng mit dem Lipidmetabolismus der Wirtszelle verknüpft ist (Hofmann et al., 2018).

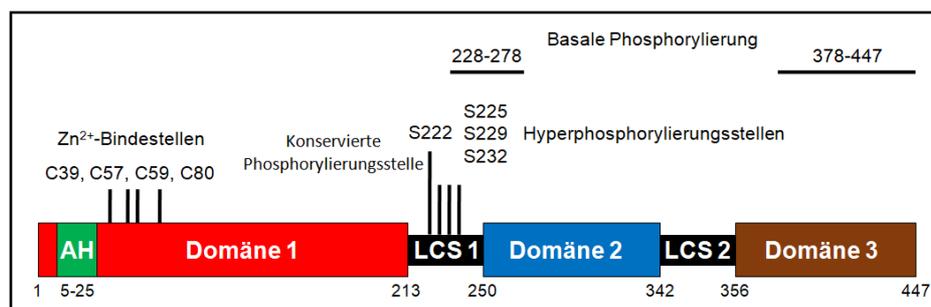
So dient das MW als modifizierte Wirtsmembran als Ort der Replikation. LDs werden beeinflusst und spielen eine wichtige Rolle bei der Assemblierung. Außerdem ist eine Vielzahl an Lipiden und Lipoproteinen Teil der Virionhülle.

### 1.3. NS5A

Das bei der vorliegenden Promotion im Fokus stehende HCV-Protein NS5A wird folgend in Hinsicht auf seinen Aufbau (s. 1.3.1.), vorhandene Kristallstrukturen (s. 1.3.2.) und seine Aufgaben (s. 1.3.3.) näher erörtert.

#### 1.3.1. Aufbau von NS5A

Die schematische Struktur von NS5A bearbeitet nach Nakamoto (2014) ist in Abbildung 8 gezeigt. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz eines HCV-Con1-Isolats (GenBank-Zugangsnummer: AJ238799) nach Tellinghuisen et al. (2004).



**Abbildung 8: Schematische Struktur von HCV-NS5A.** Bearbeitet nach Nakamoto (2014). Gezeigt ist die Drei-Domänen-Struktur von NS5A (Tellinghuisen et al. (2004)), ergänzt mit Zink-Bindungs- und Phosphorylierungsstellen (Tellinghuisen et al., 2005, Katze et al., 2000 und Tanji et al., 1995). Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz eines HCV-Con1-Isolats (GenBank-Zugangsnummer: AJ238799) nach Tellinghuisen et al. (2004). AH: N-terminale amphipathische  $\alpha$ -Helix, LCS 1 und 2: Sequenzbereiche niedriger Komplexität (*low complexity sequences*).

NS5A besteht aus den Domänen 1, 2 und 3 (D1, D2 und D3), welche untereinander durch zwei Sequenzbereiche niedriger Komplexität (*low complexity sequences*, LCS 1 und 2) getrennt sind (Tellinghuisen et al., 2004). Im Gegensatz zur hochstrukturierten D1 (s. 1.3.2.), liegen D2 (Liang et al., 2007) und D3 (Hanouille et al., 2009b) nativ ungefaltet vor. Die N-terminale amphipathische  $\alpha$ -Helix (AH) (Elazar et al., 2003 und Penin et al., 2004b) ist als Teil von D1 ebenfalls dargestellt. Über die AH kann NS5A an die cytosolische Seite von intrazellulären Membranen binden (Brass et al., 2002).

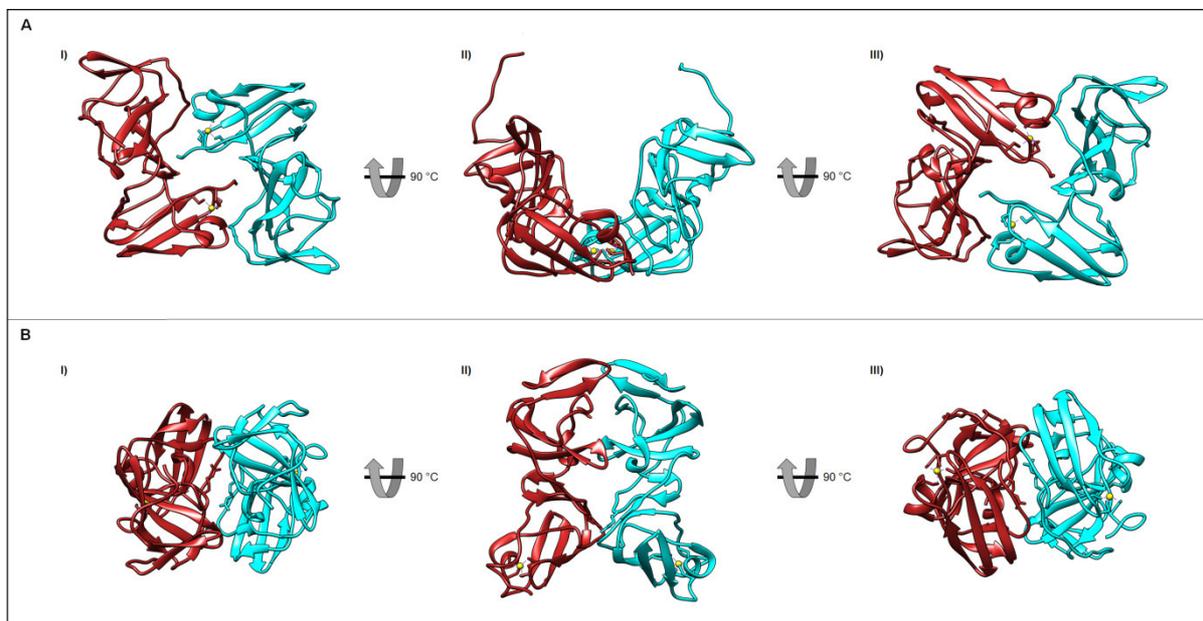
Als Zink-Metalloprotein kann NS5A über sein Zink-Koordinationsmotiv, bestehend aus den Cysteinen C39, C57, C59 und C80, ein Zink pro Molekül binden (Tellinghuisen et al., 2005). Des Weiteren handelt es sich bei NS5A um ein Phosphoprotein, bei dem zwei Phosphorylie-

rungszustände vorliegen (Tanji et al., 1995) und eine konservierte Phosphorylierungsstelle bei S222 bekannt ist (Katze et al., 2000). Stellen für die basale Phosphorylierung liegen bei 228-278 und 378-447, sowie für die Hyperphosphorylierung bei S225, S229 und S232 (Tanji et al., 1995). Abhängig von den unterschiedlichen molekularen Massen von 56 kD und 58 kD wird die basale Phosphorylierung als p56 und die Hyperphosphorylierung als p58 bezeichnet (Kaneko et al., 1994).

Die Hyperphosphorylierung geschieht durch die  $\alpha$ -Isoform von Caseinkinase 1 (Quintavalle et al., 2006). Allerdings können auch andere Kinasen wie z.B. Polo-like Kinase 1 bei der Hyperphosphorylierung eine Rolle spielen (Chen et al., 2010). Tellinghuisen et al. (2008) konnten zeigen, dass Caseinkinase 2 die D3-Domäne von NS5A phosphoryliert, was wichtig für die HCV-Assemblierung ist (s. 1.3.3.).

### 1.3.2. NS5A-D1-Kristallstrukturen

Von Tellinghuisen et al. (2005) und Love et al. (2009) sind zwei verschiedene Kristallstrukturen zu HCV-GT 1b-NS5A-D1 (PDB-ID: 1ZH1 und 3FQM) beschrieben. In beiden Fällen liegt NS5A-D1 als Homodimer vor.



**Abbildung 9: Zwei verschiedene Kristallstrukturen von HCV-GT 1b-NS5A-D1.** Die Kristallstrukturen von HCV-Genotyp 1b-NS5A-D1-Homodimeren von Tellinghuisen et al. (2005) (PDB-ID: 1ZH1) (A) und Love et al. (2009) (PDB-ID: 3FQM) (B) wurden unter Verwendung von Chimera 1.14 dargestellt. Die Monomere sind in Rot und Hellblau und gebundenes Zink als gelbe Kugeln gezeigt. Es sind je drei Perspektiven (I-III) abgebildet: I) Vom Cytoplasma her in Aufsicht auf die ER-Membran, II) in einer Ebene mit der ER-Membran im Profil und III) vom ER-Inneren her in Aufsicht auf die ER-Membran.

Zwar liegen identische Monomer-Strukturen, aber sehr unterschiedliche Interaktionsflächen vor. Bei (A) handelt es sich um eine krallenartige, offene Struktur, durch die sich eine Furche bildet. Bei dieser Furche kann es sich um eine mögliche RNA-Bindestelle handeln. Am Boden der RNA-Furche befindet sich passend die basische Aminosäure Trp84 und die Furche wird in geeigneter Abmessung durch saure „Arme“ begrenzt (Tellinghuisen et al., 2005). Bei (B) findet sich eine geschlossene Struktur. Positionen, die den bei Tellinghuisen et al. (2005) vermuteten RNA-Bindungsstellen entsprechen, sind auf zwei flachen, räumlich getrennten Oberflächen verteilt (Love et al., 2009). Love et al. (2009) interpretieren die beiden vorliegenden, verschiedenen Kristallstrukturen als Hinweis auf die Multifunktionalität von NS5A. Somit könnte die offene Struktur von (A) mit ihrer möglichen RNA-Bindungsstelle eine Rolle bei der Replikation spielen, wohingegen die Struktur von (B) für die virale Assemblierung wichtig sein könnte. Neben seiner essentiellen Bedeutung für Replikation und Assemblierung hat NS5A aber auch noch weitere Aufgaben (s. 1.3.3.).

### **1.3.3. Aufgaben von NS5A**

NS5A weist keine eigene enzymatische Aktivität auf, interagiert aber mit einer Vielzahl an viralen Proteinen (Dimitrova et al., 2003) und Wirtsproteinen (Macdonald and Harris, 2004). Auf diese Weise kann es bei wesentlichen Schritten des HCV-Lebenszyklus wie Replikation und Assemblierung Einfluss nehmen (s. 1.2.3.).

NS5A ist als Teil des RKs essentiell für die Replikation (Moradpour et al., 2005). Die Membranbindung von NS5A über seine AH (Elazar et al., 2003 und Penin et al., 2004b) und die Bindung von Zink (Tellinghuisen et al., 2004) sind dabei entscheidend. NS5A-D1 ist mit seiner Fähigkeit zur RNA-Bindung (Huang et al., 2005) von großer Bedeutung. Bei dieser Bindung werden die 3'-Enden einzelsträngiger RNA mit positiver oder negativer Polarität (Huang et al., 2005) und G/U-reiche RNA (Hwang et al., 2010) bevorzugt. Nach Hwang et al. (2010) sind die Aminosäuren 33-249 (vgl. Abb. 8) als minimale RNA-Bindedomäne ausreichend. Durch D2 und D3 allein kommt es nach Hwang et al. (2010) zu keiner RNA-Bindung, wobei Foster et al. (2010) auch eine Beteiligung dieser Domänen bei der RNA-Bindung feststellen konnten. NS5A als Dimer (vgl. Abb. 9) konnte als Form für die RNA-Bindung bestätigt werden, da die Gegenwart von U-reicher RNA das Monomer-Dimer-Gleichgewicht deutlich Richtung Dimer verschob (Hwang et al., 2010).

NS5A reguliert auch die Replikation über die Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B (Shirota et al., 2002). Bessa et al. (2017) konnten belegen, dass D2

als allosterischer Regulator von NS5B aktiv ist. Ross-Thriepland et al. (2013) stellten zusätzlich fest, dass der C-Terminus von NS5A-D2 eine Rolle bei der Replikation, aber nicht bei der Virion-Assemblierung und Freisetzung spielt. Darüber hinaus fanden Dujardin et al. (2019) ein Prolin-Tryptophan-Wendemotiv (P314-W316), welches über Interaktion mit CypA zur Feinregulation der RNA-Replikation dient. Somit erfüllt über D1 hinaus, auch D2 von NS5A seinen Zweck in der Replikation.

Im Gegensatz dazu liegt die Aufgabe von NS5A-D3 bei der Virion-Assemblierung (Appel et al., 2008). So ist D3 z.B. wichtig bei der Interaktion von NS5A mit dem Kern-Protein (Masaki et al., 2008) (vgl. 1.2.3.). Es wird vermutet, dass die verschiedenen Phosphorylierungszustände von NS5A (s. 1.3.1.) eine Rolle bei der Regulation zwischen den beiden Funktionen der Replikation und Assemblierung spielen (Huang et al., 2007 und Tellinghuisen et al., 2008).

D2 und D3 von NS5A weisen durch ihren Mangel an intrinsischer Ordnung und Struktur (vgl. 1.3.1.) eine hohe Flexibilität und weitreichende Interaktionsmöglichkeiten auf, die für die Feinregulation des vielfältigen Interaktionsnetzwerks von NS5A genutzt werden können (Sólyom et al., 2015). Dabei werden die Interaktionen der beiden NS5A-Domänen durch den Wirtszellfaktor Bin1 und die Phosphorylierung über Caseinkinase 2 reguliert (Sólyom et al., 2015 und Goonawardane et al., 2017). Auch D1 interagiert mit wichtigen Wirtszellfaktoren wie z.B. dem zellulären Transkriptionsfaktor p53 (Lan et al., 2002) oder FKBP38 als Teil des mTOR-Signalwegs (Peng et al., 2010). Durch die Vielzahl an Interaktionen mit unterschiedlichen Wirtsfaktoren kann NS5A somit verschiedenste zelluläre Prozesse wie z.B. Zellproliferation, Apoptose oder Immunabwehr kontrollieren (Tellinghuisen and Rice, 2002 und Macdonald und Harris, 2004).

Darüber hinaus steht auch zur Diskussion, ob mögliche NS5A-Oligomere eine Funktion erfüllen. Durch NS5A-Oligomerisierung könnte eine „Fahrbahn“ für RNA gebildet werden, welche dem Schutz vor RNA-Abbau und dem Transport zwischen verschiedenen Kompartimenten wie MW und LD (vgl. 1.2.3.) dienen könnte (Appel et al., 2006 und Love et al., 2009). Mögliche, theoretische helikal angeordnete NS5A-Polymer-Strukturen wurden von Love et al. (2009) und Lambert et al. (2014) erstellt.

Zusammenfassend handelt es sich bei NS5A um ein Schlüsselprotein der HCV-Replikation und Assemblierung, welches andere virale Proteine und seine Wirtszellumgebung steuert und auf diese Weise eine erfolgreiche Produktion und Freisetzung neuer

Viruspartikel unterstützt (Meanwell and Belema, 2019). Dies wird noch zusätzlich durch die Manipulation zellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Immunabwehr gesichert (Tellinghuisen und Rice, 2002 und (Macdonald and Harris, 2004)).

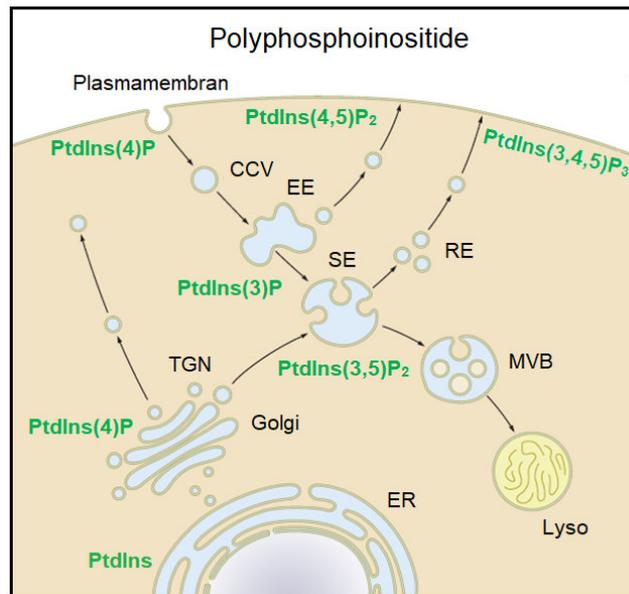
Es ist nicht überraschend, dass NS5A somit ein geeignetes Ziel für DAAs darstellt (s. 1.5.). Umso erstaunlicher ist, dass über die molekularen Details der Funktionen von NS5A immer noch sehr wenig bekannt ist.

## **1.4. Polyphosphoinositide (PPIs)**

Wie bereits erläutert, sind die einzelnen Schritte des HCV-Lebenszyklus eng mit dem Lipidmetabolismus und der Lipidzusammensetzung verschiedener Membranen der Wirtszelle verknüpft (s. 1.2.3.). PPIs nehmen dabei einen besonderen Stellenwert ein (s. 1.2.3.). So konnte auch die Interaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) mit NS5A durch Cho et al. (2015) nachgewiesen werden. Folgend werden Struktur und Verteilung von PPIs (s. 1.4.1.) und ihre Aufgaben (s. 1.4.2.) näher beschrieben. Die Ergebnisse von Cho et al. (2015) werden unter 1.4.3. genauer betrachtet.

### **1.4.1. Struktur und Verteilung von PPIs**

Nach Falkenburger et al. (2010) zeigen PPIs die übliche Struktur von Phospholipiden. Ein Glycerol-Rückgrat ist mit zwei Fettsäureketten und einem Phosphat verestert. Dieses Phosphat ist mit einer polaren Kopfgruppe verbunden. Bei PPIs dient als Kopfgruppe ein *myo*-Inositol mit freien Hydroxylgruppen D2-D6. Die Hydroxylgruppen D3, D4 und D5 können durch Lipidkinasen reversibel phosphoryliert werden, woraus sich sieben verschiedene PPIs mit einzigartiger zellulärer Verteilung ergeben. In Abbildung 10 ist bearbeitet nach Balla (2013) die Verteilung von PPIs in verschiedenen Membrankompartimenten einer typischen Zelle dargestellt.



**Abbildung 10: Verbreitung von PPIs in verschiedenen Membrankompartimenten einer typischen Zelle.** Bearbeitet nach Balla (2013). Der Großteil an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> befindet sich in der Plasmamembran, wo es in PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> umgewandelt wird. PtdIns(4)P findet sich ebenfalls in der Plasmamembran, aber es ist auch reichlich im Golgi-Apparat und in einigen Vesikeln vorhanden, die Teil des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) sind. PtdIns3P wird an Endosomen, wie frühen Endosomen (*early endosomes*, EE) und seinen Vorläuferformen, gebildet. PtdIns3P wird auf der Stufe von sortierenden Endosomen (SE) in PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> umgewandelt. Dies geschieht in Regionen eingestülpter Membranen, welche als Lumen für multivesikuläre Körperchen (*multivesicular bodies*, MVB) vorgesehen sind. PtdIns wird in vom ER abstammenden Kompartimenten gebildet, die jede andere Membran erreichen können. Die beschriebene Verteilung schließt nicht aus, dass jedes der PPIs in kleinen, unentdeckten Mengen in anderen Membrankompartimenten vorkommen kann. CCV: *clathrin-coated vesicle*, RE: *Recycling-Endosom*, Lyso: Lysosom.

Nach Hammond und Balla (2015) sind die verschiedenen PPIs und deren Vorstufe Phosphatidylinositol (PtdIns) folgend charakterisiert. Dabei ist zu beachten, dass geringe Mengen von PPIs unterhalb der Detektionsgrenze dennoch eine physiologische Relevanz haben können.

PtdIns dient als Vorstufe aller PPI und macht abhängig von der Zell- und Gewebeart 10-20 % (mol %) der gesamten zellulären Phospholipide aus. Seine Herstellung findet im ER statt, von wo es durch Vesikel oder nicht-vesikuläre Lipid-Transferproteine zu anderen Membranen transportiert wird.

PtdIns(4)P entspricht etwa 2-5 % des gesamten PtdIns einer typischen Säugetierzelle und ist die Vorstufe von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> der Plasmamembran. Allerdings kommt es in der Plasmamembran nur am zweithäufigsten vor. Der Golgi-Apparat ist das Hauptreservoir von PtdIns(4)P. Es kann aber auch in geringeren Mengen in endosomalen Membranen vorkommen. Abhängig von der Lokalisation findet die Herstellung durch bestimmte Phosphatidylinositol-4-Kinase-Enzyme statt. Auch wenn PtdIns(4)P nicht im ER detektierbar ist, ist doch PI4KIII $\alpha$  auch im ER lokalisiert. Die Rolle dieser Kinase bei der

HCV-Replikation (Reiss et al., 2011 und Altan-Bonnet and Balla, 2012) ist ein Hinweis auf die Bedeutung von PtdIns(4)P im vom ER abstammenden MW.

Phosphatidylinositol-3-phosphat (PtdIns(3)P) findet sich in geringen Mengen entsprechend 5-10 % von PtdIns(4)P in Säugetierzellen. Es ist hauptsächlich in frühen Endosomen (EE) detektierbar. Wegen seiner hohen Umsatzrate besteht ein steter Bedarf an Phosphorylierung von PtdIns. Eine Rolle von PtdIns(3)P in Autophagosomen wird vermutet.

Über Phosphatidylinositol-5-phosphat (PtdIns(5)P) ist wenig bekannt. Seine Menge in Säugetierzellen entspricht ~ 1 % von PtdIns(4)P. Seine Lokalisierung ist umstritten und es wird eine Rolle bei der Akt- und mTOR-Signalgebung sowie der Karzinogenese angenommen.

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ist mit einer Menge entsprechend 2-5 % des gesamten PtdIns das am häufigsten vorkommende PPI. Seine Hauptlokalisierung ist in der Plasmamembran. Es finden sich aber auch geringe Mengen im Golgi-Apparat und in Endosomen, wo es auch entscheidende regulative Aufgaben wahrnimmt. Zusätzlich spielt es eine Rolle bei der endolysosomalen Prozessierung und der Regulation Plasmamembran-gebundener Effektoren.

Die geringe Menge von Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>), entsprechend 2-5 % von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, ist nahe der Detektionsgrenze. Es ist in der Plasmamembran v.a. in Lamellopodien lokalisiert, was auf eine Rolle bei der Interaktion mit dem Cytoskelett und bei der Reifung Clathrin-beschichteter Vesikel (*clathrin-coated vesicle*, CCV) hinweist.

Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) stellt mit 1 % von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in Säugetierzellen die kleinste Menge an PPIs. Es ist in späten Endosomen bzw. sortierenden Endosomen (SE) lokalisiert und wichtig bei der Frachtsortierung und bei der Bildung innerer Vesikel in multivesikulären Körperchen (*multivesicular bodies*, MVBs).

Die Menge von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns (3,4,5) P<sub>3</sub>) entspricht etwa 1-5 % von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Es wird hauptsächlich in der Plasmamembran hergestellt. Es reichert sich v.a. an der Frontseite migrierender Zellen und in aktiven Membrandomänen wie Lamellopodien an. Wie PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> spielt es eine Rolle bei der Cytoskelett-Interaktion, ist aber auch an der Phagozytose beteiligt.

## 1.4.2. Aufgaben von PPIs

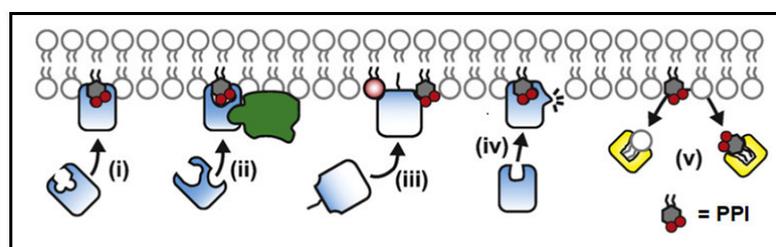
Nach Di Paolo und De Camilli (2006) spielen PPIs eine wichtige regulatorische Rolle in der Zellphysiologie und vermitteln Interaktionen durch ihre negativen Kopfgruppen.

Sie stellen einen wichtigen Teil der Kontrolle der Grenzfläche von Membran und Cytosol dar. So nehmen sie Einfluss auf die Permeabilität von Membranen und den Transport über diese hinweg und sind bei Funktionen des Cytoskeletts (z.B. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) beteiligt. Auch sind sie wichtig bei Exo- und Endozytose und auch bei Funktionen des Golgi-Netzwerks (z.B. PtdIns(4)P).

Für die Regulation von integralen Membranproteinen der Plasmamembran, z.B. Kanälen und Rezeptoren, ist PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wichtig. Des Weiteren sind ihre differenzierte Verteilung und ihr schneller Umsatz ideal für die Signalgebung. So ist z.B. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> das Substrat von Phospholipase C, welches von verschiedenen Hormonrezeptoren oder Tyrosinkinase-rezeptoren aktiviert wird (Smrcka et al., 1991). Auch sind PPIs bedeutend für die Definition der Identität von Organellen.

Zusammenfassend besitzen PPIs statt einer Strukturrolle in der Membran vielmehr eine Aufgabe in der Identifizierung verschiedener Membranen. Sie vermitteln auch das Verhalten mit der Membran interagierender Proteine und regulieren deren Funktion (Falkenburger et al., 2010). In dieser Rolle agieren PPIs oft als Kofaktoren und erhöhen die Stabilität oder den Verbleib von Proteinen in der Membran (Falkenburger et al., 2010).

Bei der Regulation von Proteinfunktion durch PPIs kann man nach Hammond und Balla (2015) von fünf funktionalen Prinzipien (i-v) ausgehen (s. Abb. 11):

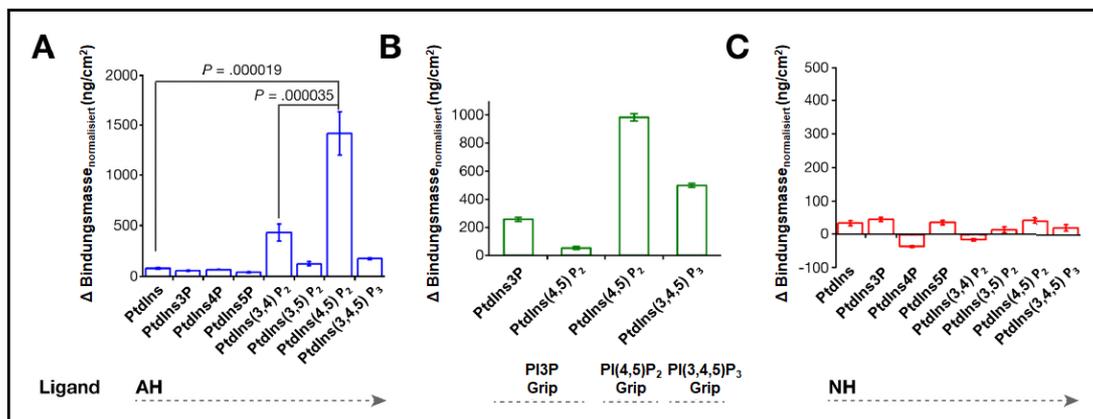


**Abbildung 11: Funktionale Prinzipien PPI-regulierter Proteinfunktion.** Bearbeitet nach Hammond und Balla, (2015). (i) Die hochaffine Bindung zwischen Protein und PPI fördert die Membranbindung. (ii) Die gemeinsame Bindung von Protein, PPI und einer dritten Determinante (hier Darstellung eines G-Proteins, aber auch physikalische Determinante möglich wie z.B. Membrankrümmung) gewährleistet die notwendige Avidität für die Membranbindung. (iii) Eine polyvalente Cluster-Bildung von PPI durch unspezifische elektrostatische Interaktionen mit der mehrbasischen Region eines amphiphilen Peptidmotivs trägt zur zielgerichteten Bindung an anionischen, lipidreichen Membranen bei. (iv) Die Bindung von PPI induziert eine Konformationsänderung im bindenden Protein. (v) Die PPI-Interaktion mit einem Transfer-Protein ermöglicht einen Lipidtransfer.

Durch hochaffine Bindung von Protein und PPI (i) oder unter Beteiligung dritter Determinanten (ii) kommt es zur Membranbindung. Die Bildung von PPI-Clustern durch unspezifische elektrostatische Interaktion mit mehrbasischen Proteinregionen (iii) kann dabei eine Rolle spielen. Auch kann sich die PPI-Bindung über Konformationsänderung des Proteins auf dessen Funktion auswirken (iv). Außerdem wird durch Interaktion mit Transfer-Proteinen Lipidtransfer möglich (v), welcher sich auf die beteiligte Membran auswirkt. Somit steht eine Vielzahl an möglichen Mechanismen zur Verfügung, die bei der von Cho et al. (2015) beschriebenen Interaktion von NS5A und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> eine Rolle spielen können.

### 1.4.3. NS5A und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>

Für die vorliegende Promotion ist von Bedeutung, dass Cho et al. (2015) eine Interaktion von NS5A und Lipidvesikeln mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> feststellen konnten (s. Abb. 12). Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen verschiedenen PPI und NS5A wurde eine Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsaufzeichnung (*quartz crystal microbalance-dissipation*, QCM-D) verwendet. Dabei wurden Lipidvesikel mit verschiedenen PPI und deren Vorläufer PtdIns auf festes SiO<sub>2</sub>-Substrat gegeben und die Bindung von NS5A-AH-Peptid überprüft. Durch die Sauerbrey-Gleichung kann die bei Messungen mit QCM-D bestimmte Resonanzfrequenz in Masse umgerechnet werden.



**Abbildung 12: HCV-NS5A-AH bindet spezifisch Lipidvesikel mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.** Bearbeitet nach Cho et al. (2015). Durch QCM-D (*quartz crystal microbalance-dissipation*) -Messungen wurden Masseveränderungen bei der Bindung von NS5A-AH-Peptid an Vesikeln mit verschiedenen PPIs bestimmt. Das System bestand aus polymerisierten Vesikeln mit PPIs und deren Vorläufer PtdIns auf festem SiO<sub>2</sub>-Substrat. (A) NS5A-AH-Peptid (~ 8  $\mu$ mol/L) bindet signifikant mehr an Vesikeln mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als mit PtdIns oder anderen PPIs. Die geringere Bindung mit diesen Vesikeln ist auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer früheren Arbeit, bei der nur Lipidvesikel genutzt wurden (Cho et al., 2007)). (B) Als Positivkontrollen wurden drei verschiedene Grip-Proteine (Echelon Biosciences) verwendet, von denen bekannt ist, dass sie PtdIns3P, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> binden. (C) Als Negativkontrolle wurde das NH (Nicht helikale)-Peptid von Elazar et al. (2003) verwendet, bei dem in NS5A-AH drei Punktmutationen (I8D, I12E und F19D) eingeführt wurden, um die hydrophobe Interaktionsfläche zu stören. Das NH-Peptid zeigte keine signifikante Bindung zu den Lipidvesikeln. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar, p-Werte wurden mit dem Student's t-Test bestimmt und sind in der Abbildung angegeben.

NS5A-AH wurde signifikant mehr an Vesikeln mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gebunden als an Vesikeln mit anderen PPIs oder PtdIns (Abb. 12 A).

Bei einer Versuchswiederholung mit NS5A vollständiger Länge (*full length*, fl), gereinigt nach Huang et al. (2004), wurde die Bindung an Lipidvesikel mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> verglichen. Die Ergebnisse standen im Einklang mit den Ergebnissen mit NS5A-AH (Abbildung nicht gezeigt). Cho et al. (2015) stellten zusätzlich fest, dass für die Bindung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> eine sogenannte *basic amino acid* PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> *pincer* (BAAPP) *domain* notwendig ist. Innerhalb dieses Motivs werden hydrophobe Aminosäuren von den Lysin K20 und K26 flankiert. Diese ermöglichen eine Interaktion mit der negativen Kopfgruppe von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Eine NS5A-AH-Mutante mit den Austausch K20A und K26A wies eine stark eingeschränkte Bindung an Vesikel mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> auf. Des Weiteren konnte durch Immunfluoreszenz eine Kollokalisierung von NS5A und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und durch zirkulären Dichroismus eine veränderte Konformation von NS5A-AH bei der Bindung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gezeigt werden. Außerdem konnte mit Hilfe eines Replicon-Systems gezeigt werden, dass die Anzahl gebildeter Huh7-Kolonien bei einer K20A-K26A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer war. Somit erscheint die Bindung von NS5A an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> essentiell für die HCV-Replikation.

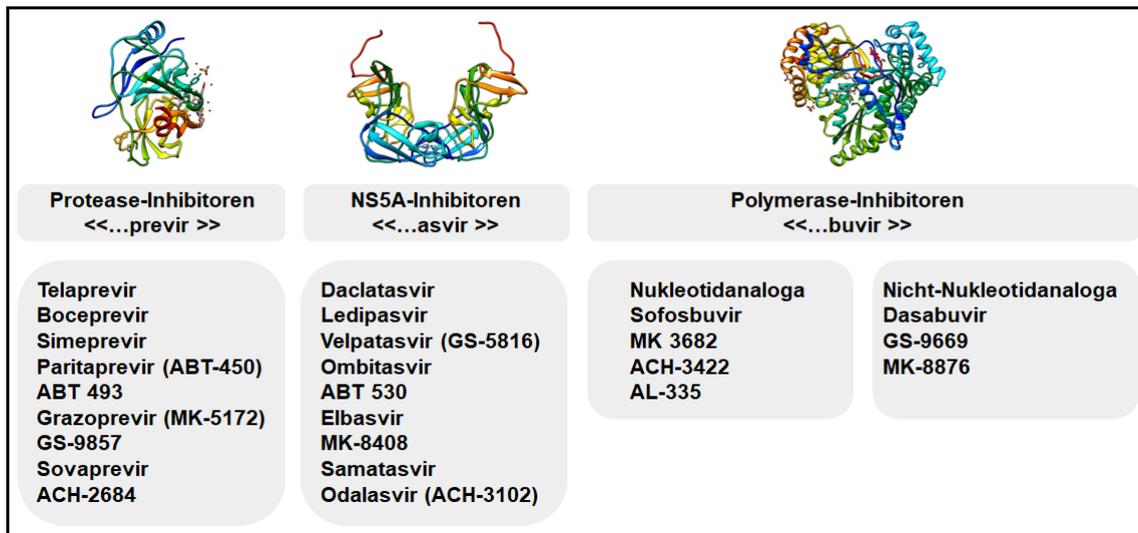
## 1.5. DAAs

Wie bereits unter 1.1. erläutert, werden Kombinationen verschiedener DAAs in der Therapie der chronischen Hepatitis C-Virusinfektion eingesetzt. Die Entwicklungsgeschichte wurde unter 1.1.3. bereits beschrieben. Durch die Kombination verschiedener DAAs in der HCV-Therapie ist eine IFN-freie Therapie aller HCV-GT möglich (Li und De Clercq, 2017). Außerdem konnte die SVR (Definition s. 1.1.3.) von ~ 60 % auf 90 % verbessert und die Behandlungsdauer von 48 Wochen auf 12 oder 8 Wochen verkürzt werden (Li und De Clercq, 2017). Auch ist durch DAAs eine orale Arzneimittelverabreichung unabhängig von der Behandlungsvorgeschichte oder bestehender Zirrhose möglich (Li und De Clercq, 2017).

Unter 1.5.1. wird eine Übersicht über die verschiedenen DAA-Klassen gegeben. Das für die vorliegende Promotion wichtige DAA Daclatasvir (DCV) und seine Wirkweisen werden unter 1.5.2. und 1.5.3. näher erläutert. Abschließend wird auf die Ausbildung von Resistenzen gegen DCV und damit verbundene HCV-Persistenz eingegangen (1.5.4.).

### 1.5.1. Übersicht von DAAs

Prinzipiell können alle HCV-Proteine, HCV-spezifischen RNA-Strukturen und Wirtsfaktoren als mögliche Ziele von DAAs dienen (Welsch et al., 2012). Die erfolgreichsten in den letzten Jahren entwickelten DAA-Klassen umfassen DAAs gegen die Serin-Protease NS3/4A, gegen NS5A und gegen die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B. Die verschiedenen DAAs sind geordnet nach ihrem Wirkstoffziel aufgelistet (s. Abb. 13, bearbeitet nach Asselah et al. (2016)). Zum Zeitpunkt der Publikation von Asselah et al. (2016) sich noch in der Entwicklung befindliche DAAs sind mit Abkürzungen der Herstellerfirmen versehen.



**Abbildung 13: Übersicht von DAAs zur Behandlung von HCV.** Bearbeitet nach Asselah et al. (2016). Gezeigt sind NS3-Protease-Inhibitoren, Nukleosid/Nukleotid-Analoga und Nicht-Nukleosid/Nukleotid-Inhibitoren der Polymerase NS5B und NS5A-Inhibitoren. Verwendete Kristallstrukturen: NS3/4A (PDB-ID: 6N2T), NS5A (PDB-ID: 1ZH1), NS5B (PDB-ID: 1YVF).

### NS3/4A-Protease-Inhibitoren

Mit dem ersten NS3/4A-Inhibitor Ciluprevir (BILN 2061), der an das aktive Zentrum der Protease bindet (Lamarre et al., 2003), konnte zum ersten Mal die Wirkung von DAAs gegen HCV im Menschen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 2). Zwar konnte eine signifikante Senkung von HCV-RNA im Serum mit HCV-GT 1 erkrankter Patienten gezeigt werden, jedoch kam es zu kardiotoxischen Nebenwirkungen und somit zu einem Entwicklungsstopp. Es wurden darauf weitere Protease-Inhibitoren entwickelt, bei denen man makrozyklische Inhibitoren und lineare Tetrapeptid- $\alpha$ -Ketoamid-Derivate unterscheiden kann. Mit Telaprevir und Boceprevir wurde schließlich 2011 die erste Generation an Protease-Inhibitoren zugelassen. Die Weiterentwicklung der ersten Generation an Protease-Inhibitoren führte zu einer geringeren Dosierungshäufigkeit, breiteren Genotyp-Aktivität und der Reduzierung von Nebenwirkungen (Welsch und Zeuzem, 2012).

### NS5A-Inhibitoren

NS5A-Inhibitoren wurden beim *Screening* von Wirkstoffbibliotheken im Replicon-System entdeckt (Lemm et al., 2010). Wirkstoffe mit antiviraler Aktivität wurden im zellbasierten *Screening-Assay* identifiziert und NS5A durch Streptavidin-Biotin-*Pulldown* und der Sequenzanalyse wirkstoffresistenter Replicons als Ziel identifiziert (Gao et al., 2010). DCV war der erste entwickelte und zugelassene NS5A-Inhibitor und wird unter 1.5.2. und 1.5.3. näher beschrieben. Trotz der Gefahr rascher Resistenzbildung (s. 1.5.4.) war DCV wegen seiner hohen Wirksamkeit bei vergleichsweise geringen Nebenwirkungen (Gao et al., 2010) sehr vielversprechend. Die zweite Generation an NS5A-Inhibitoren, z.B. Elbasvir und Velpatasvir (Gitto et al., 2017), zeigt eine pangentypische Wirkweise, ist gegenüber bisher bekannten Resistenzen aktiv und weist noch geringere Nebenwirkungen auf (Alazard-Dany et al., 2019).

### **NS5B-Polymerase-Inhibitoren**

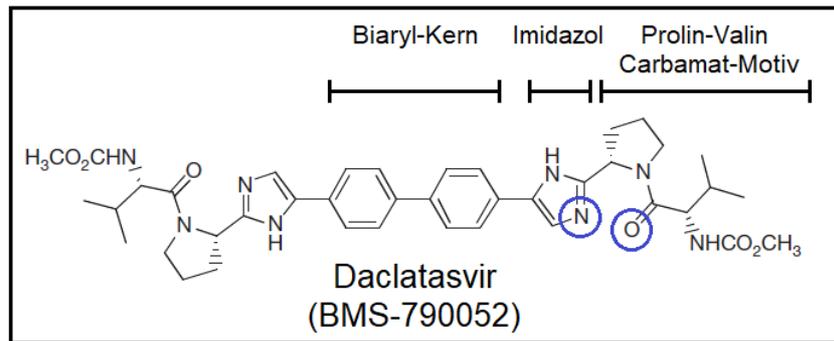
NS5B-Polymerase-Inhibitoren können in die zwei Klassen der Nukleos(t)id-analogen Inhibitoren (NI) und Nicht-Nukleos(t)id-analogen Inhibitoren (NNI) unterteilt werden. Bei NI wie Sofosbuvir wird der Wirkstoff als falsches Substrat in die wachsende RNA-Kette eingebaut, was zur Kettenterminierung führt. NI sind effektiv gegen alle HCV-GT und besitzen eine hohe Resistenzbarriere.

Im Vergleich zu den NI bindet die heterogene Klasse der NNI an verschiedenen allosterischen Stellen von NS5B. Fünf verschiedene Bindungsstellen für NNIs wurden bisher beschrieben (Alazard-Dany et al., 2019). NNIs weisen eine geringe Resistenzbarriere auf (Welsch und Zeuzem, 2012).

### **1.5.2. Daclatasvir (DCV)**

Bei DCV handelt es sich um einen hoch potenten NS5A-Inhibitor, der eine antivirale Aktivität im nieder-picomolaren Bereich aufweist, hoch spezifisch gegenüber HCV ist und eine geringe Toxizität gegenüber den Wirtszellen zeigt (Gao et al., 2010).

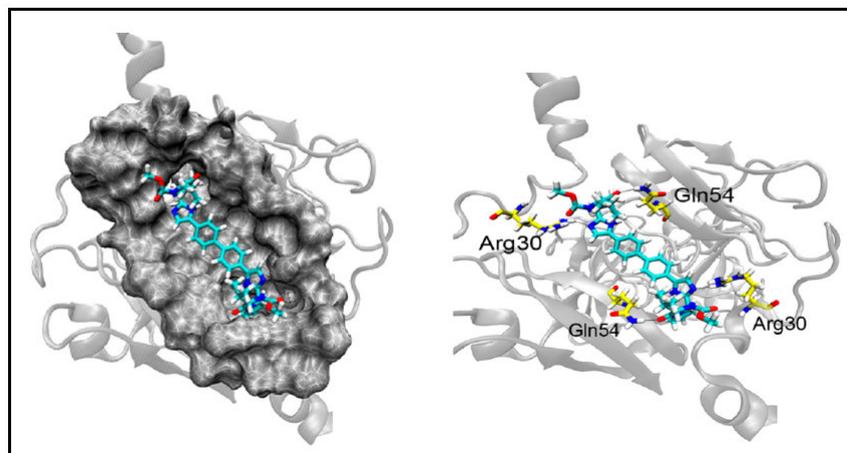
Die symmetrische dimere Struktur von DCV bzw. BMS-790052 (nach dem Hersteller Bristol-Meyers Squibb) ist in Abbildung 14 zu erkennen. Abbildung 14 wurde nach Gao et al. (2010) bearbeitet und mit Informationen zu DCV von Cordek et al. (2011) und Ahmed et al. (2016) ergänzt.



**Abbildung 14: Strukturformel von DCV (BMS-790052).** Bearbeitet nach Gao et al. (2010). Daclatasvir (DCV) ist als dimerer, symmetrischer Pharmakophor aufgebaut. Der Biaryl-Kern ist über Imidazolringe mit den Prolin-Valin-Carbamat-Motiven verbunden (Cordek et al., 2011). Für die Wasserstoffbrückenbindungen mit NS5A wichtige Akzeptorstellen (Ahmed et al., 2016) sind blau eingekreist. Bei BMS-790052 handelt es sich um die Alternativbezeichnung von DCV während dessen Entwicklungsphase (BMS: Herstellerunternehmen Bristol-Myers Squibb).

DCV weist einen hydrophoben, aromatischen Biaryl-Kern und zwei terminale Segmente in Form von Peptidkappen auf. Diese zwei Kappen umfassen je ein Prolin-Valin-Carbamat-Motiv, welches über einen Imidazolring an den Biaryl-Kern gebunden ist (Cordek et al., 2011). Für die Wasserstoffbrückenbindungen mit NS5A wichtige Akzeptorstellen (Ahmed et al., 2016) sind blau eingekreist.

Die Interaktion von DCV und HCV-GT 1b-NS5A ist bearbeitet nach Ahmed et al. (2016) in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15: 3D-Interaktion und detaillierte Darstellung des stabilsten vorhergesagten Bindungsmodells von DCV an HCV-GT 1b-NS5A.** Bearbeitet nach Ahmed et al. (2016). Daclatasvir (DCV) wird durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit nahegelegenen Aminosäureresten wie Arg30 und Gln54 in HCV-GT 1b-NS5A stabilisiert. In der 3D-Darstellung (links) ist zu erkennen, dass der zentrale Biarylring sich über die Oberfläche der charakteristischen Bindungsspalte der von Love et al. (2009) beschriebenen NS5A-Dimer-Struktur (PDB-ID: 3FQM) erstreckt. Sowohl in der 3D-Darstellung als auch im Detail (rechts) sind die Kohlenstoffe des Liganden DCV hellblau, Sauerstoffe rot, Stickstoffe dunkelblau und Wasserstoffe weiß gefärbt. Bei der Detaildarstellung (rechts) sind die Homodimere des NS5A-Proteins silbern und die Kohlenstoffe der Wasserstoff-bindenden Aminosäurereste Arg30 und Gln54 gelb gefärbt. Sauerstoffe, Stickstoffe und Wasserstoffe sind wie bei DCV gefärbt. Wasserstoffbrückenbindungen sind in Form gestrichelter schwarzer Linien abgebildet.

Die gezeigte Computermodellierung basiert auf einem Modell von Barakat et al. (2015), bei dem die NS5A-Kristallstruktur von Love et al. (2009) (PDB-ID: 3FQM) verwendet wurde. Es kommt zu einer symmetrischen Interaktion von DCV mit einer Bindungsspalte des NS5A-D1-Dimers (vgl. Abb. 6). Dabei bindet der Biaryl-Kern von DCV an der zentralen Region der Tasche und die terminalen Peptid-Kappen des Wirkstoffs interagieren über Wasserstoffbrücken mit Arg30 und Gln54 von NS5A.

### **1.5.3. Wirkweisen von DCV**

DCV weist eine Vielzahl verschiedener Wirkungen auf (Meanwell und Belema, 2019). Die zugrundeliegenden Wirkmechanismen dieser Substanzklasse (MOA, *mode of action*) sind bislang allerdings ungeklärt.

Bei Zugabe von DCV im HCV-Replicon-System stellten Lee et al. (2011) eine Inhibition der HCV-Replikation und eine Veränderung des NS5A-Lokalisierungsmusters von großen perinukleären und cytosolischen Foci zu einer diffusen Verteilung fest. Targett-Adams et al. (2011) konnten bei Zugabe von DCV in einem HCV-Replicon-System die Umverteilung von NS5A vom ER zu LDs beobachten. Somit wirkt sich DCV auf die subzelluläre Lokalisation von NS5A aus.

Ascher et al. (2014) zeigten neben der direkten Bindung von DCV an NS5A-D1 auch, dass die Bindung von DCV die RNA-Affinität von NS5A-D1 reduziert. Ein Einfluss auf die NS5A-Dimerisierung wurde, wie bereits bei Berger et al. (2014), nicht beobachtet. Dies führte zur Annahme, dass bei der DCV-Bindung eine Dimer-Struktur bevorzugt wird, die keine RNA bindet. Als Struktur für die RNA-Bindung wird die von Tellinghuisen et al. (2005) vermutet (s. 1.3.2.). Im Gegensatz dazu wird diskutiert, dass die Struktur von Love et al. (2009) (s. 1.3.2.) keine RNA, dafür aber DCV binden könnte. DCV wirkt sich folglich auf die RNA-Bindung, aber nicht auf die NS5A-Dimerisierung aus.

Darüber hinaus wird durch DCV der Phosphorylierungszustand von NS5A moduliert. Lemm et al. (2010) beobachteten bei Zugabe von Vorgängern von DCV im Replicon-System, dass der hyperphosphorylierte Zustand von NS5A reduziert vorlag. Diese Beobachtung wurde von Qiu et al. (2011) bei der Untersuchung von DCV bestätigt. Zusätzlich stellten Qiu et al. fest, dass die basale Phosphorylierung von NS5A nicht beeinträchtigt war.

Ein wichtiger Effekt von DCV ist dessen Einfluss auf die Bildung von MW und RK. Berger et al. (2014) konnten beobachten, dass durch die Zugabe von einem DCV-ähnlichen

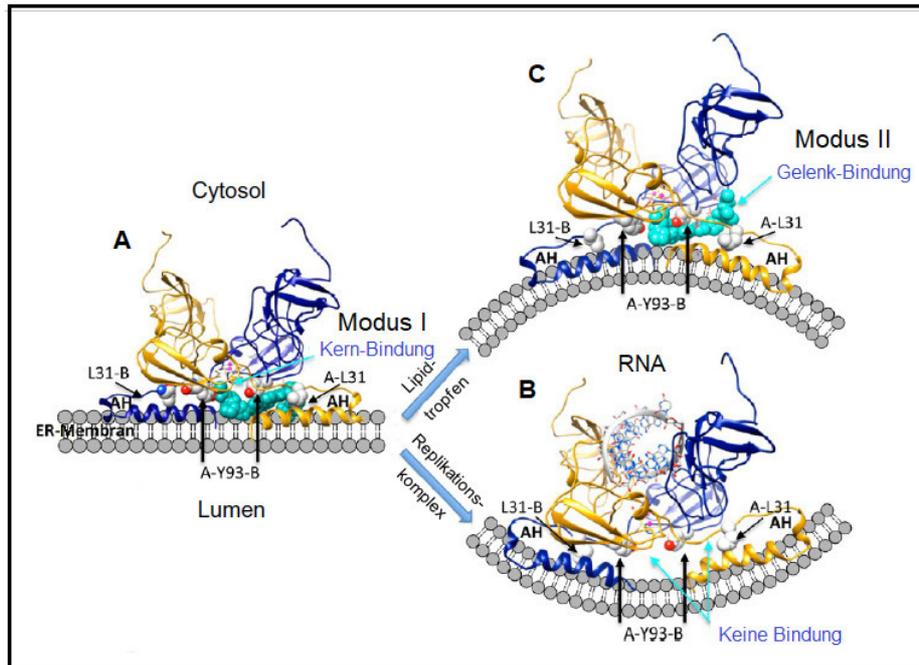
Wirkstoff die Bildung des MW verhindert und auf diese Weise die HCV-Replikation inhibiert wird. Eine Rolle bei der gestörten MW-Bildung spielt auch die Interaktion von NS5A mit PIKIII $\alpha$  (Reiss et al., 2011). Chukkapalli et al. (2015) konnten belegen, dass es durch DCV zu keiner Inhibition von PIKIII $\alpha$  oder dessen Interaktion mit NS5A kommt. Allerdings konnten sie feststellen, dass durch DCV eine spätere Aktivierung von PIKIII $\alpha$  ausbleibt. Dadurch wird die für die MW-Bildung notwendige Akkumulierung von PtdIns(4)P (s. 1.2.3.) verhindert. Interessanterweise gibt es in Hinsicht auf PIKIII $\alpha$  auch einen Bezug zum Phosphorylierungszustand von NS5A: Bei Abwesenheit von PIKIII $\alpha$  liegt NS5A vermehrt in seinem hyperphosphorylierten Zustand vor (Reiss et al., 2011).

Einen weiteren entscheidenden Einblick in die Wirkweise von DCV gewannen McGivern et al. (2014). Sie konnten *in vitro* zeigen, dass DCV einen schnellen Effekt auf die Assemblierung hat, sich aber langsam auf die RNA-Replikation auswirkt. Dabei blockiert DCV zwar die Bildung neuer RKs, hat aber keinen Einfluss auf die RNA-Synthese bereits gebildeter RKs. Die bereits beschriebene blockierte Bildung des MWs (Berger et al., 2014) kann dabei auch eine Rolle spielen (Benzine et al., 2017).

Eine Wirkung von DCV mit Einfluss auf die Assemblierung wird von Boson et al. (2017) beschrieben. Durch Zugabe von DCV kommt es zur Blockierung des Transports viralen Genoms zum Assemblierungsort und zur *Cluster*-Bildung viraler Proteine an der ER-Membran. Kern-Protein, E2, NS4B und NS5A bilden vermutlich inaktive Assemblierungsplattformen.

Dabei könnte eine Blockierung der Oligomerisierung von NS5A eine Rolle spielen (s. 1.3.3.). Die angenommene Aufgabe NS5As der Ausbildung einer RNA-„Fahrbahn“ zwischen den einzelnen Kompartimenten (Appel et al., 2006 und Love et al., 2009) wäre durch DCV beeinträchtigt. Die Auswirkungen weniger DCV-Moleküle auf ein gesamtes NS5A-Polymer könnten die hohe Wirksamkeit von DCV erklären (Belda und Targett-Adams, 2012).

Nettles et al. (2014) beziehen viele der beobachteten Wirkungen von DCV in einem hypothetischen Strukturmechanismus ein (s. Abb. 16, bearbeitet nach Nettles et al. (2014)). Eine Beteiligung der Membrankrümmung wird ebenfalls angenommen.



**Abbildung 16: Vorgeschlagener Mechanismus der DCV-Aktivität.** Bearbeitet nach Nettles et al. (2014). Daclatasvir (DCV) (hellblau) könnte simultan an zwei asymmetrischen Stellen der Membraninteraktionsstelle des NS5A-D1-Dimers (A/B) (blau/golden) binden. (A) DCV könnte das Dimer an der ER-Membran-Oberfläche mit primärer Interaktion an der A-Y93-B-Kern-Bindestelle und an einer Bindestelle niedrigerer Affinität nahe Leu31 binden, welche durch die amphipathische  $\alpha$ -Helix (AH) in einer Ebene mit der ER-Membran gebildet wird. (B) Die Bindung von NS5A mit RNA, NS5B und anderen Proteinen (nicht gezeigt) induzierte eine Konformationsänderung der AH, assoziiert mit einer Membrankrümmung Richtung Bildung des Replikationskomplexes (RK). Die Bildung von RK und membranösem Netz könnte signifikant die Affinität für die DCV-Bindung vermindern. (C) Durch eine angenommene Umlagerung der AH wird eine Wirkstoffbindestelle an einer Gelenkregion zwischen den Positionen 93 und 31 der verschiedenen D1-Untereinheiten zugänglich. Eine Bindung an dieser Gelenkstelle könnte NS5A-D1 in einer gekrümmten Konformation blockieren. Diese Konformation könnte die Lipidtröpfchen-Bildung und über Vesikelbildung die Freisetzung in das Cytosol fördern. Des Weiteren könnte die Konformationsänderung die Assemblierung anderer viraler Oligomere beeinträchtigen.

Der hypothetische Strukturmechanismus von Nettles et al. (2014) kann die veränderte Lokalisation von NS5A (Lee et al., 2011 und Targett-Adams et al., 2011) erklären. Der Mechanismus ist ebenfalls mit der Beobachtung von McGivern et al. (2014) im Einklang, dass durch DCV nur die Bildung neuer RK, aber nicht die Aktivität bestehender RK beeinträchtigt wird.

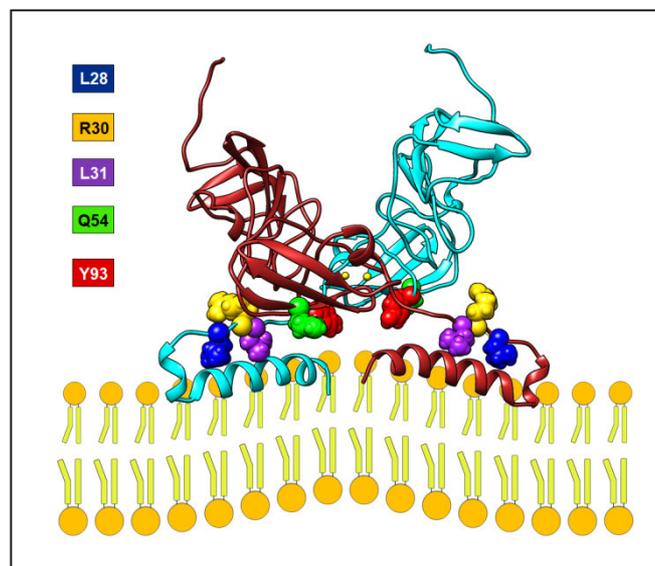
Zusammenfassend weist DCV eine Vielzahl verschiedener Wirkungen auf, die sich dual auf die Replikation und Assemblierung von HCV auswirken (Benzine et al., 2017). DCV nimmt somit über die Inhibition der Funktionen von NS5A Einfluss auf verschiedene Stellen des viralen Lebenszyklus und steigert auf diese Weise seinen antiviralen Effekt (Alazard-Dany et al., 2019). Eine detaillierte Beschreibung der exakten Mechanismen von DCV bzw. NS5A-Inhibitoren allgemein ist immer noch in Arbeit (Alazard-Dany et al., 2019). Die Entschlüsselung des Wirkmechanismus wird wegen der hohen Komplexität der Kokristallisation von DCV mit NS5A erschwert (Ahmed et al., 2016). Zusätzlich liegen

Strukturen nur von NS5A-Domäne 1 ohne AH (Tellinghuisen et al., 2005 (PDB-ID: 1ZH1) und Love et al., 2009 (PDB-ID: 3FQM), s. 1.3.2.) und von AH allein (Penin et al., 2004b (PDB-ID: 1R7G)), aber nicht von Domäne 1 mit AH oder dem *full length* Protein vor.

#### 1.5.4. Resistenz gegen DCV

Hauptprobleme des sehr wirksamen NS5A-Inhibitors DCV sind Resistenzen (Fridell et al., 2010, Issur und Götte, 2014) und bereits vor der Therapie vorhandene Resistenz-assoziierte Polymorphismen (Sun et al., 2012). Zwar haben diese Polymorphismen keinen bedeutenden Einfluss auf die Wirksamkeit von DCV, aber einen möglichen Effekt auf sich entwickelnde Resistenzprofile und mögliches Therapieversagen (Sun et al., 2012).

In Abbildung 17 ist eine NS5A-Kristallstruktur mit klinisch wichtigen RAMs gegenüber DCV und vergleichbaren NS5A-Inhibitoren dargestellt.



**Abbildung 17: NS5A-Kristallstruktur mit Resistenz-assoziierten Mutationsstellen gegen DCV.** Das verwendete NS5A-Strukturmodell (Nettles et al., 2014) wurde von James H. Nettles zur Verfügung gestellt. Das Homodimer (ziegelrot/hellblau) ist mit Chimera 1.14 dargestellt und basiert auf den NS5A-D1-Strukturen von Tellinghuisen et al. (2005), PDB-ID: 1ZH1 und Love et al. (2009), PDB-ID: 3FQM sowie der Struktur von NS5A-AH von Penin et al. (2004b), PDB-ID: 1R7G. Gebundene Zinkatome sind gelb gefärbt. Häufige Resistenz-assoziierte Mutationsstellen gegen DCV in HCV-GT 1b-NS5A sind in Kugeldarstellung abgebildet. Die Mutationsstellen wurden in Patientenserum und in Replicon-Systemen festgestellt (Gao et al. (2010), Fridell et al. (2011), Wang et al. (2013), Nakamoto (2014), Kosaka et al. (2015) und Yoshimi et al. (2015)): L28 (dunkelblau), R30 (gold), L31 (violett), Q54 (grün) und Y93 (rot).

Die Mutationsstellen wurden in Patientenserum und in Replicon-Systemen beobachtet (Gao et al., 2010; Fridell et al., 2011; Wang et al., 2013; Nakamoto, 2014; Kosaka et al., 2015 und Yoshimi et al., 2015). Alle klinisch relevanten RAMs (L28 (dunkelblau), R30 (gold), L31 (violett), Q54 (grün) und Y93 (rot)) befinden sich in der Nähe der angenommenen

DCV-Bindestelle (s. 1.5.2.). Sie liegen in NS5A-D1 oder der Verbindungsregion der AH und D1 und somit in der Nähe der Lipid- bzw. Membraninteraktionsfläche von NS5A.

Mutationen reduzieren die Wirksamkeit von DCV im HCV-GT1b-Repliconsystem 20-fach und im GT 1a-Repliconsystem bis zu 1800-fach (Gao et al., 2010). Im Patienten kann ein Therapieversagen zu einer jahrelangen Persistenz von resistenten HCV-Varianten führen (Wang et al., 2013 und Yoshimi et al., 2015). Nach Meanwell und Belema (2019) wird vermutet, dass die NS5A-Mutationen die Proteinfunktion in Gegenwart des Inhibitors wiederherstellen, anstatt dessen Bindung zu verhindern. Hierzu passt, dass es bei vielen Mutationen zu einem Austausch mit kleineren, flexibleren Aminosäuren kommt, z.B. Y93H, Y93C, L31M oder L31V. Auf diese Weise könnte es zu einer möglichen Wiederherstellung der konformationellen Flexibilität kommen, welche durch den Inhibitor beeinträchtigt war.

## **1.6. Ziele der Arbeit**

Trotz jahrelanger intensiver Forschung sind bisher keine molekularen Details zu den Funktionen von NS5A (s. 1.3.3.) und Wirkmechanismen von DCV (s. 1.5.3.) verfügbar. Es wurden unterschiedliche Dimer-Strukturmodelle für NS5A-D1 beschrieben (s. 1.3.2.), denen jeweils Aufgaben in der Replikation und der Assemblierung viraler Partikel zugeschrieben werden (s. 1.3.3.). Auch wird vermutet, dass NS5A-Inhibitoren unterschiedlich mit den verschiedenen NS5A-Konformationen interagieren (s. 1.3.3.). Eine verbreitete Annahme ist, dass unterschiedliche Phosphorylierungszustände von NS5A (s. 1.3.1.) als Schalter zwischen den Proteinkonformationen und den Funktionen der Replikation und der Assemblierung dienen (Huang et al., 2007b, Tellinghuisen et al., 2008).

Es gibt jedoch auch Hinweise dafür, dass die Lipidumgebung für die Konformation und Funktion von NS5A eine essentielle Rolle spielt und DCV Einfluss auf diese Protein-Lipid-Interaktion nehmen könnte:

Allgemein spielt der Lipidmetabolismus und dessen Manipulation im HCV-Lebenszyklus eine große Rolle (s. 1.2.3.). Die beiden Kompartimente MW und LD sind dabei für die Replikation und Assemblierung entscheidend (s. 1.2.3.) und weisen eine unterschiedliche, charakteristische Lipidzusammensetzung auf (Eggens et al., 1988 und Tauchi-Sato et al., 2002). NS5A ist im MW und an LDs zu finden (s. 1.2.3.) und wechselt zwischen beiden Kompartimenten. Diese Lokalisationsänderung ist durch DCV nachweislich gestört (s. 1.5.3.). Außerdem befindet sich die vermutete DCV-Bindestelle nahe der Membran-Lipid-Interaktionsfläche von NS5A (s. 1.5.2. und 1.5.3.). Auch entsprechende RAMs gegen DCV

treten in dieser Region auf (s. 1.5.4.). Nettles et al. (2014) haben bereits einige dieser Umstände in ihrem vorgeschlagenen Strukturmechanismus für DCV bedacht und auch eine mögliche Rolle der Membrankrümmung mit einbezogen (s. Abb. 17). Allerdings werden dabei spezifische Lipid-Protein-Interaktionen nicht berücksichtigt.

In der vorliegenden Promotion wird angenommen, dass spezifische Lipid-Protein-Interaktionen abhängig vom jeweiligen umgebenden Kompartiment (MW oder LD) Einfluss auf die Struktur und Funktion von NS5A nehmen und NS5A-Inhibitoren wie DCV über eine Inhibition dieser Interaktionen wirken. PPIs wird dabei als Interaktionspartnern eine besondere Bedeutung beigemessen, da sie eine Rolle bei der Membran-Kennzeichnung verschiedener Zellkompartimente, aber auch bei der Regulation membranassoziierter Proteine spielen (s. 1.4.2.). Außerdem wurde bereits eine Interaktion von NS5A und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beschrieben (s. 1.4.3.).

Die Ziele der vorliegenden Dissertation waren, NS5A ausreichender Menge, Reinheit und Qualität rekombinant herzustellen und dessen Interaktion mit Lipiden, insbesondere PPIs, zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte ein möglicher Effekt von NS5A-Inhibitor DCV auf die Lipidinteraktion untersucht werden.

Zu diesem Zweck war NS5A vollständiger Länge (*full length*, fl) und trunkiertes NS5A mit deletierten Domänen D2 und D3 ( $\Delta D2+3$ ) im eukaryotischen Zellsystem zu exprimieren und zu reinigen. Parallel dazu war auch eine Expression und Reinigung im bakteriellen System vorgesehen. Beides war mit und ohne Zugabe von DCV durchzuführen.

Nach Untersuchung der Stabilität von NS5A fl und  $\Delta D2+3$  im *Thermal shift assay* (TSA) und darauf zielender möglicher Effekte des Inhibitors DCV und des Chelators EDTA, sollte mit Hilfe eines *Protein lipid overlay assays* (PLOA) die Lipidinteraktion von NS5A ohne und unter Einfluss von DCV charakterisiert werden. Darauf aufbauend war als weiterer Schritt ein Liposom-Rekonstitutionsversuch zur Validierung von spezifischen Protein-Lipid-Interaktionen mit NS5A zu etablieren. Schließlich waren *in silico* mögliche PPI-Interaktionsstellen von NS5A zu identifizieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth
Agarose	VWR Life Science
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	PanReac AppliChem
Brillant Blau G250	Roth
Bromophenol Blau	Merck
Chloroform	Sigma-Aldrich
cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
D-Desthiobiotin	Sigma Life Science
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	PanReac AppliChem
dNTP Solution Mix	New England Biolabs
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalz-Dihydrat	PanReac AppliChem
Ethanol 70 %	Roth
Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
Flüssigstickstoff (LN <sub>2</sub> )	Air Liquide
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Glycin	Sigma Life Science
Harnstoff	Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	PanReac AppliChem
Imidazol	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	PanReac AppliChem
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	Merck-Millipore

N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz	Aldrich Chemistry
LB-Agar (Luria/Miller)	Roth
LB-Medium (Luria/Miller)	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
2-Mercaptoethanol	PanReac AppliChem
Methanol	Sigma-Aldrich
MG-132	AdooQ Bioscience
Milchpulver, fettarm	Roth
Natriumbutyrat (NaBu)	Alfa Aesar
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumdiphosphat-Decahydrat	Roth
Natriumfluorid	Roth
Natriumhydroxid 32 %	Roth
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Nycodenz	Abbott
Ponceau-S (0,1 % Lösung in 5 % Essigsäure)	PanReac AppliChem
Salzsäure	Sigma-Aldrich
Stickstoff	Air Liquide
N'N'N'N Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma Life Science
Zinkchlorid	Riedel-de Haën

### 2.1.2. Zellkultur-Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Zellkultur-Reagenzien.

Zellkultur-Reagenz	Hersteller
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	Gibco
(1x) <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (DPBS)	Gibco
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Life Science
Freestyle 293 Expression Medium	Thermo Fisher Scientific
Opti-MEM I	Gibco
Polyethylenimin (PEI) Max 40000	Polysciences
Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)	Sigma Life Science

Pluronic F-68 Non-ionic Surfactant (100x)	Thermo Fisher Scientific
Sf-900 II SFM	Gibco
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Gibco
Trypsin-EDTA-Lösung	Lonza
X-treme GENE 9 DNA Transfection Reagent	Roche

### 2.1.3. Detergenzien

**Tabelle 3: Verwendete Detergenzien.**

Detergens	Hersteller
n-Dodecyl $\beta$ -D-maltosid (DDM)	Glycon Biochemicals
Digitonin	Sigma Life Science
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Nonoxinol 40 (NP-40) 70 %	Sigma Life Science
n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (OG)	Roth
Triton X-100	Sigma Aldrich
Tween 20	PanReac AppliChem

### 2.1.4. Säulenmaterial

**Tabelle 4: Verwendetes Säulenmaterial.**

Säulenmaterial	Hersteller
ANTI-FLAG M2-Agarose Affinity Gel	Sigma-Aldrich
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
SP-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
Strep-Tactin Sepharose	IBA Lifesciences

### 2.1.5. Puffer, Nährmedien und Lösungen

Alle verwendeten Puffer, Nährmedien und Lösungen wurden, falls nicht anders beschrieben, in wässriger Lösung angesetzt. Die Zusammensetzungen sind in den zugehörigen Abschnitten unter 2.2. Methoden näher erläutert.

### 2.1.6. Reaktionskits

**Tabelle 5: Verwendete Reaktionskits.**

Reaktionskits	Hersteller
FLAG Immunoprecipitation Kit	Sigma-Aldrich
GloMelt Thermal Shift Protein Stability Kit	Biotium
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quick Ligation Kit	New England Biolabs
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

### 2.1.7. Bakterienstämme

**Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme.**

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Hersteller
LOBSTR-BL21 (DE3)-RIL	Basierend auf BL21(DE3) RIL: <i>B F<sup>-</sup>ompT hsdS<sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup>Tet<sup>r</sup>gal</sub></i> <i>λ(DE3) endA Hte[argUileYleuWCam<sup>r</sup>]</i> Mutationen von <i>arnA</i> : H359S, H361S, H592S, H593S Deletion von <i>slyD</i> nach Pos. 150	Kerafast, (Andersen et al., 2013)
One Shot TOP 10	<i>F<sup>-</sup>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 a-</i> <i>raD139 Δ(ara-leu)7697 galUgalK λ<sup>-</sup></i> <i>rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen
Rosetta (DE3) pLysS	<i>F<sup>-</sup>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i> pLysS RARE (Cam <sup>R</sup> )	Novagen
XL10-Gold	<i>Tet<sup>r</sup>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-</i> <i>mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lacHte [F' proAB</i> <i>lacI<sup>a</sup>ZAM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]</i>	Agilent Technologies

### 2.1.8. Eukaryotische Zelllinien

**Tabelle 7: Verwendete eukaryotische Zelllinien.**

<b>Zelllinie</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Herkunft</b>
FreeStyle 293 F	Nicht adhären wachsende, Medium-optimierte HEK 293 Zelllinie	Thermo Fisher Scientific, Steinle
HEK 293 T	Adhären wachsende, humane, embryonale Nieren-Zelllinie	Biondi
Sf9	Nicht adhären wachsende Ovar-Zelllinie von <i>Spodoptera frugiperda</i>	Biondi
U2OS	Adhären wachsende, humane Osteosarkom-Epithelzelllinie	Sigma-Aldrich, Lange

### 2.1.9. Antibiotika und Arzneimittel

**Tabelle 8: Verwendete Antibiotika und Arzneimittel.**

<b>Antibiotikum/Arzneimittel</b>	<b>Hersteller</b>
Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Stabilized	Sigma Life Science
Carbenicillin	PanReac AppliChem
Chloramphenicol	PanReac AppliChem
Daclatasvir	Hycultec
Kanamycin	Sigma Life Science
Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)	Sigma Aldrich

### 2.1.10. Vektoren und rekombinante Plasmide

**Tabelle 9: Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide.**

<b>Vektor</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Herkunft</b>
pCMV- <i>tag4</i> -NS5A	Eukaryotische Expression, Kanamycin-Resistenz, HCV-GT 1b N-Stamm - NS5A, C-terminal FLAG- <i>tag</i>	Stanley M. Lemon; UNC Chapel Hill, USA
pCMV- <i>tag4</i> -NS5A H54Q	s. pCMV- <i>tag4</i> -NS5A, mit NS5A-Mutation H54Q	Christoph Welsch,

		C. Grimm
pCG01	Eukaryotische Expression, Kanamycin-Resistenz, HCV-GT 1b N-Stamm - NS5A H54Q, N-terminal 6x His & FLAG-tag + TEV-Spaltungsstelle	Christoph Welsch, C. Grimm
pCG07	Eukaryotische Expression, Kanamycin-Resistenz, HCV-GT 1b N-Stamm - NS5A $\Delta$ D2+3 H54Q, N-terminal TEV-Spaltungsstelle, C-terminal TEV-Spaltungsstelle + 9x His-tag	Christoph Welsch, C. Grimm
pCG10	Bakterielle Expression, Ampicillin-Resistenz, HCV-GT 1b N-Stamm - NS5A $\Delta$ D2+3 H54Q codon-optimiert für <i>E. coli</i> , N-terminal TEV-Spaltungsstelle, C-terminal TEV-Spaltungsstelle + 9x His-tag	Christoph Welsch, C. Grimm
pCR4-TOPO TA	Linearisiert, Einzel-3' Thymidin-Überhänge und gebundene TOPO-Isomerase I	Invitrogen
pEBG2T-GFP	Expression in Säugetierzellen, Ampicillin-Resistenz, <i>Aequorea victoria</i> GFP, N-terminal GST-tag	Ricardo Biondi, Goethe-Universität, Frankfurt
pET-22b (+)	Bakterielle Expression, Ampicillin-Resistenz, C-terminal 6x His-tag	Christine Ziegler, Universität Regensburg
pMX-NS5A $\Delta$ D2+3	Klonierungsvektor, Kanamycin-Resistenz, HCV-GT 1b N-Stamm - NS5A $\Delta$ D2+3 H54Q, codon-optimiert für <i>E. coli</i> , N-terminal GST-tag + TEV-Spaltungsstelle, C-terminal TEV-Spaltungsstelle + 9x His-tag	Thermo Fisher Scientific

pTM023-NS5A	Basierend auf pGEX-4T3, bakterielle Expression, Ampicillin-Resistenz, N-terminal GST- <i>tag</i> + Thrombin-Spaltungsstelle, C-terminal 6x His- <i>tag</i>	Stanley M. Lemon; UNC Chapel Hill, USA
pTM023-NS5A H54Q	s. pTM023-NS5A, mit NS5A-Mutation H54Q	Christoph Welsch, C. Grimm
pVL941 Strep-NS5A-V5	Baculovirus-Transfer, Ampicillin-Resistenz, HCV-GT 2 -NS5A, N-terminal Strep- <i>tag</i> , C-terminal V5- <i>tag</i>	Daniela Ploen; Paul-Ehrlich-Institut, Langen
pVL941 Strep-NS5A ΔD2+3	s. pVL941 Strep-NS5A-V5, Insertion von 3x Stopp-Codon zwischen NS5A LCS1 und D2	Christoph Welsch, C. Stroß

### 2.1.11. Oligonukleotide

Tabelle 10: Verwendete Primer.

Primer	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> °C
for6xHisFLAGTEV	GGATCCGAATTCATG <u>CATCATCATCATCATCAT-</u> <u>GATTATAAAGATGATGATGATAAAGAGAACCTG-</u> <u>TACTTCCAGGGC</u> TCCGGCTCGTGGCTGAGGG	81
H54Q for	GACGGCATCATG <u>CAG</u> ACCACCTGCCCATG	72
H54Q rev	CATGGGCAGGTGGT <u>CTG</u> CATGATGCCGTC	72
revStoppXhoI	CGGCCG <u>CTCGAGTCA</u> GCAGCAGACGACGCTCTCACC	80
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	53
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	53
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	55
pGEXfor	ATAGCATGGCCTTTGCAGG	57
pTM-ins rev	GATGATGATGATGATGGCCGCCGCAGC	70

Die Primer H54Q for und H54Q rev wurden für ortsgerichtete Mutagenese (s. 2.2.1.5.) von pTM023-NS5A sowie pCMV-*tag4*-NS5A verwendet. Die Herstellung des Konstrukts pCG01 (s. 2.2.1.10.) erfolgte unter Nutzung von Primer for6xHisFLAGTEV und revStoppXhoI.

Die Konstrukte pCMV-*tag4*-NS5A, pCMV-*tag4*-NS5A H54Q, pCG01 und pCG07 wurden mit den Primern T3 und T7, pCG10 mit T7 und T7 term sequenziert. Mit Hilfe der Primer pGEXfor und pTM-ins rev wurden die Sequenzen von pTM023-NS5A und pTM023-NS5A H54Q überprüft (s. 2.2.1.11.)

### 2.1.12. Lipide

Tabelle 11: Verwendete Lipide.

Lipid	Hersteller
ATTO-550-1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin (ATTO-DOPE, 18:1-18:1)	ATTO-TEC
Cholesterol	Echelon Biosciences
Membrane Lipid Strips	Echelon Biosciences
Membrane PIP Strips	Echelon Biosciences
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (POPC, 16:0-18:1)	Merck (Avanti)
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin (POPE, 16:0-18:1)	Merck (Avanti)
L- $\alpha$ -Phosphatidylinositol-4-phosphat (PtdIns(4)P)	Merck (Avanti)
L- $\alpha$ -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> )	Merck (Avanti)

### 2.1.13. Proteine und Peptide

Tabelle 12: Verwendete Proteine und Peptide.

Protein/Peptid	Hersteller
Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin, BSA)	Sigma Aldrich
BSA, fettsäurefrei	Roth
His-NS5A-amphipathische $\alpha$ -Helix (AH), 1 $\mu$ g/ $\mu$ l	GenScript

### 2.1.14. Enzyme

**Tabelle 13: Verwendete Enzyme.**

Enzyme	Hersteller
Benzonase Nuclease ( $\geq 250.000$ U/ml)	Sigma-Aldrich
<i>DpnI</i> (20.000 U/ml)	New England Biolabs
<i>EcoRI</i> (20.000 U/ml)	New England Biolabs
Ligase (Quick Ligation Kit, s. 2.1.5.)	New England Biolabs
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3.000 U/ml)	Promega
<i>Taq</i> -Polymerase (5.000 U/ml)	New England Biolabs
Thrombin-Protease (500 U)	GE Healthcare
<i>XhoI</i> (20.000 U/ml)	New England Biolabs

### 2.1.15. Primäre und sekundäre Antikörper

**Tabelle 14: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.**

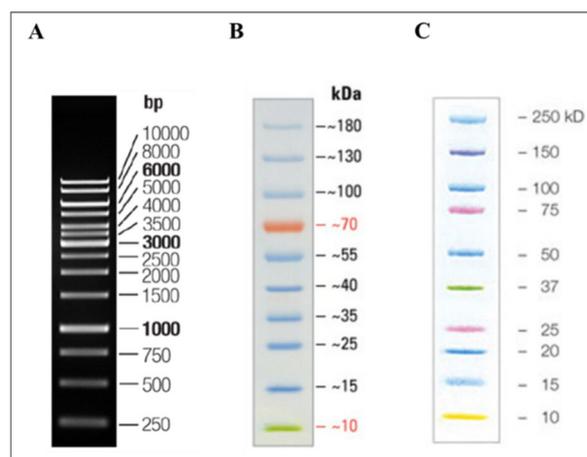
Antikörper	Eigenschaften	Spezies	Hersteller	Verwendung
<u>Primärantikörper</u>				
Anti Hepatitis C NS5A monoclonal antibody	monoklonal, gegen HCV NS5A (a.a.218-328)	Maus	ViroGen	WB
mAb 11H	monoklonal, gegen HCV NS5A (a.a.249–260)	Maus	(Brass et al., 2002)	WB
Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin antibody	monoklonal, gegen $\beta$ -Actin	Maus	Sigma-Aldrich	WB
Monoclonal ANTI-FLAG M2 antibody	monoklonal, gegen FLAG-Fusionsproteine, FLAG-tag N-terminal, C-terminal oder internal	Maus	Sigma-Aldrich	WB
Penta-His-antibody, BSA free	monoklonal, gegen 5x His-Fusionsproteine, His-tag N-terminal, C-terminal oder internal	Maus	Qiagen	WB
StrepMAB-Classic	monoklonal, gegen <i>Strep-tag</i> II-Fusionsproteine	Maus	IBA Lifesciences	WB, PLOA

<u>Sekundärantikörper</u>				
Goat Anti Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	polyklonal, gegen schwere und leichte Kette von Maus IgG	Ziege	Bio-Rad	WB, PLOA

## 2.1.16. Molekulargewichtsstandards

Tabelle 15: Verwendete Molekulargewichtsstandards.

Molekulargewichtsstandard	Hersteller
Generuler 1 kb DNA-Ladder, ready-to-use	Thermo Fisher Scientific
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Precision Plus Kaleidoscope Prestained Protein Standard	Bio-Rad



**Abbildung 18: Molekulargewichtsstandards.** A) Generuler 1 kb DNA-Ladder, ready-to-use, B) PageRuler Prestained Protein Ladder, C) Precision Plus Kaleidoscope Prestained Protein Standard, nach Herstellerangaben.

## 2.1.17. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 16: Verwendete Verbrauchsmaterialien.**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugkanülen	Sarstedt
Chromatographiesäulen: Chromatography columns, general purpose, 10 ml Econo-Pac Poly-Prep	Sigma-Aldrich Bio-Rad Bio-Rad
Dialyseschlauch (MWCO 14 kD)	Roth
Dialysekassette, Slide-A-Lyzer (MWCO 3,5 kD)	Thermo Fisher Scientific
Dichtungshaftfolie	Fisher Scientific
Einmalspritzen (5 und 25 ml)	Braun
Erlenmeyer-Einweg-Kolben mit Schikane und Filterdeckel (125 ml)	VWR
Erlenmeyer-Einweg-Kolben (250 ml)	Corning
Kanülen, Microlance 3	BD
Küvetten (Photometrie)	Sarstedt
Nitrozellulose	GE Healthcare/Amersham
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR-Detektionsplatte (96-Well)	Fisher Scientific
PCR-Reaktionsgefäße (200 µl)	Sarstedt
Petrischalen (94/16 MM)	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	Starlab
Reaktionsgefäße (1,5, 2 und 5 ml)	Greiner Bio-One
Reaktionsröhrchen (14 ml, Rundboden)	Greiner Bio-One
Reaktionsröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One
Rollerflaschen (2 L)	Greiner Bio-One
Skalpelle	Feather
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Whatman
Stripetten (5, 10 und 25 ml)	Costar
Whatman-Papier	Bio-Rad
Zellkulturflaschen (175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One
Zellkulturschalen (145 mm Ø)	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten (6-Well und 96-Well)	Greiner Bio-One

## 2.1.18. Gebrauchsgegenstände

Tabelle 17: Verwendete Gebrauchsgegenstände.

Gebrauchsgegenstand	Hersteller
Deckgläser	Hecht-Assistent
Dounce Homogenizer (40 ml)	Kontes Glass Co
Drigalski-Spatel	neoLab
Erlenmeyer-Kolben (0,25, 0,5, 1 und 2 L)	Schott, Duran
Gasbrenner	Campingaz
Gefrierbehälter	Nalgene
Gewindeflasche-Septen, Butyl/PTFE	neoLab
Glas-Gewindefläschchen (1,5 ml)	neoLab
Glas-Gewindefläschchen (3,7 ml)	Supelco
Hamilton-Spritzen (50 µl, 250 µl, 1 ml)	Hamilton
Neubauer-Zellzählkammer	Marienfeld
Pipetten: 0,5 - 2,5 µl, 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf, Gilson
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Schwimmkörper	Thermo Scientific
Stickstofftank	Taylor-Wharton
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman
Zellschaber	Greiner Bio-One
Zentrifugenflaschen	Beranek Laborgeräte

## 2.1.19. Geräte

Tabelle 18: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec
Branson Sonifier 150	Branson Ultraschall
Brutschränke	Thermo Scientific
Eismaschine	Scotsman

Elektrophorese Kammer horizontal	Biometra-Analytik Jena
Elektrophorese Kammer vertikal	Biometra-Analytik Jena
Fluoreszenz-Lampe	Zeiss
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr und Siemens
Gefrierschrank -80 °C	Dometic
Heizblock	Eppendorf
Gel Doc XR +	Bio-Rad
Image Reader LAS 4000	Fujifilm
Kipp-Schüttler	INFORS HT
Kühlschränke	Siemens
Kreisschüttler Standard 3500	VWR
Labornetzgeräte	Amersham Biosciences
Magnetrührer	IKA
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss
Mikrowelle	Severin
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Eppendorf
Reagenzglasschüttler	VWR
Rollmischer	sunlab
Rotator	VWR
Scanner	Canon
StepOne Plus RT PCR-System	Applied Biosystems
Sterile Werkbank	Thermo Scientific
Thermoschüttler: New Brunswick Innova 44 New Brunswick Innova 42 Max Q 4000	Eppendorf Thermo Fisher Scientific Thermo Scientific
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad
Ultraschall-Wasserbad	Bioblock Scientific
UV-Lampe	Biometra
Vakuum-Konzentrator	Bachofer
Veriti-Thermal Cycler	Applied Biosystems

Waagen	Sartorius, Kern
Wasserbad	GFL
Zentrifugen: Beckman J2-HS, Rotor Ja-10 Eppendorf 5430 R Eppendorf 5804 R Ultrazentrifuge, Rotor 50i2Ti und 60Ti	Beckman Eppendorf Eppendorf Beckman

## 2.1.20. Software

Tabelle 19: Verwendete Software.

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS2	Adobe
Chimera 1.14	UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics
ExpASy Compute pI/Mw	Schweizer Institut für Bioinformatik, Amos Bairoch
GraphPad PRISM	GraphPad
ImageJ	National Institutes of Health, Wayne Rasband
ImageLab	Bio-Rad
Image Reader LAS-4000	Fujifilm
Microsoft Office Excel	Microsoft
Microsoft Office Paint	Microsoft
Microsoft Office Powerpoint	Microsoft
Microsoft Office Word	Microsoft
Microsoft Windows 10	Microsoft
Multigauge V3.0	Fujifilm
ND-1000 V3.7.1	Peqlab Biotechnologie
NEBioCalculator	New England BioLabs
OligoCalc Version 3.27	Northwestern University, Warren Kibbe
RCSB Protein Data Bank	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
SeaView Version 4.0	PRABI-Doua
StepOne Software V2.0	Applied Biosystems
UniProt Knowledgebase	UniProt Consortium

Zotero	George Mason University, Center for History and New Media, Roy Rosenzweig
--------	---

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1. Transformation kompetenter *E. coli***

Die Transformation der *E. coli* Stämme LOBSTR-BL21 (DE3)-RIL, One Shot TOP 10 und Rosetta (DE3) pLysS (s. Tab. 6, 2.1.7.) erfolgte nach Herstellerprotokoll von Novagen (Novagen Competent Cells, User Protocol TB009, S. 7) unter Verwendung von SOC Medium von Invitrogen. One Shot TOP 10 wurde für Plasmid-DNA-Präparationen und LOBSTR-BL21 (DE3)-RIL sowie Rosetta (DE3) pLysS für Proteinexpression verwendet.

Die Transformation des *E. coli* Stamms XL10-Gold (s. Tab. 6, 2.1.7.) wurde nach modifiziertem Herstellerprotokoll von Agilent Technologies durchgeführt:

Statt in 14 ml-Röhrchen erfolgte die Transformation in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen, die Menge an eingesetzten Zellen und verwendetem 2-Mercaptoethanol wurden halbiert und es wurden 400 µl SOC- statt NYZ<sup>+</sup>-Medium zugegeben. Auf die pUC18-Kontrolle wurde verzichtet.

*E. coli* XL10-Gold wurde für die Herstellung neuer rekombinanter oder ortsgerecht mutierter Plasmide genutzt.

#### **2.2.1.2. Kultivierung von *E. coli***

Transformierte *E. coli*-Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit zum Plasmid passend zugesetztem Antibiotikum bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach ausreichendem Koloniewachstum von etwa 1 mm Ø wurden die Agarplatten zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

LB-Flüssigmedien wurden mit entsprechendem Antibiotikum (s. u.) passend zur Resistenz zu kultivierender Bakterienstämme versehen und mit von LB-Agarplatten entnommenen Einzelkolonien angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C über Nacht (~16-18 h) auf einem Schüttler bei 240 rpm inkubiert.

Lysogeny broth (LB)-Medium: 25 g LB-Medium (Luria/Miller)  
ad 1 L Aqua dest.

Nach Autoklavierung und Abkühlen auf unter 50 °C wurde eine entsprechende Menge an Antibiotikum (Carbenicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 25 µg/ml oder Kanamycin 50 µg/ml) zugegeben und das LB-Medium bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

LB-Agar: 17,5 g LB-Agar-Medium (Luria/Miller)  
ad 500 ml Aqua dest.

Nach Autoklavierung und Abkühlen auf unter 50 °C wurde, wie für LB-Medium beschrieben, Antibiotikum zugegeben und das Medium unter steriler Werkbank in Petrischalen gegossen. Nach 30 min Inkubation zum Aushärten, wurden die Platten bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

### **2.2.1.3. Plasmid-DNA-Präparation**

Für die Gewinnung von DNA im kleinen Maßstab (bis zu 20 µg) wurden 7 ml Flüssig-LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum (s. 2.2.1.2.) in 14 ml-Reaktionsröhrchen mit Rundboden gegeben und auf 37 °C vorgewärmt. Dieses Medium wurde mit einer Kolonie einer Transformationsplatte beimpft und über Nacht bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert.

Am Folgetag wurden 5 ml des bewachsenen Mediums für eine Plasmid-DNA-Präparation mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits verwendet. Die Präparation wurde nach Angaben des Herstellers (Quick-Start Protocol) durchgeführt. DNA wurde mit UltraPure DNase/RNase-freiem Wasser von Invitrogen eluiert und nach der Konzentrationsbestimmung (s. 2.2.1.4.) bei -20 °C gelagert.

Für eine Plasmid-DNA-Präparation im größeren Maßstab (bis zu 750 µg) wurden zunächst als Vorkultur 5 ml eines 37 °C warmen Flüssig-LB-Mediums mit passendem Antibiotikum mit einer Kolonie einer Transformationsplatte beimpft. Die Vorkultur wurde für 4 h auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Bakterienkultur in 250 ml eines 37 °C warmen Flüssig-LB-Mediums mit gleichem Antibiotikum in einen 500 ml-Erlenmeyerkolben ohne Schikane überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C im Thermoschüttler erfolgte die Plasmid-DNA-Präparation mit einem HiSpeed Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers. Wie bei der Präparation im kleinen Maßstab wurde die DNA in UltraPure DNase/RNase-freiem Wasser eluiert und nach Bestimmung der Konzentration bei -20 °C gelagert.

### **2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von DNA**

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde mit einem Nanodrop 1000 Spectrophotometer die Absorption (Abs) bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht bei doppelsträngiger DNA ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 50 ng/µl.

Als Reinheitskriterium dient der Quotient von  $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$ , der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Eine Abweichung weist auf Verunreinigungen z.B. Protein oder Phenol hin. Auch das Verhältnis von  $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{230\text{ nm}}$  dient als Reinheitsmaß. Es sollte den Wert 1,5 nicht unterschreiten und deutet in diesem Fall auf Verunreinigung mit z.B. EDTA oder Kohlenhydraten hin (T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, Thermo Scientific).

### 2.2.1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde für die Amplifizierung von Plasmid-DNA-Fragmenten und die Mutagenese verwendet. Primer (s. Tab. 10, 2.1.11.) wurden von Eurofins Genomics bezogen. Die Eigenschaften selbst kreierter Primer wurden mit OligoCalc vor Bestellung überprüft. Nach Lieferung wurden die lyophilisierten Primer gemäß Herstellerangaben zu einer Konzentration von 100 pmol/µl in UltraPure DNase/RNase-freiem Wasser (Invitrogen) gelöst und bei -20 °C gelagert. Für die Verwendung in der PCR wurden die Stammlösungen auf 1:10 verdünnt.

#### PCR-Reaktionsansatz:

DNA-Matrize:	20 ng
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	0,5 µl
UltraPure DNase/RNase-freies Wasser (Invitrogen)	ad 25 µl

#### PCR-Bedingungen:

1) Initialer Schritt		95 °C	5 min
2) Wiederholung von 18 Zyklen	a) Denaturierung	95 °C	30 s
	b) Hybridisierung	55 °C	1 min

	c) Elongation	68 °C	7 min
3) Finaler Schritt		68 °C	8 min

Bei Bedarf wurde zur Erhöhung der Produktausbeute die Anzahl an Zyklen erhöht oder die Temperatur bei der Hybridisierung an die Schmelztemperatur bestimmter Primer angepasst.

Bei Verwendung von PCR für ortsgerichtete Mutagenese wurde abschließend durch *DpnI*-Verdau die unmutierte Matrizen-DNA entfernt. Das Restriktionsenzym schneidet nur an seiner Erkennungssequenz GATC, wenn A methyliert vorliegt. Dies ist nur bei der in *E. coli* synthetisierten Matrizen-DNA der Fall, nicht jedoch bei der durch PCR hergestellten und mutierten DNA.

Zwecks *DpnI*-Verdaus wurden 20 µl des PCR-Ansatzes mit 40 U *DpnI* für 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Verdaute PCR-Ansätze konnten dann bei der Transformation in *E. coli* XL10-Gold (s. 2.2.1.2.) weiter genutzt werden.

#### **2.2.1.6. Restriktion von DNA**

Die Restriktion von DNA wurde nach Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme durchgeführt. Allerdings wurde Enzym im 5-fachen Überschuss zugegeben und die Menge eingesetzter DNA sowie die Inkubationszeit erhöht.

Bei der Herstellung des rekombinanten Plasmids pCG01 wurden keine *high fidelity*-Restriktionsenzyme verwendet. Der Verdau wurde für 3 h bei 37 °C mit Reaktionspuffer NEBuffer 3.1 (New England Biolabs) inkubiert, welcher bei den verwendeten Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* einen Doppelverdau erlaubte.

Die rekombinanten Plasmide pCG07 und pCG10 wurden nach modifiziertem Time-Saver-Protokoll von New England Biolabs hergestellt. Dabei wurden die Mengen zu verdauender DNA und eingesetzter Enzyme verdoppelt. Hierbei wurden die *high fidelity*-Varianten der Restriktionsenzyme genutzt. Die Verdaue wurden für 45 min bei 37 °C mit CutSmart Buffer (New England Biolabs) inkubiert. Die für diesen Puffer optimierten *high fidelity*-Enzyme konnten im Doppelverdau eingesetzt werden.

#### **2.2.1.7. Agarose-Gelelektrophorese**

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Anlegen einer Gleichspannung wandern die negativ geladenen

DNA-Moleküle, abhängig von ihrer Größe, unterschiedlich schnell durch die Matrix eines Agarose-Gels.

Zur Auftrennung wurde 1%-iges Agarosegel verwendet. Zu dessen Herstellung wurde Agarose abgewogen, in 1x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C, wurden pro Milliliter jeweils 0,2 µg Ethidiumbromid (Roth) zugegeben. Durch die Interkalation dieses fluoreszierenden Stoffes in die DNA-Doppelhelix, wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht detektierbar. Nach Gießen des Gels in eine Agarosegel-Kassette, wurde die vollständige Polymerisierung abgewartet. Die DNA-Proben wurden je mit Gel Loading Dye Purple (6x) (New England Biolabs) gemischt und aufgetragen. Als DNA-Größenstandard wurde Generuler 1 kb DNA-Ladder, ready-to-use verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer horizontalen Gelelektrophorese-Kammer mit TAE-Puffer (PanReac Applichem) als Laufpuffer bei 120 V für 55 min. Abschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert, mit Hilfe des Programms ImageLab digitalisiert und abschließend mit Adobe Photoshop sowie MS Powerpoint bearbeitet.

#### **2.2.1.8. DNA-Gelextraktion**

Nach dem Auftrennen der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.1.7.) wurden diese unter UV-Licht ausgeschnitten. Danach wurden die Fragmente mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert und gereinigt.

#### **2.2.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten**

Bei der Herstellung des rekombinanten Plasmids pCG01 wurde das durch PCR hergestellte Insert vorab in den Vektor pCR4-TOPO TA ligiert, um schließlich ein effizienteres Schneiden mit Restriktionsenzymen für die finale Ligation in den Endvektor zu gewährleisten (s. 2.2.1.10.).

Durch das TOPO-Vektor-System ist es mit den bereits vorliegenden 3'-Desoxythymidin-Überhängen des linearisierten Vektors und an diese gebundenen Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus möglich, PCR-Produkte mit 3'-Desoxyadenosin-Überhängen einzufügen. Aufgrund der Durchführung der PCR mit *Pfu*-DNA-Polymerase (s. 2.2.1.5.) lagen solche Überhänge zunächst nicht vor. Sie konnten aber durch Post-Amplifizierung mit *Taq*-Polymerase und *Taq*-Polymerase 10x Puffer (New England Biolabs) erzeugt werden.

Die Post-Amplifizierung von 3'-Desoxyadenosin-Überhängen sowie die folgende Ligation mit dem TOPO-Vektor erfolgten nach Herstellerangaben (User Guide TOPO TA Cloning Kit).

Die abschließende Ligation in den Endvektor bei Herstellung des Konstrukts pCG01 und andere Ligationen im Rahmen dieser Dissertation wurden mit dem Quickligation Kit nach angepassten Herstellerangaben durchgeführt.

Ausgehend von 50 ng Vektor wurde mit Hilfe des Tools NEBcalculator ein fünffach molarer Überschuss an Insert für den Ansatz berechnet und die Ligationsdauer auf 1 h bei Raumtemperatur erhöht. Falls wegen benötigten Insert-Volumens eine Erhöhung des empfohlenen Reaktionsvolumens notwendig war, wurde das für die abschließende Transformation (s. 2.2.1.1.) benötigte Volumen in Relation ebenfalls angepasst.

#### **2.2.1.10. Klonierung neuer DNA-Konstrukte**

Vektorkarten sind im Anhang aufgeführt. Alle neu klonierten Konstrukte wurden abschließend sequenziert und bei -20 °C gelagert.

##### **pTM023-NS5A H54Q und pCMV-tag4-NS5A H54Q**

Für die Herstellung der NS5A-Mutanten H54Q im bakteriellen und eukaryotischen Expressionssystem wurde bei den Plasmiden pTM023- und pCMV-tag4-NS5A (s. Tab. 9, 2.1.10.) durch ortsgerichtete Mutagenese (s. 2.2.1.5.) unter Verwendung der Primer H54Q for und H54Q rev (s. Tab. 10, 2.1.11.) ein Basenaustausch vorgenommen. So wurde Histidin durch Glutamin an Aminosäureposition 54 von NS5A ersetzt. Die neuen Konstrukte wurden sequenziert und bei -20 °C gelagert.

##### **pCMV-tag4 6x His FLAG TEV NS5A H54Q (pCG01)**

Um die *tags* von NS5A im Expressionsvektor pCMV-tag4-NS5A H54Q zu modifizieren, wurde zunächst durch PCR mit Hilfe der Primer for6xHisFLAGTEV und revStoppXhoI sowie pTM023-NS5A H54Q als Matrize ein geeignetes Insert hergestellt. Nach Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion wurde dieses vorerst in den Vektor pCR4 TOPO-TA zwischenkloniert (s. 2.2.1.9.). Dies erleichterte den Verdau mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Xho* I. Vektor pCMV-tag4-NS5A wurde ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut. Nach Isolierung von Insert und Vektor durch weitere Gelreinigung konnten beide ligiert werden.

### **pCMV-tag4-TEV-NS5A ΔD2+3 H54Q-TEV-9x His (pCG07)**

Zur Herstellung eines Konstrukts für die Expression von HCV-NS5A mit deletierten Domänen 2 und 3 im Säugetiersystem und C-terminalem 9x His-tag wurde pMX-NS5A-ΔD2+3 mit *EcoR* I und *Xho* I verdaut. Das isolierte Insert wurde in den mit gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pCG01 eingefügt.

### **pET-22b (+) -TEV-NS5A ΔD2+3 H54Q-TEV-9x His (pCG10)**

Entsprechend zur Herstellung von pCG07 erfolgte auch die Klonierung von pCG10. Hier wurde allerdings als Vektor pET-22b (+) verwendet, um auf diese Weise eine spätere Expression von NS5A mit deletierten Domänen 2 und 3 im bakteriellen System zu ermöglichen.

## **2.2.1.11. DNA-Sequenzierung**

DNA wurde durch die Firma Eurofins Genomics sequenziert. Hierfür wurden vorgemischte Proben mit je 15 µl DNA einer Konzentration von 50-100 ng/µl und Zugabe von je 2 µl passenden Primers einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesendet. Die erhaltenen Sequenzierungsergebnisse wurden durch das *Alignment*-Programm SeaView Version 4.0 überprüft.

## **2.2.2. Arbeiten mit Zellkulturen**

### **2.2.2.1. Kultivierung und Passagierung von Säugetierzellen**

#### **U2OS und HEK 293 T**

In Kryo-Gefäßen gelagerte, in  $\text{LN}_2$  gefrorene Zellen wurden rasch im 37 °C-Wasserbad aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension in vorgewärmtes DMEM überführt, dem 10 % FKS und 1 % Pen-Strep zugegeben wurden. Nach Zentrifugation bei 1.200 g für 5 min konnte der DMSO-haltige Überstand entfernt werden. Die Zellen wurden in frischem DMEM (10 % FKS, 1 % Pen-Strep) resuspendiert und in 175 mm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert.

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, in wassergesättigter Atmosphäre und bei 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt. Zellen wurden in Abhängigkeit von der Dichte des Zellrasens etwa alle 3-4 Tage in neue Kulturflaschen passagiert. Dabei verwendete Medien wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das alte Nährmedium wurde entfernt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Die adhärenen Zellen wurden durch Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung für etwa 3 min bei 37 °C abgelöst, was mikroskopisch überprüft wurde. Durch Zugabe von

frischem Medium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen resuspendiert. Bei der Überführung in eine neue Kulturflasche wurden die Zellen abhängig von ihrer vorausgehenden Dichte mit 1:6 bis 1:10 in frischem Medium verdünnt und dann für weiteres Zellwachstum im Brutschrank inkubiert.

Für längere Lagerung wurde Zellsuspensionen gewünschter Konzentration 10 % DMSO zugesetzt und 1 ml-Aliquots mit Hilfe eines Gefrierbehälters zunächst bei -80 °C über Nacht gefroren sowie schließlich in LN<sub>2</sub> gelagert.

### **HEK 293 F**

Wie bei den adhärennten Zelllinien U2OS und HEK 293 T, wurde in LN<sub>2</sub> gefrorene Zellsuspension zunächst kurz in 37 °C warmem Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Suspensionszellen in vorgewärmtes Freestyle 293 Expression Medium gegeben, welches 1 % Pluronic F-68 Non-ionic Surfactant (100x) und 0,5 % Pen-Strep beinhaltet. Nach der Entfernung von DMSO durch Zentrifugation, wie für U2OS- und HEK 293 T-Zellen beschrieben, wurden die HEK 293 F-Zellen in frischem Freestyle-Medium (1 % Pluronic 100x, 0,5 % Pen-Strep) resuspendiert und in 125 ml-Erlenmeyer-Einweg-Kolben mit Schikane kultiviert.

Die Kultivierung wurde auf einem Kreisschüttler bei ~130 rpm in einem Brutschrank bei 37 °C, wassergesättigter Atmosphäre und 8 % CO<sub>2</sub>-Gehalt durchgeführt. Die Kultur wurde bei Erreichen einer Zellkonzentration von maximal 3x10<sup>6</sup> Zellen/ml passagiert. Zu deren Überprüfung wurde im Abstand von 2-4 Tagen die Konzentration mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch Zugabe von 1:5 verdünntem 0,4 %-igem Trypan-Blau wurde dabei auch die Viabilität überprüft. Aufgrund der defekten Membran färben sich hierbei tote Zellen an. Bei Bedarf wurde mit 37 °C warmem Freestyle-Medium (1 % Pluronic 100x, 0,5 % Pen-Strep) auf ~3x10<sup>5</sup> Zellen/ml verdünnt.

HEK 293 F-Zellsuspension wurde nach Angaben des Herstellers zu Freestyle 293 Expression Medium in LN<sub>2</sub> kryokonserviert.

#### **2.2.2.2. Transfektion von Säugetierzellen**

Kultivierung nach der Transfektion erfolgte für bis zu 1-3 Tage wie unter 2.2.2.1. beschrieben. Zur Kontrolle des Transfektionserfolgs wurde je zusätzlich eine Zellkulturschale bzw. ein

*Well* der 6-*Well*-Schale mit GFP-Plasmid pEBG2T-GFP transfiziert und entsprechende Fluoreszenz mit dem Mikroskop überprüft.

### **Transfektion mit X-tremeGENE**

Für die transiente Transfektion geringerer Mengen (bis zu fünf 145 mm Ø-Zellkulturschalen) an U2OS- und HEK 293 T-Zellen wurde X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent verwendet. Je Ansatz wurden 1,25 ml Opti-MEM I mit 10 µg zu transfizierender Plasmid-DNA gemischt und anschließend 30 µl Transfektionsreagenz zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Ansätze für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden danach auf 70-80 % konfluent bewachsene 145 mm Ø-Zellkulturschalen getropft.

### **Transfektion mit PEI**

Um größere Mengen (ab zwanzig 145 mm Ø-Zellkulturschalen) an HEK 293 T-Zellen und auch HEK 293 F-Suspensionskulturen zu transfizieren, wurde PEI genutzt.

Für die Transfektion von HEK 293 T-Zellen wurden je Ansatz 2,5 ml DMEM mit 1 % Pen-Strep mit 87,5 µl PEI (1 µg/µl in H<sub>2</sub>O) und 12,5 µg Plasmid-DNA versetzt. Dies entspricht einem Verhältnis von DNA zu PEI von 1:7. Nach gründlichem Durchmischen und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung auf 70-80 % konfluent bewachsene 145 mm Ø-Zellkulturschalen verteilt.

Für die Untersuchung des Einflusses von Proteasominhibitor MG-132 auf die NS5A-Produktion (s. 2.2.3.2.) wurden HEK 293 T-Zellen in 6-*Well*-Schalen folgendermaßen transfiziert: Es wurden 200 µl DMEM (1 % Pen-Strep) mit 9 µl PEI (1 µg/µl in H<sub>2</sub>O) und 3 µg DNA-Plasmid gemischt, was einem Verhältnis von DNA zu PEI von 1:3 entspricht. Die weitere Durchführung erfolgte wie bei der Transfektion von 145 mm Ø-Zellkulturschalen.

Bei der Transfektion von HEK 293 F-Suspensionszellen wurden Kulturen mit einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml genutzt. Das Volumen des Transfektionsansatzes betrug 10 % der finalen Kultur. Es wurden 1 µg DNA-Plasmid pro  $1,25 \times 10^6$  Zellen und PEI im Verhältnis 7:1 zur verwendeten DNA eingesetzt. Zum Beispiel wurden 200 ml HEK 293 F-Kultur folgendermaßen transfiziert:

Als Transfektionsansatz wurden zu vorgewärmten 20 ml Freestyle 293 Expression Medium mit 1 % Pluronic F-68 Non-ionic Surfactant (100x) und 0,5 % Pen-Strep 160 µg Plasmid-

DNA und 1120 µl PEI gegeben und gründlich durchmischt. Nach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zu 180 ml HEK 293 F-Kultur ( $1,15 \times 10^6$  Zellen/ml) gegeben.

### **2.2.2.3. Kultivierung und Passagierung von Insektenzellen**

In flüssigem Stickstoff gelagerte Sf9-Zellen wurden vorsichtig im Wasserbad aufgetaut. Bei Sf9-Zellen handelt es sich um immortalisierte Ovarzellen der Nachtfalterart *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al., 1977). Die Sf9-Zellen wurden in 20 ml auf Raumtemperatur vorgewärmtem Sf-900 II SFM mit 0,5 % Antibiotic Antimycotic Solution resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 1.200 rpm und 26 °C für 5 min wurde das Zellpellet in 25 ml frischem Nährmedium vorsichtig erneut resuspendiert und in einen 125 ml-Einweg-Erlenmeyerkolben überführt.

Die Kultivierung erfolgte im Thermoschüttler bei 26 °C und 120 rpm. Eine Versorgung mit zusätzlichem CO<sub>2</sub> war bei Sf9-Zellen nicht notwendig. Die Kultur wurde alle 2-3 Tage bei Erreichen von etwa  $3 \times 10^6$  Zellen/ml passagiert und mit frischem Nährmedium auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt. Zelldichte und Viabilität wurden wie bei der Kultivierung von HEK 293 F (s. 2.2.2.1.) mit Neubauer-Zählkammer und Trypan-Blau bestimmt. Bei passendem Volumen und ausreichender Zelldichte wurde die Sf9-Zellkultur bei Bedarf in größere Kulturgefäße überführt. Dafür wurden bei der Kultivierung von bis zu 100 ml Kulturen jeweils 250 ml-Erlenmeyer-Einwegkolben und bei Kulturen bis zu 500 ml jeweils 2 L-Rollerflaschen genutzt.

### **2.2.2.4. Infektion von Insektenzellen mit Baculovirus**

Der für die Infektion verwendete, pVL941 Strep-NS5A-V5 oder pVL941 Strep-NS5A  $\Delta$ D2+3 tragende Baculovirus wurde mit Hilfe von *flashBAC ULTRA* (Oxford Expression Technologies) nach Herstellerangaben produziert und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Es wurden 500 ml Sf9-Zellkultur in einer 2 L-Rollerflasche bei einer Zelldichte von  $1,6-1,8 \times 10^6$  Zellen/ml mit 12 ml rekombinanter P2-Baculovirus-Lösung infiziert. Dieses optimierte Volumenverhältnis wurde von Dr. Claudia Stroß in der AG Welsch für die hergestellte Virus-Charge ermittelt. Die infizierte Zellkultur wurde abschließend für zwei Tage wie unter 2.2.2.3. beschrieben weiterkultiviert.

## **2.2.3. Biochemische Methoden**

### 2.2.3.1. Proteinproduktion in *E. coli* und Zellernte

Für die Produktion von Protein in *E. coli* wurde am Vortag eine Übernachtskultur angesetzt. Zu diesem Zweck wurden 100 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Carbenicillin und 25 µg/ml Chloramphenicol in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben ohne Schikane gegeben und auf 37 °C vorgewärmt. Das Medium wurde mit einer Kolonie von *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, welches kurz vorab mit Plasmid für die gewünschte Proteinherstellung transformiert wurde, angeimpft. Danach wurde die Kultur bei 37 °C und 240 rpm über Nacht im Thermoschüttler inkubiert.

Am Folgetag wurden je 25 ml der Übernachtskultur in insgesamt viermal 1 Liter an 37 °C warmem LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Carbenicillin und 25 µg/ml Chloramphenicol in 2 L-Kolben ohne Schikane überimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 120 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,8-0,9 bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) erreicht wurde. Daraufhin wurde die Inkubationstemperatur auf 18 °C gesenkt und jeder Kultur 0,5 mM IPTG zur Induktion der Proteinexpression zugegeben. Da es sich bei NS5A um ein Zink-Metalloprotein handelt, wurden auch 100 µM  $ZnCl_2$  hinzugefügt. Die Kultivierung wurde dann bei 18 °C und 120 rpm über Nacht fortgesetzt. Abschließend wurden die Bakterien geerntet. Die insgesamt 4 Liter Bakterienkultur wurden in einzelnen Schritten bei 8.000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die gewonnenen Pellets bei -20 °C bis zur Reinigung gelagert.

Im Verlauf der Dissertation wurde zu einem anderen Protokoll zur Expression und Reinigung von NS5A im bakteriellen System gewechselt. Dieses Protokoll basiert auf Arbeiten von Sólyom et al. (2015) sowie Valdau (2014) und wurde von Dr. Rebecca M. Richter aus der AG Welsch etabliert.

Am Vortag wurden als Übernachtskultur 125 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Carbenicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol und 0,4 % Glucose in einem 250 ml-Kolben ohne Schikane auf 37 °C vorgewärmt. Die Kultur wurde mit einer Kolonie von *E. coli* LOBSTR-BL21 (DE3)-RIL angeimpft, welches vorab mit pCG10 transformiert wurde. Im Anschluss wurde die Kultur bei 37 °C und 140 rpm über Nacht im Thermoschüttler inkubiert.

Am Folgetag wurden je 30 ml der Übernachtskultur in insgesamt viermal 1 Liter 37 °C warmem LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Carbenicillin und 0,2 % Glucose in 2 L-Kolben ohne Schikane überimpft. Die Kulturen wurden bis zum Erreichen einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,6 bei 37 °C und 140 rpm inkubiert. Nach Senken der Temperatur auf 28 °C und

Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert und zusätzlich 100 µM ZnCl<sub>2</sub> zugegeben. Die Kultivierung wurde maximal 3 h oder bis zur Stagnation des OD<sub>600 nm</sub>-Werts fortgesetzt. Die Bakterienkulturen wurden schrittweise bei 8.000 rpm und 4 °C für 15 min geerntet, sodass schließlich insgesamt vier Pellets aus viermal 1 Liter Kultur vorlagen. Die Pellets wurden je in 25 ml Lysepuffer resuspendiert und mit einem *Douncer* homogenisiert. Das Lysat wurde zu je 25 ml in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und nach Schockfrost in LN<sub>2</sub> bei -20 °C gelagert.

<u>Lysepuffer:</u>	50 mM	TRIS-HCl, pH 7,4
	100 mM	NaCl
	10 %	Glycerol
	3 mM	DTT
	4 U/ml	Benzonase
	1x	cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail

### 2.2.3.2. Proteinproduktion in Säugetier- und Insektenzellen und Zellernte

#### HEK 293 T-Säugetierzellen

Vollständig konfluent bewachsene Zellkulturen wurden zunächst gewaschen und trypsiniert (s. 2.2.2.1.). Nach Resuspension der Zellen in je 20 ml DMEM (10 % FKS, 1 % Pen-Strep) wurden die Zellkulturflaschen mit gleichem Medium auf 150 ml aufgefüllt. Die Zellresuspensionen wurden zu je 20 ml auf 145 mm Ø-Zellkulturschalen aufgeteilt. Nach Durchmischen der Schaleninhalte wurden diese über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag waren die Schalen ausreichend dicht für eine Transfektion (s. 2.2.2.2.) bewachsen.

Die Ernte erfolgte einen Tag nach Transfektion. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Verwendetes DPBS und Lysepuffer waren auf 4 °C vorgekühlt. Noch vorhandenes Medium wurde abgesaugt und die Schaleninhalte mit je 10 ml DPBS gewaschen. Die Reste der Waschlösung wurden mit Pipette entfernt. Die Zellen jeder Kulturschale wurden in je 630 µl Lysepuffer resuspendiert. Zum Ablösen der Zellen wurde ein Zellschaber verwendet. Die Zelllysate wurden in vorgekühlten 15 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt, in LN<sub>2</sub> schockgefrostet und abschließend bei -20 °C gelagert.

<u>Lysepuffer 293 T:</u>	50 mM	TRIS-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	10 %	Glycerol
	20 mM	Imidazol

0,5 %            Nonoxinol 40  
1x                cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail

Bei Versuchen zu Beginn der Doktorarbeit wurde mit den Lysaten im Anschluss eine FLAG-Proteinreinigung und keine Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-NTA-AC) durchgeführt (s. 2.2.3.4.2.). Die Zellen wurden in diesem Fall zunächst mit 1 ml DPBS pro Schale resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 1 min wurden die Überstände verworfen und die Pellets in je 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Lysepuffer 293 T enthielt zu diesem Zeitpunkt noch kein Glycerol und kein Imidazol. Nach Inkubation für 30 min bei 4 °C unter Rotation, wurden die Lysate bei 14.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und weiter gereinigt (s. 2.2.3.4.2.). Als Kontrollprobe für die anschließende Reinigung wurde separat eine Probe unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet in 6 M Harnstoff resuspendiert (Volumen entsprechend dem entnommenen Überstand). Beide Proben wurden in LN<sub>2</sub> schockgefrostet und bei -20 °C gelagert.

Im weiteren Verlauf des Promotionsprojektes wurde eine Zellfraktionierung als zusätzlicher Schritt eingeführt (s. 2.2.3.3.). Nach Etablierung dieses Schrittes wurden Zellen nicht mehr in Lysepuffer, sondern in 500 µl DPBS pro Kulturschale resuspendiert. Es wurde je die Zellresuspension aus 20 Schalen in 15 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt und mit einer Fraktionierung (s. 2.2.3.3.) fortgefahren.

### **Untersuchung des Einflusses von Proteasominhibitor MG-132 auf die NS5A-Produktion in HEK 293 T-Säugetierzellen**

Um den Effekt einer Hemmung des Proteasoms auf die Proteinausbeute zu eruieren, wurde NS5A in 6 *Well*-Zellkulturplatten hergestellt, denen der Proteasominhibitor MG-132 zugesetzt wurde.

Dafür wurden die Zellen einer vollständig bewachsenen Zellkulturflasche, wie unter 2.2.2.1. beschrieben, gewaschen und trypsiniert. Danach wurden sie in 40 ml DMEM (10 % FKS, 1 % Pen-Strep) resuspendiert. In die *Wells* der Zellkulturplatten wurden 1,6 ml vorgewärmtes DMEM (10 % FCS, 1 % Pen-Strep) gegeben und je 400 µl der Zellresuspension zugetropft. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht, waren die *Wells* am Folgetag adäquat für eine Transfektion (s. 2.2.2.2.) bewachsen.

Zur Untersuchung des Effekts von MG-132 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Ernte (1, 2, 4, 8, 12 h) bzw. zu Beginn der Transfektion das Medium durch DMEM (10 % FKS, 1 % Pen-Strep) mit zusätzlich 10 bzw. 20  $\mu$ M MG-132 ersetzt.

Die Zellen wurden einen Tag nach Transfektion geerntet, analog zur Kultivierung in 145 mm  $\varnothing$ -Zellkulturschalen. Die *Well*-Inhalte wurden mit je 1 ml DPBS gewaschen und in jeweils 75  $\mu$ l Lysepuffer aufgenommen. Eine Zellfraktionierung wurde anschließend nicht durchgeführt.

#### Lysepuffer (6 *Well*):

Ansatz wie Lysepuffer 293 T (ohne Imidazol) mit 1 % Digitonin als Detergens

5 % Digitonin-Lösung:      25 mg in 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Die Digitonin-Lösung wurde für 2 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

MG-132-Lösung:              10 mg in 1 ml DMSO

Die Lösung wurde im Anschluss sterilfiltriert und bei -80 °C gelagert.

#### **HEK 293 F-Säugetierzellen:**

Eine gewünschte Menge an HEK 293 F-Zellkultur von bis zu viermal 200 ml wurde, wie unter 2.2.2.1. beschrieben, kultiviert und im Anschluss transfiziert (s. 2.2.2.2.).

Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet. Zu diesem Zweck wurden die Suspensionskulturen schrittweise bei 8.500 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Dabei wurden die Überstände verworfen und die Pellets mit vorgekühltem DPBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde mit den Pellets eine Zellfraktionierung durchgeführt (s. 2.2.3.3.).

Für die Untersuchung einer möglichen Steigerung der Proteinexpression durch Zugabe von NaBu wurden viermal 25 ml HEK 293 F-Suspensionskultur kultiviert und drei davon transfiziert. Wie von Backliwal et al. (2008) beschrieben, erfolgte die Zugabe von NaBu 3 h nach Transfektion. Dabei wurde einer Kultur 1 mM und einer weiteren Kultur 5 mM NaBu zugesetzt. Als Kontrolle wurde der dritten transfizierten Suspensionskultur kein NaBu hinzugefügt.

Nach ein, zwei und drei Tagen wurden die Zelldichten der verschiedenen Kulturen bestimmt und je 500  $\mu$ l-Proben entnommen. Diese wurden bei 10.000 rpm und 4 °C für 10 min

zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in  $\text{IN}_2$  schockgefrostet sowie bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Die Pellets wurden auf Eis aufgetaut und in Lysepuffer-Volumen abhängig von der zum Erntezeitpunkt gemessenen Zelldichte der Kulturen resuspendiert. Die nach Trypan-Blaufärbung toten, aber noch intakten Zellen wurden dabei mitgezählt. Es wurden  $125\text{ }\mu\text{l}$  Lysepuffer pro  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Lysate wurden für 15 min auf Eis inkubiert und dann bei  $13.000\text{ rpm}$  und  $4\text{ °C}$  für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abschließend für Untersuchungen mit Coomassie-Blue-Färbung oder Western Blot (WB) vorbereitet (s. 2.2.3.8.2.).

#### Lysepuffer (293 F):

Ansatz wie Lysepuffer 293 T (ohne Imidazol) mit 1 % Triton X-100 als Detergens

Natriumbutyrat-Lösung: 1 M NaBu

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

#### **Sf9-Insektenzellen**

Zweimal 500 ml Sf9-Kultur wurden mit je 12 ml P2-Viruslösung infiziert (s. 2.2.2.4.). Nach einer Inkubation von zwei Tagen bei  $26\text{ °C}$  und  $120\text{ rpm}$ , wurde die Infektion mikroskopisch überprüft und die Zellen geerntet. Zuzüglich wurden Kulturen angesetzt, denen 10 nM des NS5A-Inhibitors DCV zum Zeitpunkt der Infektion mit P2-Viruslösung zugefügt wurden.

Die Zellsuspensionen wurden auf vier Zentrifugenflaschen verteilt und bei  $8.000\text{ rpm}$  und  $4\text{ °C}$  für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und mit den Pellets eine Zellfraktionierung durchgeführt.

### **2.2.3.3. Zellfraktionierung von Säugetier- und Insektenzellen**

#### **HEK 293 T-Säugetierzellen**

Pellets mit geernteten HEK 293 T-Zellen wurden zunächst mit DPBS gewaschen und bei  $5.000\text{ rpm}$  und  $4\text{ °C}$  für 5 min zentrifugiert. Überstände wurden verworfen und die Pellets aus je 20 Kulturschalen in 10 ml hypotonem Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation für

15 min auf Eis wurden die Resuspensionen gründlich durchmischt, mittels *Douncing* homogenisiert und in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt.

Durch bis zu fünfmaliger Zentrifugation bei 800 g und 4 °C für 10 min und Überführung der Überstände in neue Reaktionsgefäße, wurden in den Pellets verbliebene, unlysierte Zellen und Zellkerne entfernt. Nach weiterer Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C für 15 min, wurden die Überstände mit der Cytosolfraktion verworfen. Die Pellets wurden in 1 %-Triton-Puffer entsprechend dem Volumen der verworfenen Überstände resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 min, wurden die Lysate abschließend erneut bei 20.000 g zentrifugiert. Die Überstände mit der membranären Zellfraktion wurden in einem vorgekühlten Reaktionsgefäß gesammelt. Nach Zugabe von 1 mM DTT und Aliquotierung wurde die Membranfraktion in  $\text{LN}_2$  schockgefrostet und bei -20 °C bis zur Reinigung gelagert.

<u>Hypotoner Puffer (HEK 293 T):</u>	10 mM	TRIS-HCl, pH 7,5
	10 mM	NaCl
	3 mM	$\text{MgCl}_2$
	1x	cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail
<u>1 % Triton-Puffer:</u>	20 mM	TRIS-HCl, pH 7,4
	10 mM	NaF
	120 mM	NaCl
	1 %	Triton X-100
	1x	cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail
<u>DTT-Lösung:</u>	1 M	DTT

Die DTT-Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### **HEK 293 F-Säugetierzellen**

Zunächst erfolgte die Zellfraktionierung für HEK 293 F-Zellen analog wie bereits für HEK 293 T-Zellen beschrieben. Sie wurde allerdings im Verlauf der Dissertation angepasst.

Die Pellets geernteter Zellen entsprechend je 400 ml Ausgangskultur wurden in je 15 ml hypotonem Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert und gründlich durchmischt. Danach wurden die Zellen durch Sonifikation auf Eis bei maximaler Stufe für zweimal 5 s, mit 30-sekündiger Pause, aufgebrochen. Nach anschließender Zentrifugation bei 1.000 g und 4 °C für 10 min wurden die Pellets mit Kernfraktion und unlysierten Zellen verworfen. Die Überstände wurden bei 100.000 g und 4 °C für 1 h ultrazentrifugiert. Die Pellets wurden in je 10 ml Lysepuffer (ohne Detergens) resuspendiert und die Resuspensionslösungen in

vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden in  $\text{LN}_2$  schockgefrostet und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Reinigung gelagert.

#### Hypotoner Puffer (HEK 293 F):

Ansatz wie „Hypotoner Puffer (HEK 293 T)“ (S. 64), mit 2 mM 2-Mercaptoethanol

#### Lysepuffer (ohne Detergens):

Ansatz wie „1 % Triton-Puffer“ (S. 64), ohne Triton X-100, mit Erhöhung auf 300 mM NaCl und Zugabe von 10 % Glycerol, und 2 mM 2-Mercaptoethanol

### **Sf9-Insektenzellen**

Vier Pellets geernteter Sf9-Zellen (s. 2.2.3.2.) wurden in je 10 ml hypotonem Puffer resuspendiert und gleichmäßig auf zwei vorgekühlte 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden mittels Sonifikation in drei Intervallen von 10 s bei maximaler Leistung aufgebrochen. Diese erfolgte auf Eis mit 40-sekündigen Pausen zwischen den Intervallen, um ein Überhitzen der Proben zu vermeiden. Danach wurden die Proben bei 1.000 g und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert. Die Pellets aus unlysierten Zellen und Zellkernfraktion wurden verworfen. Die zweimal circa 25 ml an Überstand wurden bei 145.000 g und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  für 1 h ultrazentrifugiert. Die Überstände dieses Zentrifugationsschritts, welche die Cytosolfraktion enthalten, wurden ebenfalls verworfen. Beide Pellets mit der Membranfraktion wurden zusammen in 25 ml Puffer W resuspendiert. Nach Homogenisierung durch *Douncing* wurde die Resuspension in  $\text{LN}_2$  schockgefrostet und bis zur Reinigung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### Hypotoner Puffer (Sf9):

Ansatz wie bei „Hypotoner Puffer (HEK 293 T)“ (S. 64), mit zusätzlich 1 mM DTT und 1x Phosphatase-Inhibitor

<u>Puffer W:</u>	100 mM	TRIS-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	5 %	Glycerol
	1 mM	DTT
	1x	cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail
	1x	Phosphatase-Inhibitor

<u>25x Phosphatase-Inhibitor:</u>	250 mM	NaF
	25 mM	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{ H}_2\text{O}$

250 mM  $\beta$ -Glycerophosphat  
25 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$

#### 2.2.3.4. Proteinreinigung

Durch Proteinreinigung kann ein in der Regel rekombinant in einem Wirtssystem produziertes Zielprotein angereichert und gereinigt werden. Einen Überblick über die einzelnen Schritte liefert Abbildung 19.

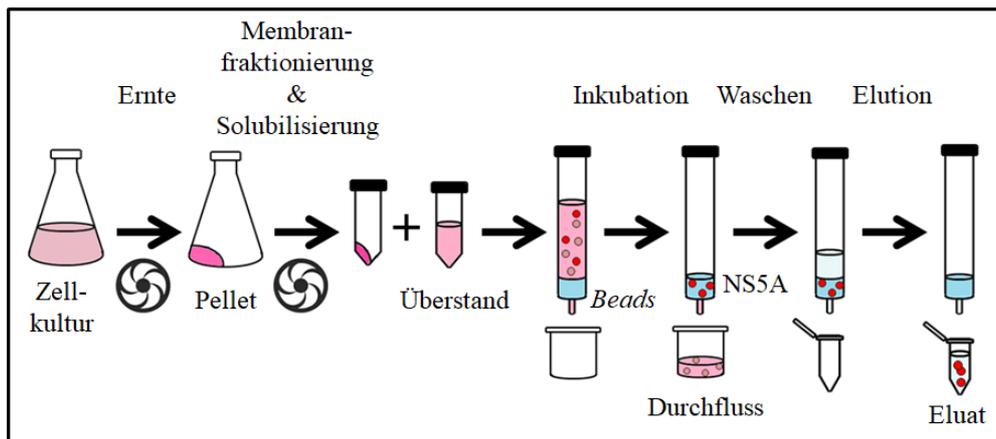


Abbildung 19: Grundprinzip einer Membranprotein-Reinigung.

Durch Zellfraktionierung können geerntete Zellen in ihre cytosolischen, membranären und nukleären Bestandteile aufgetrennt werden (s. 2.2.3.3.). Im Fall membranassoziierter Proteine wie NS5A, kann so die Membranfraktion isoliert und das Protein durch Zugabe von Detergens solubilisiert werden. Bei der folgenden Chromatographie bindet das Zielprotein über sein Protein-tag ligandenvermittelt an einer Agarose-Matrix (*Beads*). Andere Proteine ohne dieses *tag* binden im Optimalfall nicht und enden im Durchfluss. Unspezifisch gebundene Proteine werden durch Waschschrte entfernt, Durch eine Komponente des Elutionspuffers mit höherer Affinität zu den *Beads* als das Zielprotein, wird abschließend das Protein eluiert und kann weiter analysiert werden (s. 2.2.3.8.).

Alle Arbeitsschritte der verschiedenen Methoden zur Proteinreinigung in dieser Dissertation wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Verwendete Puffer wurden entsprechend vorgekühlt. Zur Überprüfung des Reinigungserfolgs wurden während der Durchführung Proben des Solubilisats, des Durchflusses bzw. bei *in batch*-Verfahren des Überstands nach der Inkubation mit den *Beads*, des Waschdurchflusses, der Eluatfraktionen und der *Beads* nach der Elution entnommen. Die Solubilisat-Probe wurde durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min aufgetrennt. Das Pellet mit ungelösten

Bestandteilen wurde in 6 M Harnstoff entsprechend dem Volumen des Überstands resuspendiert. *Beads* wurden vor der Probenentnahme 1:1 mit Waschpuffer verdünnt. Alle Kontrollproben wurden, wie unter 2.2.3.8.2. beschrieben, präpariert und weiterführend mit SDS-PAGE und Coomassie-Blue-Färbung oder WB (2.2.3.8.) analysiert. Nach Überprüfung der Proteinkonzentration der Eluatfraktionen nach Bradford (s. 2.2.3.8.1.) wurde geeignetes Eluat vereinigt, aliquotiert und nach Schockfrost in  $\text{LN}_2$  bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.3.4.1. Bakteriell System**

##### **Ni-NTA-AC**

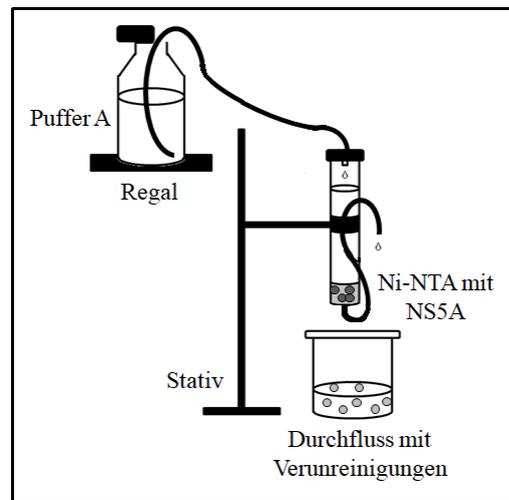
Zu Beginn der Dissertation wurde ein Protokoll der Arbeitsgruppe von Dr. Ricardo M. Biondi (IBioBA - CONICET, Universität Buenos Aires), angepasst nach Biondi (2002), verwendet.

Die geernteten vier *E. coli*-Zellpellets (s. 2.2.3.1.) wurden aufgetaut und danach mit 25 ml Lysepuffer je Pellet resuspendiert. In die Resuspensionen wurden pro Milliliter je 20 U Benzonase Nuclease gegeben, um Nukleinsäuren abzubauen und so die Lysatviskosität zu senken. Die Zelllösungen wurden in fünf Intervallen von je 15 s bei maximaler Stufe und mit Pausen von 30 s sonifiziert.

Das Lysat wurde bei 8.500 rpm für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und für 2 h im Kühlraum unter Rotation inkubiert. Währenddessen wurden zweimal 2 ml 50 %-Ni-NTA-Suspension in 50 ml-Reaktionsgefäße gegeben und je zweimal mit 4 ml Lysepuffer gewaschen. Waschüberstände wurden nach Zentrifugation bei 5.000 rpm für 5 min entfernt. Das Gesamtlusat von 100 ml wurde nach Inkubation auf die zwei Reaktionsgefäße mit äquilibrierter Ni-NTA-Agarose aufgeteilt, sodass schließlich je 50 ml Lysat mit 1 ml Ni-NTA-Agarose für 2 h unter Rotation im Kühlraum *in batch* inkubiert wurden.

Die Lysat-Ni-NTA-Gemische wurden anschließend bei 8.500 rpm für 15 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Ni-NTA-Agarose wurde mit Puffer A in einem 14 ml-Reaktionsröhrchen mit Rundboden vereinigt und *in batch* 15-mal mit 5-fachem *Bead*-Volumen entsprechend 10 ml an Puffer A gewaschen. Zugehörige Zentrifugationen wurden bei 5.000 rpm für 1 min durchgeführt. Für einen abschließenden Waschschrift mit 850 ml Puffer A wurde die Ni-NTA-Agarose zunächst mit ausreichender Menge an Puffer A im Kühlraum auf eine Econo-Pac-Chromatographiesäule überführt. Dann wurde ein

Schlauchsystem installiert und mit Parafilm abgedichtet (s. Abb. 20). Auf diese Weise konnten die *Beads* durch Schwerkraft und Unterdruck über Nacht gewaschen werden.



**Abbildung 20: Schematischer Aufbau des Schwerkraft-Waschschritts.**

Am Folgetag wurde zunächst mit fünf Säulenvolumen (SV) Elutionspuffer mit 200 mM Imidazol eluiert. Dabei wurde der Säulinhalt für 30 min mit dem Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Elution mit 2,5 SV Elutionspuffer mit 300 mM Imidazol. Die Eluate wurden zu je 1 ml fraktioniert.

Bei Nutzung des Expressionsvektors pTM023-NS5A H54Q folgte eine Proteindialyse (s. 2.2.3.5.) und eine Abspaltung des *GST-tags* mit Thrombin-Protease (s. 2.2.3.6.). Zur Entfernung des danach abgetrennten *GST-tags* wurde eine weitere Ni-NTA-AC durchgeführt, welche ausgehend von der bereits beschriebenen Methodik angepasst wurde. Als zusätzliche Kontrollen wurden jeweils Proben nach der Dialyse und dem Verdau mit Thrombin-Protease entnommen.

Thrombin-Protease wurde durch Zugabe von 1x cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail inaktiviert. Es wurde 1 ml von 50 %-Ni-NTA-Agarose verwendet und diese zweimal mit 2 ml Puffer A äquilibriert. Die Inkubation mit den *Beads* und das 15-malige Waschen mit 5-fachem *Bead*-Volumen erfolgte analog der Ni-NTA-AC vor Dialyse und GST-Abspaltung. Der Waschschritt über Nacht mit Schwerkraft und Unterdruck entfiel dabei und die Ni-NTA-Agarose wurde nicht auf eine Säule übertragen. Die Elution wurde *in batch* durchgeführt. Dabei wurde 1 ml Elutionspuffer mit 200 mM Imidazol entsprechend zwei *Bead*-Volumen zugegeben und mit der Ni-NTA-Agarose vermischt. Bei nachfolgender Inkubation für 30 min wurde die Suspension alle 10 min vorsichtig mit einer Pipette durchmischt. Nach einer

Zentrifugation bei 2.500 rpm für 2 min, wurde der Überstand vorsichtig entnommen und die Elution mit Elutionspuffer mit 300 mM Imidazol wiederholt.

<u>Lysepuffer:</u>	100 mM	TRIS-HCl, pH 8,0
	200 mM	NaCl
	0,5 %	NP-40
	10 mM	2-Mercaptoethanol
	1x	cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail

<u>Puffer A:</u>	50 mM	TRIS-HCl, pH 8,0
	750 mM	NaCl
	30 mM	Imidazol
	2,87 mM ( $\cong$ 0,02 %)	2-Mercaptoethanol

Elutionspuffer: Puffer A mit 200 und 300 mM Imidazol

### **Ni-NTA-AC (nach Sólyom und nach Valdau)**

Im Verlauf der Dissertation wurde die Herstellung von HCV NS5A im bakteriellen System weiterentwickelt und schließlich die Ni-NTA-AC nach Sólyom et al. (2015) und nach Valdau (2014) durchgeführt. Die Methodik wurde durch Dr. Rebecca M. Richter in der AG Welsch etabliert.

Die insgesamt 100 ml an Bakterienlysat (s. 2.2.3.1.) wurden aufgetaut, auf zwei 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und sonifiziert. Die Sonifikation erfolgte mit je fünf Intervallen von 20 s Dauer, unterbrochen von 30-sekündigen Pausen und bei maximaler Stufe. Nach einer Zentrifugation bei 8.500 rpm für 30 min wurden die Pellets in Sarkosyllösung resuspendiert. Dabei wurden 2 ml pro Gramm Pellet verwendet und die Resuspensionen für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rotator inkubiert. Durch Verwendung des anionischen Detergens N-Lauroylsarcosin können Einschlusskörperchen lysiert werden, falls NS5A in solchen vorliegt. Nach weiterer Zentrifugation wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und auf Eis tropfenweise 1:10 in Rückfaltungspuffer verdünnt. Die Proteinlösung wurde *in batch* mit 2 ml Ni-NTA-Agarose entsprechend 0,5 ml pro Liter Startkultur (s. 2.2.3.1.) für 1 h unter Rotation inkubiert. Die Agarose war zuvor entsprechend dem Protokoll nach Biondi äquilibriert worden. Die Suspension aus Proteinlösung und Ni-NTA-Agarose wurde bei 8.500 rpm für 30 min zentrifugiert und die *Beads* mit ausreichend Waschpuffer 1 auf eine Poly-Prep-Chromatographiesäule überführt. Dort wurden sie mit je 10 SV an Waschpuffer 1 und 2 gereinigt. Im Anschluss wurde mit 2 SV Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol eluiert. Das Eluat wurde dabei auf acht Fraktionen von je ca. 500  $\mu$ l aufgeteilt. Die Elution wurde mit Puffer einer höheren Imidazol-Molarität von 350 mM wiederholt.

Neben den üblichen Kontrollen zur Reinigung (s. 2.2.3.4.) wurden auch Proben nach der Rückfaltung und nach Reinigung der Ni-NTA-Agarose mit Waschpuffer 1 und 2 entnommen.

<u>Äquilibriumspuffer:</u>	50 mM 100 mM 3 mM	TRIS-HCl, pH 7,4 NaCl DTT
<u>Sarkosyllösung:</u>	3 % (w/v)	N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz
<u>Rückfaltungspuffer:</u>	50 mM 100 mM 2 mM 100 µM 0,016 % (~ 1 CMC) 1x	TRIS-HCl, pH 7,4 NaCl DTT ZnCl <sub>2</sub> Triton X-100 cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail
<u>Waschpuffer 1:</u>	50 mM 1 M 2 mM 5 % 100 µM 0,016 % (~ 1 CMC) 5 mM	TRIS-HCl, pH 7,4 NaCl DTT Glycerol ZnCl <sub>2</sub> Triton X-100 Imidazol

Waschpuffer 2:

Ansatz wie Waschpuffer 1, aber 100 mM NaCl, 0,032 % Triton X-100 und 15 mM Imidazol

<u>Elutionspuffer:</u>	50 mM 100 mM 2 mM 5 % 100 µM 0,016 % (~ 1 CMC) 250 bzw. 350 mM	TRIS-HCl, pH 7,4 NaCl DTT Glycerol ZnCl <sub>2</sub> Triton X-100 Imidazol
------------------------	--	--

## 2.2.3.4.2. Säugetierzellsystem

### FLAG-Immunaффinitätschromatographie (IAC)

Für die FLAG-IAC wurde ein FLAG Immunoprecipitation Kit von Sigma-Aldrich genutzt. Die Reinigung wurde nach angepasstem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurden für die in der Promotion vorliegenden 5 ml Lysat-Überstand 200 µl der ANTI-FLAG M2-Gelmatrix eingesetzt. Der optionale Wasch-

schritt der *Beads* mit Elutionspuffer vor Inkubation mit dem Lysat wurde nicht durchgeführt, sondern lediglich das standardmäßige Waschen mit zweimal 12,5 SV an Waschpuffer (1x). Zur Erhöhung der Bindung wurden *Beads* und Lysat über Nacht inkubiert. Der Säuleninhalt wurde nach Inkubation dreimal mit 12,5 SV an Waschpuffer gereinigt. Die Menge an notwendigem Elutionspuffer mit 3x FLAG-Peptid (Sigma-Aldrich) wurde an die größere Menge an Säulenmaterial angepasst, sodass schließlich mit 500 µl entsprechend 2,5 SV nach 30-minütiger Inkubation eluiert wurde. Das Eluat wurde dabei zu fünf Fraktionen von je 100 µl aufgeteilt.

Als Säulen wurden Chromatographiesäulen von Sigma-Aldrich verwendet. Durch Aufsetzen auf 14 ml-Reaktionsröhrchen mit Rundboden war es möglich, wie vom Hersteller empfohlen, den Durchfluss bei Waschschritten und Elution durch Zentrifugation bei 5.000 g für 30 s zu beschleunigen.

Waschpuffer (10x):            0,5 M            TRIS-HCl, pH 7,4  
   1,5 M            NaCl

Elutionspuffer:            Waschpuffer (1x) mit 150 ng/µl 3x FLAG

## **Ni-NTA-AC**

Ausgehend vom Protokoll für Ni-NTA-AC nach Biondi, wie es im bakteriellen System verwendet wurde (2.2.3.4.1.), wurde diese Art der Proteinreinigung für das Säugetierzellsystem mehrfach angepasst. Die nachfolgend beschriebenen Modifikationen (I) bis (III) bauen dabei aufeinander auf.

### Modifikationen (I)

Der Ablauf der Ni-NTA-AC nach Biondi wurde in seinen wesentlichen Schritten beibehalten. Die Sonifikation erfolgte jedoch nur bei Hälfte der maximalen Leistung und die Pausen zwischen den einzelnen Intervallen wurden auf 30 s erhöht. Die Pufferzusammensetzungen wurden geringfügig angepasst. Der Imidazol-Gehalt in Puffer A wurde auf 20 mM Imidazol gesenkt und die Molarität von NaCl auf 500 mM reduziert. Für die Elution wurde nur noch Elutionspuffer mit 300 mM Imidazol verwendet. Diese erfolgte mit 2 SV und die Eluate wurden zu 20 Fraktionen à ca. 200 µl aufgeteilt.

### Modifikationen (II)

Nach Etablierung einer Zellfraktionierung (s. 2.2.3.3.), wurde auf die zusätzliche Lyse durch Sonifikation verzichtet. Die Menge eingesetzter Ni-NTA-Agarose wurde auf insgesamt

250 µl an *Beads* reduziert und die Inkubationszeit mit diesen auf 1 h gesenkt. Die Imidazol-Molarität von Puffer A wurde weiter auf 10 mM reduziert. Beim Waschen der Ni-NTA-Agarose wurde auf eine Reinigung über Nacht mit Schwerkraft und Unterdruck verzichtet und stattdessen auf der Säule 10x mit 5 SV Puffer A gewaschen. Eluiert wurde mit 500 mM Imidazol im Elutionspuffer unter Verwendung einer Schlauchklemme. Die eingesetzten 10 SV wurden auf 25 Fraktionen von je ca. 100 µl aufgeteilt.

### Modifikationen (III)

Bei der finalen Anpassung des Protokolls für die Ni-NTA-AC im Säugetierzellsystem wurden Puffer A und Elutionspuffer 1x cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail und 1 mM Digitonin (~ 2-4 CMC) zugegeben. Es wurde die kleinere Poly-Prep-Chromatographiesäule statt der Econo-Pac-Version verwendet und die Anzahl der Waschschritte auf 5x 5 SV gesenkt. Die Menge eingesetzten Elutionspuffers mit 500 mM Imidazol wurde auf 4 SV reduziert. Die Eluate wurden auf 15 Fraktionen von etwa 65 µl aufgeteilt.

### **Ionenaustauschchromatographie (IC)**

Bei der IC von FreeStyle 293 F-Zelllösung wurde im Vorfeld für die Herstellung von NS5A der Expressionsvektor pCG07 verwendet. Der pI des so produzierten NS5A-Proteins mit deletierter Domäne 2 und 3 (s. Tab. 9, 2.1.10.) wurde mit dem Online-Tool ExPASy Compute pI/Mw bestimmt. Bei einem pI von 8,1 und geplanten Puffer-pH-Werten von 7,4 wurde SP-Sepharose Fast Flow mit gebundenen Sulfopropyl-Molekülen als starker Kationenaustauscher verwendet.

In einem Vorlaufexperiment wurden 10 ml Membranfraktion mit pCG07 transfizierter FreeStyle 293 F-Zellkultur (s. 2.2.3.3.) aufgetaut und durch Mischung 1:1 mit Lyse-Verdünnungspuffer eine Detergens-Konzentration von 1 % Triton X-100 eingestellt. Dadurch wurde nicht nur Detergens für die Protein-Solubilisierung zugegeben, sondern auch der Salzgehalt der Membranfraktion von 300 mM NaCl und 10 mM NaF halbiert. Die Solubilisierung erfolgte für 1 h unter Rotation.

Danach wurde das Solubilisat bei 100.000 g für 45 min ultrazentrifugiert. Währenddessen wurden im Kühlraum 250 µl SP-Sepharose Fast Flow auf eine Poly-Prep-Chromatographiesäule gegeben und mit 10 SV an Äquilibriumspuffer äquilibriert. Vor Inkubation der *Beads* mit dem Solubilisat-Überstand, wurde dessen Salzmolarität durch Mischung 2:1 mit Verdünnungspuffer nochmals reduziert. Die nun vorliegende Menge an 100 mM NaCl und

3,3 mM NaF war somit ausreichend gesenkt, um bei späterer Elution mit einer geringen NaCl-Molarität beginnen zu können. Das verdünnte Solubilisat wurde auf die Säule gegeben und durchfloss die SP-Sepharose bei einer Tropfgeschwindigkeit von etwa einem Tropfen pro fünf Sekunden. Anschließend wurde mit je 3 SV entsprechend 750 µl an Elutionspuffer mit verschiedener NaCl-Molarität von 100, 150, 200, 250 und 500 mM eluiert. Die Eluate wurden je auf sieben Fraktionen von ca. 35 µl aufgeteilt.

<u>Lyse-Verdünnungspuffer:</u>	20 mM 10 % 2 % 1x	TRIS-HCl, pH 7,4 Glycerol Triton X-100 cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail
<u>Verdünnungspuffer:</u>	20 mM 10 % 1x	TRIS-HCl, pH 7,4 Glycerol cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail
<u>Äquilibrierungspuffer:</u>	20 mM	TRIS-HCl, pH 7,4
<u>Elutionspuffer:</u>	20 mM 0,1 % 1x	TRIS-HCl, pH 7,4 Triton X-100 cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail
Mengen an NaCl:	100, 150, 200, 250 und 500 mM	

### **IC in Kombination mit Ni-NTA-AC**

Bei der Durchführung des IC-Hauptexperiments wurde im Wesentlichen das im Vorlaufversuch etablierte Protokoll verwendet und geringfügig angepasst. Zusätzlich erfolgte im Anschluss eine Ni-NTA-AC mit dem Inkubationsdurchfluss der IC.

#### Modifikationen des IC-Protokolls

Wegen erhöhter Menge des Ausgangsmaterials auf 20 ml Membranfraktion, wurde die Menge eingesetzter SP-Sepharose Fast Flow auf 500 µl verdoppelt. Der Verdünnungspuffer beinhaltete zusätzlich 150 mM NaCl, sodass bei Inkubation von verdünntem Solubilisat und *Beads* 150 mM NaCl vorlagen. Die Elution wurde nur mit Puffer von 500 mM NaCl durchgeführt. Dabei wurden 4 SV auf die Säule gegeben und unfraktioniert aufgefangen.

#### Ni-NTA-AC nach IC

Bei der auf die IC folgenden Ni-NTA-AC wurden 2x 250 µl Ni-NTA-Agarose in 50 ml-Reaktionsgefäßen gegeben. Sie wurde je 3x mit 4-fachem *Bead*-Volumen an Puffer A mit 500 mM NaCl äquilibriert. Dabei wurden die Überstände mehrfach durch Zentrifugation

bei 1.000 rpm für 5 min entfernt. Anschließend wurden je 250 µl Ni-NTA-Agarose mit 30 ml des IC-Durchflusses für 1 h im Kühlraum auf dem Rotator inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (wie bereits beschrieben) wurden die Überstände in einem Reaktionsgefäß vereinigt und eine Kontrollprobe entnommen. Die *Beads* wurden mit 1-2 SV Puffer A im Kühlraum auf eine Poly-Prep-Chromatographiesäule gegeben. Dort wurde der Säulinhalt in einem ersten Waschschrift mit 5 SV an Puffer A mit 500 mM NaCl und in einem zweiten Waschschrift mit 20 SV an Puffer A mit 300 mM NaCl gewaschen. Abschließend wurde Protein mit 3 SV Elutionspuffer einer Imidazol-Molarität von 100 mM eluiert und das Eluat auf 15 Fraktionen von je ca. 100 µl aufgeteilt. Dies wurde mit 150 mM Imidazol im Elutionspuffer wiederholt.

<u>Puffer A:</u>	50 mM	TRIS-HCl, pH 8,0
	300 bzw. 500 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
	1 mM	2-Mercaptoethanol
	0,1 % (~ 6 CMC)	Triton X-100
	1x	cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail
<u>Elutionspuffer:</u>	Puffer A mit 300 mM NaCl und zusätzlich 100 bzw. 150 mM Imidazol	

### **2.2.3.4.3. Baculovirus-vermitteltes Insektenzellsystem**

#### **Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (Strep-AC)**

Bei der Strep-AC bindet Peptid Strep-tag II (WSHPQFEK) hochspezifisch an Strep-Tactin als modifiziertes Streptavidin. Die abschließende Elution erfolgt mit dem Biotin-Derivat D-Desthiobiotin (Schmidt und Skerra, 2007). Die Nutzung von Strep-tag II als Protein-*tag* und Strep-Tactin-Sepharose zur Bindung ermöglicht somit eine effiziente Proteinreinigung. Das Strep-tag II-System wurde überwiegend nach Angaben des Herstellers verwendet und durch Dr. Claudia Stroß und Dr. Rebecca M. Richter in der AG Welsch etabliert.

Gewonnene Membranfraktionen (s. 2.2.3.3.) aus Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen wurden aufgetaut. Durch Zugabe von 0,5 % DDM wurden Proteine für 1,5 h unter Rotation solubilisiert. Das Solubilisat wurde bei 145.000 g für 45 min ultrazentrifugiert. Währenddessen wurden 500 µl Strep-Tactin Sepharose mit 1 ml Äquilibriumspuffer im Kühlraum auf eine Poly-Prep-Chromatographiesäule geladen und mit insgesamt 4 SV äquilibriert. Die so vorbereitete Agarosematrix wurde bei einer Geschwindigkeit von etwa einem Tropfen pro fünf Sekunden vom Überstand des zentrifugierten Solubilisats durchflossen.

Der Säuleninhalt wurde mit 10 SV Waschpuffer gereinigt. Der Waschschritt wurde ohne Limitierung der Durchflussgeschwindigkeit durch die Schlauchklemme durchgeführt. Protein wurde abschließend mit 5 SV Elutionspuffer bei bereits beschriebener Durchflussgeschwindigkeit eluiert. Das Eluat wurde auf zehn Fraktionen von je etwa 250 µl aufgeteilt.

<u>DDM-Stammlösung:</u>	10 %	DDM
<u>Äquilibrierungspuffer:</u>	100 mM	TRIS-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1 mM	DTT
	5 %	Glycerol
<u>Waschpuffer:</u>	100 mM	TRIS-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1 mM	DTT
	5 %	Glycerol
	0,05 %	DDM

Elutionspuffer: Waschpuffer mit zusätzlich 5 mM D-Desthiobiotin

### 2.2.3.5. Protein-Dialyse

Nach der Proteinreinigung von NS5A, hergestellt mit Konstrukt pTM023-NS5A H54Q, sollte der GST-*tag* entfernt werden. Dafür wurde Thrombin-Protease verwendet (s. 2.2.3.6.), deren Aktivität durch im Elutionspuffer enthaltenes Imidazol beeinträchtigt ist.

Um dieses zu entfernen, wurde mit Hilfe eines Dialyseschlauchs das Proteineluat dialysiert. Die Membran wurde zum Aufquellen für 15 min in H<sub>2</sub>O inkubiert. Danach wurde der Schlauch an einem Ende zugeknotet, mit der Proteinlösung luftblasenfrei gefüllt, am anderen Ende zugeknotet und mit einer Klammer gesichert. Der verschlossene Schlauch wurde anschließend an einem Schwimmer befestigt und bei 4 °C unter Rühren in 1,5 L Dialysepuffer A über Nacht inkubiert. Während der Inkubation wurde der Puffer nach zwei Stunden und weiteren vier Stunden erneuert. Das dialysierte Proteineluat wurde dem Schlauch entnommen und für die Thrombin-Proteolyse des GST-*tags* verwendet.

Für die Dialyse im Rahmen des Rekonstitutionsversuchs von NS5A (s. 2.2.3.8.9.) wurden Slide-A-Lyzer-Dialysekassetten verwendet, um Detergens OG zu entfernen. Die Kassetten wurden nach Angaben des Herstellers Thermo Fisher Scientific genutzt. Die Dialyse erfolgte unter Rühren für 1 h bei 4 °C in 2 L Dialysepuffer B. Nach Überführen in weitere 5 L des Puffers, wurde die Dialyse über Nacht fortgesetzt.

<u>Dialyse-Puffer A:</u>	20 mM	TRIS-HCl, pH 8,0
	50 mM	NaCl
<u>Dialyse-Puffer B:</u>	25 mM	HEPES-KOH, pH 7,4
	135 mM	KCl
	1 mM	DTT

Im Verlauf der Dissertation wurde das DTT durch 3 mM 2-Mercaptoethanol ersetzt.

### 2.2.3.6. Abspaltung des GST-tags mittels Thrombin-Protease

Thrombin-Protease ist in der Lage die Aminosäuresequenz LVPRGS zu erkennen und die Peptidbindung zwischen Arginin und Glycin zu spalten (Waugh, 2011). Diese Eigenschaft wurde verwendet, um bei NS5A, hergestellt mit Konstrukt pTM023-NS5A H54Q, nach der Reinigung den GST-tag (~ 25 kD) zu entfernen.

Thrombin-Protease wurde in DPBS bei einer Enzym-Konzentration von 1 U/μl resuspendiert und nach Schockfrost in IN<sub>2</sub> bei -80 °C gelagert. Nach der Dialyse des NS5A-Eluats (s. 2.2.3.5.) wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (s. 2.2.3.8.1.) und das Eluat mit 20 U/mg Thrombin auf dem Rollmischer bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

### 2.2.3.7. Herstellung von Lipidkuchen

Zur Herstellung von Lipidkuchen für die NS5A-Rekonstitution in Liposomen (s. 2.2.3.8.9.) wurden zunächst Stammlösungen benötigter Lipide hergestellt (s. Tab. 20).

Dabei wurden mit Chloroform gereinigte 1,5 ml-Glas-Gewindefläschchen mit PTFE-Deckelsepten und Hamilton-Spritzen verwendet. Die lyophilisierten Lipide wurden auf Raumtemperatur vorgewärmt und kurz zentrifugiert. Danach wurden sie im, vom Hersteller empfohlenen, Lösungsmittel bei gewünschter Konzentration gelöst und vorsichtig mit Stickstoff als Schutzatmosphäre versehen. Zum Abschluss wurden die Fläschchen mit Parafilm abgedichtet und bei -20 °C gelagert. Bei Ansetzen der Stammlösung des fluoreszierenden ATTO-DOPEs wurde Licht vermieden und dessen Glasgefäß zusätzlich durch Aluminiumfolie vor Licht geschützt.

**Tabelle 20: Eigenschaften von Lipidkomponenten bei der Herstellung von Lipidkuchen.**

Lipid	M [g/mol]	Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel
POPC	760,08	40	CHCl <sub>3</sub>
POPE	717,996	25	CHCl <sub>3</sub>
ATTO-DOPE	1420	1	CHCl <sub>3</sub> : Methanol : 8 : 2

Cholesterol	386,65	20	CHCl <sub>3</sub>
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	1096,385	1	CHCl <sub>3</sub> : Methanol : H <sub>2</sub> O: 20 : 9 : 1
PtdIns(4)P	974,764	1	CHCl <sub>3</sub> : Methanol : H <sub>2</sub> O: 20 : 9 : 1

Für die Herstellung der verschiedenen Lipidkuchen wurde zunächst über die molaren Massen und die Konzentrationen der Stammlösungen (s. Tab. 20) das Volumen der verschiedenen Lipidkomponenten für die entsprechenden Molarverhältnisse (s. Tab. 21) berechnet. Diese sollten am Ende 1,5 µmol an Gesamtlipid aufweisen.

**Tabelle 21: Molarverhältnisse der Lipidkomponenten hergestellter Lipidkuchen in mol %.**

Lipidkuchen	POPC	POPE	ATTO-DOPE	Cholesterol	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	PtdIns(4)P
Negativkontrolle	55	44,5	0,5	-	-	-
+ Cholesterol	45	34,5	0,5	20	-	-
+ PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	53	44,5	0,5	-	2	-
+ PtdIns(4)P	53	44,5	0,5	-	-	2

In der Regel wurden Ansätze von 6 µmol hergestellt und dann gleichmäßig auf vier, mit Aluminiumfolie umhüllte, 3,7 ml-Glas-Gewindefläschchen verteilt. Die verschiedenen Lipide wurden unter dem chemischen Abzug mit Hamilton-Spritzen gemischt. Das fluoreszierende ATTO-DOPE wurde unter Vermeidung von Licht je als letzte Komponente zugegeben. Die Hamilton-Spritzen wurden zwischen den Zugaben der verschiedenen Lipide mit Chloroform gespült. Die Lipid-Gemische wurden mit schwachem Stickstoff-Gasstrom vorsichtig verdampft, sodass sich Lipidkuchen am Boden der Glasgefäße bilden konnten. Nach vollständiger Evaporation im Vakuum-Konzentrator für 3 h bei Raumtemperatur und einem Unterdruck von ~ -1 bar, wurden die Lipidkuchen mit Stickstoff-Schutzatmosphäre versehen, die Glasfläschchen mit Parafilm abgedichtet und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.8. Proteinanalyse

#### 2.2.3.8.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zunächst wurde die Methode von Bradford (1976) verwendet, um die Konzentration gelöster Proteine photometrisch zu bestimmen. Zu 798 µl Coomassie-Plus-The Better Bradford Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) wurden 2 µl Proteinlösung im Duplikat zugegeben und

1-2 min auf Eis inkubiert. Bei erwarteter niedriger Proteinkonzentration wurden 780 µl Bradford-Reagenz mit 20 µl Proteinlösung gemischt. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm. Das verwendete Photometer war durch eine BSA-Verdünnungsreihe kalibriert worden, sodass einer Absorption von 0,055 eine Proteinmasse von 1 µg zugeordnet werden konnte.

Da allerdings überwiegend Eluatkonzentrationen nach der Proteinreinigung bestimmt wurden, wurde die zuvor beschriebene Methode durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Coomassie-Blue-Färbung des Gels, gefolgt von Densitometrie ersetzt (s. 2.2.3.8.4.). Dabei konnte durch Vergleich mit ebenfalls aufgetragener BSA-Verdünnungsreihe mittels Densitometrie die Konzentration gereinigten Proteins unabhängig von möglichen Verunreinigungen genauer bestimmt werden.

Die Methode von Bradford wurde dennoch weiterhin verwendet, um nach der Proteinreinigung einen ersten qualitativen Eindruck über die Verteilung von Protein innerhalb der Eluatfraktionen zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurden je 150 µl Bradford-Reagenz mit 47 µl H<sub>2</sub>O und 3 µl der verschiedenen Eluatfraktionen in *Wells* einer 96-*Well*-Zellkulturplatte gegeben und die unterschiedliche Blaufärbung qualitativ visuell beurteilt.

### **2.2.3.8.2. Präparation von Proteinproben**

In der Regel wurden 10 µl-Proteinlösungen mit 2,5 µl Laemmli-Ladepuffer (5x) gemischt. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und kurzer Zentrifugation wurden sie entweder bei -20 °C gelagert oder bei einer SDS-PAGE (s. 2.2.3.8.3.) sofort aufgetragen.

<u>Laemmli-Ladepuffer (5x):</u>	312,5 mM	TRIS-HCl, pH 6,8
	10 %	SDS
	50 %	Glycerol
	0,05 %	Bromophenol Blau

Aliquots wurden bei 4 °C gelagert und vor Nutzung 10 % 2-Mercaptoethanol zugegeben.

### **2.2.3.8.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Für die SDS-PAGE nach (Laemmli, 1970) wurden passend zur Größe der zu untersuchenden Proteine 10 %-ige Trenngele und 5 %-ige Sammelgele entsprechend zum Ansatzschema von Tabelle 22 hergestellt.

**Tabelle 22: Ansatzschema für zwei Polyacrylamidgele (10 % Trenngel, 5 % Sammelgel).**

	<b>Trenngel (10 %)</b>	<b>Sammelgel (5 %)</b>
H <sub>2</sub> O [ml]	4,0	3,3
Trenngel-Puffer [ml]	2,5	x
Sammelgel-Puffer [ml]	x	1,3
50 % Glycerin [ml]	0,2	x
Acrylamid/Bisacrylamid [ml]	3,4	0,5
APS [ $\mu$ l]	40	20
TEMED [ $\mu$ l]	20	20

Gekochte und denaturierte Proteinproben wurden in die Geltaschen aufgetragen. Als Größenstandard wurden 3  $\mu$ l Precision Plus Kaleidoscope Prestained Protein Standard oder PageRuler Prestained Protein Ladder eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 150 V für 70 min durchgeführt.

Laufpuffer:            250 mM        TRIS  
                              1,92 M        Glycin  
                              1 % (w/v)    SDS

Bei der Herstellung des Laufpuffers war keine Einstellung des pH-Wertes notwendig.

Trenngel-Puffer:    1,5 M            TRIS-HCl, pH 8,8  
                              0,4 % (w/v)    SDS

Sammelgel-Puffer: 500 mM        TRIS-HCl, pH 6,8  
                              0,4 % (w/v)    SDS

#### **2.2.3.8.4. Coomassie-Blue-Färbung**

Anfangs wurden Polyacrylamid-Gele für die Visualisierung aufgetrennter Proteine mit selbst hergestellter Coomassie-Färbelösung für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Kipp-Schüttler inkubiert. Danach wurden die Gele mit Entfärbelösung über Nacht auf dem Schüttler entfärbt.

Im Verlauf der Dissertation wurde statt selbst hergestellter Färbelösung EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Gelfärbung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Durch Coomassie-Blue-gefärbte Gele konnte auch die Proteinkonzentration von Eluat einer Proteinreinigung bestimmt werden. Neben den Eluatproben wurden ebenfalls Proben bekannter Menge (125 ng - 1 µg) an BSA aufgetragen und Bandenintensitäten densitometrisch mit dem Programm ImageJ ermittelt. Über eine BSA-Standardkurve konnte so den jeweiligen Bandenintensitäten der Eluatproben eine Konzentration zugeordnet werden.

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	0,25 % (m/v)	Brilliant Blau G250
	50 %	Methanol
	10 %	Essigsäure
<u>Entfärbelösung:</u>	40 %	Methanol
	10 %	Essigsäure

### 2.2.3.8.5. Western Blot

Nach Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE (s. 2.2.3.8.3.), wurden diese aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dieser Transfer erfolgte nach der *semi-dry*-Variante des WB unter Verwendung eines Trans-Blot Turbo Transfer Systems. Der Proteintransfer erfolgte bei 300 mA und 25 V für 55 min.

Nach dem *Blotting* der Proteine auf die Nitrozellulose, wurde eine erfolgreiche Übertragung auf die Trägermembran durch 2-minütige Inkubation in Ponceau-S-Lösung überprüft.

<u>Transfer-Puffer:</u>	48 mM	TRIS
	39 mM	Glycin
	0,0375 %	SDS
	20 %	Methanol
<u>Tris buffered saline (TBS) (10x):</u>	200 mM	TRIS-HCl, pH 7,4
	1,5 M	NaCl

Bei Herstellung des Transfer-Puffers (Bjerrum, Schaefer-Nielsen) war keine Einstellung des pH-Wertes erforderlich.

<u>TBS-T (1x):</u>	10 %	TBS (10x)
	0,05 %	Tween 20

Bei Gebrauch von Penta-His-antibody wurden, wie vom Hersteller empfohlen, 0,1 % Tween 20 zugegeben.

### 2.2.3.8.6. Chemilumineszenz-Immundetektion

Nach Proteintransfer auf die Nitrozellulose, wurde die Membran abhängig vom verwendeten Primärantikörper (s. Tab. 23) in geeigneter Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Kipp-Schüttler inkubiert. Danach wurde die Nitrozellulose für 1 h bei Raumtemperatur

oder über Nacht bei 4 °C auf dem Kipp-Schüttler mit passender Verdünnung des Primärantikörpers in Blockierlösung (s. Tab. 23) inkubiert. Im Fall von Penta-His-antibody wurde die Nitrozellulose zuvor 2x 10 min in TBS 1x gewaschen. Bei Gebrauch von StrepMAB-Classic wurde die Membran nach Blockierung 3x 5 min mit DPBS-T (0,05 %) gewaschen. Der Primärantikörper wurde nicht in der zugehörigen Blockierlösung 3 % BSA-DPBS-T (0,05 %) verdünnt, sondern in DPBS-T (0,05 %).

Es folgten drei Waschschriffe, um ungebundene Antikörper zu entfernen. In der Regel wurde 2x 10 min mit TBS-T 1x und einmal 10 min mit TBS 1x auf dem Kipp-Schüttler gewaschen. Nur bei StrepMAB-Classic wurden DPBS-T (0,05 %) und DPBS als Waschlösungen verwendet. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper Goat Anti Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate 1:5000 in jeweils verwendeter Blockierlösung verdünnt und auf die Nitrozellulose gegeben. Nach Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Kipp-Schüttler wurden drei weitere Waschschriffe, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Bei Nutzung von Penta-His-antibody wurde nach Herstellerangaben 4x mit TBS-T 1x gewaschen.

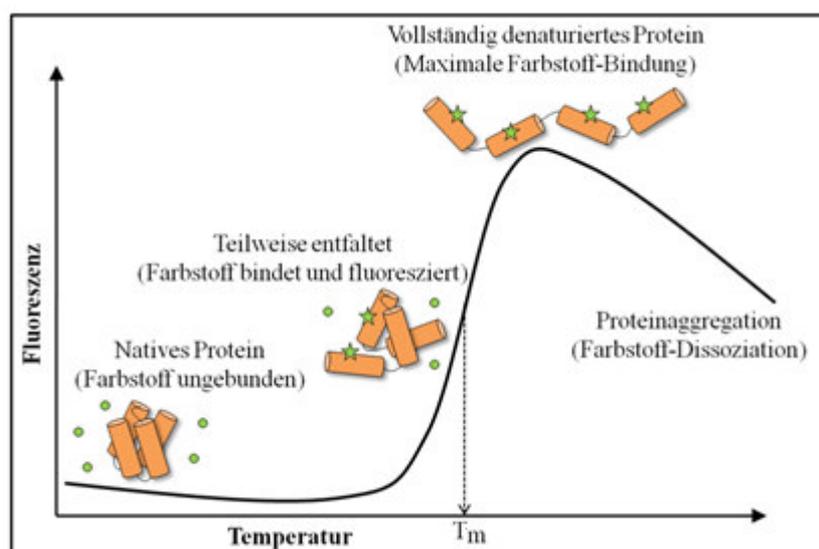
Abschließend wurden 800 µl Luminata TM Forte Western HRP Substrate (Millipore) auf die Nitrozellulose-Membran gegeben und ca. 30 s inkubiert. Durch am Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase wurde das in der Entwicklungslösung enthaltene Luminol unter Lichtfreisetzung umgesetzt. Diese Lichtemission wurde mit Hilfe des Image Reader LAS 4000 detektiert und abgebildet. Bilddateien wurden durch das Programm MultiGauge in TIF-Format konvertiert und mit Adobe Photoshop und MS Powerpoint bearbeitet.

**Tabelle 23: Verdünnung von Antikörpern und verwendete Blockierlösungen.**

Antikörper	Blockierlösung	Verdünnung
Anti Hepatitis C NS5A mono-clonal antibody	5 % Milchpulver-TBS	1:1000 in 5 % Milchpulver-TBS
mAb 11H	5 % Milchpulver-TBS	1:4000 in 5 % Milchpulver-TBS
Monoclonal Anti-β-Actin antibody	5 % Milchpulver-TBS	1:5000 in 5 % Milchpulver-TBS
Monoclonal ANTI-FLAG M2 antibody	5 % Milchpulver-TBS	7,5 µg/ml in 5 % Milchpulver-TBS
Penta-His-antibody, BSA free	3 % BSA-TBS	1:5000 in 3 % BSA-TBS
StrepMAB-Classic	3 % BSA-DPBS-T (0,05 %)	50 ng/ml in DPBS (0,05 %)

### 2.2.3.8.7. *Thermal shift assay (TSA)*

Mit Hilfe des TSA (s. Abb. 21), auch bekannt als *differential scanning fluorimetry* oder *ThermoFluor assay*, ist es möglich den Grad der Denaturierung eines Proteins in Abhängigkeit von der Temperatur zu quantifizieren und dabei Schmelztemperatur  $T_m$  als Maß für die thermische Stabilität zu ermitteln (Huynh und Partch, 2015).



**Abbildung 21: Grundprinzip des *Thermal shift assays*.** Bearbeitet nach Angaben des Herstellers Biotium (<https://biotium.com/product/glomelt-thermal-shift-protein-stability-kit/>, 5.3.20).

Zunächst liegt das zu untersuchende Protein vollständig gefaltet vor. Erst mit schrittweise steigender Temperatur unter Verwendung eines *real-time*-PCR-Geräts beginnt sich das Protein zu entfalten. Nun ist ein Farbstoff, in der vorliegenden Arbeit GloMelt der Firma Biotium, in der Lage an die hydrophoben Regionen des Proteins zu binden. Auf diese Weise nimmt die Bindung des Farbstoffs an das denaturierende Protein zu und erreicht mit maximaler Denaturierung höchstmögliche Bindung und Fluoreszenz. Mit weiter ansteigender Temperatur kommt es schließlich zur Proteinaggregation und damit verbunden einer Dissoziation des Farbstoffs vom Protein und einer Abnahme des Fluoreszenzsignals.

Der TSA erfolgte mit GloMelt Thermal Shift Protein Stability Kit nach angepassten Angaben des Herstellers. Die Reaktion wurde mit 0,25 µg zu untersuchendem Protein pro Mikroliter Reaktionsansatz durchgeführt. Im Fall der mitgelieferten IgG-Positivkontrolle wurden 0,5 µg/µl genutzt. Es wurde 0,5x GloMelt-Farbstoff eingesetzt und als Reaktionspuffer der Elutionspuffer des zu untersuchenden Proteins verwendet.

Zwecks Untersuchung des Einflusses weiterer Reagenzien wie z.B. EDTA, wurden diese in passender Stammlösung angesetzt, sodass durch Zugabe von 1 µl in der Reaktion die gewünschte Molarität erzielt werden konnte. Das Reagenz wurde nach Zugabe von GloMelt hinzu pipettiert und nach Möglichkeit erst durch Zugabe des Reaktionspuffers mit diesem vermischt. Die 20 µl-Reaktionsansätze wurden je Messung als Triplikate in die *Wells* einer 96-*Well*-PCR-Detektionsplatte pipettiert und dann mit Dichtungshaftfolie versiegelt.

Zur schrittweisen Erhöhung der Temperatur und zur Fluoreszenzmessung wurde ein StepOne Plus RT PCR-System genutzt. Es wurde die Schmelzkurven-Option verwendet und ein Reaktionsvolumen von 20 µl, ein Temperaturmessbereich von 25-61 °C, ein Temperaturanstieg von 0,1 °C/Schritt sowie eine Schrittdauer von 30 s eingestellt. Bei Messungen der IgG-Positivkontrolle wurde der Temperaturbereich bis auf 75 °C erhöht.

Wegen ähnlichen Absorptions- und Emissionswerten von GloMelt (Abs/Em: 468/507 nm) im Vergleich zu SYBR Green, konnte dieser ersatzweise als Farbstoff eingestellt werden. Auf den Referenzfarbstoff ROX wurde verzichtet.

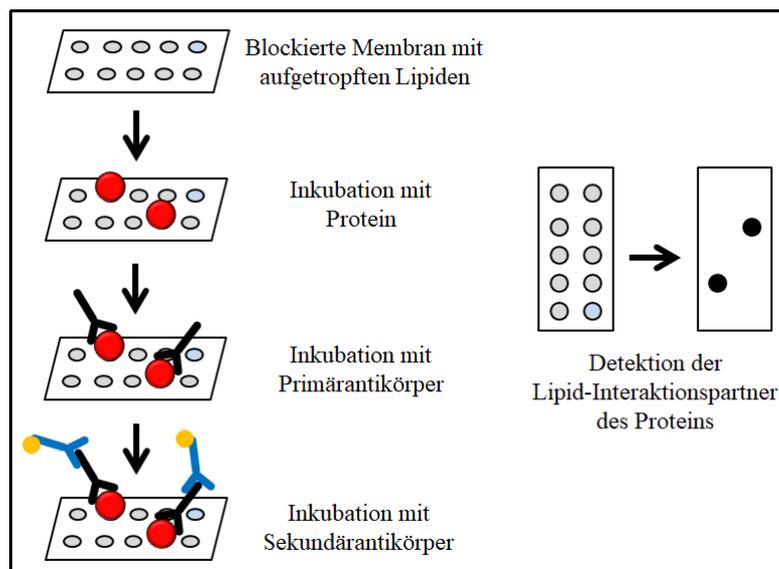
Die gewonnenen Messdaten wurden mit Hilfe von MS Excel bearbeitet und als Kurven dargestellt. Darüber hinaus wurden mit diesem Programm Minimum und Maximum im sigmoidalen Kurvenverlauf bestimmt. Die Daten in diesem Messungsbereich wurden durch Differenzbildung mit dem Minimum-Wert und Quotientenbildung mit der Differenz aus Maximum- und Minimum-Wert normalisiert. Anhand dieser normalisierten Messdaten wurde

schließlich mittels Boltzmann-Gleichung  $Y = Min + \frac{(Max-Min)}{1+\exp\left(\frac{T_m-X}{Steigung}\right)}$  des Programms Graphpad-PRISM die Schmelztemperatur  $T_m$  des Proteins berechnet.

### 2.2.3.8.8. Protein lipid overlay assay (PLOA)

Durch den PLOA nach Dowler et al. (2002) ist es möglich, Lipid-Liganden von lipidbindenden Proteinen zu identifizieren und auch eine qualitative Aussage über deren relative Bindungsaffinität zu treffen.

Das Grundprinzip des PLOAs ähnelt einer üblichen Chemilumineszenz-Immudetektion (s. Abb. 22, vgl. 2.2.3.8.6). Statt SDS-PAGE und WB geht der Detektion jedoch eine direkte Inkubation der mit diversen Lipiden betropften Nitrozellulose mit einer Lösung des zu untersuchenden Proteins voraus. Abschließend ist es möglich Lipidbindungspartner des Proteins über Abgleich mit dem Lipid-Tropfschema zu ermitteln und deren relative Affinität über die Signalstärke abzuschätzen.



**Abbildung 22: Grundprinzip des Protein lipid overlay assays.**

Für den PLOA in der vorliegenden Dissertation wurden Membrane Lipid Strips und Membrane PIP Strips der Firma Echelon Biosciences verwendet. Die Strips wurden nach angepassten Angaben des Herstellers genutzt.

Vor dem Blockieren wurde in ersten Versuchen als Positivkontrolle 1 µl unverdünnte Proteinlösung aufgetragen, was in Folgeversuchen durch 1 µl 1:100 in Elutionspuffer verdünnter NS5A-Proteinlösung ersetzt wurde. Blockierung erfolgte mit 10 ml 3 % BSA-DPBS-T (0,1 %). Dabei wurde fettsäurefreies BSA verwendet. Es wurden 0,25 - 0,5 µg NS5A-Protein

pro Milliliter Inkubationslösung eingesetzt. Das Waschvolumen wurde auf je 10 ml erhöht und es wurde für 10 min gewaschen. Als Primärantikörper wurden in der Regel 100 ng StrepMAB-Classic pro Milliliter DPBS und als Sekundärantikörper Goat Anti Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate 1:5000 verdünnt in 3 % BSA-DPBS-T (0,1 %) verwendet. Lichtemission der Meerrettich-Peroxidase des Sekundärantikörpers wurde nach Zugabe von 160 µl Luminata TM Forte Western HRP Substrate (Millipore) je *Strip* mit Image Reader LAS 4000 detektiert und abgebildet. Die Bilddateien wurden, wie unter 2.2.3.8.6. beschrieben, bearbeitet.

Zwecks Untersuchung von Lipidbindungspartnern der AH von NS5A wurde ein Peptid (a.a. 1-30) mit N-terminalem 6x-His-*tag* mit Membrane PIP Strips inkubiert. Die Durchführung erfolgte analog zum beschriebenen PLOA. Es wurden 0,5 µg NS5A-AH pro Milliliter Inkubationslösung eingesetzt und ein Primärantikörper gegen das His-*tag* 1:5000 verdünnt in 3 % BSA-DPBS-T (0,1 %) verwendet.

Im Rahmen eines Kompetitionsversuchs wurde die Lipidbindung von NS5A-AH weiter untersucht. Dafür wurde Sf9 NS5A fl mit und ohne 10x molaren Überschuss an NS5A-AH im wie bisher beschriebenen PLOA mit Membrane PIP Strips inkubiert. Nach der Detektion mit StrepMAB-Classic als Primärantikörper wurden die Lipidbindungsmuster miteinander verglichen.

Im Fall der Untersuchung des Einflusses des NS5A-Inhibitors DCV auf die Lipidbindung wurde ein weiterer Inkubationsschritt hinzugefügt. Während des Blockierens der *Strips* und vor deren Inkubation mit der Proteinlösung, wurde NS5A-Proteinlösung mit 10 µM DCV inkubiert. Zu diesem Zweck wurde 10 mM DCV-Stammlösung in ein 15 ml-Reaktionsgefäß vorgegeben, mit der Proteinlösung 1:1000 verdünnt und bei Raumtemperatur auf einem Rotator 1 h inkubiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden in diesem Fall auch NS5A-Proteinlösungen ohne DCV-Zugabe vor Inkubation mit den *Strips* auf gleiche Weise inkubiert.

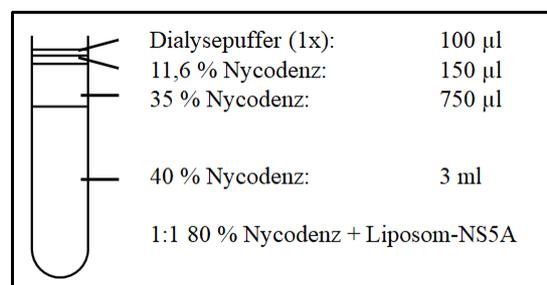
#### **2.2.3.8.9. NS5A-Rekonstitution in Liposomen**

Die Rekonstitution von NS5A wurde basierend auf Malsam et al., (2012) und Weber et al. (1998) in Liposomen verschiedener Zusammensetzung (s. 2.2.3.7.) durchgeführt und angepasst. Während des Rekonstitutionsversuchs wurden zur Kontrolle des relativen Lipidgehalts über die Fluoreszenz von ATTO-DOPE (s. 2.2.3.7.) 1 %-Proben vom Lipid-NS5A-

Gemisch vor und nach der Dialyse sowie von der Liposom-Schicht nach der Ultrazentrifugation entnommen.

Vorbereitete Lipidkuchen verschiedener Zusammensetzung (s. 2.2.3.7.) wurden auf Eis aufgetaut. Zunächst wurde jeweils so viel Liposompuffer (+ 1 % OG) zugegeben, dass bei nachfolgender Zugabe von NS5A-Lösung entsprechend 20-25 µg Protein ein Gesamtvolumen von 500 µl erreicht wurde. Dabei wurden die Lipidkuchen auf niedrigster Geschwindigkeitsstufe durchmischt und vom Gefäßboden gelöst. Danach wurden sie in einer Box unter vorsichtigem Schütteln für 15 min bei Raumtemperatur solubilisiert. Spätestens mit der folgenden Zugabe an NS5A-Lösung und darin enthaltenem OG lag genug Detergens vor, um die Lipidkuchen angemessen zu solubilisieren.

Danach wurden die Lipid-NS5A-Mischungen unter leichtem Durchmischen mit Liposompuffer auf 1,5 ml aufgefüllt. Durch die daraus resultierende schnelle Verdünnung des Detergens OG bildeten sich Liposomen aus, in denen NS5A rekonstituiert vorlag. Im Anschluss wurden die Liposomlösungen, wie unter 2.2.3.5. beschrieben, über Nacht dialysiert. Nach der Dialyse wurden die Liposom-NS5A-Lösungen in 5 ml-Reaktionsgefäße auf Eis überführt und die Volumina bestimmt. Anschließend wurden Nycodenzgradienten in Ultrazentrifugen-Röhrchen geschichtet (s. Abb. 23).



**Abbildung 23: Schema Nycodenzgradient.**

Zunächst wurden zu den dialysierten Liposom-NS5A-Lösungen gleiche Volumina an 80 %-Nycodenz-Lösung gegeben. Von diesen 40 %-Nycodenz-Mischungen wurden je 3 ml in die auf Eis vorgekühlten Röhrchen gegeben. Nacheinander wurden darauf vorsichtig 750 µl 35 %-Nycodenz-Lösung, 150 µl 11,6 %-Nycodenz-Lösung und 100 µl Dialysepuffer (1x) pipettiert. Die Proben wurden für 3 h 40 min bei 55.000 rpm und 4 °C mit abschließender Bremsung, bei der ein aktives Abbremsen erst ab 500 rpm erfolgte, ultrazentrifugiert. Anhand der Rotfärbung durch ATTO-DOPE waren die Liposom-Schichten sichtbar und konnten vorsichtig zwischen den Schichten der 11,6 %-Nycodenz-Lösung und des Dialysepuffers (1x) entnommen werden.

Es wurden Proben entsprechend 150 ng NS5A mit Dialysepuffer (1x) auf 9  $\mu$ l aufgefüllt, mit 6  $\mu$ l Laemmli-Ladepuffer (5x) bei 95 °C für 5 min aufgeköcht und somit für eine Analyse mit SDS-PAGE, WB und Chemilumineszenz-Immundetektion vorbereitet. Bei der Berechnung der Volumina entsprechend 150 ng an Protein wurde von einer 100 %-igen Rekonstitution ausgegangen und unterschiedliche Volumina der verschiedenen Ansätze nach der Dialyse mitberücksichtigt. Als Referenzprobe wurden 150 ng nicht rekonstituiertes NS5A in gleicher Weise vorbereitet. Die höhere Konzentrierung des Laemmli-Ladepuffers (final 2x) erleichterte die Vorbereitung der Liposomen-haltigen Proben. SDS-PAGE, WB und Chemilumineszenz-Immundetektion wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt (s. 2.2.3.8.).

Während des Experiments entnommene 1 %-Proben wurden mit gleicher Volumenmenge an 10 % DDM-Lösung gemischt. Nach Inkubation für 5 min bei 37 °C wurden sie auf 100  $\mu$ l mit Dialysepuffer (1x) aufgefüllt. Die Fluoreszenzmessung wurde von Dr. Anna Bulankina aus der AG Welsch in der AG von Prof. Dr. Söllner am Biochemiezentrum der Universität Heidelberg unter Verwendung eines Multi-Mode Microplate Reader Synergy 4 von BioTek durchgeführt. Die gewonnenen Messdaten wurden mit MS Excel ausgewertet und darüber ausgerechnet, wieviel Lipid in Prozent und  $\mu$ mol je am Ende des Rekonstitutionsversuchs vorhanden war.

Um die Konzentrationen von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 in den finalen Liposomproben nach der Nycodenz-Dichtegradienten-Zentrifugation zu bestimmen, wurden je 20  $\mu$ l der Proben mit 5  $\mu$ l Laemmli-Ladepuffer (5x) bei 95 °C für 5 min aufgeköcht und zusammen mit Proben bekannter Menge an BSA (125 ng - 1  $\mu$ g) mittels SDS-PAGE (s. 2.2.3.8.3.) aufgetrennt. Die Polyacrylamid-Gele wurden anschließend mit Coomassie-Blue gefärbt und die Proteinkonzentrationen densitometrisch mit Hilfe des Programms ImageJ bestimmt (s. 2.2.3.8.4.).

Mit den bestimmten Proteinkonzentrationen und durch Messung der Volumina der gewonnenen Liposomschichten aus dem Nycodenzgradienten war es daraufhin möglich, die jeweilige Gesamtmasse an rekonstituiertem NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 zu berechnen. Die jeweiligen Proteinmassen wurden nach der Bestimmung der molekularen Massen von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 mit dem Programm ExPASy Compute pI/Mw in ihre entsprechenden Stoffmengen umgerechnet. Abschließend wurden die Mengen an rekonstituiertem NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 in Prozent sowie die Molarverhältnisse von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 zu Lipiden berechnet.

<u>Liposompuffer:</u>	100 mM	TRIS-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	10 %	Glycerol
	3 mM	2-Mercaptoethanol

Liposompuffer (+ 1 % OG): Liposompuffer + 1 % OG

<u>Dialysepuffer (5x):</u>	125 mM	HEPES
	675 mM	KCl

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,6 eingestellt und liegt nach 1:5-Verdünnung bei 7,4.

Der Dialysepuffer (5x) wurde als Stammlösung bei 4 °C gelagert.

<u>Dialysepuffer (1x):</u>	25 mM	HEPES-KOH, pH 7,4
	135 mM	KCl
	1 mM	DTT

Im Verlauf der Dissertation wurde das DTT durch 3 mM 2-Mercaptoethanol ersetzt.

<u>80 %-Nycodenz-Lösung:</u>	20 %	Dialysepuffer(5x)
	80 % (m/v)	Nycodenz
	1 mM	DTT

Nycodenz wurde unter Rotation bei Raumtemperatur in der Regel über Nacht oder für mindestens 3-4 h gelöst. Danach wurde die Lösung mit Spritze und Filter (0,2 µm Porengröße) filtriert und 1 mM DTT zugegeben. Wie bei Dialysepuffer (1x) wurde DTT in späteren Experimenten durch 3 mM 2-Mercaptoethanol ersetzt.

35 %-Nycodenz-Lösung: Verdünnung von 80 %-Nycodenz-Lösung  
4,375:10 mit Dialysepuffer (1x)

11,6 %-Nycodenz-Lösung: Verdünnung von 35 %-Nycodenz-Lösung  
1:3 mit Dialysepuffer (1x)

### **2.2.3.8.10. *In silico*-Strukturanalyse von NS5A**

Ein dynamisches NS5A-Strukturmodell (Nettles et al., 2014) von James H. Nettles (Emory University School of Medicine, USA) wurde mit Hilfe des Programms Chimera 1.14 dargestellt. Bei dem Modell handelt es sich um ein Homodimer, dem die NS5A-D1-Strukturen von Tellinghuisen et al. (2005), PDB-ID: 1ZH1, und von Love et al. (2009), PDB-ID: 3FQM, sowie die Struktur von NS5A-AH von Penin et al. (2004b), PDB-ID: 1R7G, zu Grunde liegen. Das Strukturmodell wurde auf *Cluster* positiv geladener Aminosäuren (Histidin, Lysin und Arginin) hin untersucht, welche für eine Interaktion mit negativ geladenen PPI prädestiniert sind. Ausgehend von diesen ausgewählten Aminosäurepositionen

wurde eine Mutationsstrategie entwickelt, um ihre Rolle als PPI-Bindestellen in NS5A zu überprüfen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Expression von NS5A in verschiedenen Systemen und dessen Reinigung

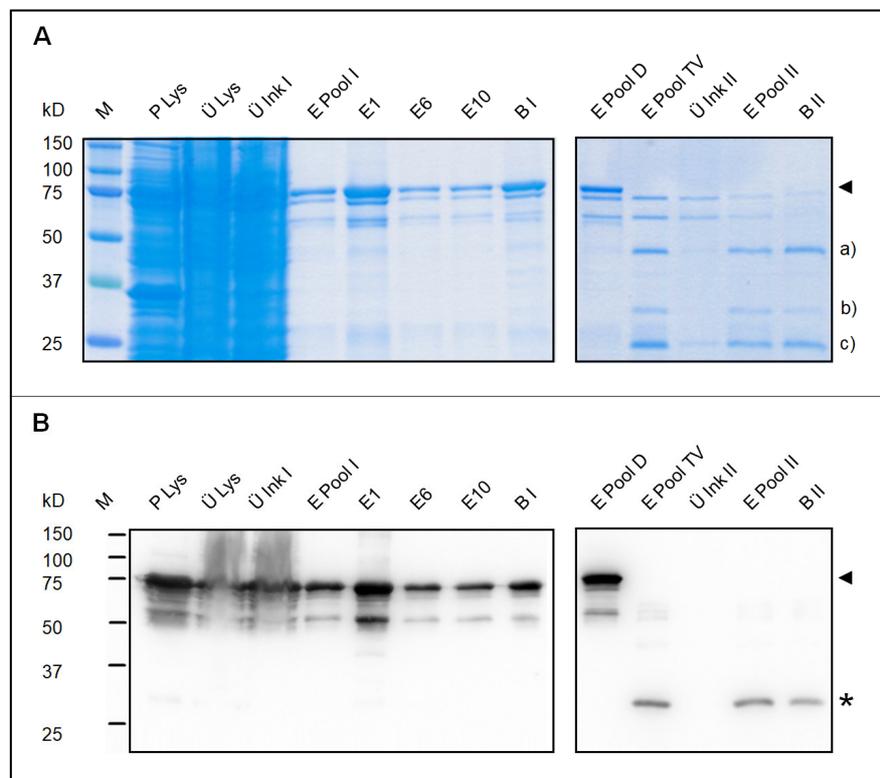
Das Vorliegen rekombinant exprimierten, gereinigten NS5A-Proteins ist Voraussetzung für die im Folgenden dargestellten Untersuchungen zur Interaktion mit Membranlipiden und zum Einfluss von Inhibitoren auf die Proteinkonformation und Membraninteraktion. Die Herstellung einer adäquaten Menge an ausreichend reinem NS5A war aus mehreren Gründen herausfordernd (s. 4.1.). Trotz dieser Herausforderungen wurde versucht, ausreichend große Mengen an NS5A vollständiger Länge (fl) und mit geeigneter Reinheit im Säugetierzellsystem zu exprimieren und zu reinigen (s. 1.6.). Als Alternative sollte die Herstellung von NS5A fl im bakteriellen System etabliert werden (s. 1.6.). Versuche in diesen Systemen mussten vorerst eingestellt werden (s. 3.1.1. und 3.1.2.). Allerdings konnten schließlich, aufbauend auf den in diesen Systemen gewonnenen Erkenntnissen, NS5A fl und seine trunkierte Version  $\Delta D2+3$  im Baculovirus-vermittelten Sf9-Insektenzellsystem (s. 3.1.3.) adäquat produziert werden. Im Folgenden werden hier die Ergebnisse der verschiedenen Methoden zur Expression und Reinigung von NS5A und deren Optimierung dargestellt.

#### 3.1.1. Bakteriell System

##### **Expression von NS5A fl in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS unter Verwendung des Vektors pTM023-NS5A H54Q und Reinigung mit Ni-NTA-AC**

Zunächst wurde ein in diesem Labor gut etabliertes bakterielles Expressionssystem verwendet. Mit Hilfe des Expressionsvektors pTM023-NS5A H54Q wurde N-terminal GST- und C-terminal 6x-His-getagtes NS5A in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS exprimiert. Bei Reinigungen des Proteins über das N-terminale GST-tag konnte trotz Optimierungsversuche bei der Äquilibrierung und Inkubation *in batch* keine Bindung an Glutathion-Sepharose erzielt werden (keine Abb. gezeigt). Es wurde vermutet, dass NS5A die Konformation des GST-tags veränderte, dessen Affinität zur Glutathion-Sepharose senkte und somit eine ausreichende Bindung nicht mehr möglich war. Von der GST-Reinigung wurde zu einer im Labor bereits etablierten Ni-NTA-AC gewechselt, die nach Biondi (2002) angepasst wurde (s. 2.2.3.4.1.). Auf diese Weise wurde das Protein über dessen C-terminalen 6x-His-tag gereinigt.

Das Protein befand sich nach der Lyse sowohl im Pellet (P Lys) als auch im Überstand des Lysats (Ü Lys) (s. Abb. 24), was auf das Vorliegen von Einschlusskörperchen und eine notwendige Verbesserung hinweist. Im Überstand des Lysats nach Inkubation mit der Ni-NTA (Ü Ink I) sowie an dieser nach Elution des Proteins (B I) zeigt sich, dass die Bindung bzw. die Elution nicht vollständig erfolgte. Proben der Eluate (E Pool I, E1, E6 und E10) zeigen jedoch das Vorhandensein eines Proteins erwarteter Größe (◄) von ~ 76 kD, das sich mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (a.a. 249-260, (Brass et al., 2002)) anfärben ließ. Neben GST-NS5A-6x-His von ~ 76 kD zeigen sich auch schwächere Banden von 60 und 70 kD, bei denen es sich der Größe nach um Hitzeschockproteine wie GroEL und Dnak (Langer et al., 1992) handeln kann.



**Abbildung 24: Ni-NTA-AC von NS5A (pTM023-NS5A H54Q) exprimiert in *E. coli* und Abspaltung des GST-tags durch Thrombin-Protease.** NS5A wurde unter Verwendung des Vektors pTM023-NS5A H54Q in *E. coli* exprimiert und mittels Ni-NTA-AC nach Biondi (2002) gereinigt. Darauf folgten eine Dialyse, Abspaltung des GST-tags mit Thrombin-Protease und eine weitere Ni-NTA-AC zur Entfernung des GST-tags. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) und WB (B) untersucht. Thrombin-Verdauprodukte sind mit a), b) und c) markiert. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5A (a.a. 249-260, Brass et al., 2002). Das Spaltprodukt nach dem Thrombinverdaue ist mit \* gekennzeichnet. GST-NS5A ist mit ◄ markiert. M: Marker, P Lys: Unlöslicher Bestandteil des Lysats, Ü Lys: Überstand des Lysats, Ü Ink I: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose bei der ersten Ni-NTA-AC, E Pool I: Vereinigtes Eluat nach der ersten Ni-NTA-AC, E1, E6 und E10: Verschiedene Eluatfraktionen nach der ersten Ni-NTA-AC, B I: Ni-NTA nach der ersten Ni-NTA-AC, E Pool D: Vereinigtes Eluat nach der Dialyse, E Pool TV: Vereinigtes Eluat nach dem Thrombinverdaue zur Abspaltung des NS5A-GST-tags, Ü Ink II: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose bei der zweiten Ni-NTA-AC, E Pool II: Vereinigtes Eluat nach der zweiten Ni-NTA-AC, B II: Ni-NTA nach der zweiten Ni-NTA-AC.

Zwar sind im WB auf entsprechender Höhe im Eluat auch Banden detektiert worden, diese können aber auf unvollständig translatiertes NS5A-Produkt hinweisen. Nach dem Thrombinverdau waren Banden von etwa 60 und 70 kD noch in der Coomassiefärbung, aber nicht mehr im WB zu erkennen. Man kann vermuten, dass zunächst Hitzeschockproteine zusammen mit unvollständig translatiertem GST-NS5A-6x His gleicher Größe vorlagen, was die Detektion im WB vor dem Thrombin-Verdau erklärt. Nach dem Thrombinverdau waren die unvollständigen NS5A-Produkte gespalten und nicht mehr im WB zu detektieren, die Hitzeschockproteine waren weiterhin in der Coomassiefärbung sichtbar.

Das im Vergleich zu NS5A (~50 kD) relativ große GST-tag (~26 kD) musste durch eine vorhandene Thrombin-Schnittstelle entfernt werden. Das GST-tag hätte durch seine N-terminale Lage nahe der AH von NS5A bei weiterführenden Experimenten die Lipidinteraktion beeinflussen können. Der Entfernung des Protein-tags ging eine Dialyse voraus, um Imidazol zu entfernen, welches die Thrombinaktivität einschränkt. Auf die Abspaltung des GST-tags folgte eine weitere Ni-NTA-AC, um das abgetrennte tag vom Protein zu trennen.

Beim Vergleich der Proben des Eluats vor (E Pool I) und nach der Dialyse (E Pool D) war hinsichtlich möglichen Proteinverlusts oder Degradierung kein Unterschied festzustellen. Nach dem Thrombinverdau (E Pool TV) war die Bande von ~76 kD nicht mehr vorhanden. Es waren drei Spaltprodukte a), b) und c) von etwa 45, 30 und 25 kD zu erkennen. Nach der Abtrennung des GST-tags (~ 25 kD) sollte als weiteres Spaltprodukt noch NS5A fl (~ 50 kD) vorliegen. Die Spaltprodukte a) und c) wiesen etwa die passenden Größen auf. Jedoch lag noch ein weiteres Spaltprodukt b) vor. Im WB konnte Spaltprodukt b) mit einer Größe von ~ 30 kD (\*), jedoch nicht a) detektiert werden. Eine Detektion des Spaltprodukts a) als angenommenes NS5A fl wäre zu erwarten gewesen. Auch sollte Spaltprodukt c) als vermutetes GST-tag bei der weiteren Ni-NTA-AC nicht an Ni-NTA binden können. Es lag jedoch in der entsprechenden Eluatprobe (A, E Pool II) und in der Probe von Ni-NTA-Agarose nach der Elution (A, B II) vor. Optimierungsversuche des Thrombin-Verdau in Hinsicht auf Menge und Inkubationsdauer blieben ohne Erfolg (keine Abb. gezeigt). Es lag innerhalb der Sequenz von NS5A keine Erkennungsstelle für die Spaltung durch Thrombin vor. Allerdings ist bekannt, dass Thrombin oft auch zu unspezifischer Spaltung führen kann (Jenny et al., 2003 und Waugh, 2011). Es wurde angenommen, dass beim Abspalten des GST-tags durch Thrombin-Protease, NS5A unspezifisch verdaut wurde und für Folgeversuche nicht zu verwenden war.

Daher wurden mehrere Anpassungen bei der Expression und Reinigung von NS5A im bakteriellen System vorgenommen, die hier zusammenfassend dargestellt sind. Zunächst wurde ein Vektor ohne N-terminales GST-tag konstruiert, um eine notwendige Abspaltung des GST-tags zu vermeiden. In der Folge kam es zur vermehrten Bildung von Einschlusskörperchen des exprimierten NS5A. Verschiedene Bedingungen bei Induktion und Expression (0,1 - 0,5 mM IPTG, verschiedene Bakteriendichten von  $OD_{600\text{ nm}} = 0,5 - 0,8$ , verschiedene Temperaturen von 18 und 20 °C bei verschiedener Expressionsdauer von 3 h, 4 h und ~ 18 h über Nacht) sowie das Testen verschiedener Detergenzien (OG, NP-40, Digitonin, Triton X-100, DDM) führten zu keiner Verbesserung hinsichtlich der bestehenden Einschlusskörperchen. Zugehörige Abbildungen sind nicht dargestellt. Auch die Nutzung des *E. coli*- Stamms Rosetta-gami 2 (Novagen) zur Optimierung der Proteinfaltung brachte keinen Erfolg (keine Abb. gezeigt). Bei diesem Stamm ist durch Mutation von Glutathion-Reduktase und Thioredoxin-Reduktase die Bildung von Disulfid-Brücken im Cytoplasma verbessert (Sahdev et al., 2007). Zusätzlich wird bei Rosetta-Stämmen die Proteinexpression durch ein zusätzliches Plasmid gesteigert. Dieses Plasmid erhöht die Verfügbarkeit von tRNAs, die in *E. coli* selten sind, aber für die rekombinante Herstellung nicht-bakterieller Proteine benötigt werden (Tegel et al., 2010).

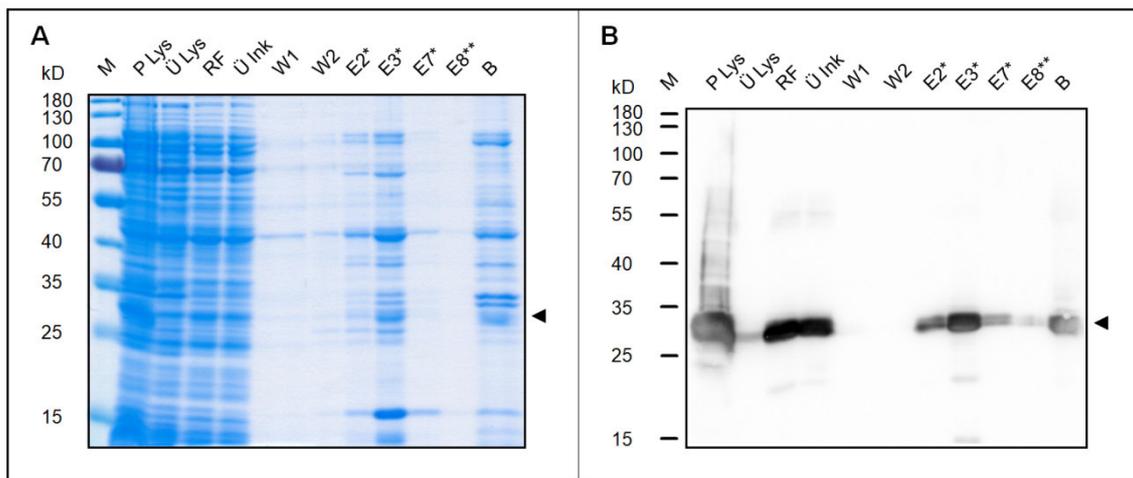
### **Expression von NS5A $\Delta$ D2+3 in *E. coli* LOBSTR-BL21 (DE3)-RIL unter Verwendung des Vektors pCG10 und Reinigung mit Ni-NTA-AC nach Sólyom und Valda**

Es wurde angenommen, dass die nativ ungefalteten, strukturlosen Domänen D2 und D3 von NS5A (s. 1.3.1.) die korrekte Faltung des restlichen NS5A erschweren und möglicherweise die Entstehung von Einschlusskörperchen begünstigen. Zudem könnte auch die hohe Interaktionsfähigkeit der flexiblen Domänen D2 und 3 (s. 1.3.3.) Verunreinigungen bei der Reinigung begünstigen. Aus diesen Gründen wurden D2 und D3 deletiert.

Es wurde das für *E. coli* codonoptimierte Konstrukt pCG10 (s. Anhang E) hergestellt, welches auf einem pET-22b (+)-Vektor basiert und für NS5A  $\Delta$ D2+3 codiert. Die Codonoptimierung wurde nach Chen und Texada (2006) durchgeführt. Das C-terminale 9x His-tag sollte eine höhere Spezifität bei der Reinigung mit Ni-NTA-AC gewährleisten. Es wurde der *E. coli*-Stamm LOBSTR-BL21 (DE3)-RIL verwendet, um die bei Ni-NTA-AC mit *E. coli*-Lysat häufigen Verunreinigungen ArnA und SlyD (Andersen et al., 2013) zu vermeiden. Bei diesem Stamm ist durch Modifizierung von *arnA* und *slyD* (s. Tab. 6, 2.1.7.) die Affinität der zugehörigen Proteine gegenüber Nickel- und Cobalt-Ionen reduziert und sie treten nicht als Verunreinigungen auf. Zudem wurde wegen der Bildung von Einschlusskörperchen die

Expression und Reinigung entsprechend einer Methode von Sólyom et al. (2015) und Valdau (2014) angepasst (s. 2.2.3.4.1.). Dabei werden Einschlusskörperchen durch N-Lauroylsarcosin lysiert und NS5A im Verlauf rückgefaltet.

Durch die WB-Analyse mittels monoklonalen Antikörpers gegen das C-terminale 9x His-tag (s. Abb. 25 B) sind Banden von ~ 30 kD (◀) zu erkennen. Dies weist auf eine erfolgreiche NS5A  $\Delta$ D2+3 Expression in *E. coli* LOBSTR-BL21 (DE3)-RIL hin. Wie erwartet kam es zur Bildung von Einschlusskörperchen, sodass der Großteil von NS5A  $\Delta$ D2+3 nach der Lyse noch im ungelösten Bestandteil (P Lys) zu finden war.



**Abbildung 25: Ni-NTA-AC nach Sólyom und Valdau von NS5A (pCG10) exprimiert in *E. coli*.** NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde unter Verwendung des Vektors pCG10 in *E. coli* exprimiert und mittels Ni-NTA-AC nach Sólyom et al. (2015) und Valdau (2014) gereinigt. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) und WB (B) untersucht. Die Immundetektion von NS5A erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das C-terminale 9x His-tag. NS5A  $\Delta$ D2+3 ist mit ◀ markiert. M: Marker, P Lys: Unlöslicher Bestandteil des Lysats, Ü Lys: Überstand des Lysats, RF: Rückfaltung, Ü Ink: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose, W1: Waschschrift mit Waschpuffer 1, W2: Waschschrift mit Waschpuffer 2, E2\*, E3\* und E7\*: Verschiedene Eluatfraktionen eluiert mit 250 mM Imidazol, E8\*\*: Eluatfraktion eluiert mit 350 mM Imidazol, B: Ni-NTA-Agarose nach der Elution.

Nach der Rückfaltung konnte NS5A im WB detektiert werden (B, RF). Starke Banden der Proben nach Inkubation mit der Ni-NTA-Agarose (B, Ü Ink) und von dieser nach der Elution (B, B) weisen darauf hin, dass die Bindung an die Ni-NTA-Agarose und die Elution noch nicht optimal waren. NS5A kann jedoch im Eluat (E2-E7) nachgewiesen werden. Eine weitere Elution mit 350 statt 250 mM Imidazol (E8\*\* im Vergleich zu E7\*) brachte kein verbessertes Ergebnis. Eine Vielzahl an Verunreinigungen war ebenfalls in der Coomassie-Färbung festzustellen.

Wegen der notwendigen Lyse der Einschlusskörperchen mit dem anionischen, denaturierenden Detergens N-Lauroylsarcosin und der folgenden Rückfaltung konnte man nicht sicher sein, ob NS5A am Ende der Reinigung korrekt gefaltet vorlag. Hinzu kam auch,

dass im bakteriellen System eine Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen von Proteinen nicht durchgeführt werden kann (Sahdev et al., 2007). So fehlen Serin-, Threonin- und Tyrosin-Proteinkinasen (Sahdev et al., 2007), was die Herstellung funktionaler Phosphoproteine wie NS5A (s. 1.3.1.) erschwert. Da auch noch viele Verunreinigungen vorlagen und schließlich die Expression und Reinigung von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 im Baculovirus-vermittelten Insektenzellsystem erfolgreich war, wurde beschlossen die Expression und Reinigung im bakteriellen System einzustellen.

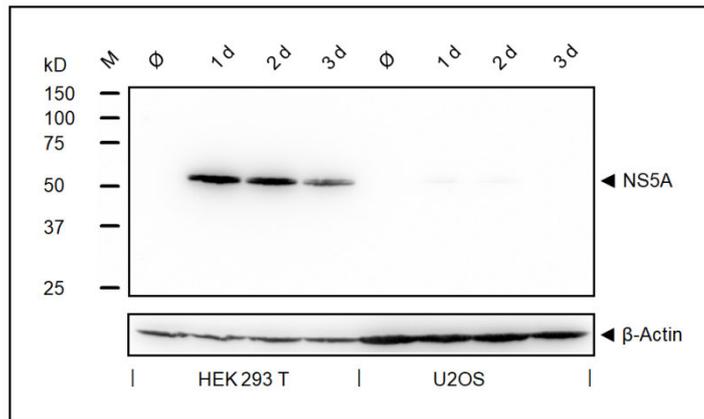
### **3.1.2. Säugetierzellsystem**

Zu Beginn der Expression von NS5A in Säugetierzellen wurde mittels WB geklärt, ob in der HEK 293 T- oder U2OS-Zelllinie eine höhere Ausbeute an NS5A zu erzielen ist. Ferner wurde untersucht, welcher Zeitpunkt der Zellernte nach der Transfektion hierfür geeignet ist.

#### **Vergleich der Expression von FLAG-NS5A in HEK 293 T- und U2OS-Zellen**

FLAG-NS5A wurde mit Hilfe des Vektors pCMV-*tag4*-NS5A H54Q in den zwei Zelllinien HEK 293 T und U2OS exprimiert. Die Zellen wurden einen, zwei und drei Tage nach der Transfektion geerntet. Die Expression von NS5A wurde im WB verglichen (s. Abb. 26). Die Immundetektion wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das C-terminale FLAG-*tag* durchgeführt.

Eine höhere Expression von FLAG-NS5A in HEK 293 T- im Vergleich zu U2OS-Zellen ist im WB detektierbar. Dies steht damit in Einklang, dass HEK 293 T-Zellen zusammen mit CHO- (*Chinese hamster ovary*)-Zellen wegen ihrer hohen Transfektionsrate als sehr geeignet für die rekombinante Proteinexpression in der Literatur beschrieben sind (Baldi et al., 2007). Die höhere Expression in HEK-293 T-Zellen wird durch den Unterschied in der  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle noch deutlicher. Gemäß der Ladekontrolle wurde mehr Protein von U2OS- im Vergleich zu HEK 293 T-Zellen in der SDS-PAGE aufgetragen. Dennoch lagen bei den HEK 293 T-Proben intensivere NS5A-Banden vor. In untransfizierten Zellen ( $\emptyset$ ) war bei beiden Zelllinien NS5A nicht detektierbar. In Hinsicht auf verschiedene Zeitpunkte der Zellernte ist sowohl bei HEK 293 T- als auch bei U2OS-Zellen eine Reduktion der Expression am dritten Tag nach der Transfektion festzustellen (3 d). Dies kann auf eine Degradation von NS5A hinweisen. Zwischen erstem und zweitem Tag (1 d und 2 d) nach der Transfektion lässt sich hingegen kein Unterschied beobachten.

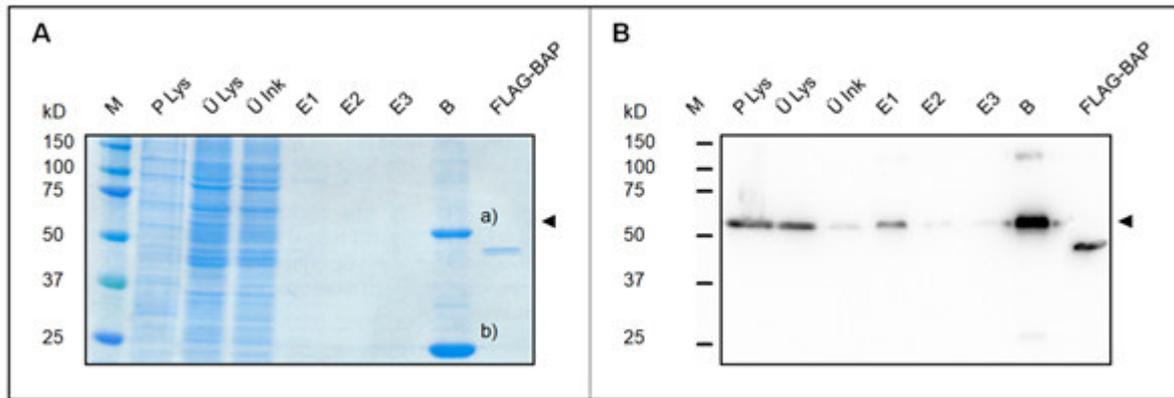


**Abbildung 26: Vergleich der Expression von NS5A (pCMV-tag4-NS5A H54Q) in HEK 293 T- und U2OS-Zellen sowie zu verschiedenen Erntezeiten nach der Transfektion.** NS5A wurde unter Verwendung des Vektors pCMV-tag4-NS5A H54Q in den Zelllinien HEK 293 T und U2OS exprimiert. Zellen beider Zelllinien wurden einen, zwei und drei Tage (1 d, 2d und 3d) nach der Transfektion mit X-treme GENE geerntet. Untransfizierte Zellen (Ø) wurden als Negativkontrollen nach einem Tag geerntet. Gleiche Volumina an Zelllysate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immundetektion von NS5A erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen den FLAG-tag des Proteins. Die Detektion von  $\beta$ -Actin mit monoklonalem Antikörper diente als Ladekontrolle.

Somit wurden weitere Experimente zur Expression von NS5A im Säugetierzellsystem in HEK 293 T-Zellen und mit einer Zellernte einen Tag nach der Transfektion durchgeführt.

### **Expression von NS5A fl in HEK 293 T-Zellen unter Verwendung des Vektors pCMV-tag4-NS5A H54Q und Reinigung mit FLAG-IAC**

NS5A fl wurde mit Hilfe des Vektors pCMV-tag4-NS5A H54Q in HEK 293 T-Zellen exprimiert und über sein C-terminales FLAG-tag durch FLAG-IAC (s. 2.2.3.4.2.) gereinigt. Banden passender Größe von  $\sim 50$  kD ( $\blacktriangleleft$ ) waren unter Nutzung eines monoklonalen Antikörpers gegen FLAG im WB (**B**) detektierbar (s. Abb. 27). Die als Positivkontrolle genutzten 200 ng FLAG-BAP waren in der Coomassie-Färbung deutlich zu erkennen und konnten durch den verwendeten monoklonalen FLAG-Antikörper im WB detektiert werden. In der Probe des ungelösten Bestandteils des Zelllysats (**B**, P Lys) war eine intensive Bande zu erkennen, die auf noch notwendige Optimierung der Zellyse hinwies. Die geringe Menge an NS5A im Eluat (**B**, E1-E3) konnte damit erklärt werden, dass kaum NS5A von der ANTI-FLAG M2-Gelmatrix eluiert werden konnte (**B**, Gelspur B). Somit war zwar im WB eine schwache Bande in der Eluatprobe E1 detektierbar, eine zugehörige Bande war in der Coomassiefärbung (**A**, E1) jedoch nicht erkennbar. Dafür waren bei der Coomassie-Färbung in der Probe der ANTI-FLAG M2-Gelmatrix nach der Elution (**A**, Gelspur B) intensive Banden **a**) und **b**) von  $\sim 50$  und 25 kD festzustellen.



**Abbildung 27: FLAG-IAC von NS5A (pCMV-tag4-NS5A H54Q) exprimiert in HEK 293 T-Zellen.** NS5A wurde unter Verwendung des Vektors pCMV-tag4-NS5A H54Q in HEK 293 T-Zellen exprimiert und mittels FLAG-IAC gereinigt. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) und WB (B) untersucht. Dominante Banden in der Probe der ANTI-FLAG M2-Gelmatrix nach der Elution (A, Gelspur B) sind mit a) und b) gekennzeichnet. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das FLAG-tag des Proteins. NS5A ist mit  $\blacktriangleleft$  markiert. Als Positivkontrolle wurden 200 ng FLAG-BAP verwendet. M: Marker, P Lys: Unlöslicher Bestandteil des Lysats, Ü Lys: Überstand des Lysats, Ü Ink: Überstand nach Inkubation mit ANTI-FLAG M2-Gelmatrix, E1, E2 und E3: Eluatfraktionen, B: ANTI-FLAG M2-Gelmatrix nach der Elution.

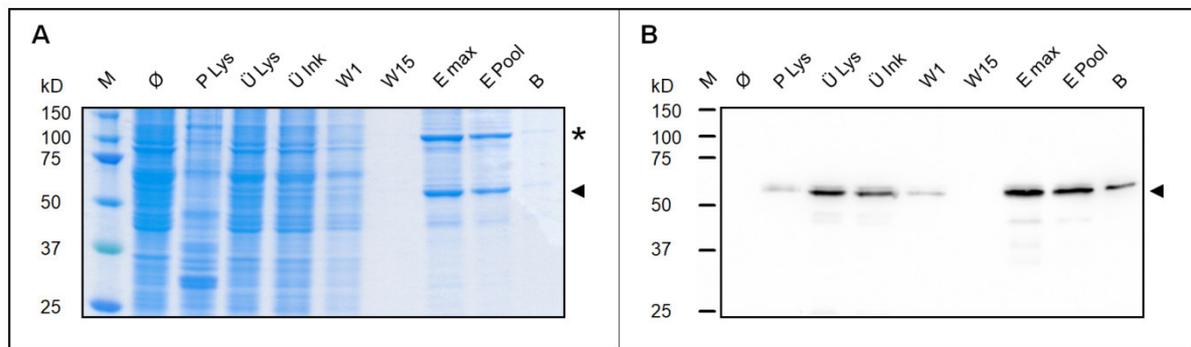
Es wurde vermutet, dass es sich bei diesen beiden Banden, um die schwere und leichte Kette des an der M2-Gelmatrix gebundenen IgG-FLAG-Antikörpers handelt. Dabei weist die schwere Kette des Antikörpers etwa die gleiche Größe wie das an der ANTI-FLAG M2-Gelmatrix gebundene NS5A fl auf und überdeckt somit dessen Signal. Zusätzlich ist auch möglich, dass im WB der gegen Maus-IgG gerichtete Sekundäntikörper (s. Tab. 14, 2.1.15.) nicht nur mit an FLAG-NS5A gebundenem Primäntikörper interagiert, sondern auch an den Antikörperbestandteilen der M2-Gelmatrix band. Laut Herstellerangaben zum Sekundäntikörper bindet dieser an der leichten und schweren Kette von Maus-IgG (s. Tab. 14, 2.1.15.). Zunächst fällt bei Abb. 27 B die intensive Bande von  $\sim 50$  kD passend zur Größe von FLAG-NS5A und der schweren Antikörperkette von IgG auf. Bei genauer Betrachtung ist aber auch eine schwache Bande von  $\sim 25$  kD passend zur leichten Antikörperkette festzustellen. Obwohl somit schwer abzuschätzen war, wie erfolgreich die Elution gewesen war, wurde versucht die Elution zu optimieren.

Ein Versuch nach Futatsumori-Sugai et al. (2009) durch Senkung des pH-Werts auf 4,4 in Gegenwart von 1 M Arginin NS5A zu eluieren, brachte jedoch keine Verbesserung (nicht dargestellt). Um als Alternative NS5A aus Säugetierzellen über Ni-NTA-AC statt FLAG-IAC zu reinigen, wurde das Konstrukt pCG01 hergestellt (s. Anhang C), welches ein N-terminales 6x His- und FLAG-tag mit TEV-Spaltungsstelle aufweist. Letzte Versuche im Rahmen einer FLAG-IAC, bei der NS5A durch TEV-Spaltung von der ANTI-FLAG M2-

Gelmatrix gelöst werden sollte, brachten keinen Erfolg (nicht dargestellt). Somit wurde schließlich zu Ni-NTA-AC als Reinigungsmethode gewechselt.

### Expression von NS5A fl in HEK 293 T-Zellen unter Verwendung des Vektors pCG01 und Reinigung mit Ni-NTA-AC

Im Vergleich zur Reinigung durch FLAG-IAC (s. Abb. 27) konnte im Rahmen einer Ni-NTA-AC (s. 2.2.3.4.2., Modifikationen (I)) NS5A fl erfolgreich eluiert werden. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, konnten im WB (**B**) durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen) Banden von ~ 51 kD (◄) detektiert werden.



**Abbildung 28: Ni-NTA-AC von NS5A (pCG01) exprimiert in HEK 293 T-Zellen.** NS5A wurde unter Verwendung des Vektors pCG01 in HEK 293 T-Zellen exprimiert und mittels Ni-NTA-AC (I) gereinigt. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (**A**) und WB (**B**) untersucht. Die dominanteste Verunreinigung ist mit \* markiert. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen). Das Lysat untransfizierter Zellen (Ø) wurde als Negativkontrolle genutzt. NS5A ist mit ◄ markiert. M: Marker, P Lys: Unlöslicher Bestandteil des Lysats, Ü Lys: Überstand des Lysats, Ü Ink: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose, W1: 1. Waschschrift, W15: 15. Waschschrift, E max: Eluatfraktion mit höchster Proteinkonzentration, E Pool: Vereinigtes Eluat, B: Ni-NTA-Agarose nach der Elution.

Banden entsprechender Höhe (E max und E Pool) waren im Gegensatz zur FLAG-IAC (vgl. Abb. 27, **A**, E1) auch in der Coomassie-Färbung (**A**, E max, E Pool) festzustellen. Nach der Zellyse verblieb nur eine geringe Menge an NS5A im unlöslichen Bestandteil (**B**, P Lys). Durch die Waschschrte wurde eine Vielzahl an Verunreinigungen entfernt (**A**, W1), ohne dabei größere Mengen NS5A zu verlieren (**B**, W1). Banden in den Proben des Überstands nach der Inkubation mit Ni-NTA-Agarose (**B**, Ü Ink) und von dieser nach der Elution (**B**, Gelspur B) wiesen auf eine noch mögliche Optimierung der Bindung von NS5A an die Ni-NTA-Agarose und der Elution hin. Dennoch waren die vorhandenen NS5A-Banden in den Eluatproben vielversprechend. Zur weiteren Verbesserung war noch die Entfernung einer Verunreinigung von ~ 100 kD (**A**, E max, E Pool, \*) notwendig. Eine Abtrennung der Verunreinigung durch Gelfiltration blieb ohne Erfolg (nicht dargestellt).

## Massenspektrometrie

Um die Verunreinigung zu identifizieren und somit gezielter eliminieren zu können, wurde die 100 kD-Bande massenspektrometrisch untersucht. Dabei wurde auch die 50 kD-Bande analysiert, um deren Identität als NS5A fl zusätzlich zur Immundetektion im WB (**B**) zu bestätigen. Nach Auftrennung der Proben durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung, wurden die Banden isoliert. Die Fixierung der Gelproben, Trypsinverdau und LC-MS/MS sowie die Auswertung über MaxQuant erfolgten durch Anshu Bhattacharya in der AG von Prof. Dikic (Institut für Biochemie II, Frankfurt). In Tabelle 24 sind für die untersuchten Banden je die zehn Proteine mit höchstem iBAQ-Wert (*Intensity Based Absolute Quantification*) aufgeführt.

**Tabelle 24: Massenspektrometrische Untersuchung der 100 kD- und 50 kD-Bande von NS5A (pCG01)-Eluat, gereinigt mit Ni-NTA-AC aus HEK 293 T-Zellen.** NS5A wurde mit Hilfe des Vektors pCG01 in HEK 293 T-Zellen exprimiert und durch Ni-NTA-AC (I) gereinigt. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung untersucht. Die 100 kD- und 50 kD-Bande der Probe von Eluat mit der höchsten Proteinkonzentration (E max) wurden ausgeschnitten und nach einem Trypsinverdau durch LC-MS/MS analysiert. Die je zehn Proteine mit den höchsten ermittelten iBAQ-Werten (*Intensity Based Absolute Quantification*) sind aufgeführt. Zelluläre Lokalisation und molekulare Massen (MW) der Proteine sind nach Informationen der Datenbank UniProt Knowledgebase angegeben.

Proteine 100 kD-Bande	UniProt#	Zelluläre Lokalisation	MW [D]	iBAQ
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	P23246	Zellkern	76149	923010000
DNA Topoisomerase 1	P11387	Zellkern	90726	85936000
Putative RNA-binding protein 15B	Q8NDT2	Zellkern	97205	6803700
YTH domain-containing protein 1	Q96MU7	Zellkern	84700	6542600
Cyclin-dependent kinase 11B, Cyclin-dependent kinase 11A	P21127 Q9UQ88	Zellkern	92620 91362	2747900
Angiomotin	Q4VCS5	Zelloberfläche	118085	1952200
ATP-dependent RNA helicase DDX42	Q86XP3	Zellkern	102975	1382300
Zinc finger protein 281	Q9Y2X9	Zellkern	96915	1201500
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	Q9P2I0	Zellkern	88487	1127200
Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	Plasmamembran	66039	1050100

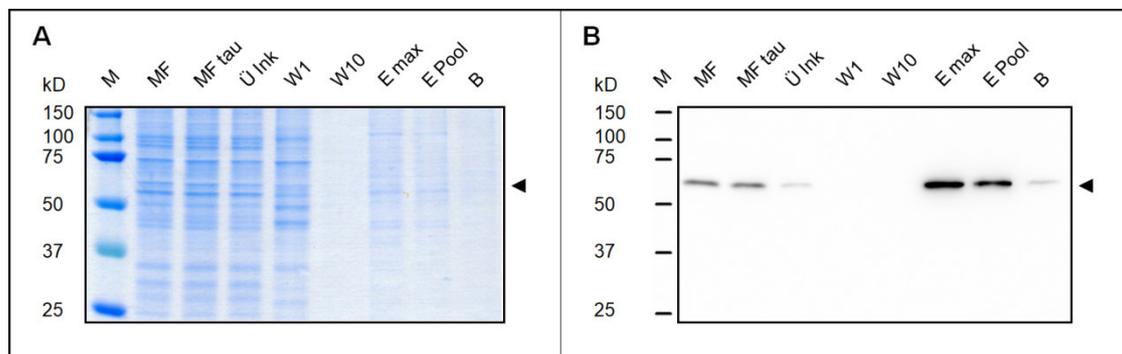
<b>Proteine 50 kD-Bande</b>	<b>UniProt #</b>	<b>Zelluläre Lokalisation</b>	<b>MW [D]</b>	<b>iBAQ</b>
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	Q15233	Zellkern	54232	758270000
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7	Q8N684	Zellkern	52050	38682000
Cytosolic purine 5-nucleotidase	P49902	Cytosol	64970	10005000
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	P55795	Zellkern	49264	4059200
Paraspeckle component 1	Q8WXF1	Zellkern	58744	3425000
<b>6xHis-FLAG-TEV-HCV-NS5A</b>	-	<b>rekombinant</b>	<b>51418</b>	<b>3332000</b>
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	P23246	Zellkern	76149	2927100
Zinc finger protein ZIC 2	O95409	Zellkern	55006	2765000
Transcriptional repressor protein YY1	P25490	Zellkern	44713	2288900
Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2	Q7L4I2	Zellkern	50560	1533600

Das durch den Trypsinverdau bedingte, artifizielle Erscheinen von Trypsin mit je zweit-höchstem iBAQ wurde nicht mit aufgelistet. Über die Datenbank UniProt wurde jeweils die zelluläre Lokalisation der ermittelten Proteine sowie deren molekulare Masse recherchiert und in den Tabellen ergänzt. Bei der Analyse der 100 kD-Bande konnten überwiegend Proteine aus dem Zellkern festgestellt werden. Keratin in der 100 kD-Bande ist vermutlich auf eine externe Verunreinigung der Probe zurückzuführen. Bei Betrachtung der Ergebnisse zur 50 kD-Bande fällt auf, dass das rekombinant exprimierte NS5A nach iBAQ-Wert nur als sechsthäufigstes Protein identifiziert wurde. Das weist darauf hin, dass in Abbildung 28 in der Coomassie-Färbung andere verunreinigende Proteine gleicher Größe die NS5A-Bande überlagern. Bei diesen Verunreinigungen handelt es sich wie bei der 100 kD-Bande überwiegend um Proteine aus dem Zellkern. Die kontaminierenden Proteine sind gemäß Literaturrecherche (Reyes, 2002 und Macdonald und Harris, 2004) keine bisher bekannten Interaktionspartner von NS5A. Höchstens in Hinsicht auf die erkannten Verunreinigungen „Cyclin-dependent kinase 11A“ und „-11B“ ist anzumerken, dass Cdk 1 als Interaktionspartner von NS5A beschrieben wurde (Arima et al., 2001). Erwähnenswert ist auch, dass die Verunreinigung „splicing factor, proline- and glutamine-rich“ mit einer Größe von ~ 76 kD sowohl in der Probe der 100 kD-Bande als auch der Probe der 50 kD-Bande zu finden war.

Es kann sich dabei, wie auch bei „Keratin, type II cytoskeletal 1“ um eine externe Verunreinigung handeln. Um die beobachteten Verunreinigungen zu reduzieren, wurde bei weiteren Reinigungen vorab eine Zellfraktionierung durchgeführt. Dabei wurde das membranständige NS5A von der Kern- und Cytosolfraktion abgetrennt.

### Reinigung von NS5A fl aus HEK 293 T-Zellen mit vorheriger Zellfraktionierung

Wie bisher wurde NS5A mit Hilfe des Vektors pCG01 in HEK 293 T-Zellen exprimiert. Vor der Reinigung durch Ni-NTA-AC wurden jedoch die geernteten Zelllysate einer Fraktionierung unterzogen (s. 2.2.3.3.). Die folgende Ni-NTA-AC wurde adäquat angepasst (s. 2.2.3.4.2., Modifikationen (II)). Im Vergleich zur Reinigung ohne Zellfraktionierung (s. Abb. 28) konnte ein Großteil der Verunreinigungen eliminiert werden (s. Abb. 29 A).



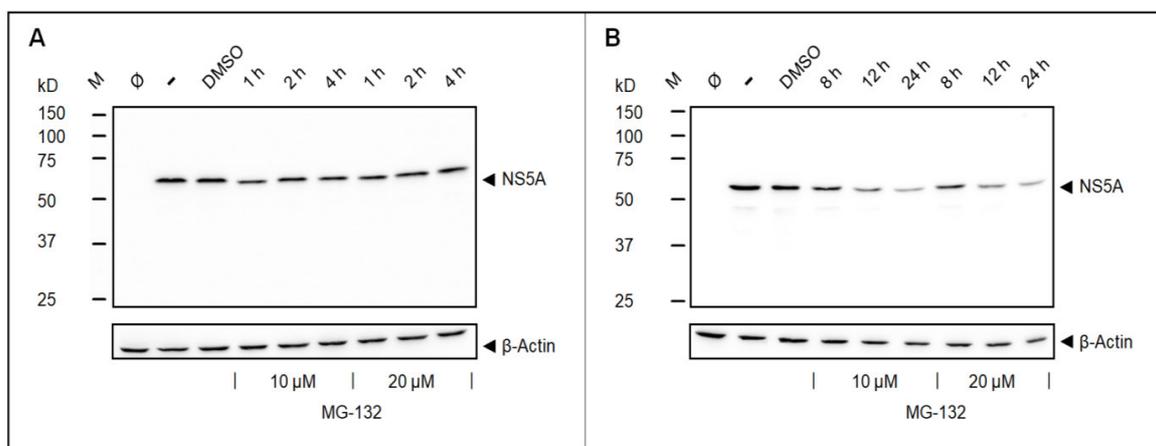
**Abbildung 29: Ni-NTA-AC von NS5A (pCG01) aus HEK 293 T-Membranfraktion.** NS5A wurde unter Verwendung des Vektors pCG01 in HEK 293 T-Zellen exprimiert und die geernteten Zellen fraktioniert. Mit Hilfe einer Ni-NTA-AC (II) wurde NS5A aus der Membranfraktion isoliert. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) und WB (B) untersucht. Die Immundetektion wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen) durchgeführt. NS5A ist mit ◀ markiert. M: Marker, MF: Membranfraktion, MF tau: Aufgetaute Membranfraktion, Ü Ink: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose, W1: 1. Waschschrift, W10: 10. Waschschrift, E max: Eluatfraktion mit höchster Proteinkonzentration, E Pool: Vereinigtes Eluat, B: Ni-NTA-Agarose nach der Elution.

In einer Probe der Membranfraktion (B, MF) konnte eine Bande erwarteter NS5A-Größe (◀) mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen) detektiert werden. Auch nach Lagerung der Membranfraktion bei -20 °C und Auftauen war eine entsprechende Bande zu erkennen (B, MF tau). Eine Proteindegradierung durch Einfrieren und Auftauen konnte somit ausgeschlossen werden. Eine intensive Bande konnte ebenfalls im Eluat (B, E max, E Pool) nachgewiesen werden. Allerdings waren in der Coomassie-Färbung (A, E max, E Pool) nur schwache Banden sichtbar. Die Menge an gewonnenem NS5A war trotz großer Menge an Zellausgangsmaterial (80x 145 mm Ø-Zellkulturschalen) entsprechend gering. Als mögliche Ursache für die geringe Ausbeute an NS5A wurde angenommen, dass es im Rahmen der rekombinanten Proteinexpression zur Akkumulation ungefalteter und

eventuell missgefalteten Proteins kommt, was schließlich ER-Stress und Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System verursacht (Amm et al., 2014, Thibaudeau und Smith, 2019). Folglich wurde überprüft, ob durch Proteasominhibition die Menge an exprimiertem NS5A gesteigert werden kann.

### **Einfluss des Proteasominhibitors MG-132 auf die Expression von NS5A fl in HEK 293 T-Zellen**

Wegen seiner Wirksamkeit und schnellen Reversibilität (Kisselev und Goldberg, 2001) wurde das Tripeptid-Aldehyd MG-132 als Proteasominhibitor ausgewählt. Zur Untersuchung des Effekts von MG-132 wurde NS5A fl wie bisher in HEK 293 T-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion durch PEI geerntet. Für die Verwendung von MG-132 in HEK 293- und HEK 293 T-Zellen sind verschiedene Molaritäten von 1, 25 und 50  $\mu\text{M}$  und Inkubationsdauern von 4, 7 und 16 h beschrieben (Picard et al., 2008, Vashisht et al., 2009 und Noels et al., 2009). Ausgehend davon wurde in der vorliegenden Arbeit MG-132 mit 10 und 20  $\mu\text{M}$  zunächst für 1, 2 und 4 h vor der Zellernte eingesetzt (s. Abb. 30 A).



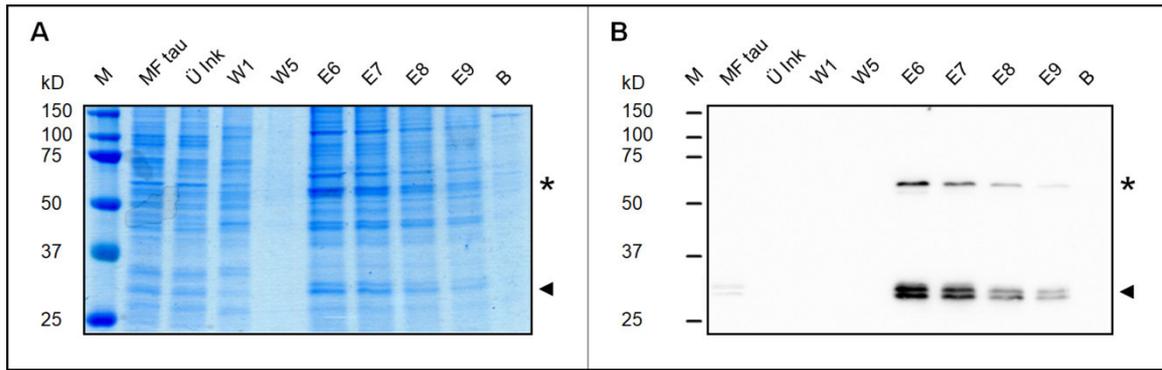
**Abbildung 30: Einfluss des Proteasominhibitors MG-132 auf die Expression von NS5A (pCG01) in HEK 293 T-Zellen.** NS5A wurde unter Verwendung des Vektors pCG01 in HEK 293 T-Zellen exprimiert. Einen Tag nach der Transfektion mit Hilfe von PEI wurden die Zellen geerntet. Vorab wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 10 und 20  $\mu\text{M}$  MG-132 zugegeben. Untransfizierte Zellen ( $\emptyset$ ) wurden als Negativkontrolle geerntet. Zellen, bei denen kein MG-132 (-) sowie DMSO entsprechend der verwendeten Menge bei Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  MG-132 zugegeben wurden, dienten als weitere Kontrollen. Es wurde MG-132 1 h, 2 h und 4 h vor der Ernte zugegeben (A). Längere Inkubationszeiträume von 8 h, 12 h und 24 h wurden ebenfalls untersucht (B). Zur Untersuchung der Expression wurden Zelllysate gleicher Volumina in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch WB analysiert. Dabei wurde für die Immundetektion ein monoklonaler Antikörper gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen) genutzt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin mit einem monoklonalen Antikörper detektiert.

Die Inkubationszeiten wurden später auf 8, 12 und 24 h verlängert (**B**). Die Mengen an vorliegendem NS5A fl wurden durch WB mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen) verglichen. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin mit einem monoklonalen Antikörper detektiert. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, bei denen entweder zu den Zellen nicht hinzugegeben wurde (-) oder nur eine Menge an DMSO, die gemeinsam mit der Zugabe von 20  $\mu$ M MG-132 appliziert wurde (DMSO), konnte bei keiner Inkubationszeit eine Steigerung der NS5A fl-Expression gegenüber Kontrolle (-) festgestellt werden. Vielmehr waren sogar geringere Intensitäten der NS5A-Banden bei Inkubationszeiten von 12 und 24 h zu beobachten (**B**). Die Verwendung von 10 oder 20  $\mu$ M MG-132 zeigte hierbei keinen Unterschied. Die verminderte Expression bei 12 und 24 h Inkubationsdauer kann ein Hinweis auf eine mögliche cytotoxische Wirkung des Proteasom-Inhibitors sein (Fribley and Wang, 2006). Auf eine Erhöhung der Molarität von MG-132 wurde verzichtet. Die NS5A-Expression konnte durch Verwendung von MG-132 nicht verbessert werden. Proteasomaler Abbau unmittelbar nach der Expression als Ursache für die geringe Ausbeute von NS5A fl in HEK 293 T-Zellen wurde ausgeschlossen.

Um ähnlich wie im bakteriellen System (s. 3.1.1.) mögliche Beeinträchtigungen bei der Expression durch die unstrukturierten Domänen 2 und 3 von NS5A zu vermeiden, wurden diese deletiert. Das auf dem Vektor pCMV-*tag4*-NS5A basierende Konstrukt pCG07 (s. Anhang D) wurde hergestellt, welches für NS5A  $\Delta$ D2+3 codiert. Wie auch beim Konstrukt pCG10 sollte das C-terminale 9x His-*tag* eine höhere Spezifität bei der Reinigung mit Ni-NTA-AC sichern. Der eingeführte Schritt der Zellfraktionierung wurde beibehalten.

### **Expression von NS5A $\Delta$ D2+3 in HEK 293 T-Zellen unter Verwendung des Vektors pCG07 und Reinigung mit Ni-NTA-AC bei vorausgehender Zellfraktionierung**

NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde mit Hilfe des Vektors pCG07 in HEK 293 T-Zellen exprimiert. Nach der anschließenden Zellfraktionierung der geernteten Zellen, wurde NS5A mittels Ni-NTA-AC (s. 2.2.3.4.2., Modifikationen (II)) gereinigt. Eine Doppelbande mit einer berechneten Größe von NS5A  $\Delta$ D2+3 von  $\sim$  30 kD ( $\blacktriangleleft$ ) konnte mittels WB (s. Abb. 31 **B**) in den Eluatproben der Reinigung (E6 - E9) detektiert werden. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 9x His-*tag* von NS5A.

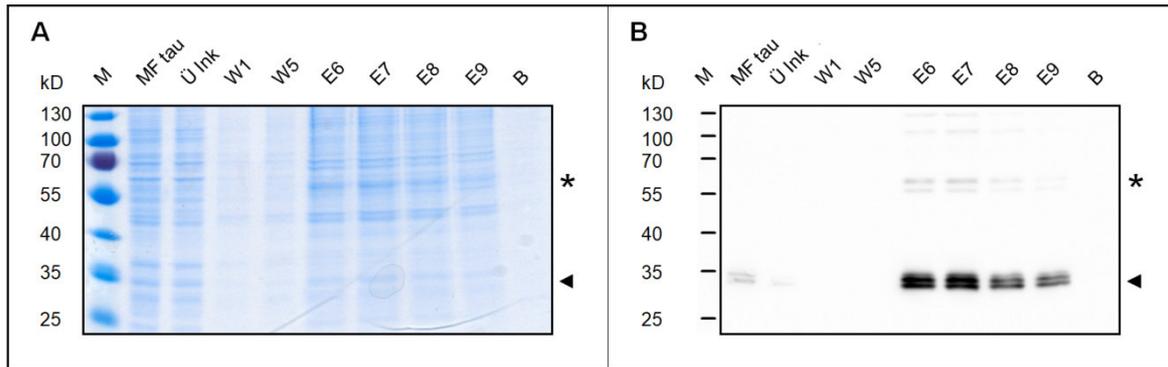


**Abbildung 31: Ni-NTA-AC von NS5A  $\Delta$ D2+3 (pCG07) aus HEK 293 T-Membranfraktion.** NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde unter Verwendung des Vektors pCG07 in HEK 293 T-Zellen exprimiert und die geernteten Zellen fraktioniert. Mit Hilfe einer Ni-NTA-AC (II) wurde NS5A  $\Delta$ D2+3 aus der Membranfraktion isoliert. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) und WB (B) untersucht. Die Immundetektion von NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 9x-His-tag des Proteins durchgeführt. NS5A  $\Delta$ D2+3 ist mit  $\blacktriangleleft$  markiert. Die stärkste Verunreinigung ist mit \* gekennzeichnet. M: Marker, MF tau: Aufgetaute Membranfraktion, Ü Ink: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose, W1:1. Waschschrift, W5: 5. Waschschrift, E6-E9: Eluatfraktionen mit höchster Proteinkonzentration, B: Ni-NTA-Agarose nach der Elution.

Fehlende Banden in der Probe des Überstands nach der Inkubation mit der Ni-NTA-Agarose (B, Ü Ink) und in der Probe der Agarose nach der Elution (B, Gelspur B) weisen auf eine gute *Bead*-Bindung und Elution hin. Im Vergleich zur Expression von NS5A fl durch Konstrukt pCG01 (Abbildung 29) waren in der Coomassie-Färbung (A) intensivere Banden zu beobachten, obwohl in der Probe der aufgetauten Membranfraktion (B, MF tau) eine weniger intensive NS5A-Bande detektiert werden konnte. Dies war vermutlich darauf zurückzuführen, dass im Vergleich zur Expression von NS5A fl auch nur die Hälfte an Zellausgangsmaterial (40 statt 80x 145 mm Ø-Zellkulturschalen) genutzt wurde. Neben dem exprimierten NS5A waren auch hier eine Vielzahl weiterer Banden zu erkennen, wovon die dominanteste (\*) auch im WB durch den verwendeten His-Antikörper detektiert werden konnte. Bei weiteren Expressionsversuchen wurde von adhärennten HEK 293 T-Zellen zu HEK 293 F-Suspensionszellen gewechselt, um eine effizientere Gewinnung von Zellausgangsmaterial zu gewährleisten. Außerdem war das Ziel, die NS5A-Expression weiter zu steigern und die Verunreinigungen im Eluat zu reduzieren.

### Wechsel von adhärennten HEK 293 T-Zellen zu HEK-293 F-Suspensionszellen

NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde wie bisher, aber nun in HEK 293 F-Zellen exprimiert. Nach der Zellernte erfolgten eine Zellfraktionierung und eine Ni-NTA-AC (s. 2.2.3.4.2., Modifikationen (II)). Der Wechsel von adhärennten Zellen zu Suspensionszellen war erfolgreich und NS5A  $\Delta$ D2+3 konnte auch in HEK 293 F exprimiert werden (vgl. Abb. 31 und 32).



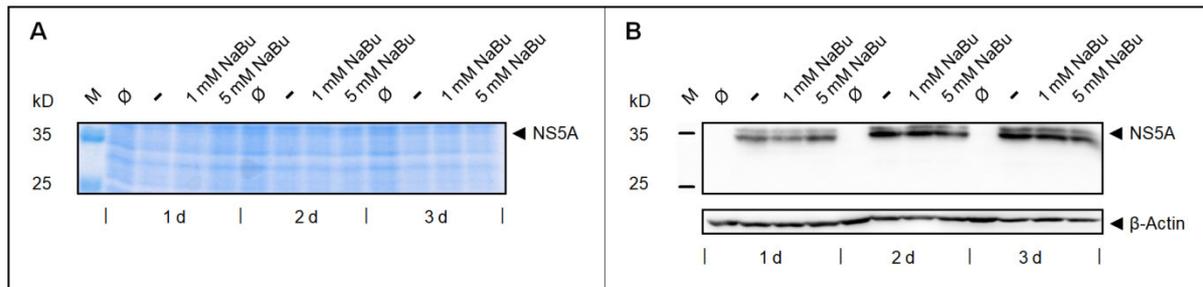
**Abbildung 32: Ni-NTA-AC von NS5A  $\Delta$ D2+3 (pCG07) aus HEK 293 F-Membranfraktion.** Für die Expression von NS5A  $\Delta$ D2+3 wurden HEK 293 F-Zellen mit Vektor pCG07 transfiziert. Im Anschluss wurden die geernteten Zellen fraktioniert. Mit Hilfe einer Ni-NTA-AC (II) wurde NS5A  $\Delta$ D2+3 aus der Membranfraktion isoliert. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) sowie WB (B) untersucht. NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 9x-His-tag des Proteins immundetektiert. NS5A  $\Delta$ D2+3 ist mit  $\blacktriangleleft$  markiert. Die im WB dominanteste Verunreinigung ist mit \* gekennzeichnet. M: Marker, MF tau: Aufgetaute Membranfraktion, Ü Ink: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose, W1: 1. Waschschrift, W5: 5. Waschschrift, E6-E9: Eluatfraktionen mit höchster Proteinkonzentration, B: Ni-NTA-Agarose nach der Elution.

Wie bei Verwendung von HEK 293 T-Zellen konnten Banden passender Größe ( $\blacktriangleleft$ ) mit Hilfe eines gegen das 9x His-tag gerichteten monoklonalen Antikörpers in den Eluatproben der Ni-NTA-AC detektiert werden. Die Etablierung der Expression in HEK 293 F-Zellen erfolgte zunächst bei einer kleineren Menge an Ausgangsmaterial von 100 ml Suspensionskultur mit etwa  $2,4 \cdot 10^6$  Zellen pro ml, was ca. zwölf konfluent bewachsenen 145 mm  $\varnothing$ -Zellkulturschalen entspricht. Die geringere Bandenintensität in der Coomassie-Färbung (A) beim Vergleich mit Abbildung 31 ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass in Abbildung 31 bei Expression in HEK 293 T-Zellen vierzig konfluent bewachsene 145 mm  $\varnothing$ -Zellkulturschalen als Ausgangsmaterial benutzt wurden. Durch Expression von NS5A in Suspensionszellkultur bestand nun die Möglichkeit auf einfachere und umfangreichere Weise das Zellausgangsmaterial zu erhöhen, als es bei adhärenenten HEK 293 T-Zellen der Fall gewesen wäre. Allerdings brachte eine Erhöhung des Ausgangsmaterials auf bis zu insgesamt 800 ml (s. 2.2.3.2.) keine deutliche Erhöhung der NS5A-Ausbeute (keine Abb. gezeigt).

### Effekt von Natriumbutyrat

Um die Expression von NS5A weiter zu verbessern, wurde der Einfluss von NaBu untersucht. Nach Gorman und Howard (1983) ist NaBu in der Lage die rekombinante Proteinexpression zu steigern. Die verminderte Transkription extrachromosomaler DNA durch deren Assoziation mit deacetylierten Histonen (Riu et al., 2007) kann durch den Histondeacetylase-Inhibitor NaBu behoben werden (Backliwal et al., 2008).

Ein möglicher Einfluss von NaBu auf die Expression von NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde in HEK 293 F-Zellen untersucht. NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde in den Suspensionszellen unter Zugabe verschiedener Mengen NaBu exprimiert. Die Ernte fand zu den Zeitpunkten von ein, zwei und drei Tagen nach der Transfektion statt. Die entsprechenden Zelllysate wurden nach ihrer Auftrennung durch eine SDS-PAGE über Coomassie-Färbung und WB miteinander verglichen (s. Abb. 33).



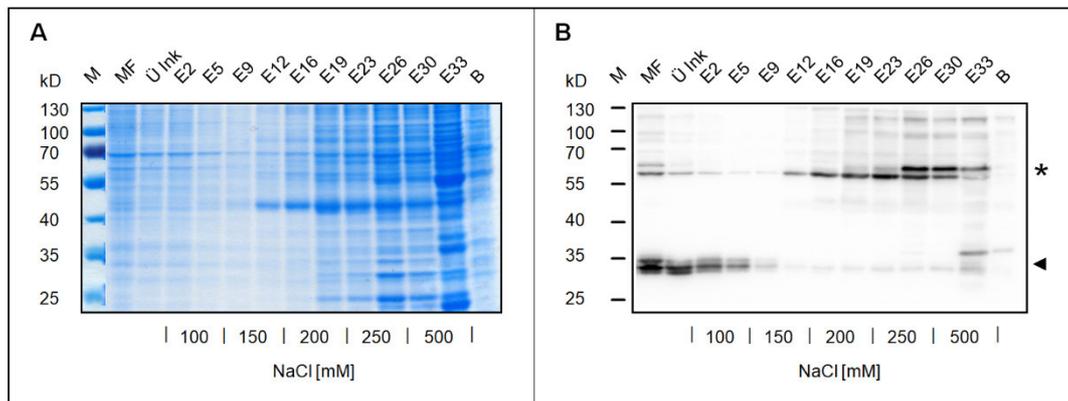
**Abbildung 33: Einfluss von Natriumbutyrat auf die Expression von NS5A  $\Delta$ D2+3 (pCG07) in HEK 293 F-Zellen zu verschiedenen Erntezeiten.** NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde unter Verwendung des Vektors pCG07 in HEK 293 F-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden einen, zwei und drei Tage (1 d, 2 d und 3 d) nach der Transfektion mit PEI geerntet. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen ( $\emptyset$ ) geerntet. Während der Kultivierung wurde entweder kein (-), 1 mM oder 5 mM Natriumbutyrat (NaBu) zugegeben. Zur Untersuchung der Expression wurden Zelllysate gleicher Volumina in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) sowie WB (B) analysiert. NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 9x-His-tag des Proteins immundetektiert. Die Immundetektion von  $\beta$ -Actin mit einem monoklonalen Antikörper diente als Ladekontrolle.

Die Coomassie-Färbung (A) wurde mit EZBlue Gel Staining Reagent durchgeführt, bei der Immundetektion (B) wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das NS5A-His-tag verwendet. Als Kontrollen wurden untransfizierte Zellen ( $\emptyset$ ) und Zellen, bei denen kein NaBu zugegeben wurde (-), genutzt. Die Detektion von  $\beta$ -Actin mit monoklonalem Antikörper diente als Ladekontrolle. In der Coomassie-Färbung war im Vergleich zu Lysaten untransfizierter Zellen kaum eine Proteinbande mit der erwarteten Größe von NS5A  $\Delta$ D2+3 ( $\blacktriangleleft$ ) zu erkennen. Auch bei Zugabe von 1 und 5 mM NaBu war das nicht der Fall. Die verschiedenen Erntezeiten von einem, zwei und drei Tagen nach der Transfektion (1 d, 2 d und 3 d) hatten ebenfalls keine Auswirkungen. Im WB konnte im Lysat untransfizierter Zellen keine Bande detektiert werden. Die Zugabe von 1 und 5 mM NaBu (nach Backliwal et al., 2008) führte zu keinen intensiveren Banden und somit zu keiner gesteigerten NS5A-Expression. In Hinsicht auf die verschiedenen Erntezeiten war festzustellen, dass die Banden zwei Tage nach der Transfektion intensiver als einen Tag nach der Transfektion waren. Beim Vergleich von zwei und drei Tagen war keine weitere Steigerung mehr zu beobachten. Für weitere Expressionsversuche wurde auf NaBu verzichtet, da es

keinen Effekt zeigte. Die Erntezeit wurde für die Expression in HEK 293 F-Zellen von einem Tag auf zwei Tage nach der Transfektion erhöht.

### Kombination von IC und Ni-NTA-AC

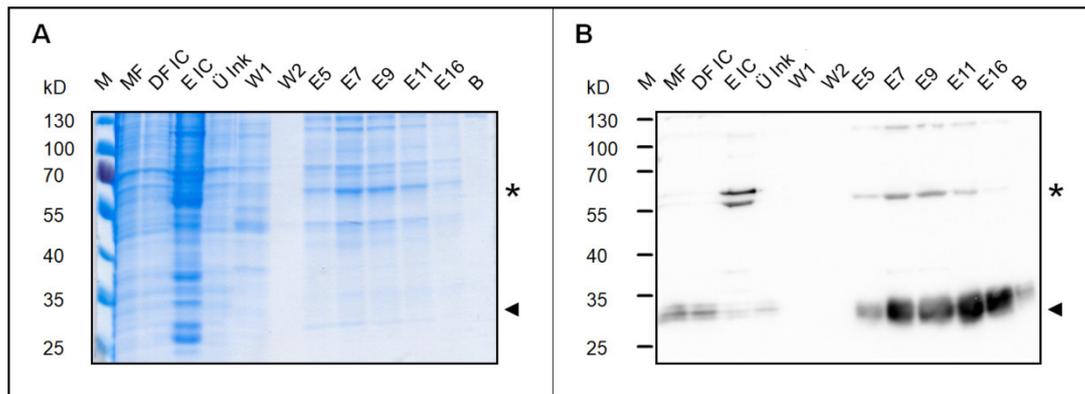
Um bei der Ni-NTA-AC-Reinigung von NS5A  $\Delta$ D2+3 aus der HEK 293 F-Membranfraktion Verunreinigungen zu reduzieren (s. Abb. 32), wurde eine zusätzliche IC (s. 2.2.3.4.2.) verwendet. Vorab wurde analysiert bei welcher NaCl-Molarität NS5A  $\Delta$ D2+3 im Rahmen einer IC eluiert wird. Zu diesem Zweck wurde NS5A  $\Delta$ D2+3 wie bisher in HEK 293 F-Zellen exprimiert und die Zellen fraktioniert. Danach wurde eine IC mit Sulfopropyl (SP)-Kationenaustauscher durchgeführt. Bei der Elution wurde die NaCl-Molarität schrittweise von 100 bis 500 mM erhöht. Während der IC entnommene Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und danach mit Coomassie-Färbung und WB weiter untersucht (s. Abb. 34).



**Abbildung 34: IC von NS5A  $\Delta$ D2+3 (pCG07) aus HEK 293 F-Membranfraktion.** NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde unter Verwendung des Vektors pCG07 in HEK 293 F-Zellen exprimiert und die geernteten Zellen fraktioniert. Im Rahmen einer IC mit Sulfopropyl-Kationenaustauscher wurde NS5A  $\Delta$ D2+3 aus der Membranfraktion isoliert. Die IC erfolgte mit einem steigenden NaCl-Gradienten von 100 - 500 mM. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) sowie WB (B) untersucht. Die Immundetektion von NS5A  $\Delta$ D2+3 erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 9x-His-tag des Proteins. NS5A  $\Delta$ D2+3 ist mit ◄ markiert. Verunreinigungen die ebenfalls im WB (B) detektiert werden konnten, sind mit \* markiert. M: Marker, MF: Membranfraktion, Ü Ink: Überstand nach Inkubation mit SP-Sephrose, E: Eluatfraktionen bei Elution mit verschiedenen NaCl-Molaritäten (Fraktionen fortlaufend nummeriert, sieben Fraktionen je NaCl-Molarität), B: SP-Sephrose nach der Elution.

Bei der Immundetektion wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das NS5A-His-tag genutzt. In der zu Beginn vorliegenden Membranfraktion (B, MF) konnte NS5A  $\Delta$ D2+3 passender Größe (◄) detektiert werden. Bei Vergleich mit der Bandenintensität der Probe nach der Inkubation mit dem SP-Kationenaustauscher (B, Ü Ink) wird deutlich, dass bei der NaCl-Ausgangsmolarität von 100 mM NS5A nur mäßig binden konnte. Mit den ersten Elutionsschritten bei 100 mM NaCl konnte gebundenes NS5A fast vollständig eluiert werden (B, E2, E5). Zugehörige NS5A  $\Delta$ D2+3-Banden waren in der Coomassie-Färbung (A) nicht zu erkennen. Allerdings sah man hier, dass der größte Teil möglicher Verunreinigungen erst bei

höheren NaCl-Molaritäten von 200 - 500 mM eluiert wurde. Von besonderer Bedeutung waren dabei Proteine von etwa 60 - 65 kD, die auch durch den His-Antikörper im WB (**B**, \*) detektiert werden konnten. Daher wurde beschlossen, statt typischerweise das Zielprotein, die Verunreinigungen an der Ionenaustauschmatrix binden zu lassen. Für das IC-Hauptexperiment wurde die Membranfraktion bei 150 mM NaCl mit SP-Sepharose inkubiert und mit dem Durchfluss eine nachfolgende Ni-NTA-AC (Modifikationen (III)) durchgeführt (s. Abb. 35).



**Abbildung 35: IC und Ni-NTA-AC von NS5A  $\Delta$ D2+3 (pCG07) aus HEK 293 F-Membranfraktion.** NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde unter Nutzung des Vektors pCG07 in HEK 293 F-Zellen exprimiert und die geernteten Zellen fraktioniert. Im Rahmen einer IC verblieb NS5A im Durchfluss und wurde durch eine folgende Ni-NTA-AC aus diesem isoliert. Bei IC und Ni-NTA-AC wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (**A**) sowie WB (**B**) analysiert. Für die Immundetektion von NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das 9x-His-tag des Proteins verwendet. NS5A  $\Delta$ D2+3 ist mit ◄ markiert. Die dominanteste verbliebene Verunreinigung ist mit \* gekennzeichnet. M: Marker, MF: Membranfraktion, DF/IC: Durchfluss nach Inkubation mit SP-Sepharose, E/IC: Eluat bei IC, Ü Ink: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose, W1: 1. Waschschrift, W2: 2. Waschschrift, E: Eluatfraktionen des Fraktionsbereichs mit der höchsten Proteinkonzentration, B: Ni-NTA-Agarose nach der Elution.

Banden der berechneten Größe von NS5A  $\Delta$ D2+3 (◄) konnten im WB (**B**) detektiert werden. Wie durch das Vorexperiment erwartet, war NS5A nicht nur im Ausgangsmaterial in Form der HEK 293 F - Membranfraktion (**B**, MF) zu finden. Es wurde auch im Durchfluss nach der IC bei 150 mM NaCl (**B**, DF/IC) festgestellt. Bei der Kontrollelution der SP-Sepharose mit 500 mM NaCl (**A**, E/IC) fand sich eine Vielzahl an möglichen Verunreinigungen, die erfolgreich mittels IC für die folgende Ni-NTA-AC eliminiert wurden. Bei der folgenden Ni-NTA-AC war die Bindung von NS5A  $\Delta$ D2+3 aus dem Durchfluss der IC an die Ni-NTA-Agarose erfolgreich. Es war nur eine schwache Bande in der Probe des Überstands nach der Inkubation mit der Ni-NTA-Agarose (**B**, Ü Ink) zu beobachten. Es konnten sehr intensive Banden mit zu NS5A  $\Delta$ D2+3 passender Größe in den Eluatproben im WB detektiert werden (**B**, E5, E7, E9, E11, E16). Allerdings waren dazu passende Banden in der Coomassie-Färbung nicht zu erkennen (**A**). Vielmehr waren hier weiterhin viele intensive

Verunreinigungen zu sehen. Die intensivste Verunreinigung (\*) war auch über den His-Antikörper im WB detektierbar.

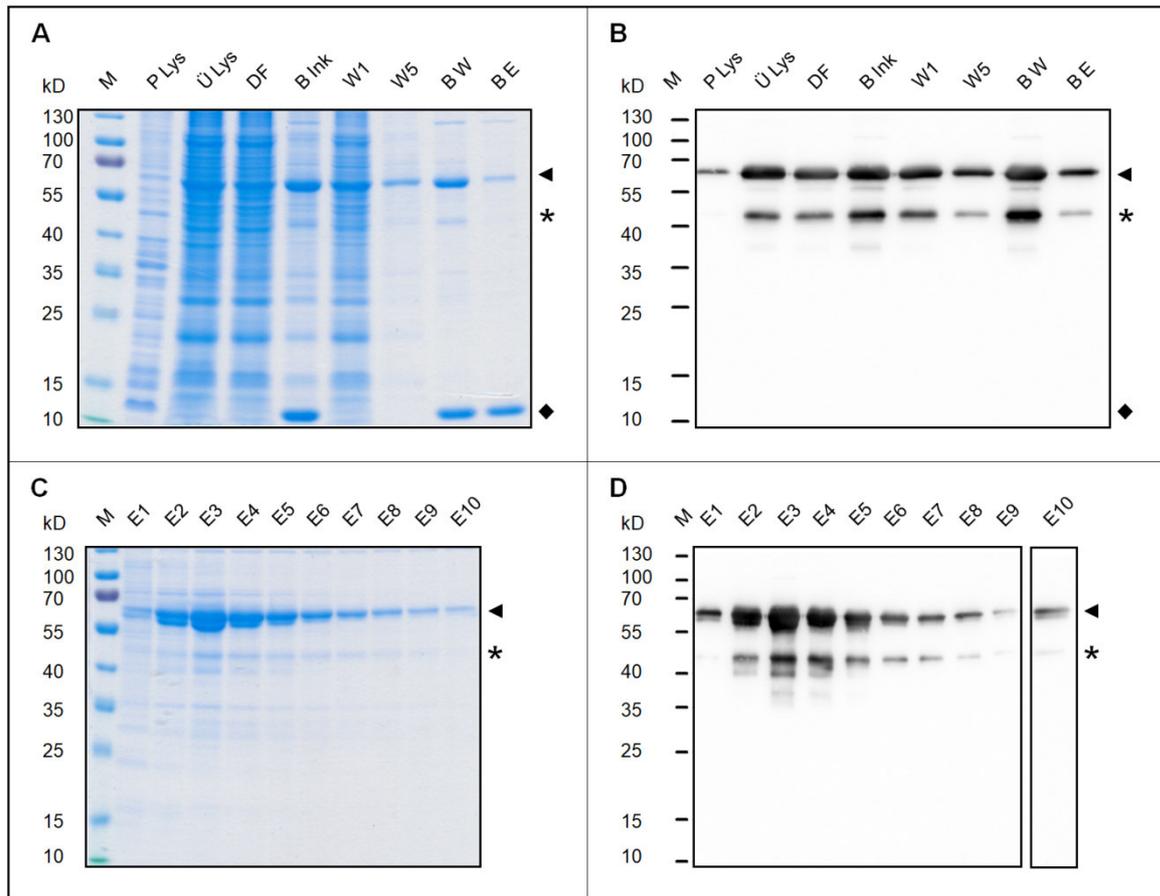
Zusammenfassend konnten die Expression von NS5A im Säugetierzellsystem und die Reduzierung der Verunreinigungen bei dessen Reinigung nicht ausreichend verbessert werden, sodass Versuche zur Herstellung von rekombinantem NS5A in diesem Zellsystem eingestellt wurden.

### **3.1.3. Baculovirus-Insektenzellsystem**

Im Gegensatz zu bakteriellem System (3.1.1.) und Säugetierzellsystem (3.1.2.) war es schließlich möglich, NS5A Baculovirus-vermittelt in Sf9-Insektenzellen zu exprimieren und mit adäquater Menge und Reinheit in ganzer Länge (*full length*, fl) sowie mit deletierten Domänen 2 und 3 ( $\Delta D2+3$ ) zu isolieren. Im Folgenden sind exemplarisch Coomassie-Färbungen und WBs zu den Reinigungen von NS5A fl und  $\Delta D2+3$  sowie Abbildungen der zugehörigen Bestimmungen von Proteinkonzentrationen gezeigt.

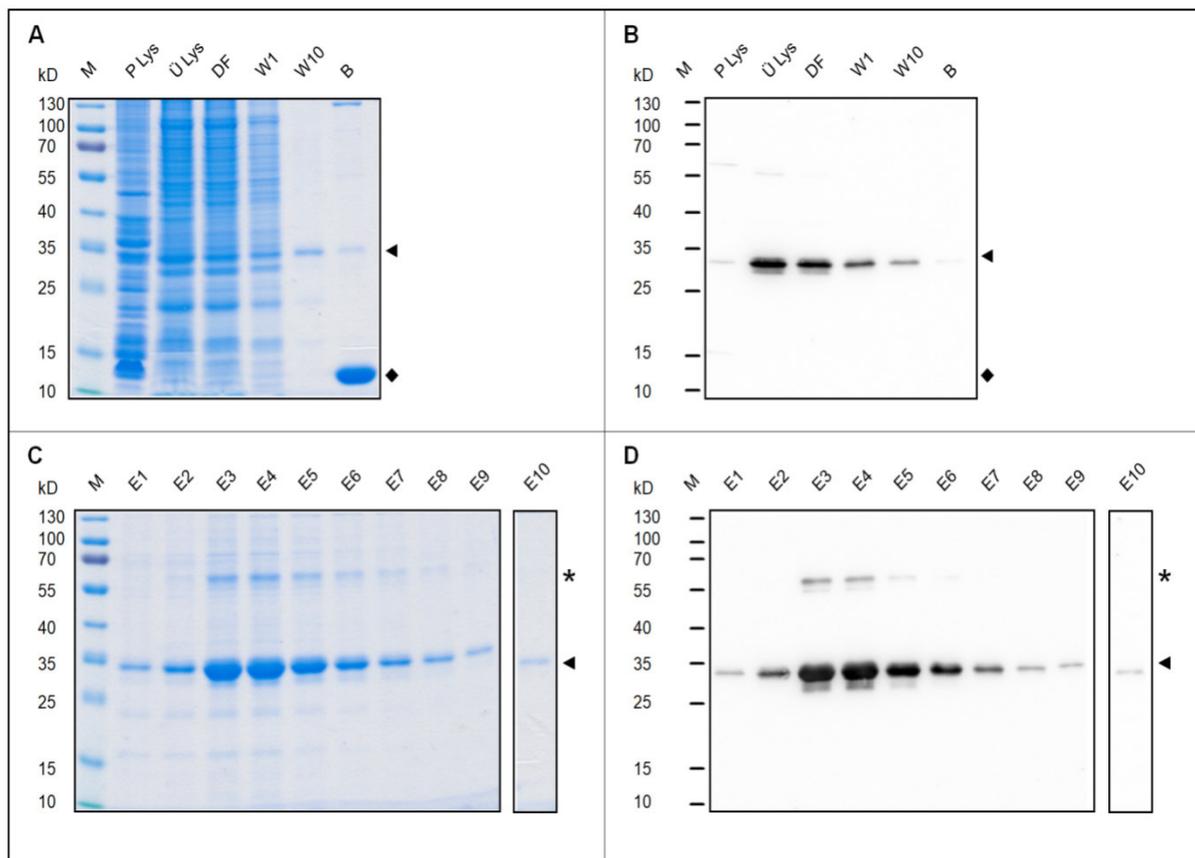
#### **Baculovirus-vermittelte Expression von NS5A fl und $\Delta D2+3$ in Sf9-Zellen unter Verwendung der Vektoren pVL941 Strep-NS5A-V5 bzw. pVL941 Strep-NS5A $\Delta D2+3$ und Reinigung mit StrepTactin-AC bei vorausgehender Zellfraktionierung**

Die beiden NS5A-Varianten fl und  $\Delta D2+3$  wurden mit Hilfe ihrer Vektoren unter Nutzung von Baculoviren in Sf9-Insektenzellen exprimiert. Nach der Zellfraktionierung der Zelllysate wurden sie über ihre N-terminalen Strep-tags mit einer StrepTactin-AC aus den Membranfraktionen isoliert. Dabei gewonnene Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und weiterführend mit Coomassie-Färbung und WB untersucht. Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden Proben vereinigten Eluats zusammen mit BSA bekannter Masse (125 ng bis 1  $\mu$ g) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden über Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Densitometrisch wurden BSA-Standardgeraden erstellt, mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen der Eluate berechnet wurden. Die Immundetektionen (**B**, **D**) von NS5A erfolgten im Fall von NS5A fl (s. Abb. 36) mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen). Bei den WBs zu NS5A  $\Delta D2+3$  (s. Abb. 37) wurde ein Antikörper gegen das NS5A-Strep-tag verwendet.



**Abbildung 36: StrepTactin-AC von NS5A fl (pVL941 Strep-NS5A-V5) exprimiert in Sf9-Zellen.** NS5A fl wurde Baculovirus-vermittelt unter Nutzung des Vektors pVL941 Strep-NS5A-V5 in Sf9-Zellen exprimiert. Es wurde aus der Membranfraktion von Zelllysat im Rahmen einer StrepTactin-AC isoliert. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A, C) und WB (B, D) untersucht. Nur beim unlöslichen Bestandteil des Lysats (P Lys) wurde ein Viertel des Volumens der anderen Proben eingesetzt. Bei den WBs wurde für die Immundetektion von NS5A ein monoklonaler Antikörper gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen) verwendet. NS5A fl ist mit ◀ markiert. Die stärkste Verunreinigung ist mit \* gekennzeichnet. Strep-Tactin (◆) ist bei Proben der Strep-Tactin-Sepharose (B Ink, B W, B E) zu erkennen. M: Marker, P Lys: Unlöslicher Bestandteil des Lysats, Ü Lys: Überstand des Lysats, DF: Durchfluss nach Inkubation mit Sepharose, B Ink: Sepharose nach Inkubation mit Lysat, W1: 1. Waschschrift, W5: 5. Waschschrift, B W: Sepharose nach Waschschriften, B E: Sepharose nach Elution, E1-E10: Eluatfraktionen.

Sowohl bei NS5A fl (s. Abb. 36) als auch bei NS5A  $\Delta$ D2+3 (s. Abb. 37) wurden im WB Banden erwarteter molekularer Masse (◀) detektiert. Entsprechende deckungsgleiche Banden waren auch in den zugehörigen Coomassie-Färbungen festzustellen. Es war kaum NS5A in den Proben mit unlöslichen Bestandteilen des Lysats (B, P Lys) zu finden. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei diesen Proben nur ein Viertel des Volumens der anderen Proben aufgetragen wurde, damit in der Coomassiefärbung nicht zu viel Protein vorlag. Wie anhand der Bandenintensitäten der Durchflussproben (B, DF) zu erkennen, besteht noch ein möglicher Optimierungsbedarf bei der Bindung an die Strep-Tactin-Sepharose.



**Abbildung 37: StrepTactin-AC von NS5A  $\Delta$ D2+3 (pVL941 Strep-NS5A  $\Delta$ D2+3) exprimiert in Sf9-Zellen.** NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde Baculovirus-vermittelt unter Nutzung des Vektors pVL941 Strep-NS5A  $\Delta$ D2+3 in Sf9-Zellen exprimiert. Es wurde aus der Membranfraktion von Zelllysat im Rahmen einer StrepTactin-AC isoliert. Dabei wurden Proben gleicher Volumina entnommen, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A, C) und WB (B, D) untersucht. Bei den WBs wurde für die Immundetektion von NS5A  $\Delta$ D2+3 ein monoklonaler Antikörper gegen das Strep-tag des Proteins verwendet. NS5A  $\Delta$ D2+3 ist mit  $\blacktriangleleft$  markiert. Die stärkste Verunreinigung ist mit \* gekennzeichnet. Strep-Tactin ( $\blacklozenge$ ) ist bei der Probe der Strep-Tactin-Sepharose (B) zu erkennen. M: Marker, P Lys: Unlöslicher Bestandteil des Lysats, Ü Lys: Überstand des Lysats, DF: Durchfluss nach Inkubation mit Sepharose, W1: 1. Waschschrift, W10: 10. Waschschrift, B: Sepharose nach der Elution, E1-E10: Eluatfraktionen.

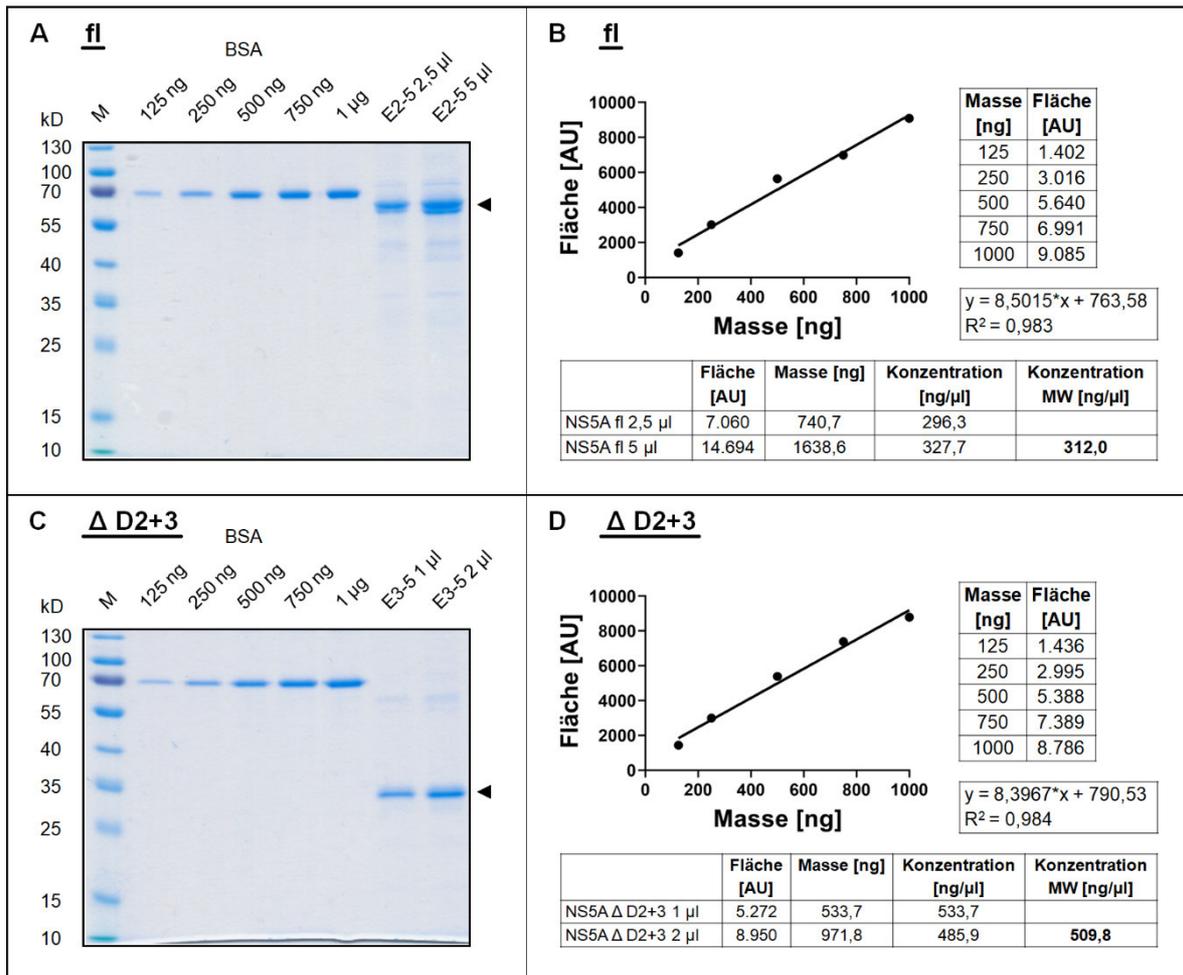
Die bei der Reinigung von NS5A fl zusätzlich entnommenen Proben von Strep-Tactin-Sepharose nach dem Durchfluss des Zelllysats (s. Abb. 36, A und B, B Ink) und nach den Waschschriften (s. Abb. 36, A und B, B W) zeigten allerdings immer noch ausreichend vorhandenes NS5A. In Hinsicht auf die Elution war im Fall von NS5A fl vergleichsweise wenig und bei NS5A  $\Delta$ D2+3 nahezu kein verbliebenes Protein (s. Abb. 36 B, B E und Abb. 37 B, Gelspur B) festzustellen. Bei diesen Proben war in den Coomassie-Färbungen jedoch immer eine Bande von  $\sim 10$  kD ( $\blacklozenge$ ) zu erkennen, bei der es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Strep-Tactin handelt. Auch waren noch vergleichsweise kleine Verunreinigungen (\*) zu erkennen.

Im Fall von NS5A fl waren schwache zusätzliche Banden von  $\sim 40$  bis 45 kD in der Coomassiefärbung festzustellen (s. Abb. 36 A und C \*). Entsprechende Banden gleicher

Größe waren auch im zugehörigen WB zu beobachten (s. Abb. 36 **B** und **D**). Dabei könnte es sich um unvollständig translatiertes oder im Verlauf der Reinigung fragmentiertes NS5A handeln. So weisen, berechnet mit ExPASy Compute pI/Mw, die molekularen Massen von NS5A  $\Delta$ D3 und von NS5A  $\Delta$ LCS2+D3 (vgl. Abb. 8, 1.3.1.) mit  $\sim 39$  und  $41$  kD etwa passende Größen auf. Der N-terminale Strep-*tag* wäre vorhanden, um eine Reinigung mit StrepTactin-AC zu ermöglichen. Der gegen den Großteil von LCS1 und den N-terminalen Bereich von D2 (a.a. 218-328) gerichtete monoklonale NS5A-Antikörper (ViroGen) (s. Tab. 14, 2.1.15.) könnte im WB erfolgreich binden. Wegen der auch in anderen WB beobachteten hohen Sensitivität des NS5A-Antikörpers wirken die zusätzlichen Banden im WB sehr intensiv (s. Abb. 36 **B** und **D**, 3.1.3.). Bei Betrachtung der Coomassiefärbungen (s. Abb. 36 **A** und **C**, 3.1.3.) wird jedoch deutlich, dass es sich im Vergleich zum hauptsächlich hergestellten NS5A fl um geringe, zu vernachlässigende Mengen handelt.

Auch im Fall der Expression und Reinigung von NS5A  $\Delta$ D2+3 ist eine schwache weitere Bande in der Coomassiefärbung und im WB zu erkennen (s. Abb. 37, **C** und **D\***). Wäre die Bande allein in der Coomassiefärbung zu finden, könnte es sich bei ihrer Größe von  $\sim 60$  kD um HSP60 der Sf9-Zellen handeln (King und MacRae, 2015). Da jedoch eine Bande entsprechender Größe auch im WB zu erkennen ist, wäre eine andere Möglichkeit, dass es bei der Verwendung des Vektors pVL941 Strep-NS5A  $\Delta$ D2+3 (s. Tab. 9, 2.1.10.) trotz der Insertion von drei Stopp-Codons zwischen der Sequenz für LCS1 und D2 zu einer geringen Expression von NS5A fl kommt. Bei einer Überprüfung der Bandenidentität mit NS5A-Antikörper (ViroGen) im WB konnte die Bande allerdings nicht detektiert werden (keine Abb. gezeigt). Es muss sich folglich um eine andere Verunreinigung handeln, die ein dem Strep-*tag* ähnelndes Motiv aufweist. Unabhängig von ihrer ungeklärten Identität ist die Verunreinigung wegen ihrer geringen Menge im Vergleich zum produzierten NS5A  $\Delta$ D2+3 in Folgeexperimenten zu vernachlässigen.

Somit war bei NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 in den Eluatproben (**C**) ausreichend reines Protein mit passender molekularer Masse nachweisbar. Über Densitometrie und BSA-Standardgeraden (s. Abb. 38) konnten zufriedenstellend hohe Proteinkonzentrationen für NS5A fl (**A**, **B**) von  $\sim 300$  ng/ $\mu$ l und für NS5A  $\Delta$ D2+3 (**C**, **D**) von  $\sim 500$  ng/ $\mu$ l ermittelt werden.

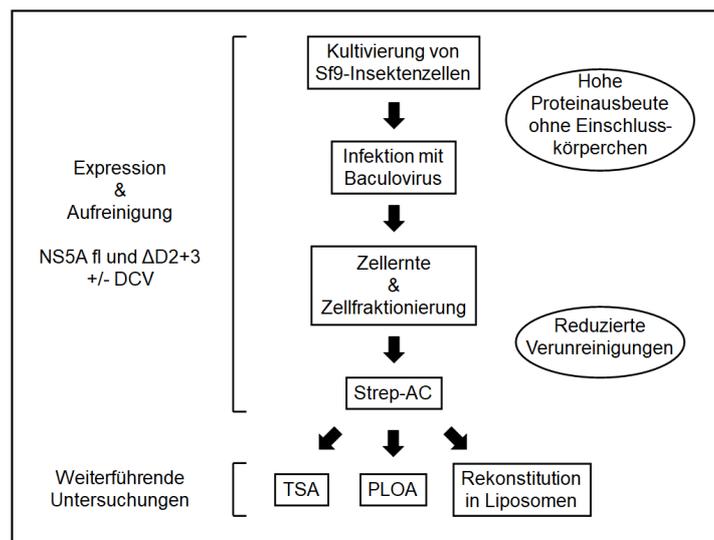


**Abbildung 38: Bestimmung der Proteinkonzentrationen von NS5A fl (pVL941 Strep-NS5A-V5-His) und NS5A ΔD2+3 (pVL941 Strep-NS5A ΔD2+3).** Durch Expression in Sf9-Zellen gewonnenes und mit StrepTactin-AC gereinigtes NS5A wurde zusammen mit einem BSA-Standard (125 ng - 1 µg) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Coomassie-Färbung mit EZBlue Staining Reagent analysiert (A, C). Die molekularen Massen von NS5A fl und ΔD2+3 sind mit ◀ markiert. (B, D) Durch Densitometrie wurden anhand der Bandenintensitäten der BSA-Proben (gemessen in *arbitrary units* (AU)) Standardgeraden erstellt, durch die über die Bandenintensität der vereinigten Eluatfraktionen (fl: E2-5, ΔD2+3: E3-5) die Proteinkonzentrationen von NS5A fl und ΔD2+3 ermittelt wurden. Die Funktionsgleichungen der Standardgeraden sowie die Bestimmtheitsmaße ( $R^2$ ) sind aufgeführt. Bei fl wurden 2,5 und 5 µl des Eluats und bei ΔD2+3 1 und 2 µl untersucht. Abschließend wurde bei beiden NS5A-Varianten ein Mittelwert (MW) der Proteinkonzentrationen gebildet.

Für einen Vergleich der Ausbeute von NS5A fl und ΔD2+3 muss berücksichtigt werden, dass Eluate geringerer Proteinmenge nicht mit vereinigt wurden. Durch densitometrische Bestimmung der Bandenintensitäten aller Eluatfraktionen, wurden basierend auf den bestimmten Mengen an NS5A aus vereinigtem Eluat nachträglich die gesamten Proteinmassen abgeschätzt. Für die exemplarisch aufgezeigten Reinigungen (s. Abb. 36 u. 37) ergaben sich bei 1 L Sf9-Zellsuspension an Ausgangsmaterial Ausbeuten für NS5A fl von ~ 430 µg entsprechend ~ 8 nmol und für NS5A ΔD2+3 von ~ 600 µg entsprechend ~ 21 nmol. Die höhere Ausbeute bei NS5A ΔD2+3 weist auf eine mögliche Erschwernis der NS5A-Expression durch die nativ ungefalteten Domänen D2+3 hin. Demnach war es

prinzipiell ein guter Ansatz, die NS5A-Expression im bakteriellen System und Säugetierzellsystem durch Deletion von D2 und D3 verbessern zu wollen (s. 3.1.1. und 3.1.2.). Nur führte es insbesondere im Säugetierzellsystem nicht zu einer ausreichenden Verbesserung.

Zusammenfassend konnte eine Methode zur Herstellung des Membranproteins NS5A etabliert werden (s. Abb. 39), welche die Produktion von NS5A fl und  $\Delta D2+3$ , ohne und mit Zugabe von DCV, in hoher Menge und Reinheit sicherte und Folgeexperimente wie TSA, PLOA und die Rekonstitution in Liposomen ermöglichte.



**Abbildung 39: Übersicht zur Herstellung von NS5A fl und  $\Delta D2+3$  im Baculovirus-vermittelten Sf9-Insektenzellsystem und Folgeversuchen.** NS5A fl: NS5A *full length*, NS5A  $\Delta D2+3$ : Trunkierte Version von NS5A mit deletierten Domänen D2 und D3, DCV: NS5A-Inhibitor Daclatasvir, Strep-AC: StrepTactin-Affinitätschromatographie, TSA: *Thermal shift assay*, PLOA: *Protein lipid overlay assay*;

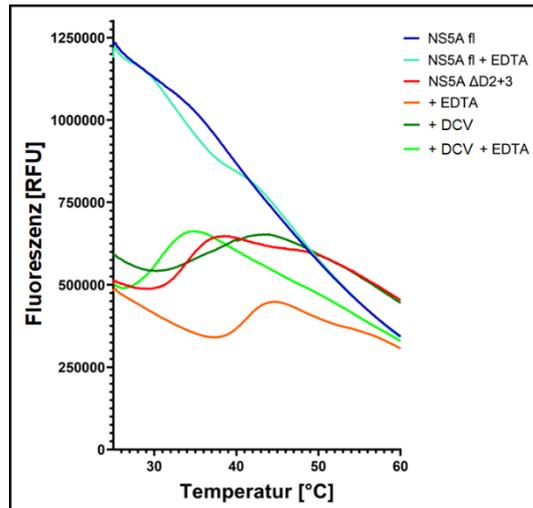
Durch den Wechsel zur Baculovirus-vermittelten Expression in Sf9-Insektenzellen konnte im Vergleich zum Säugetierzellsystem die Proteinausbeute deutlich gesteigert werden, ohne dass wie im bakteriellen System die Gefahr von Einschlusskörperchen bestand. Die bereits im Umgang mit HEK 293 F-Zellen gewonnenen Erfahrungen mit Suspensionszellen konnten für die Kultivierung der Sf9-Insektenzellen genutzt werden. Die bei der Expression im Säugetierzellsystem etablierte Zellfraktionierung konnte bei der Herstellung von NS5A aus Sf9-Insektenzellen übernommen werden. Zusätzlich konnten im Vergleich zum bakteriellen System und Säugetierzellsystem Verunreinigungen durch einen Wechsel von Ni-NTA-AC zu Strep-AC nahezu vollständig eliminiert werden.

### 3.2. Protein-Stabilität und Einfluss des NS5A-Inhibitors Daclatasvir und des Zink-Chelators EDTA auf die Faltung von NS5A

Die exakten Details des Wirkmechanismus von NS5A-Inhibitoren sind bis heute noch nicht aufgeklärt (s. 1.6.). Unter Verwendung von gereinigtem NS5A (s. 3.1.3.) kann der molekulare Mechanismus untersucht werden. Eine Hypothese wäre, dass der Inhibitor, in den vorliegenden Untersuchungen DCV, durch Bindung an das Protein dessen Konformation ändert oder das eventuell bereits durch eine Bindung an das NS5A-Protein während der Synthese die Proteinfaltung beeinträchtigt wird.

Mit Hilfe des in diesem Labor gut etablierten TSAs kann der Grad der Denaturierung eines Proteins in Abhängigkeit von schrittweise steigender Temperatur über die Fluoreszenz eines hydrophobe Regionen bindenden Fluorophors bestimmt werden (s. 2.2.3.8.7.). Der dabei bestimmbare  $T_m$ -Wert dient als Maß für die thermische Stabilität. Unterschiede in der thermischen Stabilität können auf unterschiedlich stabile Proteinfaltungen bzw. verschiedene Konformationen hinweisen. Somit ist der TSA geeignet für die Untersuchung möglicher Effekte von DCV auf die Faltung von NS5A. Die Bindung von Zink ist ebenfalls für die korrekte Faltung des Metalloproteins NS5A (s. 1.3.1.) von großer Bedeutung. Deshalb wurde zusätzlich der Effekt des Zink-Chelators EDTA im TSA untersucht.

Im Rahmen der TSAs wurde die thermische Stabilität von NS5A fl und  $\Delta D2+3$  (s. 3.1.3.) bestimmt. Zur Untersuchung eines Effekts von DCV wurde NS5A  $\Delta D2+3$  mit und ohne Zugabe von 10 nM DCV bei der Expression und Reinigung hergestellt. Zur Überprüfung eines Einflusses des Zink-Chelators EDTA wurde zu Beginn der TSAs entweder kein oder 10 mM EDTA zugegeben. Die Bestimmung der Schmelzkurven erfolgte je Versuchsbedingung im Triplikate. Bei den Schmelzkurven der verschiedenen Bedingungen wurden die Kurvenwerte der Triplikate gemittelt dargestellt (s. Abb. 40).

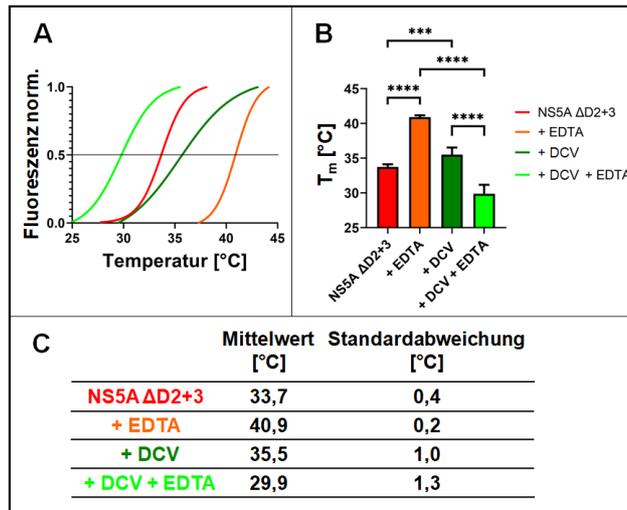


**Abbildung 40: Schmelzkurven von NS5A fl und NS5A  $\Delta$ D2+3 mit und ohne Zugabe von EDTA sowie NS5A-Inhibitor DCV.** Das Schmelzverhalten von NS5A fl und NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde unter verschiedenen Bedingungen im TSA ermittelt. Beide NS5A-Varianten wurden in Sf9-Zellen exprimiert und mit StrepTactin-AC aus Membranfraktionen der Zellysate isoliert. Für die Expression von NS5A fl wurde Vektor pVL941 Strep-NS5A-V5 und für die der Deletionsmutante Vektor pVL941 Strep-NS5A  $\Delta$ D2+3 verwendet. Bei NS5A fl wurde der Effekt von 10 mM EDTA auf die Thermostabilität untersucht. Im Fall von NS5A  $\Delta$ D2+3 wurden zusätzlich zur Untersuchung des Effekts von 10 mM EDTA im TSA, die Auswirkungen von 10 nM Daclatasvir (DCV) während der Proteinexpression und -reinigung analysiert. Es ist jeweils exemplarisch die gemittelte Kurve eines Versuchs unter Durchführung von Triplikaten dargestellt.

### NS5A fl und $\Delta$ D2+3

Bei NS5A fl (dunkelblau) wurde schon zu Beginn eine hohe Fluoreszenz gemessen, die mit steigender Temperatur stetig abnahm. Dies ist wahrscheinlich auf hohe Hintergrundsignale durch Bindung des GloMelt-Farbstoffs an die ungefalteten Domänen 2 und 3 von NS5A fl (s. 1.3.1.) zurückzuführen. Die Zugabe von EDTA (hellblau) hatte keine Auswirkungen auf den Kurvenverlauf. Da eine Bestimmung der  $T_m$ -Werte wegen eines fehlenden sigmoidalen Kurvenverlaufs nicht möglich war, wurde auf weitere Versuche mit NS5A fl im TSA verzichtet. Der Einfluss von DCV-Zugabe bei Expression und Reinigung wurde ebenfalls nicht untersucht. Bei der Untersuchung von NS5A  $\Delta$ D2+3 konnten auswertbare Schmelzkurven gemessen werden. Bereits bei den nicht normalisierten Kurvenverläufen (s. Abb. 40) fällt auf, dass verschiedene  $T_m$ -Werte vorliegen.

Die TSA-Messungen wurden mit verschiedenen Herstellungschargen von NS5A  $\Delta$ D2+3 mit und ohne 10 nM DCV bei Expression und Reinigung insgesamt dreimal als Triplikate wiederholt. Die sigmoidalen Bereiche der Schmelzkurven wurden normalisiert und gemittelt (s. Abb. 41 A). Mittels Boltzmann-Gleichung (s. 2.2.3.8.7.) wurden für jede Kurve die  $T_m$ -Werte bestimmt und für die verschiedenen Versuchsbedingungen die Mittelwerte miteinander verglichen (B). Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen sind unter (C) aufgeführt.



**Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurven von NS5A ΔD2+3 mit und ohne Zugabe von EDTA sowie von NS5A-Inhibitor DCV und Vergleich der Schmelztemperaturen.** NS5A ΔD2+3, bei dem Domäne 2 und 3 deletiert vorliegen, wurde in Sf9-Zellen exprimiert und mit StrepTactin-AC gereinigt. Für die Expression wurde Vektor pVL941 Strep-NS5A ΔD2+3 verwendet. Die Schmelzkurven von NS5A ΔD2+3 wurden unter verschiedenen Bedingungen im TSA ermittelt. Dabei wurden die Effekte von 10 mM EDTA und 10 nM Daclatasvir (DCV) untersucht. Die Zugabe von EDTA erfolgte während des TSAs, wohingegen DCV während der Expression und Reinigung von NS5A ΔD2+3 hinzugefügt wurde (A). Je Bedingung wurden drei unabhängige Versuche im Triplikate durchgeführt. Die Kurven wurden innerhalb des sigmoidalen Verlaufs normalisiert und deren Mittelwerte dargestellt. Mittels Boltzmann-Gleichung wurde für jede einzelne Kurve die Schmelztemperatur  $T_m$  berechnet. Die Mittelwerte der  $T_m$ -Werte jeder Versuchsbedingung und zugehörige Standardabweichungen sind bei (B) gezeigt und unter (C) im Detail aufgeführt. Die Signifikanz der Schmelztemperaturunterschiede bei Zugabe und Fehlen von EDTA wurde für NS5A ΔD2+3 mit und ohne DCV über ungepaarten t-Test verglichen (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*\*\*\*)  $p < 0,0001$ ).

### Einfluss von DCV und EDTA auf die Proteinfaltung von NS5A ΔD2+3

Mit einer verwendeten EDTA-Molarität von 10 mM wies EDTA bei eingesetzter Proteinmenge von 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (s. 2.2.3.8.7.) einen  $\sim 1200$ -fachen molaren Überschuss gegenüber NS5A ΔD2+3 auf. Somit sollte die Zugabe von EDTA zu Beginn des TSAs trotz kurzer Inkubationszeit im Rahmen des TSAs einen Effekt auf die Stabilität von NS5A haben.

Die Zugabe von EDTA zu Beginn des TSAs hatte sowohl bei NS5A ΔD2+3 ohne Zugabe von DCV bei Expression und Reinigung (rot) als auch bei jenem mit Zugabe von DCV (+ DCV, dunkelgrün) eine signifikante Änderung des  $T_m$ -Werts ( $p < 0,0001$ ) zur Folge. Ohne Zugabe von DCV kam es zu einer Rechtsverschiebung der Schmelzkurve (A, vgl. rot und orange) und höherem  $T_m$ -Wert (B, orange), wohingegen sich bei Zugabe von DCV zu Expression und Reinigung bei späterer Zugabe von EDTA zu Beginn des TSAs eine Linksverschiebung der Schmelzkurve (A, vgl. dunkelgrün und hellgrün) und ein geringerer  $T_m$ -Wert (B, hellgrün) ergaben. Auffällig ist ebenfalls ein flacherer Verlauf der Schmelzkurve bei vorhandenem DCV bei Expression und Reinigung (A, dunkelgrün). Die Zugabe von DCV bei Expression und Reinigung führte zu einer geringen Erhöhung des  $T_m$ -Werts

(vgl. rot und dunkelgrün,  $p < 0,001$ ). Im Gegensatz dazu, war der größte Unterschied ( $p < 0,0001$ ) beim Vergleich der  $T_m$ -Werte von NS5A  $\Delta D2+3$  mit zugegebenem EDTA (+ EDTA, orange) und NS5A  $\Delta D2+3$  mit DCV bei Expression und Reinigung und zugegebenem EDTA (+ DCV + EDTA, hellgrün) festzustellen.

Zusammenfassend führte die Zugabe des Zink-Chelators EDTA beim TSA nur zu einer Senkung des  $T_m$ -Werts und somit instabileren Faltung von NS5A  $\Delta D2+3$ , wenn vorab auch DCV bei der Expression und Reinigung des Proteins zugegeben worden war. War dies nicht der Fall, hatte die Zugabe von EDTA sogar eine Erhöhung des  $T_m$ -Werts und stabilere Faltung von NS5A  $\Delta D2+3$  zur Folge. Eine Zugabe von DCV bei der Expression und Reinigung ohne spätere Zugabe von EDTA beim TSA führte zu einer geringen  $T_m$ -Steigerung und einem flacheren Verlauf der Schmelzkurve. Somit hat DCV alleine zwar nur einen geringen Effekt auf die thermische Stabilität, allerdings weist sein extremer Einfluss auf die Wirkweise von EDTA dennoch auf mögliche durch DCV induzierte Konformationsänderungen hin. Mögliche Zusammenhänge von DCV, EDTA und Zink auf die Faltung von NS5A  $\Delta D2+3$  sind unter 4.2. näher erläutert.

### **3.3. Untersuchung der Lipidinteraktion von NS5A**

Wie bereits für andere membranassoziierte Proteine gezeigt (Hunte, 2005), spielen Wechselwirkungen mit Lipiden auch bei NS5A wahrscheinlich eine essenzielle Rolle in der Proteinfaltung und Funktion, sowie bei Konformationsänderungen innerhalb des Replikationszyklus. Für NS5A wurde bereits gezeigt, dass es mit  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  interagiert (Cho et al., 2015). Durch bisher nicht näher aufgeklärte komplexe Interaktionen mit Lipiden des ERs kommt NS5A eine entscheidende Rolle bei der Umstrukturierung intrazellulärer Membranen und der Ausbildung des viralen RKs zu (s. 1.2.3.). NS5A-Inhibitoren wie beispielsweise DCV (s. 1.5.2.) könnten Einfluss auf die Interaktion des Proteins mit Lipiden und intrazellulären Membranen haben und damit wesentlich zum Wirkmechanismus dieser Substanzklasse beitragen.

Mit Hilfe des gereinigten Proteins sollten im Rahmen dieser Dissertation Lipidbindungspartner von NS5A identifiziert werden (s. 1.6.). Zum *Screening* auf Protein-Lipid-Interaktionen wurden PLOAs eingesetzt. Dabei wurden die Auswirkungen von DCV überprüft und auch die Rollen verschiedener struktureller Bereiche von NS5A wie AH und der unstrukturierten Domänen D2 und D3 (s. 1.3.1.) berücksichtigt. Für weiterführende Versuche wurde ein Liposomen-Modell etabliert und die Rekonstitution von NS5A in

Liposomen verschiedener Zusammensetzungen überprüft. Des Weiteren wurden *in silico* mit Hilfe des Programms Chimera 1.14 in einem NS5A-Strukturmodell *Cluster* positiv-geladener Aminosäuren als mögliche PPI-Bindungsstellen identifiziert.

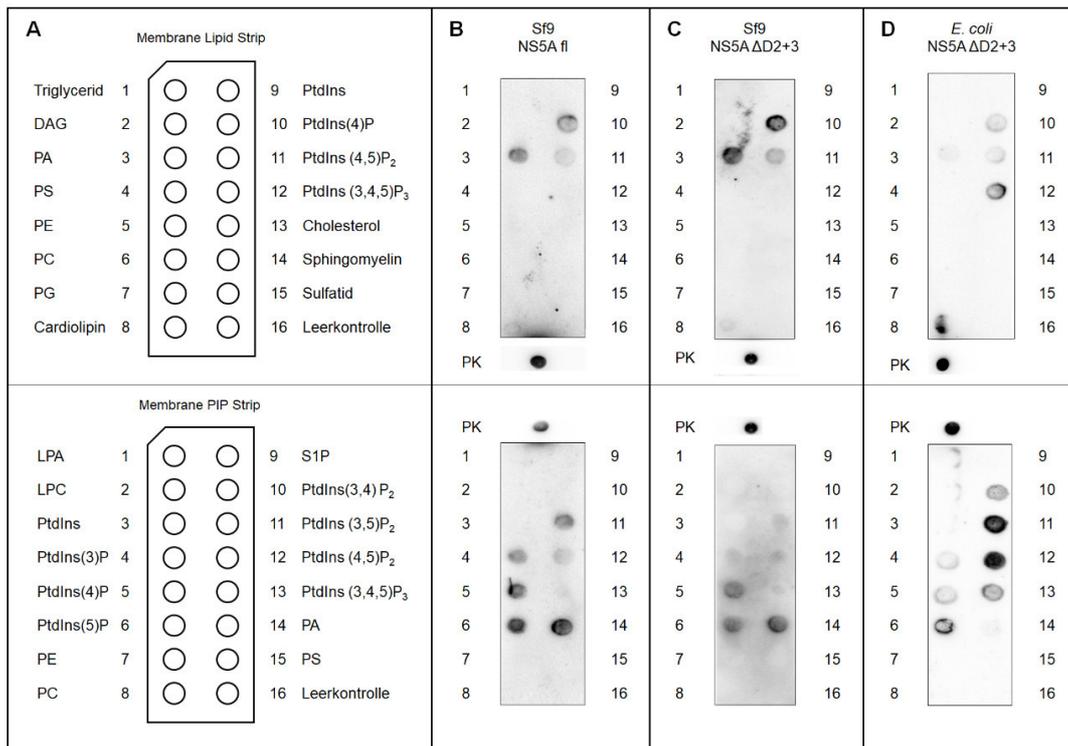
### 3.3.1. Lipidbindungspartner von NS5A im PLOA

Zur Identifikation von Lipidbindungspartnern von NS5A wurde der PLOA ausgewählt. Durch einen PLOA kann auf schnelle und einfache Weise (Dowler et al., 2002) ein *Screening* von gereinigtem NS5A auf mögliche Interaktionen mit einer Vielzahl verschiedener Lipide und Phospholipide erfolgen. Diese sind auf Membranen getropft und daran bindendes NS5A kann, vergleichbar mit einem WB, immundetektiert werden (s. 2.2.3.8.8.). Mit Hilfe von Membrane Lipid Strips und Membrane PIP Strips (s. Tab. 11, 2.1.12.) wurde die Lipid-Bindung verschiedener NS5A-Varianten im PLOA analysiert (s. Abb. 42).

Bei (A) sind die Lipidtropfschemata für Lipid Strips (oben) und PIP Strips (unten) dargestellt. Für die Detektion von NS5A fl (B) und  $\Delta D2+3$  (C) exprimiert in Sf9-Zellen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das NS5A-Strep-tag genutzt. Die Detektion von NS5A  $\Delta D2+3$  exprimiert in *E. coli* (D) erfolgte mit monoklonalem Antikörper gegen 5x-His. Als Positivkontrollen (PK) waren vor dem Blockieren der *Strips* (s. 2.2.3.8.8.) aufgetropfte NS5A-Eluate detektierbar. Bei Verwendung der Lipid Strips (oben) wurden für Sf9 NS5A fl und  $\Delta D2+3$  als Lipidbindungspartner Phosphatidsäure (PA), PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> festgestellt. Bei Cardiolipin waren ebenfalls schwache Bindungen zu erkennen. Im Fall von NS5A  $\Delta D2+3$  aus *E. coli* war zusätzlich eine Bindung an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zu beobachten.

Durch den Gebrauch von PIP Strips (unten) waren für Sf9 NS5A zusätzlich als Lipidbindungspartner PtdIns(3)P, PtdIns(5)P und PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> zu erkennen. Eine schwache Interaktion mit PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> war ebenfalls detektierbar, die allerdings im Lipid-Strip nicht zu sehen war.

Bei Untersuchung von NS5A  $\Delta D2+3$  aus *E. coli* waren zusätzlich Interaktionen mit PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> sowie schwache Bindungen an Lysophosphatidsäure (LPA) und Lysophosphocholin (LPC) zu identifizieren.



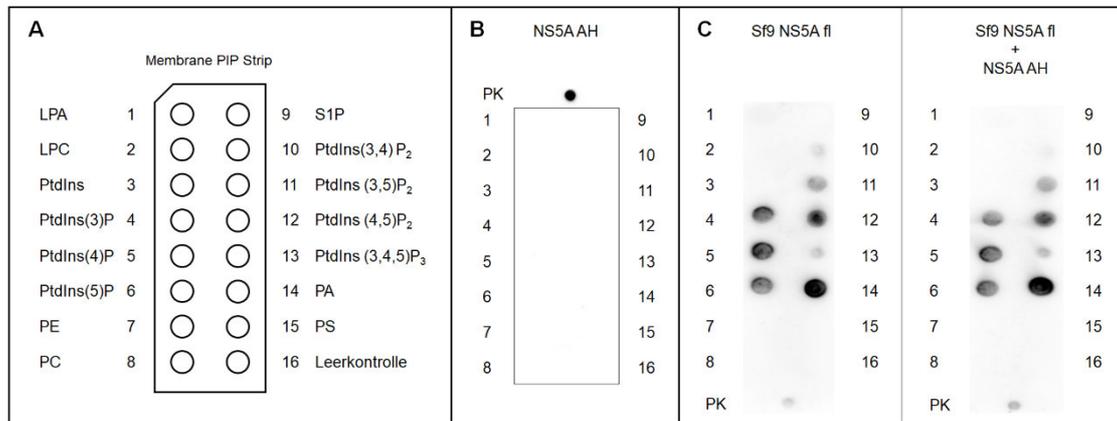
**Abbildung 42: Lipidbindung von NS5A fl und ΔD2+3 aus Sf9-Zellen sowie von NS5A ΔD2+3 aus E. coli im PLOA.** Die Lipidbindung verschiedener NS5A-Varianten wurde im PLOA unter Verwendung von Membrane Lipid Strips (oben) und Membrane PIP Strips (unten) untersucht. Die Tropfschemata der verschiedenen Lipide sind unter (A) dargestellt. Als Positivkontrollen (PK) wurden NS5A-Eluate auf die Strips aufgetropft. (B) zeigt die Lipidinteraktionen von NS5A fl exprimiert durch Vektor pVL941 Strep-NS5A-V5 in Sf9-Zellen und gereinigt durch StrepTactin-AC. Die Lipidinteraktionen von NS5A ΔD2+3 liegen unter (C) vor. Diese Deletionsmutante wurde mittels Vektor pVL941 Strep-NS5A ΔD2+3 ebenfalls in Sf9-Zellen exprimiert und durch StrepTactin-AC gereinigt. (D) stellt die Lipidinteraktionen von NS5A ΔD2+3 dar, welches mit Vektor pCG10 in E. coli exprimiert und mit Ni-NTA-AC nach Sölyom et al. (2015) und Valda (2015) gereinigt wurde. Bei (B) und (C) erfolgte die Immundetektion mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Strep-tag von NS5A fl bzw. ΔD2+3, bei (D) wurde hierfür ein solcher gegen das 5x-His-tag von NS5A ΔD2+3 verwendet.

Zusammenfassend wiesen Sf9 NS5A fl und ΔD2+3 gleiche Bindungsmuster auf. Bei NS5A ΔD2+3 aus E. coli waren die gleichen Lipidbindungspartner feststellbar. Allerdings traten hier noch weitere Bindungen bei LPA, LPC und PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> auf und die relativen Bindungsintensitäten waren unterschiedlich. Wegen der Unreinheit von NS5A ΔD2+3 aus E. coli (s. Abb. 25. 3.1.1.) wurde in weiteren Versuchen auf dessen Untersuchung verzichtet. Ferner wurde im weiteren Verlauf der Dissertation der Schwerpunkt auf die Interaktion mit PPI gelegt. Somit wurden nur noch Membrane PIP Strips für weitere Experimente verwendet.

### 3.3.2. Lipidbindung der amphipathischen α-Helix von NS5A

Kommerzielle NS5A-AH (a.a. 1-30) mit N-terminalem 6x His-tag wurde ebenfalls im PLOA auf ihre Lipidbindungspartner hin untersucht. Dafür wurde NS5A-AH mit Membrane PIP

Strips inkubiert. Die Detektion erfolgte mit monoklonalem Antikörper gegen den His-tag der AH. Abbildung 43 (B) zeigt, dass nur als Positivkontrolle (PK) auf den PIP Strip aufgetropftes AH von 1 µl detektierbar war. Interaktionen mit Lipiden des Strips (A) konnten nicht festgestellt werden.



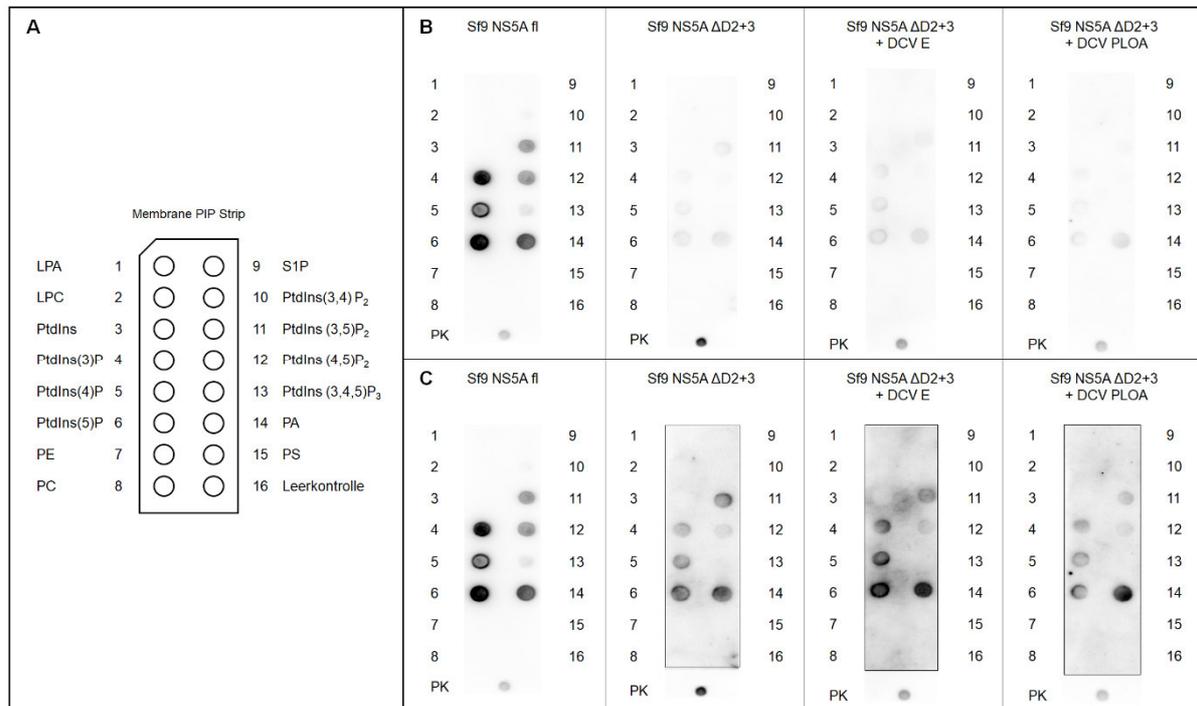
**Abbildung 43: Lipidbindung der amphipathischen  $\alpha$ -Helix von NS5A im PLOA.** Die Lipidbindung kommerzieller amphipathischer Helix (AH) von NS5A wurde im PLOA unter Nutzung von Membrane PIP Strips untersucht. Das Tropfschema der verschiedenen Lipide ist unter (A) aufgeführt. Als Positivkontrollen (PK) wurden NS5A-AH (B) und Sf9 NS5A fl (C) vor der Blockierung auf die Strips aufgetropft. (B) zeigt die Lipidinteraktionen von NS5A-AH. (C) stellt den Einfluss der AH auf die Lipidbindung von NS5A fl dar, welches unter Verwendung von Vektor pVL941 Strep-NS5A-V5 in Sf9-Zellen exprimiert und durch StrepTactin-AC gereinigt wurde. Bei diesem Wettbewerbsversuch wurde NS5A-AH im 10-fach molaren Überschuss zugegeben. Für die Immundetektion bei (B) wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den His-tag der AH verwendet. Im Fall von (C) wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den Strep-tag von NS5A fl genutzt.

Des Weiteren wurde überprüft, ob NS5A-AH im Rahmen eines Wettbewerbsversuchs bei gleichzeitiger Inkubation mit Sf9 NS5A fl im 10x molaren Überschuss dessen Lipidinteraktion beeinflussen kann. Dabei wurde Sf9 NS5A fl mit monoklonalem Antikörper gegen dessen Strep-tag detektiert. Unter (C) ist zu erkennen, dass die gleichzeitige Inkubation mit NS5A AH keine Auswirkungen auf die Bindungsintensität von Sf9 NS5A fl hatte. Das bereits beobachtete Lipidbindungsmuster (vgl. Abb. 42) war erneut feststellbar.

### 3.3.3. Vergleich der Lipidbindung von NS5A fl und NS5A $\Delta$ D2+3 mit und ohne Inhibitor Daclatasvir

Die Bestimmungen der Lipidbindungsmuster von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 aus Sf9-Zellen über PLOA erfolgten zunächst in separaten Experimenten. So konnten zwar die Bindungsmuster, aber nicht deren Bindungsintensitäten miteinander verglichen werden. Aus diesem Grund wurden bei weiteren Versuchen, die mit den verschiedenen NS5A-Varianten inkubierten, Membrane PIP Strips im abschließenden Schritt gleichzeitig immundetektieren. Zusätzlich wurde für Sf9 NS5A  $\Delta$ D2+3 untersucht, ob die Zugabe von DCV Effekte auf das Lipid-

bindungsmuster zur Folge hat. Dabei wurden zum einen 10 nM DCV bereits bei der Expression und Reinigung von NS5A zugegeben (+ DCV E). Zum anderen wurden 10  $\mu$ M des NS5A-Inhibitors im PLOA vor der Inkubation mit dem PIP Strip hinzugefügt (+ DCV PLOA). Die Immundetektionen wurden mit monoklonalem Antikörper gegen NS5A-Strep-tag durchgeführt (s. Abb. 44).



**Abbildung 44: Vergleich der Lipidbindungen von NS5A fl und NS5A  $\Delta$ D2+3 im PLOA sowie Untersuchung des Effekts von NS5A-Inhibitor DCV.** Die Lipidbindungen von NS5A fl und NS5A  $\Delta$ D2+3 wurden im PLOA unter Verwendung von Membrane PIP Strips untersucht. NS5A fl wurde durch Vektor pVL941 Strep-NS5A-V5 in Sf9-Zellen exprimiert und durch StrepTactin-AC gereinigt. NS5A  $\Delta$ D2+3 wurde auf entsprechende Weise mit Hilfe von Vektor pVL941 Strep-NS5A  $\Delta$ D2+3 hergestellt. Das Tropfschema der verschiedenen Lipide ist unter (A) dargestellt. Als Positivkontrollen (PK) wurden NS5A-Eluate auf die Strips aufgetropft. (B) zeigt die Lipidinteraktionen von NS5A fl und NS5A  $\Delta$ D2+3. Im Fall der Deletionsmutante wurden zusätzlich die Lipidbindungen auf Effekte von 10 nM Daclatasvir (DCV) bei der Proteinexpression und -reinigung (Sf9 NS5A  $\Delta$ D2+3 + DCV E) sowie von 10  $\mu$ M DCV im PLOA (Sf9 NS5A  $\Delta$ D2+3 + DCV PLOA) untersucht. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5A-tag Strep. (C) Um die schwächeren Lipidbindungsmuster von NS5A  $\Delta$ D2+3 besser zu erkennen, wurde deren Kontrast unabhängig von dem von NS5A fl zusätzlich erhöht.

Unter (A) ist das Schema der aufgetropften Lipide des PIP Strips gezeigt. Bei (B) war festzustellen, dass bei NS5A fl im Vergleich zu NS5A  $\Delta$ D2+3 unabhängig von der Zugabe von DCV die Bindungsintensität deutlich höher ist. Durch Kontrasterhöhung für NS5A  $\Delta$ D2+3 unabhängig von NS5A fl (C) konnten nicht nur bei NS5A fl, sondern auch bei NS5A  $\Delta$ D2+3 die bereits beobachteten Lipidbindungsmuster (vgl. Abb. 42 und 43) festgestellt werden. DCV hatte weder bei Zugabe von 10 nM bei der NS5A-Herstellung (+ DCV E) noch bei Hinzufügen von 10  $\mu$ M während des PLOAs (+ DCV PLOA)

Auswirkungen auf das Lipidbindungsmuster. Die Positivkontrollen (PK) waren in allen Fällen detektierbar.

Zusammenfassend konnten für NS5A fl und  $\Delta D2+3$  im PLOA mit Membrane PIP Strips (s. Tab. 11, 2.1.12.) Lipid-Interaktionen mit PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und PA festgestellt werden (s. Tab. 25).

**Tabelle 25: Überblick zu Lipidinteraktionen von NS5A fl und  $\Delta D2+3$  im PLOA.** Die Lipidbindungen von NS5A fl und NS5A  $\Delta D2+3$  wurden im PLOA unter Verwendung von Membrane PIP Strips untersucht. NS5A fl wurde durch Vektor pVL941 Strep-NS5A-V5 in Sf9-Zellen exprimiert und durch StrepTactin-AC gereinigt. NS5A  $\Delta D2+3$  wurde auf entsprechende Weise mit Hilfe von Vektor pVL941 Strep-NS5A  $\Delta D2+3$  hergestellt. Lipide, bei denen eine Interaktion mit NS5A fl und  $\Delta D2+3$  beobachtet wurde, sind mit ● markiert.

LPA		S1P	
LPC		PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>	
PtdIns		PtdIns(3,5)P <sub>2</sub>	●
PtdIns(3)P	●	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	●
PtdIns(4)P	●	PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	●
PtdIns(5)P	●	PA	●
PE		PS	
PC		Leerkontrolle	

Für NS5A-AH wurde keine Interaktion beobachtet und NS5A-AH konnte auch nicht die Lipidinteraktion von NS5A fl beeinträchtigen (s. 3.3.2.). Zwar zeigte NS5A  $\Delta D2+3$  die gleichen Lipidinteraktionen wie NS5A fl, wies aber eine deutlich geringere Bindungsintensität als NS5A fl auf. Sowohl die Zugabe von DCV bei der Expression und Reinigung von NS5A  $\Delta D2+3$  als auch die Zugabe von DCV beim PLOA mit NS5A  $\Delta D2+3$  hatten keine Auswirkungen auf die Art der Lipidinteraktionspartner. Jedoch konnten mögliche Effekte von DCV auf die verschiedenen Bindungsintensitäten im PLOA nicht ausgeschlossen werden.

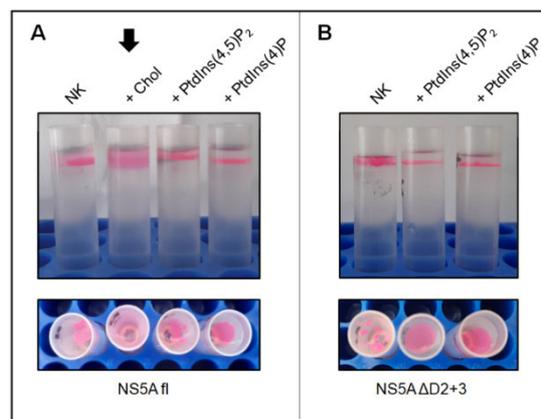
### 3.3.4. Rekonstitution von NS5A in Liposomen verschiedener

#### Zusammensetzung

Um die Lipidinteraktion von NS5A in einem System untersuchen zu können, dass die Gegebenheiten *in vivo* näher wiedergibt als die im PLOA verwendeten Membrane PIP Strips (s. 3.3.3.), wurde ein Liposomen-Modell etabliert. Die Verwendung dieses komplexeren Modells ermöglicht eine genauere Charakterisierung der Membranerkennung von NS5A. Die erhöhte Menge an PtdIns(4)P und Cholesterol in den Membranen des MW (s. 1.2.3.) kann

passend simuliert und dessen Rolle untersucht werden. Zur Etablierung wurden zunächst Liposomen mit einfacherer Zusammensetzung (s. Tab. 21, 2.2.3.7.) als die der MW-Membran hergestellt. Ausgehend von einer Negativkontrolle (NK) mit 55 % PC und 45 % PE, wurden der Effekt von 20 % Cholesterol (+ Chol), 2 % PtdIns(4)P (+ PtdIns(4)P) sowie 2% PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (+ PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) auf den Rekonstitutionserfolg von NS5A fl und NS5A ΔD2+3 untersucht (s. 2.2.3.8.9.). Die verwendeten NS5A-Varianten wurden in Sf9-Zellen exprimiert und mit StrepTactin-AC aus der Membranfraktion isoliert (s. 3.1.3.). Liposomproben wurden über einen Nycodenz-Dichtegradienten (s. 2.2.3.8.9.) gewonnen.

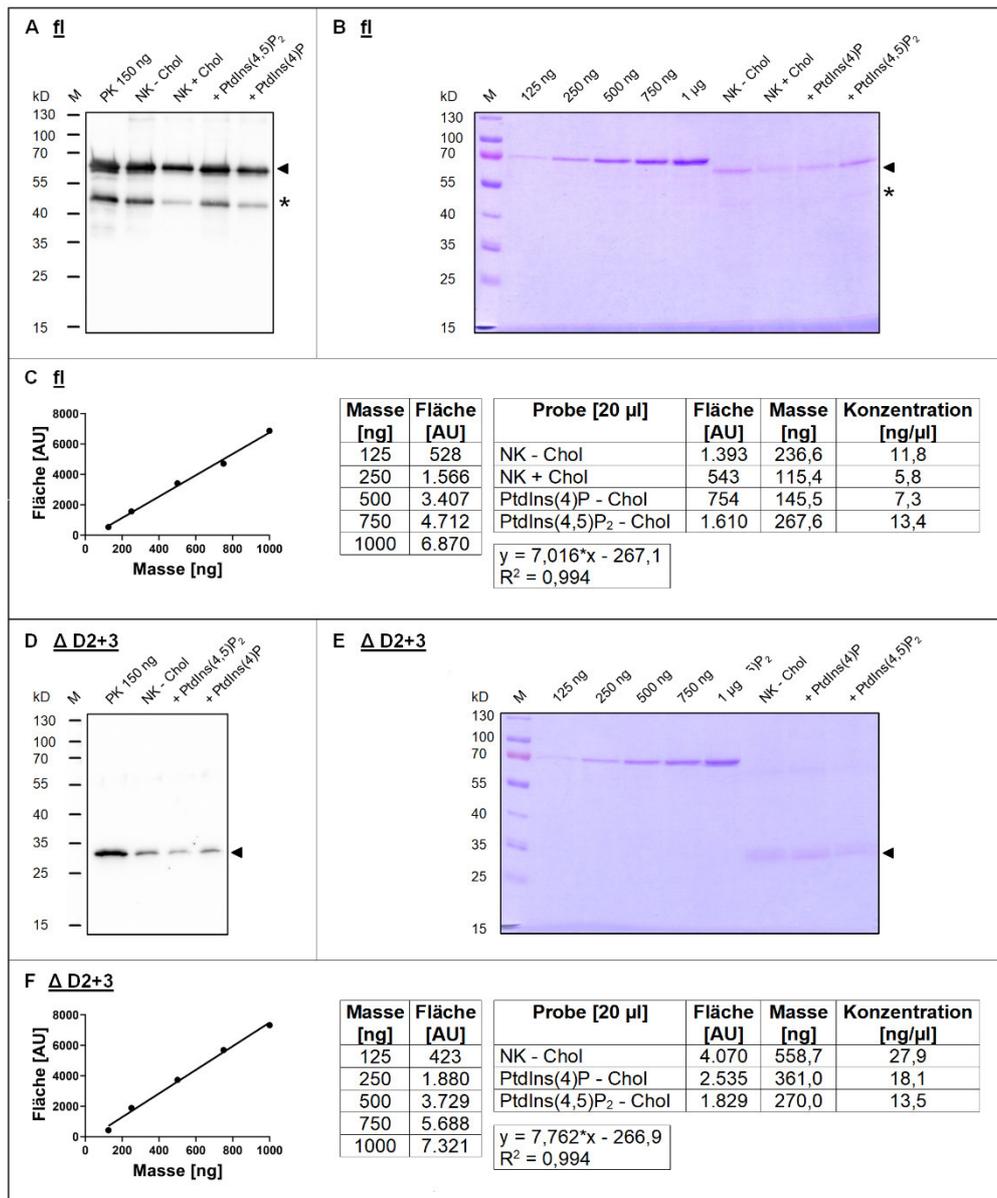
Nach der Nycodenz-Dichtegradienten-Zentrifugation konnte in Hinsicht auf die Beschaffenheit der Liposomschichten bei fast allen Liposomzusammensetzungen eine Aggregatbildung bei Rekonstitution von NS5A fl und ΔD2+3 festgestellt werden (s. Abb. 45). Nur bei 20 % Cholesterol als Liposomkomponente (Pfeil) war keine Aggregatbildung zu beobachten.



**Abbildung 45: Liposomen verschiedener Zusammensetzung bei Rekonstitution von NS5A fl und NS5A ΔD2+3.** NS5A fl und NS5A ΔD2+3 wurden unter Verwendung der Vektoren pVL941 Strep-NS5A-V5 und pVL941 Strep-NS5A ΔD2+3 in Sf9-Zellen exprimiert und durch StrepTactin-AC gereinigt. NS5A fl (A) und dessen Deletionsmutante (B) wurden in Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzung rekonstituiert. (A) Negativkontrolle (NK): 55 % PC, 45 % PE; + Chol: 45 % PC, 35 % PE, 20 % Cholesterol; + PtdIns(4)P: 53 % PC, 45 % PE, 2 % PtdIns(4)P; +PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>: 53 % PC, 45 % PE, 2 % PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>; (B) wie (A), aber ohne Chol. Die Beschaffenheit der Liposomschichten im Nycodenz-Gradienten ist bei (A) und (B) dargestellt.

Die entnommenen Liposomproben wurden auf die erfolgreiche Rekonstitution von NS5A fl bzw. ΔD2+3 untersucht (s. Abb. 46). Proben der finalen Liposomen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch WB (A fl, D ΔD2+3) untersucht. Bei der Immundetektion von NS5A fl wurde ein monoklonaler Antikörper gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen) verwendet. Für die Detektion von NS5A ΔD2+3 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das NS5A-Strep-tag genutzt. NS5A fl sowie ΔD2+3 sind mit ◀ und unspezifische Banden bei Detektion von NS5A fl mit \* markiert. Als Positivkontrollen (PK) wurden 150 ng NS5A fl bzw. ΔD2+3 verwendet. Die Volumina der Liposomproben wurden so gewählt, dass bei

100%-iger Rekonstitution 150 ng an NS5A vorliegen würden. Durch Vergleich mit den Positivkontrollen war so eine erste grobe Abschätzung der Rekonstitutionserfolge möglich.



**Abbildung 46: Rekonstitution von NS5A fl und ΔD2+3 in Liposomen verschiedener Zusammensetzung.** NS5A fl und ΔD2+3 wurden mit Hilfe der Vektoren pVL941 Strep-NS5A-V5 und pVL941 Strep-NS5A ΔD2+3 in Sf9-Zellen exprimiert und durch StrepTactin-AC gereinigt. Die Proteine wurden je in Liposomen verschiedener Zusammensetzung rekonstituiert: Negativkontrolle (NK): 55 % PC, 45 % PE; + Chol (nur bei NS5A fl): 45 % PC, 35 % PE, 20 % Cholesterol; + PtdIns(4)P: 53 % PC, 45 % PE, 2 % PtdIns(4)P; +PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>: 53 % PC, 45 % PE, 2 % PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>; Proben der finalen Liposomen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch WB (A, D) und Coomassie-Färbung (B, E) auf ihren NS5A-Gehalt hin untersucht. NS5A fl und ΔD2+3 sind mit ◀ markiert. Unspezifische Banden bei NS5A fl sind mit \* markiert. Die Immundetektion erfolgte für NS5A fl mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS5A (a.a. 218-328, ViroGen) und für NS5A ΔD2+3 gegen Protein-tag Strep. BSA-Standards (125 ng - 1 µg) wurden in der SDS-PAGE mit aufgetrennt und gefärbt. (C, F) Durch Densitometrie wurden anhand der Bandenintensitäten der BSA-Proben (gemessen in *arbitrary units* (AU)) Standardgeraden erstellt, durch die über die Bandenintensitäten der verschiedenen Liposomproben von 20 µl, die Proteinkonzentrationen von NS5A fl und ΔD2+3 ermittelt wurden. Die Funktionsgleichungen der Standardgeraden sowie die Bestimmtheitsmaße ( $R^2$ ) sind mit aufgeführt.

In Hinsicht auf NS5A fl konnte bei 20 % Cholesterol und 2 % PtdIns(4)P als Liposomkomponente weniger rekonstituiertes NS5A fl als bei der Liposom-Negativkontrolle detektiert werden (s. Abb. 46 A). Bei 2 % PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als Bestandteil der Liposomen war etwa gleich viel rekonstituiertes NS5A im Vergleich zur Negativkontrolle festzustellen. Auch im Fall von NS5A ΔD2+3 war mit 2 % PtdIns(4)P in den Liposomen weniger rekonstituiertes Protein im Vergleich zur Negativkontrolle zu detektieren (s. Abb. 46 D). Im Gegensatz zu NS5A fl traf das bei NS5A ΔD2+3 auch für Liposomen mit 2 % PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu. Versuche mit 20 % Cholesterol als Liposombestandteil müssen für die Rekonstitution von NS5A ΔD2+3 noch durchgeführt werden. Bei Vergleich mit den Positivkontrollen von 150 ng wirkte die Rekonstitution von NS5A fl erfolgreicher als die von ΔD2+3.

Um die Rekonstitutionserfolge in den verschiedenen Liposomen quantitativ auswerten zu können, wurden die Konzentrationen von NS5A fl bzw. ΔD2+3 in den finalen Liposomproben berechnet. Dazu wurden 20 µl der Proben zusammen mit BSA-Standards von 125 ng bis 1 µg durch SDS-PAGE aufgetrennt und gefärbt (s. Abb. 46 B für NS5A fl und E für NS5A ΔD2+3). Anschließend wurden durch Densitometrie BSA-Standardgeraden erstellt und anhand der Funktionsgleichungen die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Liposomproben bestimmt (s. Abb. 46 C für NS5A fl und F für NS5A ΔD2+3).

Mit den bestimmten Proteinkonzentrationen, den Volumina der Liposomschichten im Nycodenzgradienten (nicht dargestellt) und mit den molekularen Massen von NS5A fl (~ 51,6 kD) und NS5A ΔD2+3 (~ 28,8 kD) wurden die finalen NS5A-Stoffmengen berechnet, welche erfolgreich rekonstituiert in den Liposomschichten vorlagen. Diese wurden in Verhältnis zu den NS5A-Stoffmengen gesetzt, welche zu Beginn der Rekonstitutionsversuche eingesetzt wurden. Auf diese Weise wurde die jeweilige NS5A-Rekonstitution in % ermittelt. Über die Vergleiche der Fluoreszenzen des Liposom-Bestandteils ATTO-DOPE (s. Tab. 21, 2.2.3.7.) zu Beginn und am Ende der Rekonstitutionsexperimente (nicht dargestellt) wurden auch die finalen Lipidmengen in % bestimmt. Über die zum Versuchsbeginn eingesetzten Lipidstoffmengen von 1,5 µmol, konnten darauf die finalen Lipidstoffmengen in nmol berechnet werden. Unter Einbezug der berechneten finalen NS5A-Stoffmengen ließen sich dann die Molarverhältnisse von NS5A zu Lipid angeben. Die beschriebenen Kenngrößen der Rekonstitutionsversuche sind in Tabelle 26 aufgeführt.

**Tabelle 26: Finale Lipid- und NS5A-Mengen, NS5A/Lipid-Molarverhältnisse und Rekonstitutionserfolge von NS5A fl und NS5A  $\Delta$ D2+3 in Liposomen verschiedener Zusammensetzung.** NS5A fl und NS5A  $\Delta$ D2+3 wurden mit Hilfe der Vektoren pVL941 Strep-NS5A-V5 und pVL941 Strep-NS5A  $\Delta$ D2+3 in Sf9-Zellen exprimiert und durch StrepTactin-AC gereinigt. Beide NS5A-Varianten wurden in Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzung rekonstituiert. NS5A fl: Negativkontrolle (NK): 55 % PC, 45 % PE; + Chol: 45 % PC, 35 % PE, 20 % Cholesterol; + PtdIns(4)P: 53 % PC, 45 % PE, 2 % PtdIns(4)P; + PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>: 53 % PC, 45 % PE, 2 % PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>; NS5A  $\Delta$ D2+3 wie fl, aber ohne + Chol. Bei den Rekonstitutionen wurden zu Beginn je 1,5  $\mu$ mol Lipid und 22,1  $\mu$ g NS5A (fl  $\pm$  0,428 nmol,  $\Delta$ D2+3  $\pm$  0,766 nmol) eingesetzt. Die finalen Lipidmengen in % wurden über den Vergleich der Fluoreszenz von ATTO-DOPE zu Beginn und Ende der Rekonstitutionsversuche bestimmt. Damit wurden ausgehend von 1,5  $\mu$ mol Startlipid die finalen Lipidmengen in  $\mu$ mol berechnet. Durch Bestimmung der Proteinkonzentration von finalem NS5A in den Liposomproben über Densitometrie (s. Abb. 46), die Volumina der Liposomproben und die molekularen Massen von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 (nicht dargestellt) wurden die finalen, rekonstituierten NS5A-Mengen in nmol berechnet. Mit diesen Werten konnten das NS5A/Lipid-Molarverhältnis und die Rekonstitution von NS5A in % bestimmt werden.

	<b>Lipid final [%]</b>	<b>Lipid final [<math>\mu</math>mol]</b>	<b>NS5A final [nmol]</b>	<b>NS5A/Lipid-Molarverhältnis</b>	<b>Rekonstitution [%]</b>
<b>NS5A fl</b>					
NK	89,4	1,3	0,087	~ 1 : 15000	20,3
+ Chol	61,4	0,9	0,042	~ 1 : 22000	9,9
+ PtdIns(4)P	65,2	1,0	0,037	~ 1 : 27000	8,6
+ PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	79,3	1,2	0,098	~ 1 : 12000	23,0
<b>NS5A <math>\Delta</math>D2+3</b>					
NK	76,1	1,1	0,291	~ 1 : 4000	37,9
+ PtdIns(4)P	77,3	1,2	0,188	~ 1 : 6000	24,5
+ PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	66,2	1,0	0,159	~ 1 : 6000	20,8

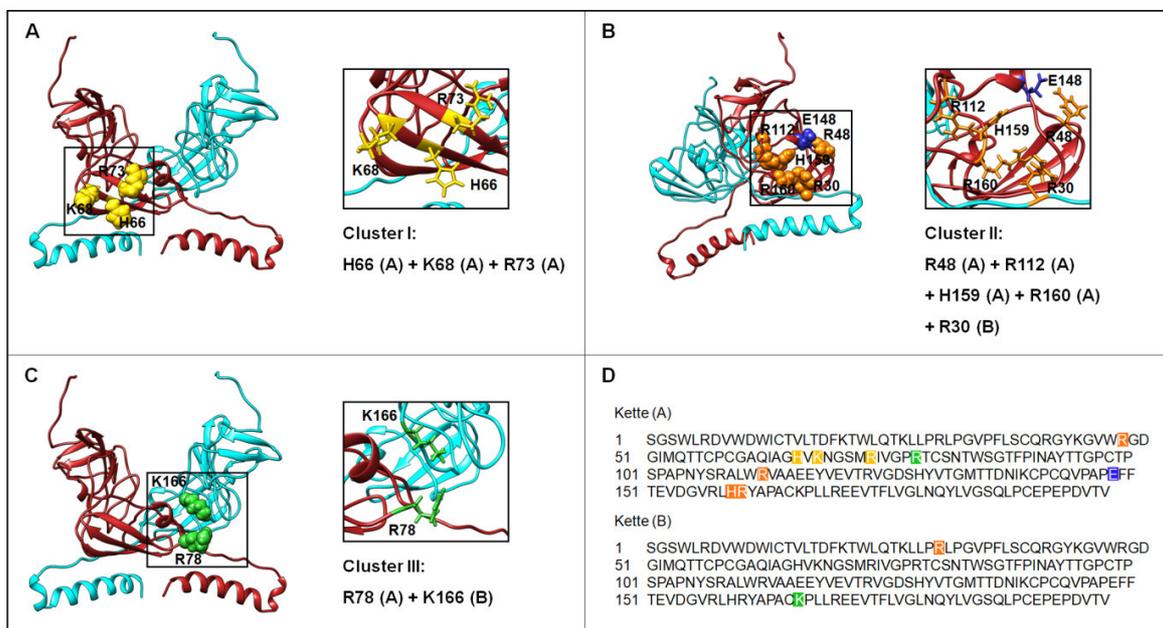
Die finalen Lipidgehalte und damit die Wiedergewinnungen von Lipid im Verlauf der Rekonstitutionen waren adäquat hoch. Zur weiteren Verminderung der Varianzen bei der Lipidrückgewinnung, werden die Versuchsabläufe weiter optimiert. Die Unterschiede der NS5A/Lipid-Molarverhältnisse beruhen auf der ungleichen Lipidrückgewinnung und der divergierenden Menge an rekonstituiertem NS5A. Der auffällige Unterschied zwischen den Molarverhältnissen für NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 ist darauf zurückzuführen, dass bei den Rekonstitutionsexperimenten die Masse an eingesetztem Protein gleichblieb. Für zukünftige Versuche werden die unterschiedlichen molekularen Massen von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 berücksichtigt und gleiche Stoffmengen zu Beginn eingesetzt.

Für NS5A fl war, konform mit den Ergebnissen des WBs (s. Abb. 46 A), bei 20 % Cholesterol bzw. 2 % PtdIns(4)P als Liposombestandteil ein geringerer Rekonstitutionserfolg als bei der Negativkontrolle festzustellen. Bei 2 % PtdIns(4,5)<sub>2</sub> als Liposomkomponente lag ein leicht höherer Rekonstitutionserfolg als bei der Negativkontrolle vor.

Betreffend NS5A  $\Delta$ D2+3 standen die berechneten Rekonstitutionserfolge ebenfalls in Einklang mit den WB-Ergebnissen (s. Abb. 46 D). Mit PtdIns(4)P bzw. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in der Liposommembran war der Prozentsatz von rekonstituiertem NS5A  $\Delta$ D2+3 niedriger als bei der Negativkontrolle. Beim Vergleich der Rekonstitutionen von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 fällt auf, dass die Rekonstitution von NS5A  $\Delta$ D2+3 in der Liposom-Negativkontrolle und in Liposomen mit PtdIns(4)P erfolgreicher war als die Rekonstitution von NS5A fl. Für die Rekonstitution in Liposomen mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> war kein großer Unterschied festzustellen.

### 3.3.5. *In silico*-Strukturanalyse zur Identifizierung von PPI-Bindestellen in NS5A

Basierend auf einem dynamischen NS5A-Strukturmodell von James H. Nettles (s. 2.2.3.8.10) wurden mit Hilfe des Programms Chimera 1.14 Strukturanalysen zur Identifikation potenzieller PPI-Bindestellen von NS5A durchgeführt. Das verwendete Strukturmodell eines NS5A-Homodimers (s. Abb. 47) basiert auf den NS5A-D1-Strukturen von Tellinghuisen et al. (2005), PDB-ID: 1ZH1 und Love et al. (2009), PDB-ID: 3FQM sowie auf der NS5A-AH-Struktur von Penin et al. (2004b), PDB-ID: 1R7G.



**Abbildung 47: Vermutete PPI-Bindestellen in NS5A.** Ein dynamisches NS5A-Strukturmodell (Nettles et al., 2014) basierend auf den NS5A-D1-Strukturen von Tellinghuisen et al. (2005), PDB-ID: 1ZH1, und Love et al. (2009), PDB-ID: 3FQM, und der NS5A-AH-Struktur von Penin et al. (2004b), PDB-ID: 1R7G, wurde mit dem Programm Chimera 1.14 analysiert. Das Strukturmodell wurde auf Cluster der positiv geladenen Aminosäuren Histidin (H), Lysin (K) und Arginin (R) untersucht, welche für eine Bindung negativer PPI prädestiniert sind. Die gefundenen Cluster (I (gelb), II (orange) und III (grün)) sind unter A-C gezeigt und die Positionen in den Sequenzen von Kette (A) (rot) und (B) (hellblau) des NS5A-Dimers markiert (D). Bei Cluster II ist zusätzlich die negativ geladene Aminosäure Glutaminsäure (E) an Position 148 (dunkelblau) markiert, da sie eine räumliche Nähe zu R48 aufweist und die PPI-Bindung beeinflussen könnte.

Zwar waren keine für die PPI-Interaktion typischen käfigartigen Domänen (Kooijman und Burger, 2009) zu erkennen (s. 4.3.4.), aber es konnten unter Berücksichtigung der animierten Konformationsänderungen des Modells *Cluster* der basischen Aminosäuren Histidin (H), Lysin (K) und Arginin (R) identifiziert werden. Diese sind durch die positiven Ladungen ihrer Seitenketten dazu in der Lage mit negativ geladenen Phosphatidyl-Kopfgruppen von PPIs (s. 1.4.1.) zu interagieren. Drei *Cluster* (I-III) konnten im Strukturmodell identifiziert werden (s. Abb. 47 **A**, **B** und **C**). Die Positionen innerhalb der Sequenzen von Kette (A) (rot) und Kette (B) (hellblau) des NS5A-Dimers sind unter (**D**) aufgeführt.

*Cluster* I (gelb) umfasst die Aminosäuren H66 (A), K68 (A) und R73 (A). *Cluster* II (orange) wird von den Aminosäuren R48 (A), R112 (A), H159 (A), R160 (A) und R30 (B) gebildet. Da negativ geladene Glutaminsäure E148 (dunkelblau) sehr nah bei R48 als Teil von *Cluster* II liegt (s. Abb. 23 **B**), kann die Interaktion des positiv geladenen R48 mit negativ geladenen Phosphatidylgruppen von PPIs beeinträchtigt sein. E148 könnte dabei PPIs abstoßen. *Cluster* III (grün) schließlich besteht aus den Aminosäuren R78 (A) und K166 (B).

Basierend auf der Analyse der *Cluster* wurde eine Mutationsstrategie entwickelt (s. 4.3.4.), um die *Cluster* auf ihre Funktion als PPI-Bindestellen zu überprüfen und in einem Folgeprojekt die PPI-Interaktion von NS5A weiter zu charakterisieren.

## 4. Diskussion

Der vorliegenden Dissertation liegt die Hypothese zu Grunde, dass spezifische Lipid-Protein-Interaktionen abhängig von der Lipidumgebung der verschiedenen NS5A-Lokalisationen (membranöses Netz oder Lipidtropfen) Einfluss auf die Struktur und Funktion von NS5A nehmen und NS5A-Inhibitoren wie beispielsweise Daclatasvir über eine Inhibition dieser Interaktionen wirken könnten. Auf diese Weise hätte ein NS5A-Inhibitor sowohl einen Effekt auf die Replikation als auch die Assemblierung von HCV (s. 1.5.3.). Polyphosphoinositiden wird dabei als Lipidinteraktionspartnern mit NS5A eine besondere Bedeutung beigemessen, da sie eine Rolle bei der Membran-Kennzeichnung verschiedener Zellkompartimente, aber auch bei der Regulation membranassoziierter Proteine spielen (s. 1.4.2.). Außerdem wurde bereits eine Interaktion von NS5A mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beschrieben (s. 1.4.3.).

NS5A spielt eine entscheidende Rolle in wesentlichen Schritten des HCV-Lebenszyklus wie der RNA-Replikation und der Assemblierung infektiöser viraler Partikel. NS5A ist auch bei einer Vielzahl an Interaktionen mit Wirtsproteinen und viralen Proteinen beteiligt (s. 1.2.3. und 1.3.3.). Trotz dieser essentiellen Aufgaben von NS5A in der HCV-Biologie ist über die molekularen Details seiner Wirkweise wenig bekannt. Durch die Verwendung von NS5A-Inhibitoren wie z.B. Daclatasvir in Kombinationstherapie mit anderen direkt wirkenden antiviralen Arzneimitteln konnte die Therapie von HCV einschneidend verbessert werden (s. 1.1.3.). Aber auch die Wirkweise von NS5A-Inhibitoren (s. 1.5.3.) ist auf molekularer Ebene bisher noch nicht verstanden.

Die Herstellung adäquater Mengen an NS5A mit ausreichender Reinheit war Voraussetzung für weiterführende Versuche zur Stabilität und Lipidinteraktion von NS5A. Zunächst wurden zur rekombinanten Herstellung von NS5A bakterielle und eukaryotische Zellsysteme verwendet (s. 4.1.). Die Expression ausreichender Mengen hochreinen Proteins gelang schließlich im Baculovirus-vermittelten Insektenzellsystem für das Protein vollständiger Länge (NS5A fl) und eine trunkierte Variante ohne die Domänen 2 und 3 ( $\Delta$ D2+3). Die Entwicklung der NS5A-Herstellung in den drei verwendeten Expressionssystemen ist unter 4.1. erörtert.

Bei der Überprüfung der Stabilität hergestellten NS5As im *Thermal shift assay* wurden auch die Auswirkungen von Daclatasvir überprüft. Wegen der Bedeutung von Zink für die Stabilität des Metalloproteins NS5A (s. 1.3.1.) wurde ebenfalls der Effekt des Chelators EDTA untersucht (s. 4.2.).

Im Rahmen der Charakterisierung der Lipidinteraktion mit NS5A gewonnene Erkenntnisse durch *Protein lipid overlay assay*, Rekonstitution in Liposomen und *in silico*-Strukturanalyse werden abschließend unter 4.3. diskutiert.

#### **4.1. Vergleich der Expression und Reinigung von NS5A in verschiedenen Systemen**

Die Expression und Reinigung von NS5A als grundlegender erster Schritt der vorliegenden Promotion war aus mehreren Gründen technisch anspruchsvoll und herausfordernd.

Durch die Assoziation von NS5A mit verschiedenen Membranen über seine amphipathische Helix (s. 1.3.1.), war man bei NS5A mit unterschiedlichen Problemen einer Membranprotein-Reinigung konfrontiert. Für die funktionale und strukturelle Integrität von Membranproteinen ist die Interaktion mit der Lipidumgebung häufig essentiell und Lipide müssen durch passende Detergenzien ersetzt werden (Seddon et al., 2004, Arnold und Linke, 2008, Hunte und Richers, 2008). Ein weiteres mögliches Problem bei der Reinigung von NS5A stellten die nativ ungefalteten Domänen D2 und D3 dar (s. 1.3.1.). Auch die Vielzahl an beschriebenen Interaktionspartnern von NS5A (s. 1.3.3.) begünstigt „Verunreinigungen“. Des Weiteren war für NS5A als Metalloprotein (s. 1.3.1.) die Verfügbarkeit und korrekte Einbindung von Zinkionen ein weiterer kritischer Aspekt der Expression und Reinigung.

Durch die Verwendung verschiedener Expressionssysteme (bakterielles, Säugetier- und Insektenzellsystem), Protein-tags und Strategien zur Affinitätsreinigung, konnte schließlich eine erfolgreiche Vorgehensweise zur Reinigung etabliert werden (s. 2.2.3.4.3.). Dabei aufgetretene Probleme und ihre jeweiligen Lösungsansätze sind im Folgenden zusammengefasst:

##### **Bakterielles System**

Nach einem Wechsel von GST-Reinigung zu Ni-NTA-AC konnte *full length* NS5A erfolgreich in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden (s. Abb. 24, 3.1.1.). Um die bei der Entfernung des GST-tags durch Thrombinverdau auftretende unspezifische Spaltung von *full length* NS5A (s. Abb. 24, 3.1.1.) zu vermeiden, wurde ein neues Konstrukt ohne GST-tag hergestellt.

Die Verwendung dieses Konstrukts hatte jedoch die Entstehung von Einschlusskörperchen zur Folge (keine Abb. gezeigt), die weder durch Expressionsoptimierung (s. 3.1.1.) noch

durch die Nutzung des *E. coli*-Stamms Rosetta-gami 2 (Novagen) verhindert werden konnte (keine Abb. gezeigt).

Zur Verbesserung der Expression und um die Wahrscheinlichkeit von Einschlusskörperchen zu reduzieren, wurde das codonoptimierte Konstrukt pCG10 hergestellt. Dieses Konstrukt codiert für die trunkierte Version NS5A  $\Delta$ D2+3 mit deletierten Domänen D2 und D3. Für diese Domänen wurde angenommen, dass sie als filamentäre Strukturen wegen fehlender Faltung (s. 1.3.1.) die gesamte Proteinfaltung von *full length* NS5A erschweren könnten (s. 3.1.1.). Um außerdem die Reinheit bei der Ni-NTA-AC zu verbessern, wurde die Anzahl an Histidinen im *tag* von 6 auf 9 erhöht. Zusätzlich wurde im Verlauf zur Vermeidung der häufigen Verunreinigungen ArnA und SlyD (Andersen et al., 2013) der *E. coli*-Stamm LOBSTR-BL21 (DE3)-RIL (s. 2.1.7., Tab. 6) verwendet.

Erst der Wechsel zur Reinigungsmethode nach Sólyom (2015) und Valdau (2014) (s. 2.2.3.4.1.) ermöglichte eine erfolgreiche Isolation von NS5A  $\Delta$ D2+3 aus *E. coli* (s. Abb. 25, 3.1.1.). Durch die Nutzung von N-Lauroylsarcosin wurde NS5A  $\Delta$ D2+3 aus den Einschlusskörperchen lysiert, danach rückgefaltet und über Ni-NTA-AC gereinigt.

Durch die Rückfaltung war unklar, ob NS5A  $\Delta$ D2+3 korrekt gefaltet vorlag. Auch wegen der verbliebenen Verunreinigungen im Eluat und der anzunehmenden, fehlenden posttranslationalen Modifikationen im bakteriellen System, wurde schließlich die Expression und Reinigung in diesem System eingestellt.

## **Säugetierzellsystem**

Nach passender Auswahl der Zelllinie und Optimierung des Zeitpunkts der Zellernte (s. Abb. 26, 3.1.2.) sowie nach dem Wechsel der Reinigungsmethode von FLAG-IAC zu Ni-NTA-AC (vgl. Abb. 27 und 28, 3.1.2.) konnte NS5A schließlich auch im Säugetierzellsystem exprimiert werden und lag nach der Reinigung gemäß WB auch im Eluat vor (s. Abb. 29, 3.1.2.). Allerdings konnte trotz verschiedener Maßnahmen wie der Verwendung des Proteasominhibitors MG-132 (s. Abb. 30, 3.1.2.) oder Natriumbutyrat (s. Abb. 33, 3.1.2.), der Deletion der Domänen D2 und D3 (s. Abb. 31, 3.1.2.) und dem Wechsel zu HEK 293 F-Suspensionszellen (s. Abb. 32, 3.1.2.), die Menge an exprimiertem NS5A nicht ausreichend gesteigert werden. Trotz deutlicher Reduzierung von Verunreinigungen durch Zellfraktionierung (vgl. Abb. 28 und 29, 3.1.2.) und IC (s. Abb. 35, 3.1.2.) lagen weiterhin relativ zur NS5A-Ausbeute zu viele Verunreinigungen vor. Deshalb und auch wegen der erfolgreichen Expression und Reinigung von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 parallel im Baculovirus-

vermittelten Insektenzellsystem (s. u.) wurde die Expression und Reinigung im Säugetierzellsystem eingestellt.

## **Baculovirus-vermitteltes Insektenzellsystem**

Unter Berücksichtigung der erworbenen Erkenntnisse aus dem bakteriellen System und dem Säugetierzellsystem konnten schließlich NS5A fl und  $\Delta D2+3$  im Baculovirus-vermittelten Insektenzellsystem unter Beibehalten einer Zellfraktionierung und unter Verwendung von StrepTactin-AC erfolgreich exprimiert und gereinigt werden (s. Abb. 36 und 37, 3.1.2.). Schwache Verunreinigungen bei *full length* NS5A (s. Abb. 36 \*, 3.1.2.) und  $\Delta D2+3$  (s. Abb. 37, C und D\*) waren vernachlässigbar.

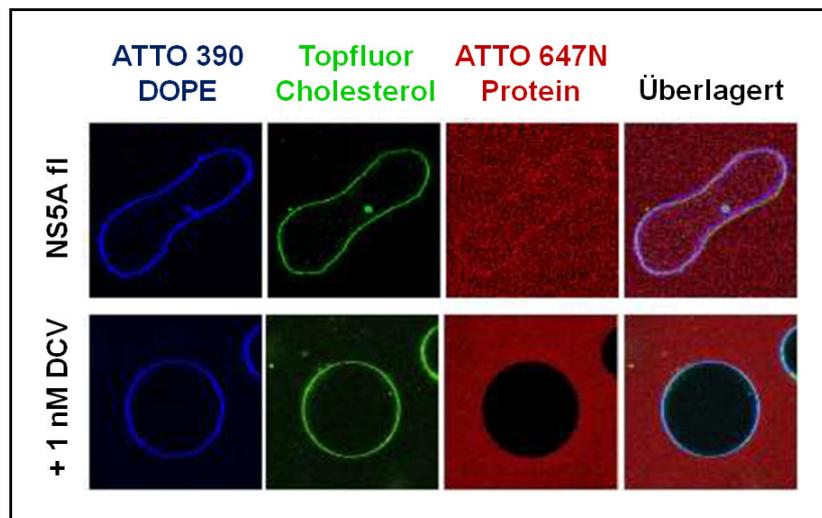
Durch den Vergleich von hergestelltem *full length* NS5A und der trunkierten Variante  $\Delta D2+3$  mit BSA bekannter Menge über SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Densitometrie konnten für Folgeversuche ausreichend hohe Konzentrationen und zufriedenstellende Proteinausbeuten an hochreinem NS5A zuverlässig generiert werden (s. Abb. 38, 3.1.2.). Für die korrekte Faltung von NS5A als Zink-Metalloprotein (s. 1.3.1.) ist auch die Bindung von Zink essentiell. Gemäß Herstellerangaben lag mit einer Zink-Molarität von  $\sim 293$  nM ausreichend Zink im Sf9-Zellkulturmedium SF-900 II SFM (s. Tab. 2, 2.1.2.) vor, um die unter 3.1.3. exemplarisch aufgeführten Mengen an  $\sim 8$  nmol *full length* NS5A und  $\sim 21$  nmol NS5A  $\Delta D2+3$  herzustellen.

## **Membranveränderung durch *full length* NS5A und Inhibition durch DCV**

Ein erster Hinweis auf die korrekte Faltung und Funktionalität des wie oben beschrieben gereinigten *full length* NS5A-Proteins wurde durch einen Kooperationspartner erbracht. Die AG von Prof. MinKyung Yi (University of Texas Medical Branch Galveston) konnte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und GUVs (*Giant Unilamellar Vesicles*) nach Zugabe des im Rahmen dieser Promotion hergestellten *full length* NS5A-Proteins charakteristische Membranveränderungen nachweisen (Membran-Remodellierung) (s. Abb. 48, oben). Diese membranverändernde Eigenschaft von *full length* NS5A steht mit den Beobachtungen von Romero-Brey et al. (2012) im Einklang. Sie beschrieben, dass NS5A im Rahmen der Ausbildung eines membranösen Netzes am ER die Bildung von Doppelmembran-Vesikeln induziert.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 1 nM Daclatasvir die NS5A-induzierten Membranzustandveränderungen der GUVs inhibiert (s. Abb. 48, unten, bisher unveröffentlichte Ergebnisse). Dies passt zur Beobachtung von Berger et al. (2014), dass Daclatasvir die

Bildung des membranösen Netzes hemmt. Eine Überprüfung für NS5A  $\Delta$ D2+3 steht noch aus.



**Abbildung 48: Nachweis von Membran-Remodellierung an GUVs nach Zugabe von NS5A fl und Hemmung der Remodellierung durch Daclatasvir.** Unter Verwendung von ATTO 390 DOPE und Topfluor Cholesterol wurden GUVs (*Giant Unilamellar Vesicles*) hergestellt. Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie konnten bei Zugabe von ATTO 647N-markiertem *full length* NS5A (NS5A fl) Membranumstrukturierungen beobachtet werden. Bei Zugabe von 1 nM des NS5A-Inhibitors Daclatasvir (DCV) konnten keine Membranveränderungen festgestellt werden. Das hierfür benötigte Protein wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit in Sf9-Zellen exprimiert, mit StrepTactin-AC gereinigt und den Kooperationspartnern in den USA zur Verfügung gestellt.

## 4.2. Auswirkungen von DCV und EDTA auf die NS5A-Stabilität im TSA

### Stabilität von *full length* NS5A und der trunkierten Variante $\Delta$ D2+3

Mit Hilfe des *Thermal shift assays* (s. 2.2.3.8.7.) kann der „Schmelzpunkt“ eines Proteins als Surrogat für eine korrekte Proteinfaltung und die Stabilität des Proteins bestimmt werden. Das NS5A fl-Protein zeigt hier ein hohes Start-Fluoreszenzsignal (s. Abb. 40, 3.2.), was auf eine fehlende oder unvollständige Faltung hinweist. Wahrscheinlich interagieren bereits zu Beginn frei liegende hydrophobe Regionen von NS5A mit dem verwendeten Fluorophor GloMelt (s. 2.2.3.8.7.). Die Ursache hierfür könnten die laut Liang et al. (2007) und Hanouille et al. (2009b) unstrukturierten Domänen 2 und 3 sein. Die Ergebnisse von Liang et al. (2007) und Hanouille et al. (2009b) werden durch die vorliegenden TSA-Experimente mit NS5A fl bestätigt.

Im Fall von NS5A  $\Delta$ D2+3 konnte die Schmelztemperatur als Surrogat für die thermische Stabilität durch einen vorliegenden sigmoidalen Kurvenverlauf bestimmt werden (s. Abb. 40 und 41, 3.2.). Somit war im Gegensatz zum NS5A fl-Protein bei NS5A  $\Delta$ D2+3 von einem kompakt gefalteten Protein auszugehen. Veränderte Schmelztemperatur-Werte im Vergleich

zu NS5A  $\Delta$ D2+3, bei dem Daclatasvir während der Expression und Reinigung zugefügt worden war, weisen auf eine unterschiedliche thermische Stabilität und möglicherweise veränderte Proteinfaltung bzw. Konformation hin.

### **Effekte von Daclatasvir und EDTA auf die Faltung von NS5A $\Delta$ D2+3**

Beim *Thermal shift assay* mit NS5A  $\Delta$ D2+3 wurden zur Untersuchung der Auswirkung von Daclatasvir 10 nM des NS5A-Inhibitors während der Expression und Reinigung eingesetzt. Diese Menge liegt deutlich über dem picomolaren Wirkungsbereich des Inhibitors (Gao et al., 2010 und Ascher et al., 2014).

In Gegenwart von Daclatasvir während der Expression und Reinigung des Proteins im Vergleich zur Expression und Reinigung ohne Daclatasvir stieg der  $T_m$ -Wert im Mittel signifikant um 1,8 °C an (s. Abb. 41, 3.2.), was auf eine Stabilisierung des Proteins durch den NS5A-Inhibitor hindeutet. Auffällig ist auch der flachere Verlauf im sigmoidalen Bereich der Schmelzkurve, was ebenfalls auf einen stabilisierenden Effekt durch DCV hinweisen kann. Zwar wurde von Berger et al. (2014) kein Einfluss von NS5A-Inhibitoren auf die Protein-stabilität beobachtet, jedoch wurde in diesem Fall nicht Daclatasvir, sondern der verwandte Inhibitor BMS-553 verwendet. Dieser weist mit fehlendem Imidazolring und Carbamat sowie einem modifizierten Prolin-Peptid-Motiv signifikante Unterschiede zu Daclatasvir auf (vgl. Abb. 14, 1.5.2. und Berger et al. (2014), Abb. 1A). Auch wurde bei Berger et al. (2014) im Vergleich zur vorliegenden Promotion nicht die thermische Stabilität von gereinigtem NS5A im *Thermal shift assay* untersucht. Vielmehr trafen Berger et al. (2014) Aussagen zur Stabilität mittels Bestimmung der Halbwertszeit von NS5A über Western Blot und Densitometrie und Arbeiten in Zellkultur, jedoch nicht am gereinigten Protein. Die Bindung von Daclatasvir kann eine geringfügige Erhöhung der thermischen Stabilität von 1,8 °C verursachen. Dies muss sich aber nicht zwangsläufig in einer Veränderung der intrazellulären Halbwertszeit von NS5A äußern.

Neben dem Effekt von NS5A-Inhibitoren sollte die Rolle von Zink bei der Faltung des Metalloproteins NS5A charakterisiert werden. Hierzu wurde die thermische Stabilität von *full length* NS5A und  $\Delta$ D2+3 in Gegenwart von EDTA gemessen. EDTA kann als starker Metallchelator mit einer Dissoziationskonstante  $pK_d$  von  $\sim 16,5$  Zink hocheffizient binden (Janecki und Reilly, 2005).

Innerhalb von Metalloproteinen nehmen Metallionen oft eine stabilisierende Funktion für die Tertiär- und Quartärstruktur ein (Janecki and Reilly, 2005). Die Komplexbildung von EDTA

mit entsprechenden Metallionen führt daher in der Regel zur Destabilisierung von Metalloproteinen (Janecki and Reilly, 2005). Im vorliegenden Fall war jedoch bei Zugabe von EDTA zu NS5A  $\Delta$ D2+3 im Mittel ein signifikanter Anstieg des  $T_m$ -Werts um 7,8 °C zu beobachten. Bei Zugabe von Daclatasvir bei der Expression und Reinigung von NS5A  $\Delta$ D2+3 war in Gegenwart von EDTA hingegen eine signifikante Senkung des  $T_m$ -Werts um 5,6 °C zu erkennen (vgl. Abb. 41, 3.2.).

Von Naika und Tiku (2011) wurde bereits die Stabilisierung eines Metalloproteins durch EDTA im *Thermal shift assay* beschrieben. Der exakte Mechanismus für die beobachtete erhöhte Stabilität blieb jedoch unklar. Um zu klären, ob EDTA überhaupt in der Lage wäre, das Zinkion von NS5A  $\Delta$ D2+3 zu binden, müssten die Zink-Bindungsaffinitäten von EDTA und NS5A  $\Delta$ D2+3 verglichen werden. Eine Dissoziationskonstante von NS5A und Zinkionen wurde bisher noch nicht bestimmt.

Es muss bei Überlegungen zum Stabilisierungsmechanismus des Weiteren berücksichtigt werden, dass EDTA über seine Funktion als Chelator hinaus mit NS5A anderweitig interagieren könnte, wie z.B. von Carvajal et al. (2004) für eine Variante der humanen Leber-Arginase beschrieben wurde. Auch Lopata et al. (2019) erwähnten einen Effekt von EDTA unabhängig von dessen Fähigkeit zur Chelierung, bei dem EDTA an der Nukleotidbindestelle von Enzymen bindet.

In Hinsicht auf die beobachtbare Destabilisierung durch EDTA in Gegenwart von Daclatasvir kann erstens vermutet werden, dass die Bindung von DCV die Zinkbindung von NS5A  $\Delta$ D2+3 vermindert. Die räumliche Nähe der Daclatasvir-Bindestelle (s. Abb. 15, 1.5.2.) zur Bindungsstelle von Zink (s. Abb. 17, 1.5.4.) unterstützt zusätzlich diese Annahme. Auf diese Weise würde eine Zink-Chelierung durch EDTA und damit Destabilisierung von NS5A  $\Delta$ D2+3 ermöglicht. Zweitens wäre auch mit einzubeziehen, dass EDTA unabhängig von seiner Rolle als Chelator über eine bisher unbekannte Bindungsstelle mit NS5A  $\Delta$ D2+3 interagieren könnte und auf diese Weise dessen thermische Stabilität erhöht. Die Anwesenheit von Daclatasvir könnte zu Konformationsänderungen führen, wodurch eine Bindung von EDTA an NS5A  $\Delta$ D2+3 nicht mehr möglich wäre und eine zugehörige Stabilisierung entfallen würde. Eine potentielle Bindungsstelle von EDTA wäre die RNA-Bindestelle im NS5A-Dimer. Ascher et al. (2014) stellten fest, dass Daclatasvir eine NS5A-Konformation stabilisiert, die nicht RNA binden kann. Sollte nun EDTA die bindende RNA ersetzen und ebenfalls in Gegenwart von Daclatasvir analog zur RNA NS5A nicht binden können,

würde das erklären, wieso es bei Zugabe von EDTA in Gegenwart von Daclatasvir zu keiner Stabilisierung von NS5A  $\Delta$ D2+3 im *Thermal shift assay* kommen kann.

### **4.3. Charakterisierung der NS5A-Lipidbindung**

Im nächsten Schritt sollte unter Verwendung des gereinigten Proteins und eines *Protein lipid overlay assays* (s. 2.2.3.8.8.) nach Protein-Lipid-Interaktionen gesucht werden. Ein Liposom-Assay wurde zur Validierung der identifizierten Bindungen eingesetzt. In der Literatur war von Cho et al. (2015) bisher nur eine spezifische NS5A-Lipid-Interaktion mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beschrieben worden (s. 4.3.1.). In der vorliegenden Arbeit wurden die Bindungsmuster von NS5A fl und  $\Delta$ D2+3 aus Sf9-Insektenzellen mit den Bindungen von NS5A  $\Delta$ D2+3 aus *E. coli* verglichen (s. 4.3.1.). Des Weiteren werden die Beteiligung verschiedener Domänen von NS5A (s. 4.3.2.) und der Einfluss von Daclatasvir (s. 4.3.3.) bei der Lipidinteraktion detailliert betrachtet. Abschließend werden mögliche *in silico* identifizierte PPI-Bindestellen (s. 4.3.4.) erörtert.

#### **4.3.1. Identifizierung neuer Lipidinteraktionspartner**

##### **Lipidinteraktionspartner von NS5A im PLOA**

Im Rahmen der Promotion konnten bei Verwendung eines *Protein lipid overlay assays* (s. Abb. 42, 3.3.1.) für NS5A fl und NS5A  $\Delta$ D2+3 eine Vielzahl an Lipidbindungspartnern festgestellt werden. Bei der Etablierung des *Assays* wurden zunächst Membrane Lipid Strips statt Membrane PIP Strips (s. Tab. 11, 2.1.12.) verwendet (s. Abb. 42 o., 3.3.1.). Bei der Nutzung dieser *Strips* zeigten sich neben einer schwachen Bindung an Cardiolipin und einer stärkeren Bindung an PA auch Bindungen an den PPIs PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.

##### **Bindung an Cardiolipin**

Cardiolipin ist eine spezifische Lipidkomponente von Mitochondrien und weist als dimeres Phospholipid zwei Phosphatidylreste auf. Eine Vielzahl an Protein-Interaktionspartnern für Cardiolipin ist bereits bekannt, deren physiologische Relevanz nicht vollständig geklärt ist (Schlame et al., 2000). Berücksichtigt man, dass NS5A eine Rolle bei der Regulation HCV-induzierter Mitophagie spielt (Jassey et al., 2019) und Cardiolipin durch Lokalisationswechsel von der inneren zur äußeren Mitochondrien-Membran als Signalgeber für Mitophagie in Zellen dient (Chu et al., 2013), könnte eine physiologische Bedeutung gegeben sein. Diese Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht, kann aber für weitere Forschung von Interesse sein.

## **Bindung an PA**

Die beobachtbare Interaktion mit PA ist dahingehend interessant, dass PA trotz seiner geringen Menge weniger mol% in biologischen Membranen wichtige Aufgaben in der Signalgebung und Membrandynamik wahrnimmt (Kooijman und Burger, 2009). Es stellt ein wichtiges Intermediat in der Phosphoglycerid-Synthese dar und kann über CDP-Diacylglycerol (DAG) in PtdIns, die Vorstufe von PPIs (s. 1.4.1.), umgewandelt werden (Athenstaedt and Daum, 1999). Für PtdIns selbst war im *Protein lipid overlay assay* keine Interaktion zu erkennen. Auch kann PA durch seine ausgeprägte Kegelform bei der Ausbildung negativer Membrankrümmung beteiligt sein (Zimmerberg and Kozlov, 2006), was im Rahmen des HCV-Lebenszyklus bei der Bildung des membranösen Netzes (s. 1.2.3.) eine Rolle spielen könnte.

## **PPIs als Lipidinteraktionspartner**

Von entscheidender Bedeutung für die vorliegende Promotion war, dass im *Protein lipid overlay assay* Interaktionen mit PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (s. Abb. 42, 3.3.1.) beobachtet wurden. PtdIns(4)P nimmt einen besonderen Stellenwert im HCV-Lebenszyklus ein, da dessen Anreicherung essentiell für die Ausbildung des membranösen Netzes und damit für die Replikation von HCV ist (s. 1.2.3.). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, erfolgt eine Akkumulation von PtdIns(4)P durch eine NS5A-vermittelte Rekrutierung einer spezifischen Kinase, der PI4KIII $\alpha$  (Reiss et al., 2011). Auch die für die Bildung des membranösen Netzes (s. 1.2.3.) notwendige Anreicherung von Cholesterin in Doppelmembran-Vesikeln steht in Zusammenhang mit PtdIns(4)P. Es interagiert mit dem Cholesterin-Transferprotein und PI4-Kinase-Effektor OSBP (Wang et al., 2014) und reguliert somit indirekt die Akkumulation von Cholesterin. Die Beobachtung unseres Kooperationspartners MinKyung Yi von der UTMB Galveston (s. 4.1.), dass für eine Membran-Remodellierung von GUVs durch *full length* NS5A Cholesterin notwendig ist (unpublizierte Daten), betont die Bedeutung von Cholesterin für die Funktionalität von NS5A. Durch die Zusammenhänge von NS5A über PI4KIII $\alpha$ , PtdIns(4)P und OSBP mit Cholesterin wird klar, wie sich NS5A auf die Cholesterin-Menge im membranösen Netz auswirken kann ohne direkt mit Cholesterin zu interagieren. Dies erklärt, warum keine spezifische Bindung von NS5A an Cholesterin im PLOA zu erkennen war (s. Abb. 42 o., 3.3.1.).

Der Fokus wurde im Weiteren auf die Interaktion von NS5A mit PPIs (s. 1.4.) gerichtet und bei weiteren PLOA-Versuchen wurden Membrane PIP Strips (s. Tab. 11, 2.1.12.) verwendet

(s. Abb. 42 u., 3.3.1.). Hier konnten neben der Interaktion mit PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)<sub>2</sub> auch Interaktionen mit PtdIns(3)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> sowie erneut die Interaktion mit PA gezeigt werden (s. 3.3.1.). Andere Phosphoglyceride wie z.B. PS, PE und PC wurden nicht gebunden, sodass von einer spezifischen Interaktion des *full length*-Proteins von NS5A und der trunkierten Variante ΔD2+3 mit PPIs ausgegangen werden kann.

Die Möglichkeit von NS5A zur spezifischen Interaktion mit verschiedenen weiteren PPIs neben PtdIns(4)P kann auch von Interesse sein. So könnte die spezifische Zusammensetzung auch kleiner Mengen an PPIs für die Membrankennzeichnung (s. 1.4.2.) der für den HCV-Zyklus wichtigen Kompartimente, membranösem Netz und Lipidtropfen, entscheidend sein und somit Einfluss auf die Membranwahrnehmung und den Lokalisationswechsel von NS5A nehmen (vgl. 1.2.3.). So würden spezifische Interaktionen mit PPIs zu einer bevorzugten Bindung von NS5A am membranösen Netz führen und eine verminderte Regulation dieser Bindungen könnte einen Wechsel zur PPI-freien Oberfläche (Tauchi-Sato et al., 2002) von Lipidtropfen begünstigen.

Bei der Untersuchung der Lipidinteraktion von NS5A wurde zusätzlich zu *full length* NS5A und der trunkierten Variante ΔD2+3 aus Sf9-Insektzellen auch die Bindung von NS5A ΔD2+3 aus *E. coli* analysiert (s. Abb. 42, 3.3.1.). Vergleicht man die Bindungsmuster treten bei NS5A ΔD2+3 aus *E. coli* zusätzliche Lipidbindungspartner auf. So wurden zusätzlich zu den Lipidbindungspartnern nach Expression des Proteins in Sf9-Insektzellen eine Interaktion mit PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und sehr schwache Bindungen an LPA und LPC festgestellt. Außerdem liegen Unterschiede in der relativen Affinität innerhalb der verschiedenen aufgetropften Lipide vor.

Diese Abweichungen vom bisher beobachteten Muster können auf fehlende posttranslationale Modifikationen in *E. coli* wie Phosphorylierungen zurückzuführen sein. Es muss aber auch berücksichtigt werden, dass NS5A ΔD2+3 aus *E. coli* weniger rein vorlag (s. Abb. 25., 3.1.1. und 4.1.). Wie bereits unter 3.1.3. angemerkt, weist der in der Promotion verwendete NS5A-Antikörper von ViroGen (s. Tab. 14, 2.1.15.) eine sehr hohe Sensitivität auf. Trotz verschiedener Optimierungsversuche hatte die Verwendung dieses Antikörpers im PLOA einen zu starken Hintergrund für eine adäquate Auswertung zur Folge. Aus diesem Grund wurde für die Detektion von NS5A ΔD2+3 aus *E. coli* ein His-Antikörper (s. Tab. 14, 2.1.15.) verwendet. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige der detektierten Lipidinteraktionen durch Verunreinigungen hervorgerufen wurden. Auch besteht die Möglichkeit, dass Verunreinigungen bei der Lipidbindung mit NS5A ΔD2+3

konkurrierten. Dies könnte auch eine Ursache für die im Vergleich zu NS5A  $\Delta$ D2+3 aus Sf9-Zellen abweichenden Bindungsaffinitäten innerhalb der aufgetropften Lipide sein. Die Untersuchungen mit NS5A  $\Delta$ D2+3 aus *E. coli* wurden aus diesen Gründen nicht fortgesetzt.

Eine Phospholipid-Interaktion von NS5A mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wurde bereits von Cho et al. (2015) unter Verwendung einer Quarzkristall-Mikrowaage mit Verlustüberwachung (QCM-D) beobachtet (s. 1.4.3.). Allerdings wurden in dieser Arbeit im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit keine weiteren Interaktionen von NS5A mit PPIs nachgewiesen. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen angewandten Methoden zur Bestimmung der Lipidinteraktion zurückzuführen. Bei der QCM-D wird über Frequenzänderungen eines Quarzkristalls die Masse adsorbierender Stoffe wie Lipide, Proteine oder DNA bestimmt (Ausili et al., 2012). Dabei wurde bei Cho et al. (2015) die Möglichkeit genutzt, den Quarzkristall-Sensor mit Liposomen verschiedener PPI-Zusammensetzung zu beschichten (s. 1.4.3.) und die Interaktion mit dieser Oberfläche zu untersuchen (Ausili et al., 2012). Zur Stabilisierung der Liposomenschicht war hierbei eine Polymerisierung mit dem *cross-linker* Polydiacetylen notwendig (Cho et al., 2015). Ein Einfluss dieser Polymerisierung auf die Interaktion von NS5A mit der Liposomenschicht kann nicht ausgeschlossen werden.

Noch gravierender ist, dass bei Cho et al. (2015) die Interaktionsversuche für alle PPIs nur mit der N-terminalen amphipathischen Helix von NS5A durchgeführt wurden, welche chemisch synthetisiert wurde. Zwar wurde in weiteren Untersuchungen auch das *full length* NS5A-Protein verwendet, jedoch wurde dieses *full length* NS5A nach Huang et al. (2004) in *E. coli* exprimiert. Im Gegensatz zum in der vorliegenden Promotion verwendeten Protein aus Sf9-Insektenzellen, *full length* NS5A und der trunkierten Variante  $\Delta$ D2+3, wies das von Cho et al. verwendete Protein demnach keine posttranslationalen Modifikationen auf. Darüber hinaus wurde bei Cho et al. (2015) eine mögliche Interaktion des *full length* Proteins von NS5A nur in Hinsicht auf PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> untersucht.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Protein lipid overlay assay* zur Bestimmung der Lipidinteraktionen von *full length* NS5A und  $\Delta$ D2+3 handelt es sich um eine einfache, zeitsparende und kostengünstige Methode (Dowler et al., 2002), die zudem sehr sensitiv ist. Durch die Verwendung von Membrane Lipid Strips und Membrane PIP Strips (s. Tab. 11, 2.1.12.) konnte im Gegensatz zur Arbeit von Cho et al. (2015) ein *Screening* einer größeren Anzahl an Lipiden auf Interaktionen mit NS5A durchgeführt werden. Mögliche Fehler in Hinsicht auf Verunreinigungen, fehlerhafte Blockierung der *Strips* und unspezifische Bindungen wurden durch die Optimierung des *Assays* gemäß den Empfehlungen nach Shirey

et al. (2017) minimiert. Dennoch muss angemerkt werden, dass es sich bei den verwendeten *Strips* (s. Tab. 11, 2.1.12.) um stark vereinfachte Modelle zur Untersuchung von Lipidinteraktion handelt. Durch das lokal hoch konzentrierte Vorliegen von je nur einer Art an Lipid pro Tropfen auf einem *Strip*, weichen die Bedingungen deutlich von physiologischen Bedingungen innerhalb einer biologischen Membran ab.

Der *Protein lipid overlay assay* ermöglicht demnach noch keine Zuordnung der Protein-Lipid-Interaktionen bezüglich ihrer physiologischen Relevanz (Narayan und Lemmon, 2006). Allerdings gibt es auch Beispiele, dass schwache Lipidinteraktionen mit physiologischer Relevanz nur aufgrund der hohen Sensitivität im *Protein lipid overlay assay* nachzuweisen waren (Narayan and Lemmon, 2006). So wurden beispielsweise Interaktionen der PH-Domäne von Dynamin (Lee et al., 1999, Achiriloaie et al., 1999 und Vallis et al., 1999) und der Proteine Slm1p und Slm2p von *S. cerevisiae* (Audhya et al., 2004 und Yu et al., 2004) entdeckt.

### **Liposomen und Rekonstitutionsversuch**

Um Lipidinteraktionen aus dem *Protein lipid overlay assay* in einem „physiologischeren“ Membranmodell zu verifizieren, wurden Liposomen eingesetzt. Im Rahmen der Promotion konnte eine Methode zur Herstellung von Liposomen und NS5A-Rekonstitution etabliert werden.

Es wurde angenommen, dass durch das Vorliegen spezifischer Lipidinteraktionspartner in der Liposomenmembran die Bindung von NS5A unterstützt und damit die Menge rekonstituierten NS5As erhöht sein sollte. Als Kontrolle wurde der Effekt von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> im Liposomenmodell auf den Rekonstitutionserfolg untersucht, da hier neben dem *Protein lipid overlay assay* auch bereits von Cho et al. (2015) eine Interaktion mit NS5A beschrieben wurde (s. 1.4.3.). Weiterhin wurde der Effekt von PtdIns(4)P im Liposomenmodell auf die NS5A-Bindung und den Rekonstitutionserfolg überprüft. PtdIns(4)P spielt eine besondere Rolle im HCV-Lebenszyklus (s. 1.2.3.), ist in Membranen des membranösen Netzes angereichert (Bianco et al., 2012) und somit als potentieller physiologischer Interaktionspartner von NS5A von besonderem Interesse. Da bei einer HCV-Infektion auch die Cholesterol-Konzentration in der Membran von Bedeutung ist (Paul et al., 2014), wurde zusätzlich der Effekt unterschiedlicher Cholesterol-Konzentrationen auf den Rekonstitutionserfolg untersucht.

*Full length* NS5A und die trunkierte  $\Delta$ D2+3-Variante konnten in Liposomen verschiedener Zusammensetzung erfolgreich rekonstituiert werden (s. Abb. 46 und Tab. 26, 3.3.4.). Bei Betrachtung der Rekonstitution von *full length* NS5A (s. Abb. 46 **A, B, C** und Tab. 26, 3.3.4.) konnte passend zu den Ergebnissen von Cho et al. (2015) in Liposomen mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> eine bessere Rekonstitution als in Liposomen mit Cholesterol und PtdIns(4)P festgestellt werden. Dies weist zunächst auf eine spezifische Interaktion von NS5A mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> hin.

Allerdings ist die Menge an rekonstituiertem *full length* NS5A in Liposomen mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> nicht wesentlich größer als in der Negativkontrolle. Außerdem waren die Ergebnisse bei der Rekonstitution von NS5A  $\Delta$ D2+3 (s. Abb. 46 **D, E, F** und Tab. 26, 3.3.4.) nicht mit den Ergebnissen bei der Rekonstitution von *full length* NS5A vereinbar. Hier war die Rekonstitution in der Negativkontrolle deutlich höher als in den Liposomen mit PPI. In Liposomen mit PtdIns(4)P war eine bessere NS5A-Rekonstitution als in Liposomen mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> nachweisbar. Des Weiteren waren die Rekonstitution von NS5A  $\Delta$ D2+3 in der Negativkontrolle ohne PPI und in Liposomen mit PtdIns(4)P deutlich höher als bei der Rekonstitution von *full length* NS5A. Bei Liposomen mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gab es im Vergleich von *full length* NS5A und  $\Delta$ D2+3 keinen deutlichen Unterschied.

Beachtenswert ist auch, dass die Rekonstitution von NS5A in der Negativkontrolle mindestens gleichermaßen gut ausfiel im Vergleich zur Rekonstitution von NS5A in Liposomen mit potentiellen Phospholipid-Interaktionspartnern des Proteins. Demnach könnte bei der Rekonstitution die Bindung der N-terminalen amphipathischen Helix von NS5A eine übergeordnete Rolle spielen und die Interaktion von PPIs eine für die Membranerkennung von NS5A untergeordnete Rolle.

Es ist allerdings anzumerken, dass es sich um erste Ergebnisse eines neu etablierten *Assays* handelt, welche noch reproduziert werden müssen, um signifikante Aussagen zu treffen.

### **Grundlagen für die Imitation von Membranen des membranösen Netzes und Lipidtropfen**

Durch die Rekonstitution von NS5A in Liposomenmodellen wurden wichtige Grundlagen gelegt, um zu komplexeren Liposomen-Zusammensetzungen zu wechseln. Diese können die Lipid-Zusammensetzung von intrazellulären Membranen, die für NS5A und den viralen Replikationszyklus bedeutend sind, detaillierter widerspiegeln (Zhao und Lappalainen, 2012).

Als Orientierung können für die Membranen des vom ER abstammenden membranösen Netzes die Angaben von Eggens et al. (1988) und für die Zusammensetzung von Lipidtropfen die Angaben von Tauchi-Sato et al. (2002) dienen. Die Beobachtung von Hofmann et al. (2018), dass sich das Lipidprofil mikrosomaler Fraktionen und von Lipidtropfen in HCV-infizierten Zellen verändert und langkettigere Fettsäuren in Lipiden vermehrt auftreten, sollte auch mit einbezogen werden. Zusätzlich sollte auch berücksichtigt werden, dass in Membranen des membranösen Netzes insbesondere PtdIns(4)P und Cholesterol angereichert vorliegen (s. 1.2.3.).

Welche Menge an PtdIns(4)P im Liposomenmodell passend festzulegen wäre, ist schwer abzuschätzen, da PtdIns(4)P im ER nicht in detektierbarer Menge vorliegt (Hammond und Balla, 2015) und konkrete quantitative Angaben zur Anreicherung im Rahmen einer HCV-Infektion in der Literatur nicht verfügbar sind. Ausgehend von allgemeinen Angaben von Hammond und Balla (2015) können jedoch die von Cho et al. (2015) verwendeten 5 mol% für PPI als zu hoch angesehen werden. Die in der vorliegenden Arbeit etablierten 2 mol% (s. Tab. 21, 2.2.3.7.) erscheinen demnach eher physiologisch und sollten in Folgeversuchen als Ausgangspunkt verwendet werden. Da im *Protein lipid overlay assay* auch eine Interaktion mit PA gezeigt werden konnte, sollte auch PA eine Komponente der Liposomenmodelle sein. Eine geeignete Menge muss noch evaluiert werden.

In Hinsicht auf die Menge einzusetzenden Cholesterols ist anzumerken, dass die Rekonstitution von *full length* NS5A in Liposomen mit 20 % Cholesterol im Vergleich zu Liposomen ohne Cholesterol deutlich niedriger war (s. Abb. 46 A, B, C, 3.3.4.). Hinzu kommt die interessante Beobachtung, dass nur bei Liposomen mit Cholesterol die Liposomschicht nach der Nycodenz-Dichtegradienten-Zentrifugation nicht aggregiert vorlag (s. Abb. 45, 3.3.4.). In Etablierungsversuchen zur Rekonstitution (keine Abb. gezeigt) konnte dies auch entsprechend beobachtet werden.

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass sich Cholesterol nicht nur auf die Lipidinteraktion von NS5A auswirken kann, sondern auch Einfluss auf die Stabilität und Größe der hergestellten Liposomen hat (Jovanović et al., 2018). Die Größe der hergestellten Liposomen ist einerseits wichtig, um Effekte der Membrankrümmung auf die NS5A-Interaktion zu untersuchen (s. Abb. 16, 1.5.3.). Andererseits ist sie aber auch in Bezug auf ein von Cho et al. (2009) berichtetes Lysepotential durch die N-terminale amphipathische Helix von NS5A in Abhängigkeit von der Vesikelgröße der Liposomen von Bedeutung. Diese Beobachtungen erfolgten mit NS5A-AH-Peptid (Cho et al., 2009) und Vesikeln kleiner

als 90 nm. Demnach kann ein ähnlicher Effekt der amphipathischen Helix im *full length* Protein bei Rekonstitution in Liposomen mit 20 % Cholesterol nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte die fehlende Aggregation innerhalb der Liposomschicht nach der Zentrifugation und auch den geringeren Rekonstitutionserfolg erklären.

#### 4.3.2. Bedeutung der NS5A-Domänenarchitektur für die Lipidbindung

Um die Bedeutung der verschiedenen Domänen von NS5A (s. Abb. 8, 1.3.1.) bei der Lipidbindung näher zu analysieren, wurden die Lipidinteraktionen des *full length* Proteins, der trunkierten Variante NS5A  $\Delta$ D2+3 und von NS5A-AH miteinander verglichen.

Beim direkten Vergleich der Lipidinteraktion von NS5A  $\Delta$ D2+3 und NS5A fl zeigte die trunkierte Variante eine deutlich schwächere PPI-Bindung im *Protein lipid overlay assay* (s. Abb. 44 B, 3.3.3.).

Das in der vorliegenden Promotion verwendete synthetisch hergestellte NS5A-AH-Peptid (s. Tab. 12, 2.1.13.) zeigte im *Protein lipid overlay assay* im Gegensatz zur Arbeit von Cho et al. (2015) keine PPI-Bindung (s. Abb. 43 B, 3.3.2.). Dies kann ggf. durch die unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Lipidinteraktion, QCM-D bei Cho et al. (2015) und PLOA in der vorliegenden Promotion, erklärt werden. Der fehlende Nachweis einer spezifischen Lipidinteraktion von NS5A-AH in der vorliegenden Arbeit könnte eventuell auf eine geringere Affinität der PPI-Bindung durch die amphipathische Helix und einen Verlust der Interaktion durch multiple Waschschrte im PLOA zurückzuführen sein, wohingegen die Interaktion und Affinität im *full length* Protein oder der trunkierten Variante  $\Delta$ D2+3 wesentlich stabiler zu sein scheint. In einem Wettbewerbsversuch mit NS5A-AH und *full length* NS5A konnte trotz 10-fach molaren Überschusses von NS5A-AH die PPI-Bindung des *full length* Proteins nicht gemindert oder aufgehoben werden, was die deutlich höhere Affinität des *full length* Proteins zu PPIs unterstreicht (s. Abb. 43 C, 3.3.2.).

Von Cho et al. (2015) konnte eine eindeutige Bindung von synthetischem NS5A-AH (SGSWLRD~~V~~WDW~~I~~CTVLTDFKTWLQSKLDYKD, Anaspec: AS-60430-1) an Liposomen mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beobachtet werden (s. Abb. 12, 1.4.3.). Die verwendete Sequenz von NS5A-AH wurde von Elazar et al. (2003) übernommen. In der vorliegenden Arbeit wurde synthetisches 6x His-NS5A-AH mit der Sequenz HHHHHHMSGSWLRD~~V~~WDW~~V~~CTVLTDFKTWLQSKLLPR eingesetzt. Die Sequenzunterschiede (rot markiert) beider NS5A-AHs sind auf Genotyp-Unterschiede der beiden HCV-Sequenzen zurückzuführen. Die Unterschiede sind jedoch gering und die physikochemischen Eigenschaften der

Aminosäuren bleiben durch konservative Austausche überwiegend erhalten (I/V, T/S und K/R). Der für die PPI-Interaktion wesentliche Sequenzabschnitt (fett markiert) (nach Cho et al. (2015) mit der essentiellen BAAPP-Domäne (s. 1.4.3.)) ist jeweils identisch. Die PPI-Bindungsverhalten zu NS5A-AH aus der hier vorliegenden Arbeit unter Verwendung von PLOAs und den Ergebnissen von Cho et al. (2015) unterscheiden sich voneinander. Die Unterschiede deuten darauf hin, dass die Lipid-Interaktion von NS5A-AH zwar ausreichend affin ist, um mittels QCM-D im Liposomschicht-Modell von Cho et al. (2015) bevorzugt an Liposomen mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu binden, jedoch keine notwendige Affinität aufweist, um ein entsprechendes Ergebnis auch im PLOA zu zeigen.

In Zusammenschau legen die Ergebnisse aus der vorliegenden Promotion nahe, dass für das PPI-Interaktionsmuster die Domäne 1 von NS5A wesentlich ist und die amphipathische Helix eher eine Rolle beim *membrane sensing* spielt, möglicherweise im Zusammenspiel mit der Domäne 1 bei der PPI-Bindung von Relevanz ist.

### **Hypothese für die Membranbindung von NS5A**

Basierend auf den Daten aus der vorliegenden Arbeit und Daten aus der Literatur kann der folgende Mechanismus zur Membranbindung für NS5A angenommen werden:

Eine unspezifische Bindung über die AH führt zunächst zu einer ersten Assoziation und Ausrichtung von NS5A an der Membran des entstehenden Replikationskomplexes. Durch Interaktion mit NS5A kommt es zur Aktivierung von PI4KIII $\alpha$  (Reiss et al., 2011) und damit zur PI4KIII $\alpha$ -abhängigen Stimulierung der Produktion von PtdIns(4)P (Berger et al., 2014). Über die Interaktion von PtdIns(4)P mit dem Lipidtransfer-Protein OSBP kommt es zusätzlich zu einer Akkumulierung von Cholesterol (Wang et al., 2014). Eventuell wird außerdem die Membranzusammensetzung in Hinsicht auf weitere PPIs, deren Interaktionen mit NS5A im PLOA beobachtet wurden, durch noch nicht aufgeklärte Mechanismen angepasst.

Die Anpassung des Lipidmilieus ermöglicht eine spezifische Interaktion und Membranerkennung durch NS5A-D1 passend zu den im PLOA beobachteten Lipidinteraktionen. Die PPI-Interaktionen mit NS5A-D1 und der amphipathischen Helix unterstützen ggf. weitere Konformationsänderungen im NS5A-Protein und triggern dadurch wahrscheinlich die Ausbildung von Doppelmembran-Vesikeln (Romero-Brey et al., 2012). Die im PLOA beobachtete stärkere Lipidbindung des *full length* Proteins im Vergleich zu NS5A  $\Delta$ D2+3 legt nahe, dass die Domänen D2 und D3 ebenfalls zur Lipidinteraktion beitragen. Da hier kein

Einfluss auf das Lipidbindemuster zu beobachten war (s. Abb. 44 C, 3.3.3.), ist hier von einem unspezifischen Beitrag zur Bindungsaffinität von NS5A an die Membran auszugehen. Ein mögliches Modell wäre eine Rückfaltung der filamentären Strukturen zur Membran hin.

Die große Anzahl an beschriebenen Wirtszellfaktoren, die mit NS5A interagieren (s. 1.3.3.), kann bei den Konformationsänderungen von NS5A eine Rolle spielen. Auch der Phosphorylierungszustand (s. 1.3.2.) von NS5A ist für dessen Konformation und Funktion von Bedeutung (s. 1.3.3.). Dabei ist besonders interessant, dass die von NS5A rekrutierte Kinase PI4KIII $\alpha$  nicht nur durch Erhöhung des PtdIns(4)P-Gehalts das Lipidmilieu von NS5A verändert (s.o.), sondern auch den Phosphorylierungszustand von NS5A beeinflusst (Reiss et al., 2013). PI4KIII $\alpha$  sorgt dafür, dass NS5A vermehrt im basal phosphorylierten Zustand (p56) vorliegt (Reiss et al., 2013), was einen wichtigen Regulationsmechanismus darstellen kann.

Durch Interaktionen mit Wirtsfaktoren und Phosphorylierung werden wahrscheinlich weitere Konformationsänderungen im NS5A-Protein getriggert. Diese könnten zur Membraninteraktion von NS5A, zur Membran-Remodellierung und/oder zum Wechsel zwischen subzellulären Kompartimenten, insbesondere zwischen membranösem Netz und Lipidtropfen, beitragen. Somit könnten die Konformationsänderungen die Funktion von NS5A zwischen Replikation und Virionassemblierung (s. 1.2.3. und 1.3.3.) modulieren.

### **4.3.3. Einfluss des NS5A-Inhibitors Daclatasvir**

Daclatasvir ist ein Prototyp einer antiviralen Wirkstoffklasse, der NS5A-Inhibitoren, die zu den potentesten bisher entwickelten antiviralen Medikamenten gehören. Der Wirkmechanismus dieser Substanzklasse ist bisher jedoch gänzlich unklar (s. 1.5.). Durch die vermutete membrannahe Bindestelle von Daclatasvir wird deutlich, dass durch ein tieferes Verständnis der Protein-Lipid-Interaktionen von NS5A auch der Wirkmechanismus dieser Substanzklasse besser charakterisiert werden könnte und umgekehrt auch neue Informationen zur Rolle von NS5A im HCV-Lebenszyklus gewonnen werden könnten.

Eines der Ziele dieser Arbeit war zu klären, ob der Wirkmechanismus von Daclatasvir über einen Effekt auf die Lipidinteraktion von NS5A zu erklären ist. Da es Hinweise aus dem infektiösen Zellkultursystem gibt, dass Daclatasvir die Neubildung sogenannter Replikationskomplexe hemmt, aber keinen Effekt auf bereits bestehende Replikationskomplexe hat (McGivern et al., 2014), wurde Daclatasvir in der vorliegenden Promotionsarbeit zum einen bereits bei der Expression und Reinigung von NS5A zugegeben und zum anderen erst im

*Protein lipid overlay assay* bei der Inkubation von NS5A mit auf die *Strips* gegeben. Die Daclatasvir-Molarität von 10 nM bei der Expression und Reinigung und von 10  $\mu$ M beim PLOA lagen deutlich über dem von Gao et al. (2010) bestimmten niederpicomolaren Wirkungsbereich der Inhibitoren.

### **Kein Effekt von Daclatasvir auf das Lipidbindungsmuster von NS5A $\Delta$ D2+3**

Weder bei der Zugabe von Daclatasvir bei der Expression und Reinigung von NS5A  $\Delta$ D2+3 noch bei der Zugabe von Daclatasvir beim *Protein lipid overlay assay* konnte eine Auswirkung auf die detektierten Lipidinteraktionsmuster von NS5A  $\Delta$ D2+3 festgestellt werden (s. Abb. 44, 3.3.3.). Zwar wurde ein insgesamt schwächeres Signal im Vergleich zum PLOA mit *full length* NS5A beobachtet, allerdings ist dies vermutlich auf den Effekt der deletierten Domänen D2 und D3 zurückzuführen (s. 4.3.2.) und kein direkter Effekt durch den Inhibitor. Erste Untersuchungen mit dem *full length* Protein, bei Zugabe von 10 nM Daclatasvir während der Expression und Reinigung, wiesen hingegen auf einen potentiellen Effekt des NS5A-Inhibitors auf die Bindungsaffinität zu Phospholipiden hin (keine Abb. gezeigt). Eine Reproduktion dieser Ergebnisse steht noch aus. Die Untersuchung zum Effekt von Daclatasvir im Liposomenmodell sind Teil eines Folgeprojektes aufbauend auf den Ergebnissen aus der hier vorliegenden Promotion.

### **Effekte von Daclatasvir auf die NS5A-Bindungsaffinität zu verschiedenen Phospholipiden**

Im *Protein lipid overlay assay* konnten keine Effekte auf das Lipidbindungsmuster von NS5A  $\Delta$ D2+3 bei Zugabe von Daclatasvir beobachtet werden. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Daclatasvir die Bindungsaffinitäten von NS5A zu den verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Phospholipid-Interaktionspartnern des Proteins beeinflusst. Derartige Veränderungen der Phospholipid-Interaktion könnten zu einer veränderten Membranerkennung von NS5A beitragen und unter Umständen die veränderte subzelluläre Lokalisierung und Umverteilung von NS5A vom ER zu Lipidtropfen nach Behandlung mit Daclatasvir (Targett-Adams et al., 2011) erklären.

Der *Protein lipid overlay assay* ist eine hervorragende Methode für ein schnelles, sensitives *Screening* zur qualitativen Bestimmung möglicher Lipidinteraktionspartner. Für einen quantitativen Vergleich von Bindungsaffinitäten ist der PLOA jedoch ungeeignet (Dowler et al., 2002). So nimmt bereits die unterschiedliche Wasserlöslichkeit der verschiedenen Phospholipide in Abhängigkeit von der Anzahl ihrer Phosphorylierungen

Einfluss auf das Bindungssignal (Narayan and Lemmon, 2006). Bei den vielzähligen Waschschritten des PLOAs wird PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> stärker als PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und diese stärker als PtdIns(3)P, PtdIns(4)P und PtdIns(5)P von den *Strips* gelöst, was die jeweiligen Bindungssignale unterschiedlich beeinflusst. Auch kann es im Rahmen der Chemilumineszenz-Messung des PLOAs bei starker Bindung zu einer Übersättigung des Lipidbindesignals kommen, was sich in einem Halo-Effekt mit Kaffeering-artigem Erscheinungsbild äußert (Echelon Biosciences Inc., 2020). Derartige Signale können nicht zuverlässig durch Densitometrie ausgewertet werden.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen aus dieser Arbeit sollten weiterführende quantitative Untersuchungen zum Effekt von Daclatasvir auf die NS5A-Lipid-Bindungsaffinität mit dafür ggf. besser geeigneten Methoden durchgeführt werden, beispielsweise der *Surface plasmon resonance* (Beseničar et al., 2006 und Patching, 2014).

#### **4.3.4. *In silico*-Charakterisierung möglicher Phospholipid-Bindestellen in NS5A**

Basierend auf den hier dargelegten Lipidinteraktionsmustern ist davon auszugehen, dass neben der von Cho et al. (2015) beschriebenen BAAPP-Domäne der amphipathischen Helix weitere Bindestellen für Phospholipide in AH-NS5A-D1 existieren.

##### **Analyse in einem animierten Modell basierend auf verfügbaren experimentellen Strukturdaten zu NS5A**

Mit Hilfe eines animierten (dynamischen) *in silico*-Strukturmodells (Nettles et al., 2014) (s. 2.2.3.8.10.) aus verfügbaren Röntgenstrukturdaten der Domäne D1 von NS5A aus der Proteindatenbank RCSB PDB (Tellinghuisen et al., 2005 und Love et al., 2009) sowie Strukturinformationen zur N-terminalen amphipathischen Helix von NS5A (Penin et al., 2004b) konnten mehrere potentielle Bindungsstellen für Phospholipide in AH-NS5A-D1 identifiziert werden. Basierend auf einem *in silico*-Strukturmodell von Nettles et al. (2014) ist anzunehmen, dass sich Phospholipid-Bindestellen in NS5A erst bei Lipidinteraktion des Proteins und daraus resultierenden Konformationsänderungen zwischen der amphipathischen Helix mit und innerhalb der Domäne 1 von NS5A ausbilden.

##### **Identifikation von *Clustern* positiv geladener Aminosäuren als potentielle Phospholipid-Bindungsstellen in NS5A**

„Klassische“ Phospholipid-Bindungsdomänen nach Lemmon et al. (2008) wie z.B. FYVE-Domänen, PX-Domänen, Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen oder PROPPIN (PPI bindende  $\beta$ -Propeller)-Domänen waren in NS5A nicht zu identifizieren.

Bei der Suche nach Gruppen positiv geladener Aminosäuren, Histidin, Lysin und Arginin, als potentielle Interaktions- bzw. Bindungspartner für negativ geladene Kopfgruppen der Phospholipide, konnten allerdings drei entsprechende Aminosäure-*Cluster* in der Domäne 1 von NS5A identifiziert werden (s. Abb. 47, 3.3.5.):

Der *Cluster* I mit den Aminosäuren H66, K68 und R73 befindet sich in einer aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix bestehenden Region mit im Vergleich zu beschriebenen Phospholipid-Bindungsdomänen aus der Literatur vergleichbar komplexer Proteinarchitektur. Im Unterschied zu den *Clustern* II und III besteht der *Cluster* I weiterhin aus Aminosäuren eines NS5A-Monomers, wohingegen die *Cluster* II und III jeweils aus Aminosäuren eines NS5A-Dimers bestehen.

*Cluster* II weist mit R48, R112, H159, R160 aus einem NS5A-Monomer und R30 aus dem interagierenden zweiten NS5A-Monomer die größte Anzahl an beteiligten Aminosäuren und damit eventuell stärkste Bindung zu Phospholipiden auf. Jedoch ist die Frage zu klären, inwiefern die in der Nähe befindliche negativ geladene Glutaminsäure E148 die potentielle Bindung negativer Kopfgruppen der Phospholipide beeinträchtigen kann. *Cluster* II weist mit R30 eine Aminosäureposition in unmittelbarer Nachbarschaft zur von Cho et al. (2015) beschriebenen BAAPP-Domäne innerhalb der amphipathischen Helix von NS5A auf. Basierend auf unserem dynamischen Strukturmodell könnten *Cluster* II und die BAAPP-Domäne gemeinsam zu einer Phospholipid-Bindungsstelle beitragen.

Im Gegensatz zu den beiden anderen *Clustern* wird *Cluster* III hingegen nur von zwei Aminosäuren gebildet, R78 und K166 aus jeweils zwei interagierenden NS5A-Molekülen eines Dimers. Die Bindungsaffinität gegenüber Phospholipiden könnte demnach deutlich schwächer im Vergleich zu den *Clustern* II und III sein.

Die Bedeutung der identifizierten *Cluster* als mögliche Phospholipid-Bindungsstellen wird aktuell im Rahmen eines Folgeprojektes durch Mutationsversuche überprüft. So werden je K68 von *Cluster* I, R160 von *Cluster* II und R166 von *Cluster* III durch nicht-konservative Aminosäureaustausche gegen negativ geladene Glutaminsäure ersetzt, um potentielle Effekte auf das Lipidbindungsmuster von NS5A im PLOA und Liposomenmodell zu charakterisieren.



## 5. Ausblick

Im Rahmen dieser Promotion wurden parallel zur erfolgreichen Expression und Reinigung von *full length* NS5A und der trunkierten Variante  $\Delta$ D2+3 im Baculovirus-vermittelten Sf9-Insektenzellsystem unterschiedliche weitere Methoden etabliert, um strukturelle Veränderungen und potentielle Lipidinteraktionen mit dem gereinigten Protein sicher identifizieren und weiter charakterisieren zu können sowie Untersuchungen zum Wirkmechanismus von NS5A-Inhibitoren durchführen zu können.

Die im *Thermal shift assay* beobachteten Auswirkungen des Metallion-Chelators EDTA und des NS5A-Inhibitors Daclatasvir auf die Proteinfaltung und Stabilität von NS5A müssen weiter verifiziert und charakterisiert werden, insbesondere um die Bedeutung unterschiedlicher Proteinkonformationen von NS5A für den Wirkmechanismus von NS5A-Inhibitoren besser zu verstehen. Auch können Effekte von Lipiden auf die Proteinfaltung im *Thermal shift assay* in *Nanodiscs* (Nath et al., 2007) oder Liposomenmodellen untersucht werden. Erste Versuche mit Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung zur Untersuchung der Stabilität von NS5A im *Thermal shift assay* sind bereits erfolgt.

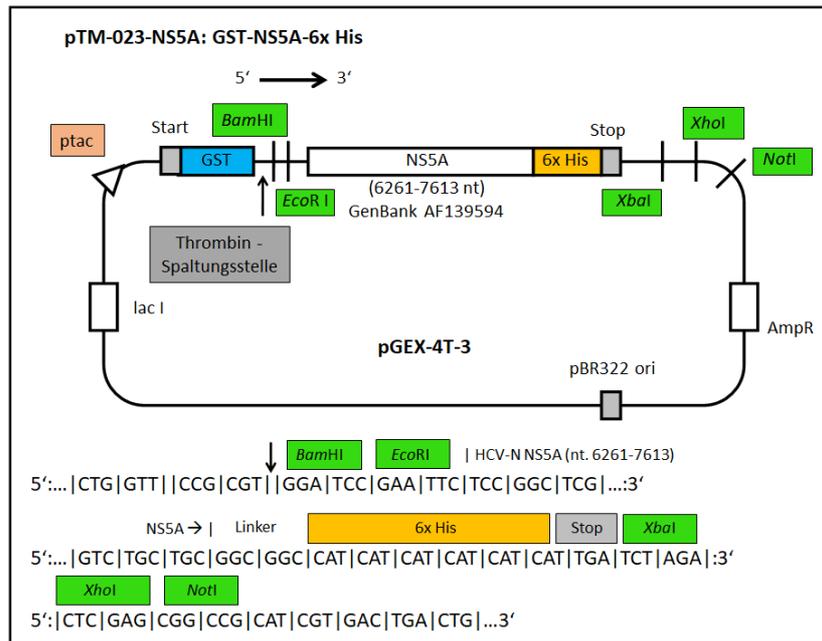
Ein Schlüsselergebnis der hier vorliegenden Promotionsarbeit ist die Beobachtung, dass die Spezifität der Lipidinteraktion von NS5A primär über die Domäne 1 vermittelt wird und die Domänen 2 und 3 eher zur Bindungsaffinität beitragen und diese ggf. durch einen komplexen Konformationswandel und eine Rückfaltung zur Membran verstärken. Das hieraus abgeleitete mechanistische Modell kann als Grundlage für weitere Experimente zur Charakterisierung der NS5A-Membraninteraktionen dienen und unter Einbezug der identifizierten Lipidinteraktionspartner für weitere mechanistische Betrachtungen zum Wirkmechanismus von NS5A-Inhibitoren verwendet werden.

Besondere Priorität hat hierbei die Verifizierung der *in silico* innerhalb NS5A-Domäne 1 identifizierten potentiellen Phospholipid-Bindestellen. Ergebnisse aus den hieraus abgeleiteten Mutationsprotokollen ermöglichen ggf. eine weitere Charakterisierung der Protein-Membraninteraktion und Optimierung der dynamischen Strukturmodelle unter Einbeziehung unterschiedlicher Lipidmilieus beispielsweise im ER, membranösen Netz und in Lipidtropfen. Aktuell laufen bereits erste Untersuchungen zur Membran-Remodellierung in sogenannten *giant unilamellar vesicles* (GUVs) (Kooperation mit Professor MinKyung Yi an der UTMB, Galveston, USA) unter Einbeziehung unterschiedlicher Lipidzusammen-

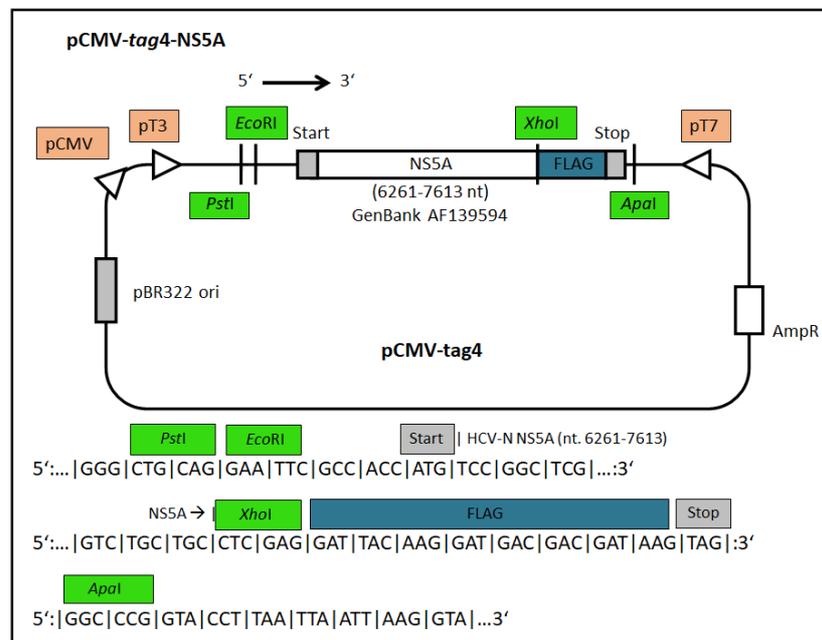
setzungen der GUVs basierend auf den Ergebnissen der hier vorgelegten Promotionsarbeit und unter Verwendung des hier exprimierten und gereinigten *full length* Proteins.

Langfristig sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als Grundlage für Folgeexperimente über die Promotion hinaus dienen und weiterführende Untersuchungen zur Rolle von NS5A in der Biologie des HCV sowie zur Bedeutung von Protein-Lipid-Interaktionen und zur Membran-Remodellierung bei RNA-Viren ermöglichen.

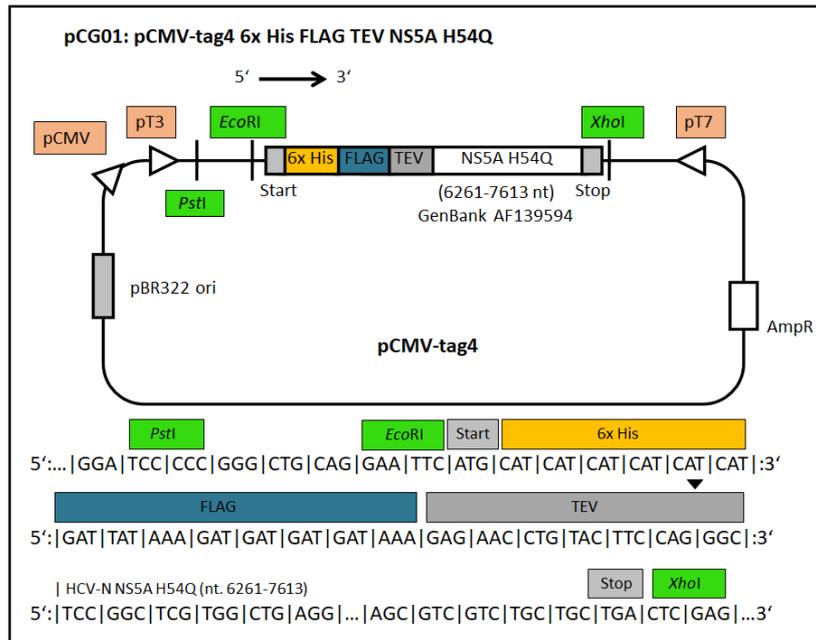
## 6. Anhang



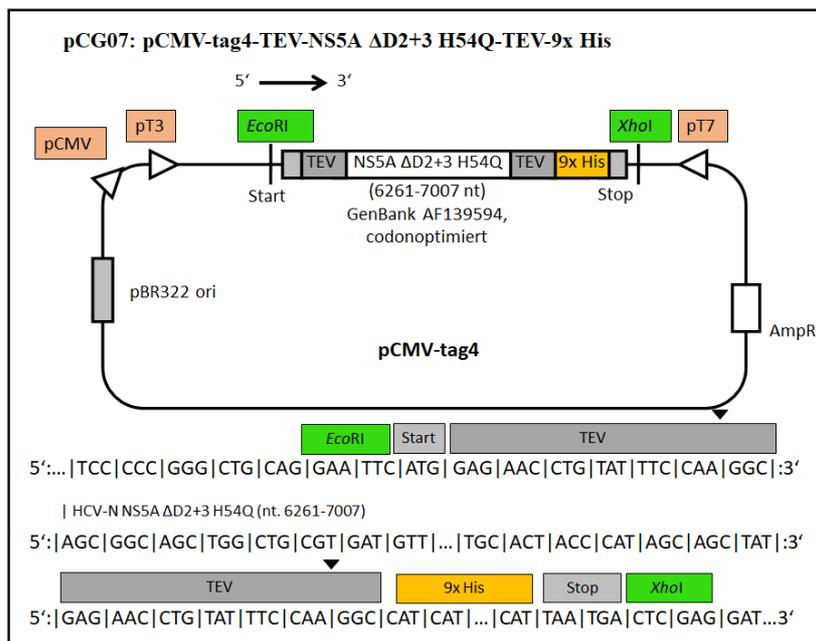
**Anhang A: Plasmidkarte von pTM-023-NS5A.** Erstellt nach Angaben von Stanley M. Lemon (s. 2.1.10., Tab. 9) und ergänzt mit Informationen zu pGEX-4T-3 ([www.addgene.org/vector-database/2875/](http://www.addgene.org/vector-database/2875/)). NS5A: HCV-GT 1b N-Stamm, 6261-7613 nt, GenBank AF139594.



**Anhang B: Plasmidkarte von pCMV-tag4-NS5A.** Erstellt nach Angaben von Stanley M. Lemon (s. 2.1.10., Tab. 9) und ergänzt mit Informationen zu pCMV-tag4 ([www.addgene.org/vector-database/2232/](http://www.addgene.org/vector-database/2232/)). NS5A: HCV-GT 1b N-Stamm, 6261-7613 nt, GenBank AF139594.

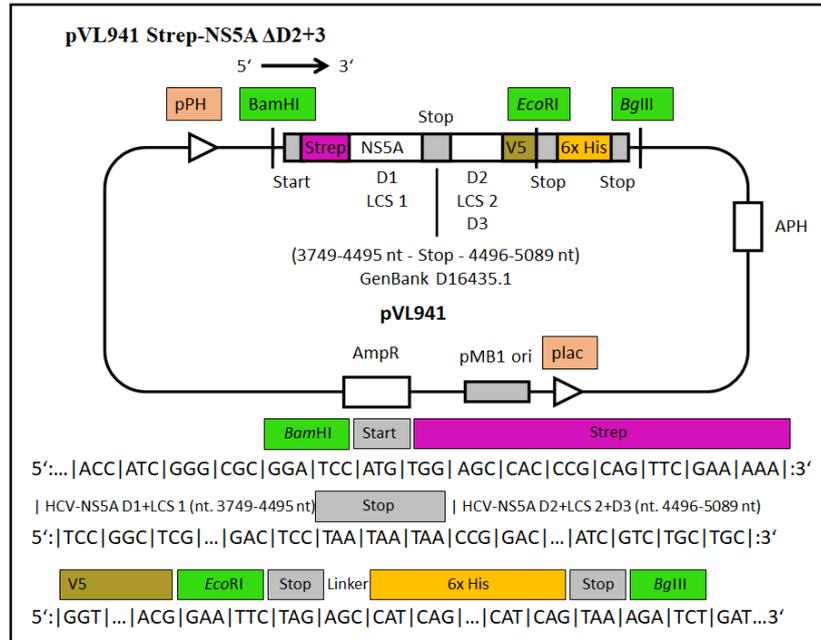


**Anhang C: Plasmidkarte von pCG01.** Basierend auf der Plasmidkarte von pCMV-tag4-NS5A und modifiziert gemäß beschriebener Klonierungsmaßnahmen (s. 2.2.1.10.). NS5A: HCV-GT 1b N-Stamm, 6261-7613 nt, GenBank AF139594, H54Q (CAC→CAG, 6420-6422 nt).



**Anhang D: Plasmidkarte von pCG07.** Basierend auf der Plasmidkarte von pCMV-tag4-NS5A und modifiziert gemäß beschriebener Klonierungsmaßnahmen (s. 2.2.1.10.). NS5A: HCV-GT 1b N-Stamm, 6261-7007 nt, GenBank AF139594, H54Q (CAC→CAG, 6420-6422 nt), Identifizierung von Codons, die nach Chen und Texada (2006) für die Proteinexpression kritisch sind und Optimierung dieser Codons nach Genscript ([www.genscript.com/tools/codon-frequency-table](http://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table)).





**Anhang G: Plasmidkarte von pVL941 Strep-NS5A ΔD2+3.** Erstellt nach Angaben von Daniela Ploen (s. 2.1.10., Tab. 9) und ergänzt mit Informationen zu pVL941 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT727492.1?report=fasta](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT727492.1?report=fasta)). NS5A: HCV-GT 2, 3749-5089 nt, GenBank D16435.1, Insertion von drei Stop-Codons zwischen 4495 nt und 4496 nt.

## 7. Literaturverzeichnis

- Achiriloaie, M., Barylko, B., und Albanesi, J.P. (1999). Essential Role of the Dynamin Pleckstrin Homology Domain in Receptor-Mediated Endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1410–1415.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B., und Zhang, Q.-X. (1999). Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 12766–12771.
- Ahmed, M., Pal, A., Houghton, M., und Barakat, K. (2016). A Comprehensive Computational Analysis for the Binding Modes of Hepatitis C Virus NS5A Inhibitors: The Question of Symmetry. *ACS Infect. Dis.* *2*, 872–881.
- Alazard-Dany, N., Denolly, S., Boson, B., und Cosset, F.-L. (2019). Overview of HCV Life Cycle with a Special Focus on Current and Possible Future Antiviral Targets. *Viruses* *11*, 30.
- Altan-Bonnet, N., und Balla, T. (2012). Phosphatidylinositol 4-kinases: hostages harnessed to build panviral replication platforms. *Trends Biochem. Sci.* *37*, 293–302.
- Amm, I., Sommer, T., und Wolf, D.H. (2014). Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1843*, 182–196.
- Andersen, K.R., Leksa, N.C., und Schwartz, T.U. (2013). Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification: Optimized *E. coli* Expression Strain LOBSTR. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *81*, 1857–1861.
- André, P., Perlemuter, G., Budkowska, A., Bréchet, C., und Lotteau, V. (2005). Hepatitis C Virus Particles and Lipoprotein Metabolism. *Semin. Liver Dis.* *25*, 93–104.
- Appel, N., Schaller, T., Penin, F., und Bartenschlager, R. (2006). From Structure to Function: New Insights into Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Biol. Chem.* *281*, 9833–9836.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., und Bartenschlager, R. (2008). Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLoS Pathog.* *4*, 1-14.
- Arima, N., Kao, C.-Y., Licht, T., Padmanabhan, R., Sasaguri, Y., und Padmanabhan, R. (2001). Modulation of Cell Growth by the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS5A. *J. Biol. Chem.* *276*, 12675–12684.
- Arnold, T., und Linke, D. (2008). The Use of Detergents to Purify Membrane Proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* *53*. 4.8.1.-4.8.30.
- Ascher, D.B., Wielens, J., Nero, T.L., Doughty, L., Morton, C.J., und Parker, M.W. (2014). Potent hepatitis C inhibitors bind directly to NS5A and reduce its affinity for RNA. *Sci. Rep.* *4*, 4765.
- Asselah, T., Boyer, N., Saadoun, D., Martinot-Peignoux, M., und Marcellin, P. (2016). Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver Int.* *36*, 47–57.
- Athenstaedt, K., und Daum, G. (1999). Phosphatidic acid , a key intermediate in lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.* *266*, 1–16.

- Audhya, A., Loewith, R., Parsons, A.B., Gao, L., Tabuchi, M., Zhou, H., Boone, C., Hall, M.N., and Emr, S.D. (2004). Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* *23*, 3747–3757.
- Ausili, A., Berglin, M., Elwing, H., Corbalán-García, S., and Gómez-Fernández, J.C. (2012). Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring and the real-time study of biological systems and macromolecules at interfaces. *Biomed. Spectrosc. Imaging* *1*, 325–338.
- Backliwal, G., Hildinger, M., Kuettel, I., Delegrange, F., Hacker, D.L., and Wurm, F.M. (2008). Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* *101*, 182–189.
- Baldi, L., Hacker, D.L., Adam, M., and Wurm, F.M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol. Lett.* *29*, 677–684.
- Balla, T. (2013). Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation. *Physiol. Rev.* *93*, 1019–1137.
- Barakat, K.H., Anwar-Mohamed, A., Tuszynski, J.A., Robins, M.J., Tyrrell, D.L., and Houghton, M. (2015). A Refined Model of the HCV NS5A Protein Bound to Daclatasvir Explains Drug-Resistant Mutations and Activity against Divergent Genotypes. *J. Chem. Inf. Model.* *55*, 362–373.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* *19*, 95–103.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., and Penin, F. (2013). The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 482–496.
- Belda, O., and Targett-Adams, P. (2012). Small molecule inhibitors of the hepatitis C virus-encoded NS5A protein. *Virus Res.* *170*, 1–14.
- Benga, W.J.A., Krieger, S.E., Dimitrova, M., Zeisel, M.B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T.F., et al. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* *51*, 43–53.
- Benzine, T., Brandt, R., Lovell, W.C., Yamane, D., Neddermann, P., De Francesco, R., Lemon, S.M., Perelson, A.S., Ke, R., and McGivern, D.R. (2017). NS5A inhibitors unmask differences in functional replicase complex half-life between different hepatitis C virus strains. *PLOS Pathog.* *13*, 1–20.
- Berger, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Terreux, R., Zayas, M., Paul, D., Harak, C., Hoppe, S., Gao, M., Penin, F., et al. (2014). Daclatasvir-Like Inhibitors of NS5A Block Early Biogenesis of Hepatitis C Virus-Induced Membranous Replication Factories, Independent of RNA Replication. *Gastroenterology* *147*, 1094–1105.
- Beseničar, M., Maček, P., Lakey, J.H., and Anderluh, G. (2006). Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids* *141*, 169–178.
- Bessa, L.M., Launay, H., Dujardin, M., Cantrelle, F.-X., Lippens, G., Landrieu, I., Schneider, R., and Hanouille, X. (2017). NMR reveals the intrinsically disordered domain 2 of NS5A protein as an allosteric regulator of the hepatitis C virus RNA polymerase NS5B. *J. Biol. Chem.* *292*, 18024–18043.
- Bianco, A., Reghellin, V., Donnici, L., Fenu, S., Alvarez, R., Baruffa, C., Peri, F., Pagani, M., Abrignani, S., Neddermann, P., et al. (2012). Metabolism of Phosphatidylinositol 4-Kinase III $\alpha$ -Dependent PI4P Is Subverted by HCV and Is Targeted by a 4-Anilino Quinazoline with Antiviral Activity. *PLoS Pathog.* *8*, e1002576.

- Biondi, R.M. (2002). High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site. *EMBO J.* *21*, 4219–4228.
- Biotium (2020). About GloMelt™ Thermal Shift Protein Stability Kit. URL: [biotium.com/product/glomelt-thermal-shift-protein-stability-kit/](https://biotium.com/product/glomelt-thermal-shift-protein-stability-kit/). Abruf am 5.3.2020.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., und Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* *80*, 6964–6972.
- Boson, B., Denolly, S., Turlure, F., Chamot, C., Dreux, M., und Cosset, F.-L. (2017). Daclatasvir Prevents Hepatitis C Virus Infectivity by Blocking Transfer of the Viral Genome to Assembly Sites. *Gastroenterology* *152*, 895-907.e14.
- Boulant, S., Douglas, M.W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., und McLauchlan, J. (2008). Hepatitis C Virus Core Protein Induces Lipid Droplet Redistribution in a Microtubule- and Dynein-Dependent Manner. *Traffic* *9*, 1268–1282.
- Boyer, A., Dreneau, J., Dumans, A., Burlaud-Gaillard, J., Bull-Maurer, A., Roingeard, P., und Meunier, J.-C. (2019). Endoplasmic Reticulum Detergent-Resistant Membranes Accommodate Hepatitis C Virus Proteins for Viral Assembly. *Cells* *8*, 487.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F., und Moradpour, D. (2002). An Amino-terminal Amphipathic  $\alpha$ -Helix Mediates Membrane Association of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J. Biol. Chem.* *277*, 8130–8139.
- Camus, G., Herker, E., Modi, A.A., Haas, J.T., Ramage, H.R., Farese, R.V., und Ott, M. (2013). Diacylglycerol Acyltransferase-1 Localizes Hepatitis C Virus NS5A Protein to Lipid Droplets and Enhances NS5A Interaction with the Viral Capsid Core. *J. Biol. Chem.* *288*, 9915–9923.
- Carvajal, N., Orellana, M.S., Bórquez, J., Uribe, E., López, V., und Salas, M. (2004). Non-chelating inhibition of the H101N variant of human liver arginase by EDTA. *J. Inorg. Biochem.* *98*, 1465–1469.
- Chen, D., und Texada, D.E. (2006). Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. *Gene Ther. Mol. Biol.* *10*, 1-12.
- Chen, S., Wu, Z., Wang, M., und Cheng, A. (2017). Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses* *9*, 291.
- Chen, Y.-C., Su, W.-C., Huang, J.-Y., Chao, T.-C., Jeng, K.-S., Machida, K., und Lai, M.M.C. (2010). Polo-Like Kinase 1 Is Involved in Hepatitis C Virus Replication by Hyperphosphorylating NS5A. *J. Virol.* *84*, 7983–7993.
- Cho, N.-J., Cheong, K.H., Lee, C., Frank, C.W., und Glenn, J.S. (2007). Binding Dynamics of Hepatitis C Virus' NS5A Amphipathic Peptide to Cell and Model Membranes. *J. Virol.* *81*, 6682–6689.
- Cho, N.-J., Dvory-Sobol, H., Xiong, A., Cho, S.-J., Frank, C.W., und Glenn, J.S. (2009). Mechanism of an Amphipathic  $\alpha$ -Helical Peptide's Antiviral Activity Involves Size-Dependent Virus Particle Lysis. *ACS Chem. Biol.* *4*, 1061–1067.
- Cho, N.-J., Lee, C., Pang, P.S., Pham, E.A., Fram, B., Nguyen, K., Xiong, A., Sklan, E.H., Elazar, M., Koytak, E.S., et al. (2015). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Is an HCV NS5A Ligand and Mediates Replication of the Viral Genome. *Gastroenterology* *148*, 616–625.

Choo, Q., Kuo, G., Weiner, A., Overby, L., Bradley, D., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359–362.

Chu, C.T., Ji, J., Dagda, R.K., Jiang, J.F., Tyurina, Y.Y., Kapralov, A.A., Tyurin, V.A., Yanamala, N., Shrivastava, I.H., Mohammadyani, D., et al. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat. Cell Biol.* 15, 1197–1205.

Chukkapalli, V., Berger, K.L., Kelly, S.M., Thomas, M., Deiters, A., and Randall, G. (2015). Daclatasvir inhibits hepatitis C virus NS5A motility and hyper-accumulation of phosphoinositides. *Virology* 476, 168–179.

Cordek, D.G., Bechtel, J.T., Maynard, A.T., Kazmierski, W.M., and Cameron, C.E. (2011). Targeting the NS5A protein of HCV: An emerging option. *Drugs Future* 36, 691.

Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651–657.

Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M.P., and Schuster, C. (2003). Protein-Protein Interactions between Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins. *J. Virol.* 77, 5401–5414.

Ding, Q., von Schaewen, M., and Ploss, A. (2014). The Impact of Hepatitis C Virus Entry on Viral Tropism. *Cell Host Microbe* 16, 562–568.

Dowler, S., Kular, G., and Alessi, D.R. (2002). Protein Lipid Overlay Assay. *Sci. STKE* 129, pl6.

Dujardin, M., Madan, V., Gandhi, N.S., Cantrelle, F.-X., Launay, H., Huvent, I., Bartenschlager, R., Lippens, G., and Hanouille, X. (2019). Cyclophilin A allows the allosteric regulation of a structural motif in the disordered domain 2 of NS5A and thereby fine-tunes HCV RNA replication. *J. Biol. Chem.* 294, 13171–13185.

Echelon Biosciences Inc. (2020). FAQ for Lipid Strip and Lipid Array Products. URL: [echelon-inc.com/wp-content/uploads/2020/06/FAQ\\_Strips\\_Rev-4.pdf](https://echelon-inc.com/wp-content/uploads/2020/06/FAQ_Strips_Rev-4.pdf). Abruf am 15.9.2020.

Eggens, I., Biickman, L., Jakobsson, A., and Valtersson, C. (1988). The lipid composition of highly differentiated human hepatomas, with special reference to fatty acids. *Br. J. exp. Path.* 69, 671–683.

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J. Virol.* 76, 5974–5984.

Elazar, M., Cheong, K.H., Liu, P., Greenberg, H.B., Rice, C.M., and Glenn, J.S. (2003). Amphipathic Helix-Dependent Localization of NS5A Mediates Hepatitis C Virus RNA Replication. *J VIROL* 77, 7.

Evans, M.J., Rice, C.M., and Goff, S.P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 13038–13043.

Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801–805.

Falkenburger, B.H., Jensen, J.B., Dickson, E.J., Suh, B.-C., and Hille, B. (2010). SYMPOSIUM REVIEW: Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins: Phosphoinositides instruct membrane proteins. *J. Physiol.* 588, 3179–3185.

- Farci, P. (2000). The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. *Science* 288, 339–344.
- Foster, T.L., Belyaeva, T., Stonehouse, N.J., Pearson, A.R., and Harris, M. (2010). All Three Domains of the Hepatitis C Virus Nonstructural NS5A Protein Contribute to RNA Binding. *J. Virol.* 84, 9267–9277.
- Fribley, A., and Wang, C.-Y. (2006). Proteasome inhibitor induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress. *Cancer Biol. Ther.* 5, 745–748.
- Fridell, R.A., Qiu, D., Wang, C., Valera, L., and Gao, M. (2010). Resistance Analysis of the Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor BMS-790052 in an In Vitro Replicon System. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3641–3650.
- Fridell, R.A., Wang, C., Sun, J.-H., O’Boyle, D.R., Nower, P., Valera, L., Qiu, D., Roberts, S., Huang, X., Kienzle, B., et al. (2011). Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in Humans: In Vitro and In Vivo Correlations. *Hepatology* 54, 1924–1935.
- Futatsumori-Sugai, M., Abe, R., Watanabe, M., Kudou, M., Yamamoto, T., Ejima, D., Arakawa, T., and Tsumoto, K. (2009). Utilization of Arg-elution method for FLAG-tag based chromatography. *Protein Expr. Purif.* 67, 148–155.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W., and Lai, M.M.C. (2004). Interactions between Viral Nonstructural Proteins and Host Protein hVAP-33 Mediate the Formation of Hepatitis C Virus RNA Replication Complex on Lipid Raft. *J. Virol.* 78, 3480–3488.
- Gao, M., Nettles, R.E., Belema, M., Snyder, L.B., Nguyen, V.N., Fridell, R.A., Serrano-Wu, M.H., Langley, D.R., Sun, J.-H., O’Boyle II, D.R., et al. (2010). Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 465, 96–100.
- Gentsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., Perin, P.M., Frentzen, A., Kaderali, L., and Pietschmann, T. (2013). Hepatitis C Virus p7 is Critical for Capsid Assembly and Envelopment. *PLoS Pathog.* 9, e1003355.
- Gitto, S., Gamal, N., and Andreone, P. (2017). NS5A inhibitors for the treatment of hepatitis C infection. *J. Viral Hepat.* 24, 180–186.
- Goonawardane, N., Gebhardt, A., Bartlett, C., Pichlmair, A., and Harris, M. (2017). Phosphorylation of Serine 225 in Hepatitis C Virus NS5A Regulates Protein-Protein Interactions. *J. Virol.* 91, 17.
- Gorman, C.M., and Howard, B.H. (1983). Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate. *Nucleic Acids Res.* 11, 7631-7648.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J. Virol.* 77, 5487–5492.
- Hammond, G.R.V., and Balla, T. (2015). Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 746–758.
- Hanouille, X., Badillo, A., Wieruszkeski, J.-M., Verdegem, D., Landrieu, I., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lippens, G. (2009a). Hepatitis C Virus NS5A Protein Is a Substrate for the Peptidyl-prolyl *cis* / *trans* Isomerase Activity of Cyclophilins A and B. *J. Biol. Chem.* 284, 13589–13601.

- Hanouille, X., Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszeski, J.-M., Penin, F., und Lippens, G. (2009b). Domain 3 of non-structural protein 5A from hepatitis C virus is natively unfolded. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *381*, 634–638.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaelcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., und Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat. Med.* *16*, 1295–1298.
- Hofmann, S., Krajewski, M., Scherer, C., Scholz, V., Mordhorst, V., Truschow, P., Schöbel, A., Reimer, R., Schwudke, D., und Herker, E. (2018). Complex lipid metabolic remodeling is required for efficient hepatitis C virus replication. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1863*, 1041–1056.
- Honda, M., Ping, L.-H., Rijnbrand, R.C.A., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D., und Lemon, S.M. (1996). Structural Requirements for Initiation of Translation by Internal Ribosome Entry within Genome-Length Hepatitis C Virus RNA. *Virology* *222*, 31–42.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., und Ye, J. (2007a). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 5848–5853.
- Huang, L., Sineva, E.V., Hargittai, M.R.S., Sharma, S.D., Suthar, M., Raney, K.D., und Cameron, C.E. (2004). Purification and characterization of hepatitis C virus non-structural protein 5A expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* *37*, 144–153.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R.S., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D., und Cameron, C.E. (2005). Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A (NS5A) Is an RNA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* *280*, 36417–36428.
- Huang, Y., Staschke, K., De Francesco, R., und Tan, S.-L. (2007b). Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: A new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* *364*, 1–9.
- Hunte, C. (2005). Specific protein–lipid interactions in membrane proteins. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 5.
- Hunte, C., und Richers, S. (2008). Lipids and membrane protein structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *18*, 406–411.
- Huynh, K., und Partch, C.L. (2015). Analysis of Protein Stability and Ligand Interactions by Thermal Shift Assay. *Curr. Protoc. Protein Sci.* *79*.
- Hwang, J., Huang, L., Cordek, D.G., Vaughan, R., Reynolds, S.L., Kihara, G., Raney, K.D., Kao, C.C., und Cameron, C.E. (2010). Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A: Biochemical Characterization of a Novel Structural Class of RNA-Binding Proteins. *J. Virol.* *84*, 12480–12491.
- Issur, M., und Götte, M. (2014). Resistance Patterns Associated with HCV NS5A Inhibitors Provide Limited Insight into Drug Binding. *Viruses* *6*, 4227–4241.
- Jacobson, I.M., Davis, G.L., El-Serag, H., Negro, F., und Trépo, C. (2010). Prevalence and Challenges of Liver Diseases in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *8*, 924–933.
- Janecki, D.J., und Reilly, J.P. (2005). Denaturation of metalloproteins with EDTA to facilitate enzymatic digestion and mass fingerprinting. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *19*, 1268–1272.

- Jassey, A., Liu, C.-H., Changou, C., Richardson, C., Hsu, H.-Y., und Lin, L.-T. (2019). Hepatitis C Virus Non-Structural Protein 5A (NS5A) Disrupts Mitochondrial Dynamics and Induces Mitophagy. *Cells* 8, 290.
- Jenny, R.J., Mann, K.G., and Lundblad, R.L. (2003). A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr. Purif.* 31, 1–11.
- Jones, D.M., Patel, A.H., Targett-Adams, P., und McLauchlan, J. (2009). The Hepatitis C Virus NS4B Protein Can trans-Complement Viral RNA Replication and Modulates Production of Infectious Virus. *J. Virol.* 83, 2163–2177.
- Jopling, C.L. (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* 309, 1577–1581.
- Jovanović, A.A., Balanč, B.D., Ota, A., Ahlin Grabnar, P., Djordjević, V.B., Šavikin, K.P., Bugarski, B.M., Nedović, V.A., und Poklar Ulrih, N. (2018). Comparative Effects of Cholesterol and  $\beta$ -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120, 1800039.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K., und Shimotohno, K. (1994). Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 320-326.
- Katze, M.G., Kwieciszewski, B., Goodlett, D.R., Blakely, C.M., Neddermann, P., Tan, S.-L., und Aebersold, R. (2000). Ser2194 Is a Highly Conserved Major Phosphorylation Site of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS5A. *Virology* 278, 501–513.
- Khan, I., Katikaneni, D.S., Han, Q., Sanchez-Felipe, L., Hanada, K., Ambrose, R.L., Mackenzie, J.M., und Konan, K.V. (2014). Modulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Glycosphingolipids and Four-Phosphate Adaptor Protein 2. *J. Virol.* 88, 12276–12295.
- King, A.M., und MacRae, T.H. (2015). Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 59–75.
- Kisselev, A.F., und Goldberg, A.L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem. Biol.* 8, 739–758.
- Kooijman, E.E., und Burger, K.N.J. (2009). Biophysics and function of phosphatidic acid: A molecular perspective. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 881–888.
- Kosaka, K., Imamura, M., Hayes, C.N., Abe, H., Hiraga, N., Yoshimi, S., Murakami, E., Kawaoka, T., Tsuge, M., Aikata, H., et al. (2015). Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir combination therapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *J. Viral Hepat.* 22, 158–165.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lamarre, D., Anderson, P.C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., Bös, M., Cameron, D.R., Cartier, M., Cordingley, M.G., et al. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426, 186–189.
- Lambert, S.M., Langley, D.R., Garnett, J.A., Angell, R., Hedgethorpe, K., Meanwell, N.A., und Matthews, S.J. (2014). The crystal structure of NS5A domain 1 from genotype 1a reveals new clues to the mechanism of action for dimeric HCV inhibitors: Crystal structure of HCV genotype 1a NS5A domain 1. *Protein Sci.* 23, 723–734.

- Lan, K.-H., Sheu, M.-L., Hwang, S.-J., Yen, S.-H., Chen, S.-Y., Wu, J.-C., Wang, Y.-J., Kato, N., Omata, M., Chang, F.-Y., et al. (2002). HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 21, 4801–4811.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K., and Hartl, F.U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356, 683–689.
- Lauer, G.M. (2001). Hepatitis C Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* 345, 41-52.
- Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S., and Lemmon, M.A. (1999). Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr. Biol.* 9, 261–265.
- Lee, C., Ma, H., Hang, J.Q., Leveque, V., Sklan, E.H., Elazar, M., Klumpp, K., and Glenn, J.S. (2011). The hepatitis C virus NS5A inhibitor (BMS-790052) alters the subcellular localization of the NS5A non-structural viral protein. *Virology* 414, 10–18.
- Lemm, J.A., O’Boyle, D., Liu, M., Nower, P.T., Colonno, R., Deshpande, M.S., Snyder, L.B., Martin, S.W., St. Laurent, D.R., Serrano-Wu, M.H., et al. (2010). Identification of Hepatitis C Virus NS5A Inhibitors. *J. Virol.* 84, 482–491.
- Lemmon, M.A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 99–111.
- Li, G., and De Clercq, E. (2017). Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral Res.* 142, 83–122.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C.M., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., and Lemon, S.M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 2992–2997.
- Liang, Y., Ye, H., Kang, C.B., and Yoon, H.S. (2007). Domain 2 of Nonstructural Protein 5A (NS5A) of Hepatitis C Virus Is Natively Unfolded †. *Biochemistry* 46, 11550–11558.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.-J., and Rice, C.M. (2006). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology*, 5<sup>th</sup> Edition, D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1101-1152.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., and Wang, T. (2009). Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection. *J. Virol.* 83, 2011–2014.
- Lopata, Jójárt, Surányi, Takács, Bezúr, Leveles, Bendes, Viskolcz, Vértessy, and Tóth (2019). Beyond Chelation: EDTA Tightly Binds Taq DNA Polymerase, MutT and dUTPase and Directly Inhibits dNTPase Activity. *Biomolecules* 9, 621.
- Love, R.A., Brodsky, O., Hickey, M.J., Wells, P.A., and Cronin, C.N. (2009). Crystal Structure of a Novel Dimeric Form of NS5A Domain I Protein from Hepatitis C Virus. *J. Virol.* 83, 4395–4403.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J.M., Shanmugam, S., Singh, S.M., Lemon, S.M., and Yi, M. (2011). Hepatitis C Virus NS2 Protein Serves as a Scaffold for Virus Assembly by Interacting with both Structural and Nonstructural Proteins. *J. Virol.* 85, 86–97.
- Macdonald, A., and Harris, M. (2004). Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol.* 85, 2485–2502.

- Mackenzie, J. (2005). Wrapping Things up about Virus RNA Replication: Membrane Replication Complexes of RNA Viruses. *Traffic* 6, 967–977.
- Madan, V., Paul, D., Lohmann, V., und Bartenschlager, R. (2014). Inhibition of HCV Replication by Cyclophilin Antagonists Is Linked to Replication Fitness and Occurs by Inhibition of Membranous Web Formation. *Gastroenterology* 146, 1361-1372.
- Malsam, J., Parisotto, D., Bharat, T.A.M., Scheutzow, A., Krause, J.M., Briggs, J.A.G., und Söllner, T.H. (2012). Complexin arrests a pool of docked vesicles for fast Ca<sup>2+</sup>-dependent release: Role of complexin in membrane fusion. *EMBO J.* 31, 3270–3281.
- Manns, M.P., und von Hahn, T. (2013). Novel therapies for hepatitis C — one pill fits all? *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 595–610.
- Manns, M.P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J.-M., Razavi, H., Terrault, N., und Younossi, Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17006.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., et al. (2008). Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. *J. Virol.* 82, 7964–7976.
- Masaki, T., Matsunaga, S., Takahashi, H., Nakashima, K., Kimura, Y., Ito, M., Matsuda, M., Murayama, A., Kato, T., Hirano, H., et al. (2014). Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- in Infectious Virus Production. *J. Virol.* 88, 7541–7555.
- McGivern, D.R., Masaki, T., Williford, S., Ingravallo, P., Feng, Z., Lahser, F., Asante-Appiah, E., Neddermann, P., De Francesco, R., Howe, A.Y., et al. (2014). Kinetic Analyses Reveal Potent and Early Blockade of Hepatitis C Virus Assembly by NS5A Inhibitors. *Gastroenterology* 147, 453-462.e7.
- Meanwell, N.A., und Belema, M. (2019). The Discovery and Development of Daclatasvir: An Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS5A Replication Complex. In *HCV: The Journey from Discovery to a Cure*, M.J. Sofia, ed. (Cham: Springer International Publishing), 27–55.
- Messina, J.P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G.S., Pybus, O.G., und Barnes, E. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 61, 77–87.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., und Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167–1172.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., und Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9, 1089–1097.
- Moradpour, D., Brass, V., und Penin, F. (2005). Function follows form: The structure of the N-terminal domain of HCV NS5A. *Hepatology* 42, 732–735.
- Moradpour, D., Penin, F., und Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 453–463.
- Murphy, D.G., Willems, B., Deschenes, M., Hilzenrat, N., Mousseau, R., und Sabbah, S. (2007). Use of Sequence Analysis of the NS5B Region for Routine Genotyping of Hepatitis C Virus with Reference to C/E1 and 5' Untranslated Region Sequences. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1102–1112.

- Naika, G.S., und Tiku, P.K. (2011). Influence of Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) on the Structural Stability of Endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. *J. Agric. Food Chem.* *59*, 7341–7345.
- Nakamoto, S. (2014). Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World J. Gastroenterol.* *20*, 2902.
- Narayan, K., und Lemmon, M.A. (2006). Determining selectivity of phosphoinositide-binding domains. *Methods* *39*, 122–133.
- Nath, A., Atkins, W.M., und Sligar, S.G. (2007). Applications of Phospholipid Bilayer Nanodiscs in the Study of Membranes and Membrane Proteins. *Biochemistry* *46*, 2059–2069.
- Nettles, J.H., Stanton, R.A., Broyde, J., Amblard, F., Zhang, H., Zhou, L., Shi, J., McBrayer, T.R., Whitaker, T., Coats, S.J., et al. (2014). Asymmetric Binding to NS5A by Daclatasvir (BMS-790052) and Analogs Suggests Two Novel Modes of HCV Inhibition. *J. Med. Chem.* *57*, 10031–10043.
- Noels, H., Somers, R., Liu, H., Ye, H., Du, M.-Q., De Wolf-Peeters, C., Marynen, P., und Baens, M. (2009). Auto-Ubiquitination-Induced Degradation of MALT1-API2 Prevents BCL10 Destabilization in t(11;18)(q21;q21)-Positive MALT Lymphoma. *PLoS ONE* *4*, e4822.
- Parent, R., Qu, X., Petit, M.-A., und Beretta, L. (2009). The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* *49*, 1798–1809.
- Patching, S.G. (2014). Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1838*, 43–55.
- Paul, D., Madan, V., und Bartenschlager, R. (2014). Hepatitis C Virus RNA Replication and Assembly: Living on the Fat of the Land. *Cell Host Microbe* *16*, 569–579.
- Pearlman, B.L., und Traub, N. (2011). Sustained Virologic Response to Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Cure and So Much More. *Clin. Infect. Dis.* *52*, 889–900.
- Peng, L., Liang, D., Tong, W., Li, J., und Yuan, Z. (2010). Hepatitis C Virus NS5A Activates the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway, Contributing to Cell Survival by Disrupting the Interaction between FK506-binding Protein 38 (FKBP38) and mTOR. *J. Biol. Chem.* *285*, 20870–20881.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., und Pawlotsky, J.-M. (2004a). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* *39*, 5–19.
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., und Moradpour, D. (2004b). Structure and Function of the Membrane Anchor Domain of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J. Biol. Chem.* *279*, 40835–40843.
- Picard, N., Charbonneau, C., Sanchez, M., Licznar, A., Busson, M., Lazennec, G., und Tremblay, A. (2008). Phosphorylation of Activation Function-1 Regulates Proteasome-Dependent Nuclear Mobility and E6-Associated Protein Ubiquitin Ligase Recruitment to the Estrogen Receptor  $\beta$ . *Mol. Endocrinol.* *22*, 317–330.
- Pileri, P. (1998). Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* *282*, 938–941.
- Qiu, D., Lemm, J.A., O’Boyle, D.R., Sun, J.-H., Nower, P.T., Nguyen, V., Hamann, L.G., Snyder, L.B., Deon, D.H., Ruediger, E., et al. (2011). The effects of NS5A inhibitors on NS5A phosphorylation, polyprotein processing and localization. *J. Gen. Virol.* *92*, 2502–2511.

Quintavalle, M., Sambucini, S., Di Pietro, C., De Francesco, R., und Neddermann, P. (2006). The  $\alpha$  Isoform of Protein Kinase CKI Is Responsible for Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation. *J. Virol.* *80*, 11305–11312.

Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., et al. (2011). Recruitment and Activation of a Lipid Kinase by Hepatitis C Virus NS5A Is Essential for Integrity of the Membranous Replication Compartment. *Cell Host Microbe* *9*, 32–45.

Reiss, S., Harak, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Klein, R., Ruggieri, A., Rebhan, I., Bartenschlager, R., und Lohmann, V. (2013). The Lipid Kinase Phosphatidylinositol-4 Kinase III Alpha Regulates the Phosphorylation Status of Hepatitis C Virus NS5A. *PLoS Pathog.* *9*, e1003359.

Reyes, G.R. The Nonstructural NS5A Protein of Hepatitis C Virus: An Expanding, Multifunctional Role in Enhancing Hepatitis C Virus Pathogenesis. *J Biomed Sci* *11*.

Riu, E., Chen, Z.-Y., Xu, H., He, C.-Y., und Kay, M.A. (2007). Histone Modifications are Associated with the Persistence or Silencing of Vector-mediated Transgene Expression In Vivo. *Mol. Ther.* *15*, 1348–1355.

Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., et al. (2012). Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathog.* *8*, e1003056.

Ross-Thriepfand, D., Amako, Y., und Harris, M. (2013). The C terminus of NS5A domain II is a key determinant of hepatitis C virus genome replication, but is not required for virion assembly and release. *J. Gen. Virol.* *94*, 1009–1018.

Sahdev, S., Khattar, S.K., und Saini, K.S. (2007). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* *307*, 249–264.

Sammes, P.G., und Yahioğlu, G. (1994). 1,10-Phenanthroline: A Versatile Ligand. *Chem. Soc. Rev.* *23*, 327–334.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., und Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* *21*, 5017–5025.

Schlame, M., Rua, D., und Greenberg, M.L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* *39*, 257–288.

Schmidt, T.G., und Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* *2*, 1528–1535.

Seddon, A.M., Curnow, P., und Booth, P.J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1666*, 105–117.

Shi, S.T., Polyak, S.J., Tu, H., Taylor, D.R., Gretch, D.R., und Lai, M.M.C. (2002). Hepatitis C Virus NS5A Colocalizes with the Core Protein on Lipid Droplets and Interacts with Apolipoproteins. *Virology* *292*, 198–210.

Shirey, C.M., Scott, J.L., und Stahelin, R.V. (2017). Notes and tips for improving quality of lipid-protein overlay assays. *Anal. Biochem.* *516*, 9–12.

- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (2002). Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Binds RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP) NS5B and Modulates RNA-dependent RNA Polymerase Activity. *J. Biol. Chem.* *277*, 11149–11155.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., et al. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* *42*, 962–973.
- Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., and Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* *59*, 318–327.
- Smrcka, A., Hepler, Brown, K., and Sternweis, P. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* *251*, 804–807.
- Sólyom, Z., Ma, P., Schwarten, M., Bosco, M., Polidori, A., Durand, G., Willbold, D., and Brutscher, B. (2015). The Disordered Region of the HCV Protein NS5A: Conformational Dynamics, SH3 Binding, and Phosphorylation. *Biophys. J.* *109*, 1483–1496.
- Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C Virus P7—A Viroporin Crucial for Virus Assembly and an Emerging Target for Antiviral Therapy. *Viruses* *2*, 2078–2095.
- Sun, J.-H., O’Boyle II, D.R., Zhang, Y., Wang, C., Nower, P., Valera, L., Roberts, S., Nettles, R.E., Fridell, R.A., and Gao, M. (2012). Impact of a baseline polymorphism on the emergence of resistance to the hepatitis C virus nonstructural protein 5a replication complex inhibitor, BMS-790052. *Hepatology* *55*, 1692–1699.
- Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., and Shimotohno, K. (1995). Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J. Virol.* *69*, 3980–3986.
- Targett-Adams, P., Graham, E.J.S., Middleton, J., Palmer, A., Shaw, S.M., Lavender, H., Brain, P., Tran, T.D., Jones, L.H., Wakenhut, F., et al. (2011). Small Molecules Targeting Hepatitis C Virus-Encoded NS5A Cause Subcellular Redistribution of Their Target: Insights into Compound Modes of Action. *J. Virol.* *85*, 6353–6368.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., and Fujimoto, T. (2002). The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. *J. Biol. Chem.* *277*, 44507–44512.
- Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., and Persson, A. (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta(DE3). *Protein Expr. Purif.* *69*, 159–167.
- Tellinghuisen, T.L., and Rice, C.M. (2002). Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr. Opin. Microbiol.* *5*, 419–427.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., and Rice, C.M. (2004). The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein. *J. Biol. Chem.* *279*, 48576–48587.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* *435*, 374–379.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008). Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathog.* *4*, e1000032.
- Thibaudeau, T.A., and Smith, D.M. (2019). A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* *71*, 170–197.

- Trahey, M., Li, M.J., Kwon, H., Woodahl, E.L., McClary, W.D., und Atkins, W.M. (2015). Applications of Lipid Nanodiscs for the Study of Membrane Proteins by Surface Plasmon Resonance. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 81.
- Valdau, O. (2014). Untersuchungen zur Rekonstruktion von c-Src-NS5A-NS5B sowie EDD E3- $\beta$ -Catenin – zweier krankheitsrelevanter Proteinkomplexe. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Vallis, Y., Wigge, P., Marks, B., Evans, P.R., und McMahon, H.T. (1999). Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.* 9, 257–263.
- Vashisht, A.A., Zumbrennen, K.B., Huang, X., Powers, D.N., Durazo, A., Sun, D., Bhaskaran, N., Persson, A., Uhlen, M., Sangfelt, O., et al. (2009). Control of Iron Homeostasis by an Iron-Regulated Ubiquitin Ligase. *Science* 326, 718–721.
- Vaughn, J., Goodwin, R., Tompkins, G., McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-217.
- Vieyres, G., Dubuisson, J., und Pietschmann, T. (2014). Incorporation of Hepatitis C Virus E1 and E2 Glycoproteins: The Keystones on a Peculiar Virion. *Viruses* 6, 1149–1187.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791–796.
- Wang, H., und Tai, A. (2016). Mechanisms of Cellular Membrane Reorganization to Support Hepatitis C Virus Replication. *Viruses* 8, 142.
- Wang, C., Sun, J.-H., O’Boyle, D.R., Nower, P., Valera, L., Roberts, S., Fridell, R.A., und Gao, M. (2013). Persistence of Resistant Variants in Hepatitis C Virus-Infected Patients Treated with the NS5A Replication Complex Inhibitor Daclatasvir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2054–2065.
- Wang, H., Perry, J.W., Lauring, A.S., Neddermann, P., De Francesco, R., und Tai, A.W. (2014). Oxysterol-Binding Protein Is a Phosphatidylinositol 4-Kinase Effector Required for HCV Replication Membrane Integrity and Cholesterol Trafficking. *Gastroenterology* 146, 1373-1385.e11.
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., und Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B Is a Functional Regulator of Hepatitis C Virus RNA Polymerase. *Mol. Cell* 19, 111–122.
- Waugh, D.S. (2011). An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr. Purif.* 80, 283–293.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., und Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion. *Cell* 92, 759–772.
- Welsch, C., und Zeuzem, S. (2012). Will interferon-free regimens prevail? *Gastroenterology*. 142, 1351-1355.
- Welsch, C., Jesudian, A., Zeuzem, S., und Jacobson, I. (2012). New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut*. 61 (Suppl 1), 36-46.
- WHO (2017). Global hepatitis report, 2017. URL: [www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/](http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/). Abruf am 27.7.2020

WHO (2020). Hepatitis C. URL: [www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c). Abruf am 27.7.2020.

Wozniak, A.L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S.M., und Weinman, S.A. (2010). Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and Its Contribution to Infectious Virus Production. *PLoS Pathog.* 6, e1001087.

Yang, F., Robotham, J.M., Nelson, H.B., Irsigler, A., Kenworthy, R., und Tang, H. (2008). Cyclophilin A Is an Essential Cofactor for Hepatitis C Virus Infection and the Principal Mediator of Cyclosporine Resistance In Vitro. *J. Virol.* 82, 5269–5278.

Yoshimi, S., Imamura, M., Murakami, E., Hiraga, N., Tsuge, M., Kawakami, Y., Aikata, H., Abe, H., Hayes, C.N., Sasaki, T., et al. (2015). Long term persistence of NS5A inhibitor-resistant hepatitis C virus in patients who failed daclatasvir and asunaprevir therapy: Long Term Persistence of DCV-Resistant HCV. *J. Med. Virol.* 87, 1913–1920.

Yu, J.W., Mendrola, J.M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D.B., Murray, D., Emr, S.D., und Lemmon, M.A. (2004). Genome-Wide Analysis of Membrane Targeting by *S. cerevisiae* Pleckstrin Homology Domains. *Mol. Cell* 13, 677–688.

Zeisel, M.B., Felmlee, D.J., und Baumert, T.F. (2013). *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer Verlag (Germany), 369, 87–112.

Zhao, H., und Lappalainen, P. (2012). A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein–lipid interactions. *Mol. Biol. Cell* 23, 2823–2830.

Zimmerberg, J., und Kozlov, M.M. (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 9–19.