

1 Einleitung

1.1 HCV

1.1.1 Epidemiologie, Erkrankung und Therapie

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist ein leberspezifisches Virus, dessen einziger natürlicher Wirt der Mensch ist. Es wurde erst 1989 identifiziert (Choo et al., 1989, Rosenberg, 2001), und nach Angaben der *World Health Organisation* (WHO) waren im Jahr 2000 ca. 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus infiziert (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html>). Das entspricht 3% der Weltbevölkerung und macht somit die HCV-Infektion zu einem globalen gesundheitspolitischen Problem. HCV ist im Unterschied zum Hepatitis B Virus (HBV) nicht nur ein Problem der Entwicklungsländer, sondern auch der so genannten Industrieländer (Rosenberg, 2001). So waren im Jahr 2000 vier Millionen Menschen in Nord Amerika und sieben Millionen Menschen in Europa infiziert (Rosenberg, 2001). Eine Übersicht über das Auftreten von HCV-Infektionen im Jahr 2000 ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

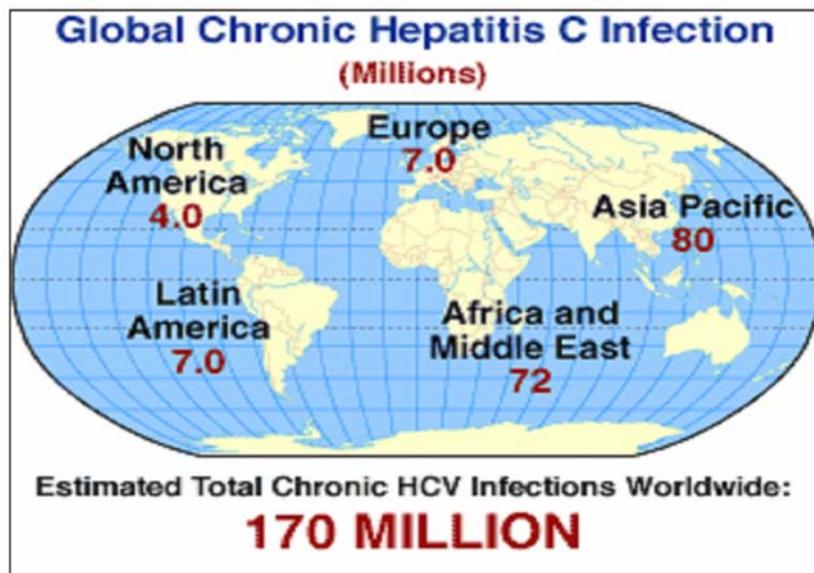


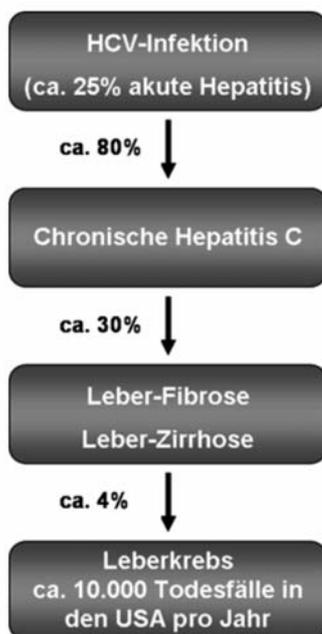
Abbildung 1: HCV-Infektionen weltweit (World Health Organisation; 2000).

HCV wird hauptsächlich über den parenteralen Weg, also durch infiziertes Fremd-Blut übertragen. Aus diesem Grunde sind vor allem Hämophiliepatienten, die nicht inaktivierte Blutprodukte erhalten haben, und Dialysepatienten betroffen. Auch für Drogenkonsumenten, die gemeinsame Spritzen verwenden, besteht ein erhöhtes HCV-Infektionsrisiko. Bei diesen und bei Hämophiliepatienten werden häufig Doppelinfektionen mit HBV oder HIV (*human immuno deficiency virus*) beobachtet (Chen et al., 1990, Fattovich et al., 1991, Fong et al.,

Einleitung: HCV

1991, Thomas, 2002). Die sexuelle Übertragung scheint keine wesentliche Rolle zu spielen, ist neueren Erkenntnissen nach aber möglich (Terrault, 2002). Jedoch lässt sich auch in Deutschland bei bis zu 40% aller chronischen HCV-Infektionen kein eindeutiger Übertragungsweg mehr feststellen (sporadische Hepatitis C) (<http://www.hepatitis-c.de/alleshep.htm>). Um eine HCV Infektion zu diagnostizieren, werden vor allem spezifische Antikörper bzw. eine Antikörper-Konversion und der Nachweis der HCV-RNA in der Labordiagnostik verwendet. In 25% der Fälle äußert sich die HCV-Infektion in einer akuten, aber zumeist recht mild verlaufenden Hepatitis. Mit 50-80%iger Wahrscheinlichkeit chronifiziert die Infektion jedoch. In bis zu 30% der Fälle führt dies zu einer Leberfibrose (Alter & Seeff, 2000). Schließt sich daran die Ausbildung einer Leberzirrhose an, so sinkt die Überlebenschance auf 50% innerhalb der nächsten fünf Jahre (Wright, 2002). Pro Jahr führt bei zwei bis vier Prozent dieser Patienten die Leberzirrhose zu der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCCs) (Alter & Seeff, 2000, El-Serag, 2002).

A)



B)

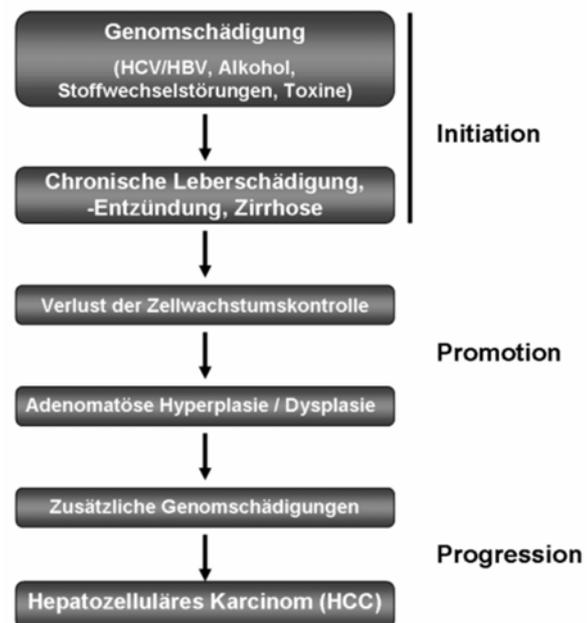


Abbildung 2.: HCV und HCC-Entstehung. (A) Verlauf von HCV-Infektionen. Die angegebenen Zahlen schwanken je nach Quelle, in Abhängigkeit zu äußeren Lebensumständen und HCV-Genotyp der Infektion. (B) Phasen der HCC-Entstehung (modifiziert nach: (Nita et al., 2002)).

Die Entstehung eines HCCs, wie auch die Entstehung anderer Krebsarten, unterteilt man in mehrere Abschnitte. Dabei steht am Anfang des Prozesses die Initiation, ausgelöst, im Falle des HCCs, hauptsächlich durch eine Infektion mit HCV oder/und HBV, Alkoholmissbrauch und Stoffwechselstörungen. Diese Einflüsse führen zu einer chronischen Schädigung der Leber und zur Ausbildung einer Leberzirrhose. Die Leberzirrhose wiederum ist

Einleitung: HCV

gekennzeichnet durch Strukturveränderungen der Leberläppchen und die erhöhte Einlagerung von Bindegewebe in die Leber (Martinez-Hernandez & Amenta, 1993). Der zweite Schritt in der Entstehung eines HCCs ist die Promotion, verursacht durch den Verlust der Zellwachstumskontrolle. Dieser Verlust begründet sich z.B. durch Mutationen in Genen, die für Wachstumsfaktoren codieren, deren Rezeptoren, Oncogenen und Tumor-Suppressorgenen. Es können aber auch virale Faktoren bei der Förderung der Krebsentstehung eine Rolle spielen, wie z.B. virale *ras*- Onkogene (*v-ras*), welche konstitutiv aktive Äquivalente des zellulären Ras-Proteins exprimieren (Papageorge et al., 1982). Durch derartige Prozesse entwickeln sich zunächst noch gutartige Organvergrößerungen bzw. -fehlentwicklungen (adenomatöse Hyperplasie), die aber im Laufe der Zeit auf Grund weiterer genomischer Veränderungen zu bösartigen Gewebsveränderungen führen können (Progression) (Nita et al., 2002). Im Falle eines HCCs sind dabei direkt Leberzellen betroffen, wobei nicht genau geklärt ist, ob auch frühere Differenzierungsstadien der entsprechenden Vorläuferzellen Ursprung der Tumorzellen sein können (Sell, 2002, Wu & Chen, 2006).

Auf Grund der Schädigung der Leber sind chronische HCV-Infektionen für ca. 10.000 Todesfälle pro Jahr allein in den USA verantwortlich (Tan & Katze, 2001). Da zurzeit noch kein Impfstoff gegen HCV verfügbar ist, beschränken sich die vorbeugenden Maßnahmen gegen eine HCV-Infektion auf Schutz- und Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit infizierten Personen oder infektiösem Material. Im Falle einer Erkrankung wird in der Regel eine Kombinationstherapie mit Interferon- α (IFN α) und Ribavirin angewendet (Di Bisceglie, 2002). Interferon- α aktiviert antivirale Schutzmechanismen der Zellen, u.a. die Produktion von Proteinkinase R (PKR), welche in infizierten Zellen den eukaryontischen Initiationsfaktor-2 α (eIF-2 α) phosphoryliert und somit die Translation der zelleigenen aber auch viralen RNA inhibiert (Tan & Katze, 2001). Das Guanosin-Analogon Ribavirin hingegen verhindert die Bildung der mRNA (Tan & Katze, 2001).

Diese Therapieform ist jedoch in ca. 60% der HCV-Infektionen erfolglos. Bei einer Infektion mit Viren der Genotypen 1 oder 4 (siehe 1.1.3) sprechen nach einem Jahr z.B. nur maximal 40% der Patienten auf die Therapie an. Eine wesentlich höhere Heilungschance, nämlich bis zu 85%, besteht bei einer Infektion mit Viren der Genotypen 2 oder 3 (Reyes, 2002, Tan & Katze, 2001).

1.1.2 Infektionsverlauf / Immunantwort

Die chronische HCV-Infektion geht mit Leberentzündungen und Fibrose einher. HCV selber ist aber ein nicht-zytopathogenes Virus, das heißt, dass die Infektion an sich die Zelle nicht schädigt (Hoofnagle, 2002). Die Schädigung der Leber ist daher meist eine Konsequenz der

Einleitung: HCV

zellulären Immunantwort. Der Grad der Leberschädigung kann beispielsweise an Hand des Gehaltes der Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT) im Serum gemessen werden. Dieses leberspezifische Enzym wird im Falle einer Schädigung der Leberzellen in den Blutkreislauf entlassen (Fontana & Lok, 2002). Der Verlauf des ALT-Gehaltes und der HCV-RNA im Blut von Patienten mit einer akuten und wieder kurierten bzw. mit einer chronischen Infektion sind in Abbildung 3 wiedergegeben.

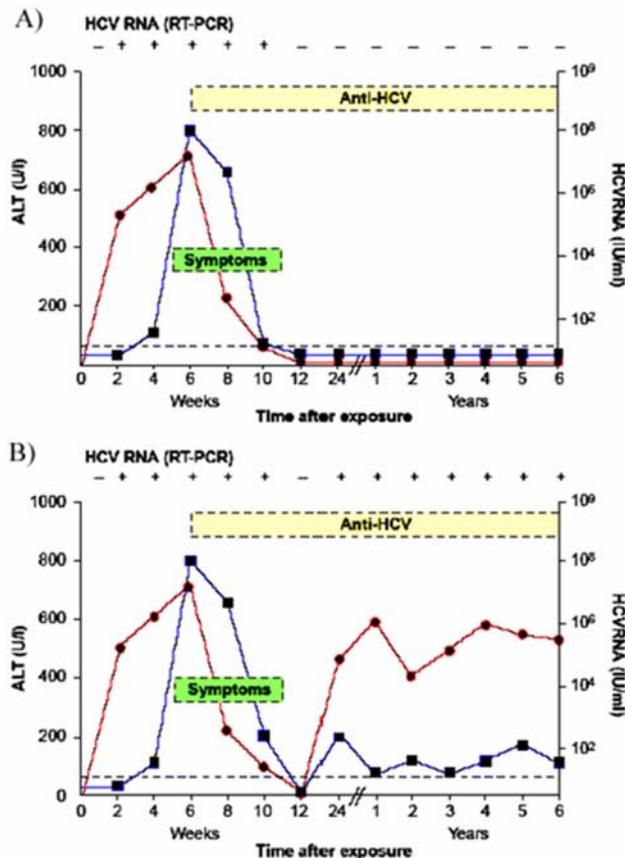


Abbildung 3: Typischer Verlauf einer HCV-Infektion. (A) Verlauf einer akuten kurierten HCV-Infektion. HCV-RNA (rote Kreise) konnte im Serum schon innerhalb der ersten zwei Wochen detektiert werden, erhöhte ALT-Werte (blaue Quadrate) aber erst 2-6 Wochen nach der Infektion. Sobald die HCV-Infektion zurückgeht, vermindern sich auch die Symptome, und HCV-spezifische Antikörper können nachgewiesen werden. (B) Verlauf einer akuten, chronifizierten HCV-Infektion. Während der Entwicklung von einer akuten zu einer chronischen Infektion schwanken die Werte für die HCV-RNA und den ALT-Gehalt beachtlich (Racanelli & Rehermann, 2003).

Wie in Abbildung 3 zu erkennen ist, kann die virale RNA innerhalb von zwei Wochen nach der Infektion detektiert werden, gesteigerte ALT-Werte aber erst nach vier bis sechs Wochen. Sofern die Patienten sich erholen und die Infektion ausheilt, fallen die RNA- und ALT-Werte ca. zehn bis zwölf Wochen nach der Infektion auf die Werte vor der Infektion ab. Sofern jedoch die Infektion chronifiziert, steigen die Werte für die virale RNA und ALT wieder an und sind über die Jahre der Infektion deutlich detektierbar (Hoofnagle, 2002, Racanelli & Rehermann, 2003).

Auf Grund des Fehlens eines adäquaten Kleintier-Infektionsmodells sind die genauen Mechanismen der Immunantwort im Falle einer HCV-Infektion noch relativ unklar. Die meisten Daten wurden mit Hilfe von experimentell infizierten Schimpansen generiert. Diese Experimente lassen vermuten, dass als erste direkte Immunreaktion eine T-Zell-Antwort 10-

Einleitung: HCV

14 Tage nach der Infektion stattfindet (Racanelli & Rehermann, 2003). Aktivierte HCV-spezifische T-Zellen gelangen über die Pfortader in die Leber. Der Kontakt zwischen den T-Zellen und leberspezifischen antigen-präsentierenden Zellen vermittelt die Stimulation der T-Zellen. Die stimulierten T-Zellen erkennen HCV-Peptide im Komplex mit MHC-I auf der Oberfläche der infizierten Zellen. Dadurch wird die zytotoxische Reaktion der T-Zellen hervorgerufen und die betroffenen Hepatozyten werden lysiert. Als Konsequenz gelangen leberspezifische Enzyme in das Blutsystem und können dort, wie im Falle von ALT, nachgewiesen werden. HCV-spezifische Antikörper können erst sieben bis acht Wochen nach der Infektion nachgewiesen werden (Racanelli & Rehermann, 2003).

Schafft das Immunsystem es nicht, das Virus zu eliminieren, etabliert sich eine chronische HCV-Infektion. Obwohl es bei einem Großteil der Patienten nicht zu einer schnellen Viruseliminierung kommt, sind einige Patienten auch ohne Therapie in der Lage, sich später von der Infektion zu erholen. Ausgehend von Experimenten mit Schimpansen häufen sich die Hinweise, dass die T-Zell-Antwort Ausschlag gebend für die Art der Infektion ist. Eine starke T-Zell-Antwort geht folglich mit einer Eliminierung des Virus einher, eine schwache T-Zell-Reaktion begünstigt eine Chronifizierung der Infektion. Dabei korreliert der Virus-Titer invers mit dem Auftreten von CD8⁺ T-Zellen in der Leber. Zudem geht eine starke CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antwort im Blut von akut infizierten Patienten mit einer Erholung von der Infektion einher. Umgekehrt korreliert ein Versagen des Immunsystems mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einer Chronifizierung der HCV-Infektion (Racanelli & Rehermann, 2003).

Wie andere Viren auch, hat das Hepatitis C Virus verschiedene Mechanismen entwickelt, um dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen. Zum einen ist die Replikation während der akuten Infektionsphase mit 10^{10} - 10^{12} Virionen pro Tag sehr schnell. Das ermöglicht das Erreichen sehr hoher Virus-Titer innerhalb der ersten Infektionswochen, noch bevor eine humorale und zelluläre Immunreaktion erkennbar wird. Zum anderen ist auf Grund des Fehlens einer Korrekturlesefunktion der HCV-Polymerase (NS5B) die Mutationsrate sehr hoch, was zur Bildung vieler Quasispezies führt (Racanelli & Rehermann, 2003). Daraus resultiert, dass immer wieder Virus-Varianten der Immunantwort entgehen und somit der Wirt nicht in der Lage ist, den Virus komplett zu eliminieren. Zudem repliziert das Virus im chronischen Krankheitsverlauf nur auf geringem Niveau, so dass nur wenige extrazelluläre Antigene zur Verfügung stehen, die von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen werden können und somit für die humorale Immunantwort zur Verfügung gestellt werden. Zusätzlich interferieren verschiedene HCV-Proteine wie z.B. NS3, E2 und vor allem NS5A mit der Wirkung von

Einleitung: HCV

Interferon- α , einem wichtigen Zytokin bei der Bekämpfung von Virusinfektionen (Foy et al., 2003, Gale et al., 1998, Taylor et al., 1999).

1.1.3 HCV: Aufbau und Struktur

Das Hepatitis C Virus (HCV) gehört der Familie der *Flaviviridae* an, in der es einen eigenen Genus bildet. Zu dieser Virus-Familie gehören auch die *Flaviviren* wie z.B. Dengue Virus, Gelb-Fieber Virus, West-Nil Virus und einige *Pestiviren* (Miller & Purcell, 1990). Das Hepatitis C Virus ist außen mit einer Membran umhüllt, die neben Lipiden der Wirtszelle auch die beiden viralen Glycoproteine E1 und E2 enthält. Die Membran umhüllt ein aus dem Core-Protein bestehendes Nucleokapsid in dessen Inneren eine einzelsträngige positiv-orientierte RNA liegt, das virale Genom (Baumert et al., 1998, Penin et al., 2004b). Nach Sequenzanalysen lassen sich sechs verschiedene Genotypen und ca. 50 Subtypen von HCV unterscheiden. Das Virus ist im Durchmesser ca. 70 nm groß (Bartenschlager & Lohmann, 2000, Hoofnagle, 2002).

Das HCV-Genom umfasst ca. 9600 Basenpaare und kodiert für ein ungefähr 3000 Aminosäure großes Vorläuferprotein (Major & Feinstone, 1997). Dieses Vorläuferprotein wird nach der Translation durch wirtseigene Proteasen und durch die vom Virus codierten Proteasen NS2 und NS3 in die verschiedenen viralen Proteine prozessiert. Es entstehen die Glykoproteine E1 (p31), E2 (p70), das Strukturprotein Core und die Nicht-Strukturproteine p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, und NS5B (Tan & Katze, 2001). Zudem wird durch eine Verschiebung des Leserasters innerhalb der Core-Protein-Region das F-Protein gebildet, dessen Funktion jedoch unbekannt ist (Xu et al., 2001). Das sieben kDa große p7-Protein ist in der Lage, Ionenkanäle in der Wirtsmembran zu bilden. Die Funktion dieser Kanäle bzw. des p7-Proteins innerhalb des viralen Lebenszyklusses ist jedoch noch nicht geklärt (Pavlovic et al., 2003). NS2 ist eine 23 kDa große Metalloprotease, die das Vorläuferprotein zwischen NS3 und NS2 schneidet. Die 70 kDa große Serin-Protease NS3 prozessiert die übrigen NS-Proteine wobei es aber das acht kDa große NS4A als Cofaktor benötigt. Die Strukturproteine werden von wirtseigenen Proteasen prozessiert. Weiterhin enthält NS3 eine Nucleosid-Triphosphatase und eine Helicase-Funktion. Die Funktion des NS4B-Proteins (27 kDa) hingegen ist weitestgehend unbekannt. Das 68 kDa große NS5B-Protein ist die für ein RNA-Virus essentielle RNA-abhängige RNA-Polymerase. Auf das Nicht-Strukturprotein 5A wird im Folgenden näher eingegangen, die genaue Funktion von NS5A ist jedoch noch nicht geklärt. Eine Zusammenfassung der Genomstruktur von HCV ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

Einleitung: NS5A

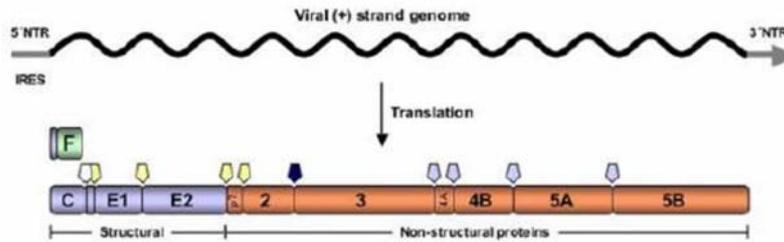


Abbildung 4: HCV-Genom, Translation und proteolytische Spaltung. Das virale (+) Strang-Genom wird in ein Polyprotein von ca. 3000 Aminosäuren translatiert. Zusätzlich entsteht durch ribosomale Verschiebung des Leserasters das F-Protein. Das Polyprotein wird durch Wirts-eigene Proteasen (weiß, gelb) und die viralen Proteasen NS2/3 (dunkel blau) und NS3/4A (hell blau) prozessiert. (http://www.molecular-virology.uni-hd.de/rsr/area_hcv.htm)

1.2 NS5A

1.2.1 Struktur / Phosphorylierung / Replikation / Lokalisation

Das Nicht-Strukturprotein 5A (NS5A) des Hepatitis C Virus besteht aus 447 Aminosäuren. Es können innerhalb des NS5A-Proteins drei Domänen unterschieden werden (Tellinghuisen et al., 2004, Tellinghuisen et al., 2005). Am Anfang der Domäne I (Aminosäure 1-213) befindet sich von Aminosäure 1-30 eine amphiphatische Helix, die das Protein an Membranen verankert (Penin et al., 2004a). Die Domäne I komplexiert zudem über vier Cystein-Reste ein Zink-Atom. Die Cystein-Reste und somit die Komplexierung des Zink-Atoms sind essentiell für die HCV-Replikation. Zudem enthält die Domäne I eine Disulfidbrücke, was ungewöhnlich für ein zytoplasmatisches Protein ist, da es sich in einem reduzierenden Milieu befindet. Die Struktur eines Teiles dieser N-terminalen Domäne (AS 36-198) wurde mit Hilfe von Röntgenstruktur-Untersuchungen erforscht. Eine Dimerisierung zweier solcher Moleküle schafft eine sattelförmige Struktur, die einzel- bzw. doppelsträngige RNA binden könnte (Tellinghuisen et al., 2005). Tatsächlich konnte experimentell gezeigt werden, dass NS5A in der Lage ist, RNA zu binden und zwar sowohl HCV-RNA als auch künstliche plus- oder minus-Strang RNA (Huang et al., 2005). Die Domäne II (AS 250-342) wird von der Domäne I durch eine so genannte *low complexity sequence* (AS 214-249) getrennt. Auf Grund von verschiedenen Untersuchungsmethoden wird für die Domäne II eine größtenteils ungeordnete und flexible Struktur angenommen (Liang et al., 2006). An die Domäne II schließt sich, auch durch eine *low complexity sequence* (AS 343-355) getrennt, die Domäne III an, von der man ebenfalls eine ungeordnete Struktur annimmt (Tellinghuisen et al., 2005).

NS5A besitzt ein Molekulargewicht von 49 kDa. Es kommt in zwei unterschiedlich phosphorylierten Formen vor, die im SDS-Polyacrylamid-Gel mit einem apparenten Molekulargewicht von 56 kDa (p56, basalphosphoryliert) und 58 kDa (p58, hyperphospho-

Einleitung: NS5A

phoryliert) auftreten (Kaneko et al., 1994). Die hyperphosphorylierte Form wird nur bei einer Koexpression von NS5A mit NS4A gebildet (Kaneko et al., 1994), wobei es umstritten ist, ob noch andere virale Proteine benötigt werden (Kaneko et al., 1994, Koch & Bartenschlager, 1999, Neddermann et al., 1999). Zudem tritt die hyperphosphorylierte Form nicht bei allen Genotypen auf (Hirota et al., 1999, Satoh et al., 2000). Phosphoryliert wird NS5A hauptsächlich an Serin- und z.T. an Threonin-Resten, vermutlich von Kinasen der Familie der CMGC-Kinasen (z.B. CDK's, GSK 3, MAPK, Casein-Kinase) (Reed et al., 1997). Zudem wurde aus Experimenten mit Hefen geschlossen, dass auch Kinasen wie Akt oder MEK1 NS5A phosphorylieren können. Dies ist deswegen interessant, weil NS5A selber Einfluss auf die entsprechenden Signalwege ausübt, innerhalb derer diese Kinasen involviert sind (Coito et al., 2004). Es ist zwar noch nicht geklärt, welche Kinasen im Falle der NS5A-Phosphorylierung physiologische Relevanz besitzen. Es ist aber zu vermuten, dass die Casein-Kinasen eine Rolle spielen, da die Casein-Kinase II in der Lage ist, NS5A zu phosphorylieren (Kim et al., 1999). Zudem konnte für die Casein-Kinase I α in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass sie für die Hyperphosphorylierung von NS5A verantwortlich ist (Neddermann et al., 2004, Quintavalle et al., 2006). Essentiell für die hyperphosphorylierte Form des NS5A-Proteins sind die Serin-Reste 221, 224, 228 und 231 (Katz et al., 2000, Tanji et al., 1995). Bei den zahlreichen (potentiellen) Phosphorylierungsstellen für die basal- und hyperphosphorylierte Form des NS5A-Proteins ist aber anzunehmen, dass nicht nur eine Kinase der Wirtszelle für die verschiedenen phosphorylierten Zustände des Proteins verantwortlich ist. Es ist auch noch unklar, ob die Phosphorylierung der für die Hyperphosphorylierung essentiellen Reste die hyperphosphorylierte Form direkt verursacht, oder ob sie erst die Grundvoraussetzung zur Bildung dieser NS5A Variante schafft.

Mit Hilfe des HCV-Replicon-Systems wurde aufgedeckt, dass die HCV-Replikation durch den Phosphorylierungsstatus von NS5A moduliert werden kann. So konnte durch Mutationsanalysen gezeigt werden, dass die Reduktion der hyperphosphorylierten Form zu einer Steigerung der HCV-Replikation führt. Diese und weitere Beobachtungen lassen vermuten, dass die Phosphorylierung von NS5A einen wichtigen Kontrollpunkt im viralen Lebenszyklus darstellt (Appel et al., 2005). Eine direkte Einflussnahme von NS5A auf die Replikation, vermittelt über die Bindung von NS5A an die virale RNA, ist auf Grund der Strukturanalysen der Domäne I und der beobachteten Fähigkeit von NS5A RNA zu binden, wahrscheinlich. Jedoch ist die genaue Funktion von NS5A innerhalb der Replikation noch nicht geklärt. Bekannt ist nur, dass das Protein essentiell für die HCV-Replikation ist und sich Mutationen des NS5A-Proteins auf die Replikation auswirken können (Lohmann et al., 2001).

Einleitung: NS5A

Solche so genannten Zellkultur adaptiven Mutationen, also Mutationen, die bei der HCV-Replikation in Zellkultur-experimenten spontan auftreten und die mit einer effizienten Replikation verbunden sind, treten neben dem NS5A auch in anderen Nicht-Strukturproteinen auf (Krieger et al., 2001, Lohmann et al., 2001).

Indirekt kann NS5A auf die virale Replikation Einfluss nehmen, indem es z.B. über die Inhibition der MAP-Kinase p38 den eukaryontischen Initiationsfaktor 4E der Translation blockiert und somit die wirtseigene Cap-abhängige RNA-Translation vermindert. Die Translation der viralen RNA wäre dadurch bevorzugt (He et al., 2001).

Zudem ist NS5A auf der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, verankert über seine N-terminale amphiphatische α -Helix (Brass et al., 2002). Hier kommt NS5A in den so genannten Replikationskomplexen vor, einer Ansammlung der verschiedenen Nicht-Strukturproteine und der HCV-RNA an der ER-Membran (Moradpour et al., 2004, Pietschmann et al., 2001). Man nimmt an, dass diese Komplexe der Ort der HCV-Replikation sind. So konnten unter anderem die verschiedenen Nicht-Strukturproteine und auch NS5A mit jeweils anderen Nicht-Strukturproteinen kopräzipitiert werden, wobei auch NS5A mit sich selber präzipitiert werden konnte (Dimitrova et al., 2003). Fehlt dem NS5A-Protein aber seine N-terminale α -Helix, z. B. nach proteolytischer Spaltung, können solche trunkierten Fragmente oder entsprechende Deletionskonstrukte auch im Zellkern nachgewiesen werden (Penin et al., 2004a).

Eine enzymatische Aktivität von NS5A konnte bis jetzt noch nicht festgestellt werden. Eine Übersicht über die verschiedenen Domänen und anderer wichtige Strukturmerkmale von NS5A ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

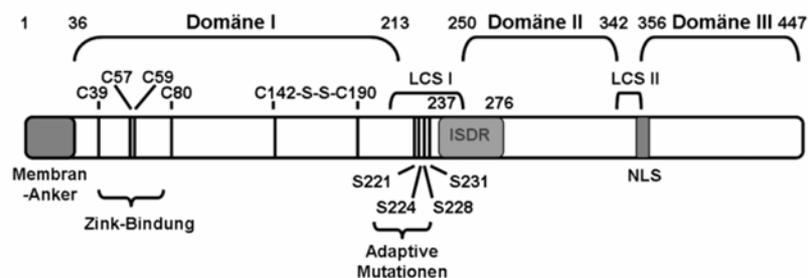


Abbildung 5: NS5A-Graphik. C: Cysteinrest; S: Serinrest; ISDR: *interferon sensitivity-determining region*, LCS: *low complexity sequence*; NLS: *nuclear localisation signal* (modifiziert nach: (Moradpour et al., 2005)).

1.2.2 Einfluss von NS5A auf die Wirtszelle

Zum Einfluss von NS5A auf die Wirtszelle gibt es noch kein eindeutiges Modell. Es wurden jedoch schon viele zum Teil auch widersprüchliche Effekte dieses viralen Proteins auf

Einleitung: NS5A

verschiedene zelluläre Mechanismen und Signalwege beschrieben. Auch wurden mehrere zelluläre Interaktionspartner identifiziert. Auf die wichtigsten Beobachtungen wird im Folgenden näher eingegangen.

Interferenz von NS5A mit dem Interferon-Signalweg

Ein häufig beschriebener Effekt ist der Einfluss von NS5A auf den antiviralen Mechanismus, ausgelöst durch Interferon (IFN). Dabei soll NS5A für die unterschiedlichen Sensitivitäten der einzelnen HCV-Genotypen gegenüber IFN α verantwortlich sein. Die IFN-Antwort ist ein zentrales Ereignis bei der Bekämpfung einer Virusinfektion. Dabei spielen vor allem antivirale Proteine eine Rolle, deren Gene durch IFN reguliert werden, wie z.B. die Gene der 2',5'-Oligoadenylat-Synthase (2',5'-OAS) und der RNA-abhängigen Protein Kinase R (PKR) (Rebouillat & Hovanessian, 1999, Samuel, 2001). Ursächlich für den Block der IFN-Wirkung durch NS5A, soll gerade die Bindung von NS5A an PKR sein, wodurch die PKR-Aktivität inhibiert wird. Das würde bedeuten, dass ein wesentlicher Effektor des Interferonsignalweges und somit der antiviralen Zellantwort außer Kraft gesetzt wird. Die Bindungsregion im NS5A wurde mit der umstrittenen Bezeichnung „*interferon sensitivity-determining region*“ (ISDR) versehen (Gale et al., 1998, Tan & Katze, 2001). Unterschiede in der Sequenz dieser Region werden mit unterschiedlichen Sensitivitäten auf IFN α in Verbindung gebracht (Enomoto et al., 1995, Enomoto et al., 1996, Polyak et al., 2001, Schiappa et al., 2002). Die klinischen und molekularbiologischen Daten sind aber bis heute umstritten, da andere Experimente keinen Nachweis eines Einflusses von NS5A auf die PKR-Aktivität erbrachten (Aus dem Siepen et al., 2005, Pawlotsky & Germanidis, 1999, Reyes, 2002). Zudem wurden Untersuchungen zum Einfluss von NS5A auf die Interferon-induzierte Genexpression durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass NS5A in der Lage war in HeLa Zellen die mindestens zweifach gesteigerte Expression von 14 IFN-induzierten Genen zu inhibieren. Ein in huh7 Zellen parallel untersuchtes subgenomisches HCV-Replicon hatte jedoch keinen großen Einfluss auf die Genexpression, und nur zwei der im Falle der HeLa Zellen betroffenen Gene wurden durch das Replicon inhibiert, obwohl das verwendete Replicon auch für NS5A codierte (Geiss et al., 2003). Weiterhin erbrachte in anderen Experimenten die Expression von NS5A in huh7 Zellen zwar auch eine Reduktion von IFN-induzierten Genen, jedoch waren andere Gene betroffen als im Falle der HeLa Zellen (Girard et al., 2002). Diese Experimente zeigen, wie unterschiedlich Beobachtungen zu NS5A-vermittelten Effekten ausfallen können, abhängig vom zellulären Hintergrund und der Art der Expression.

Einleitung: NS5A

Einfluss von NS5A auf das Zellwachstum und den Zellzyklus

Neben der Einflussnahme von NS5A auf Interferon-abhängige Mechanismen sind vor allem Effekte auf die Zellzykluskontrolle, Zellproliferation und das Zellwachstums beschrieben. Ein solcher, in vielen Organismen konservierter Mechanismus, ist die Kaskade von Serin/Threonin-Kinasen, so genannte *mitogen activated Proteinkinases* (MAPK). Sie umfassen meist eine MAP-Kinase, einen MAP-Kinase Aktivator (MKK (MAPK-Kinase) oder MEK (MAP/ERK-Kinase) und einen MKK/MEK Aktivator (MAPKK-Kinase). Die Signalweiterleitung erfolgt über Phosphorylierungen, wodurch die betroffene Kinase aktiviert wird. In Säugetieren sind 5 verschiedene MAP-Kinasesignalwege beschrieben (Schaeffer & Weber, 1999). Neben dem JNK und dem p38-abhängigen MAP-Kinasesignalweg, ist der ERK-abhängige einer der am besten untersuchten. Da im Zusammenhang mit NS5A und für die vorliegende Arbeit der ERK-abhängige MAP-Kinasesignalweg von zentraler Bedeutung ist, wird dieser im Folgenden vorgestellt und genauer beschrieben.

Der ERK-abhängige MAP-Kinasesweg ist in vielen Tumorarten dereguliert (Miller & Raab-Traub, 1999, Rapp et al., 1983) und spielt mutmaßlich auch bei der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen eine Rolle (Huynh et al., 2003). Zudem beeinflussen Hepatitis-Viren, deren Auftreten mit der Entstehung von HCCs in Verbindung gebracht wird, die MAP-Kinase-Signalweiterleitung (Huynh et al., 2003, Panteva et al., 2003). Auch von dem HCV-Protein NS5A ist bekannt, dass es zumindest Teile des MAP-Kinasesignalweges beeinflusst (Macdonald et al., 2003, Tan et al., 1999).

In gesunden Zellen wird der ERK-abhängige MAP-Kinasesignalweg vornehmlich durch Wachstumsfaktoren wie beispielsweise *epidermal growth factor* (EGF) und *plated derived growth factor* (PDGF), die extrazellulär an ihre Rezeptoren binden, aktiviert (Daum et al., 1994). Für die Weiterleitung des Signals ist sowohl die Bindung des *growth factor receptor binding proteins* Grb2 als auch die Rekrutierung des Nukleotid-Austauschfaktors SOS notwendig (Kolch, 2000). Darüber wird an Ras gebundenes GDP durch GTP ausgetauscht. Aktiviertes GTP-Ras rekrutiert Raf-1 (C-Raf) an die Zellmembran, ein essentieller Schritt bei der Raf-1 Aktivierung (Dhillon & Kolch, 2002). Die eigentliche Aktivierung von Raf-1 verläuft über die Phosphorylierung, wobei unterschiedliche Kinasen beschrieben sind, die Raf-1 phosphorylieren können, wie z.B. PAK oder Src (Dumaz & Marais, 2005). Eine direkte Aktivierung von Raf-1 wird im Falle der Proteinkinase C (PKC) angenommen (Castagna et al., 1982, Kolch et al., 1993), eine Tatsache, die man sich bei der Aktivierung von Raf-1 durch das PKC-Stimulans PMA zunutze macht (Castagna et al., 1982). PMA (Phorbol-myristyl-acetat) ist ein strukturelles Analogon zu Diacylglycerol, welches über die

Einleitung: NS5A

direkte Aktivierung der Proteinkinase C auch Raf-1 und somit den MAP-Kinaseweg aktiviert (Kolch et al., 1993). PMA wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, um eine Aktivierung des MAP-Kinaseweges auf Ebene von Raf-1 hervorzurufen. Raf-1 selber kann an mehreren Serin- und Tyrosinresten phosphoryliert werden, die sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken können (Dumaz & Marais, 2005). Die am besten charakterisierten Phosphorylierungsstellen sind Serin338 und Tyrosin341 (Dhillon & Kolch, 2002). Dabei spielt wohl Serin338 im Falle der Signalweiterleitung über Ras eine entscheidende Rolle (Chong et al., 2001, Mason et al., 1999), wohingegen die Tyrosin341-Phosphorylierung nicht unbedingt mit der Signalweiterleitung an MEK in Verbindung gebracht wird (Dhillon & Kolch, 2002). Abweichend zu diesem Modell beobachten Huser *et al.* jedoch auch im Falle der Phosphorylierung an den Tyrosinreste 340 und 431 eine MEK-Aktivierung (Huser et al., 2001). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von Raf-1 an verschiedenen Resten zu unterschiedlichen Funktionen von Raf-1 führen kann, die in einzelnen Zelllinien auch von den üblichen Mechanismen abweicht (Alavi et al., 2003).

Innerhalb des MAP-Kinaseweges führt die Raf-1-Aktivierung zur Phosphorylierung von MEK an den Serinresten 217 und 221. Dieses führt wiederum zu dessen Aktivierung (Bondzi et al., 2000, Zheng & Guan, 1994). MEK phosphoryliert und aktiviert seinerseits ERK. ERK wiederum ist in der Lage andere Kinasen oder direkt Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 oder SAP-1 zu phosphorylieren und somit die Genexpression zu regulieren (Hazzalin & Mahadevan, 2002).

Für Raf-1 gibt es auch vom MAP-Kinasesignalweg unabhängige Funktionen. So beeinflusst Raf-1 Mitglieder der Bcl2-Proteinfamilie, was zu einer Beeinflussung mitochondrialer Apoptosesignale führen kann (Troppmair & Rapp, 2003). Zudem wurde in Endothelzellen beobachtet, dass es bei einer Phosphorylierung von Raf-1 an Tyr340/341 zwar zu einer Aktivierung des MEK/ERK-Weges kam, eine Phosphorylierung von Ser338/339 aber zu einer MEK-unabhängigen Translokation von Raf-1 zur Mitochondrienmembran führte (Alavi et al., 2003). Weiterhin wurde eine Raf-1-abhängige NFκB-Aktivierung beschrieben, die über die Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes (IKK) verläuft (Arsura et al., 2000, Li & Sedivy, 1993). Dabei ist auch eine direkte Einflussnahme von Raf-1 auf die IKK-Aktivierung wahrscheinlich, da andere Proteine des klassischen MAP-Kinaseweges unterhalb von Raf-1 für die Aktivierung nicht unbedingt notwendig sind (Ludwig et al., 2001).

Zum MAP-Kinaseweg alternative Funktionsweisen für Raf-1 sind auch deshalb nahe liegend, da es neben verschiedenen Phosphorylierungsstellen innerhalb von Raf-1 mit A-, B-, D- und C-Raf auch noch andere Raf-Kinasen gibt (Daum et al., 1994). Es wird im Falle von B-Raf

Einleitung: NS5A

sogar davon ausgegangen, dass es die hauptsächliche MEK-Kinase *in vivo* ist (Peyssonnaud & Eychene, 2001). Neben unterschiedlichen Formen von MEK (MEK1 und 2) gibt es zudem zwei ERK-Proteine ERK1 und ERK2. Zusätzlich gibt es neben den vier Ras Proteinen N-Ras, H-Ras, Ki-Ras4A und Ki-Ras4B noch andere Raf-bindende G-Proteine wie z.B. Rap1. Dieses Protein kann u.a. durch cAMP aktiviert werden und interferiert mit der Ras induzierten Raf-1-Aktivierung (Peyssonnaud & Eychene, 2001). Somit nehmen die Erkenntnisse über die Komplexität des MAP-Kinaseweges und seiner Regulationsmechanismen ständig zu. Diese komplexen Strukturen einerseits und andererseits die in vielen Zellen konservierte Funktionsweise dieses Signalweges, nutzen eine Reihe von Viren, um auf die Genexpression der Zelle Einfluss zu nehmen. So wurden auch Raf und Ras über die entsprechenden viralen Protoonkogene *v-raf* und *v-ras* identifiziert (Papageorge et al., 1982, Rapp et al., 1983, Shimizu et al., 1983).

Eine schematische Zusammenfassung der für diese Arbeit wichtigsten Abläufe im MAP-Kinasesignalweg ist in Abbildung 6 wiedergegeben.

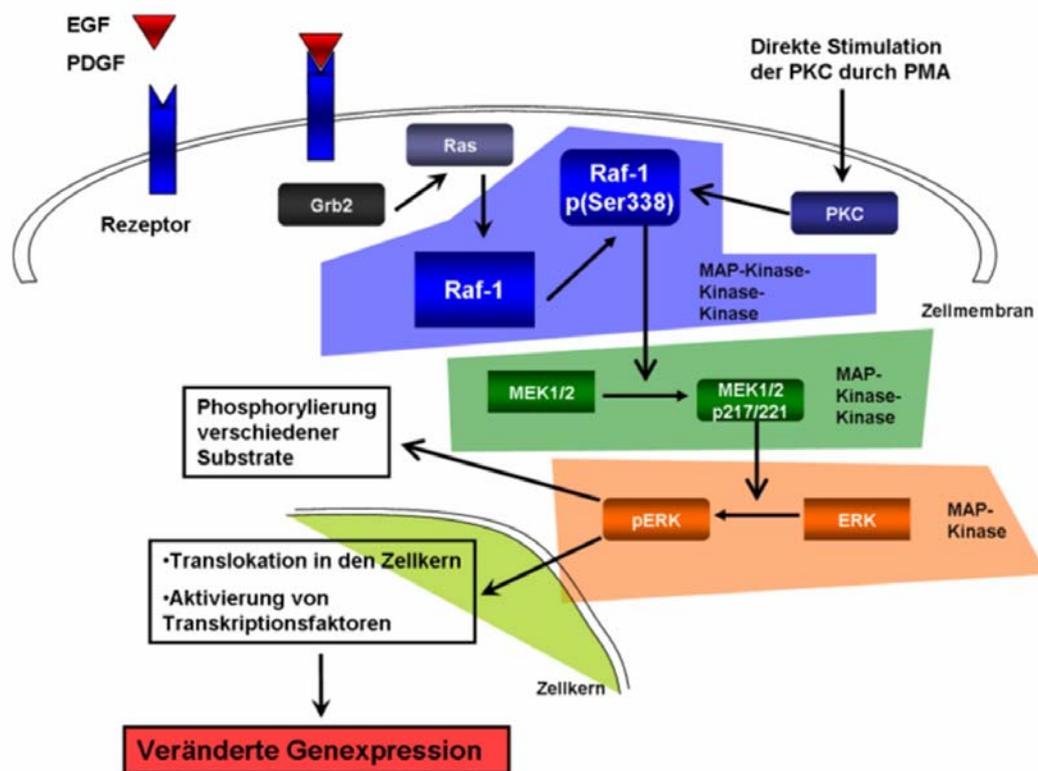


Abbildung 6: Schlüsselereignisse desRaf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinasesignalweges.

Kinase wird aktiviert: \longrightarrow ; direkte Phosphorylierung: \longrightarrow ; aktiviert/verursacht: \longrightarrow ; für weitere Erleuterungen siehe vorangegangenen Text.

Auch im Falle des Hepatitis C Virus ist eine Einflussnahme auf den MAP-Kinaseweg mehrfach sowohl für das Core-Protein (Aoki et al., 2000, Erhardt et al., 2002, Hayashi et al.,

Einleitung: NS5A

2000) als auch für das NS5A-Protein beschrieben. So zeigen Tan *et al.* (Tan et al., 1999) eine Interaktion von NS5A mit Grb2. Diese Interaktion wird über zwei *Src homology 3* (SH3) Domänen des Grb2-Proteins vermittelt. In HeLa Zellen wird diese Interaktion durch die Stimulation mit *epidermal growth factor* (EGF) begünstigt, wobei sich gleichzeitig die NS5A-Expression inhibierend auf die Aktivierung von ERK1/2 durch EGF auswirkt (Georgopoulou et al., 2003, He et al., 2002, Tan et al., 1999).

Weiter konnte in eigenen Arbeiten die Interaktion von NS5A mit der Schlüssel-Kinase Raf-1 gezeigt werden. Bei diesen Studien wurde u.a. beobachtet, dass in huh7 Zellen N-terminal trunkierte NS5A-Varianten, die im Zellkern lokalisiert sind, Raf-1 mit in den Kern schleusen. Zudem hatte eine Inhibition von Raf-1 eine negative Auswirkung auf die HCV-Replikation im Replicon-System. Dieses wurde mit Hilfe des Raf-1 Inhibitors Bay-43-9006 und siRNA Experimenten gezeigt (Burckstummer et al., 2006). Wiederum Auswirkungen einer NS5A-Expression auf Raf-1 werden im Folgenden in dieser Arbeit vorgestellt.

Andere Angriffspunkte von NS5A

NS5A greift neben dem MAP-Kinaseweg noch andere Mechanismen der Zellwachstums- bzw. Zellzykluskontrolle an. So ist z.B. die Interaktion von NS5A mit dem Tumorsupressor-Protein p53 und somit die Einflussnahme auf die durch p53 regulierte Genexpression beschrieben. Durch die Interaktion der beiden Proteine, die möglicherweise noch das TATA-Box-Bindeprotein mit einschließt (Qadri et al., 2002), wird die Genexpression von p21/waf1, ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, inhibiert (Majumder et al., 2001). Ein Einfluss von NS5A auf den p21/waf1-Promotor konnte schon von Gosh et al. (Ghosh et al., 1999) gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Steigerung des Zellwachstums und der Expression des *proliferation cell nuclear antigen* (PCNA), ein positiver Marker für Zellwachstum, durch NS5A gezeigt. Zudem soll NS5A die p53-induzierte Apoptose inhibieren (Lan et al., 2002).

Weiterhin wurde eine Einflussnahme von NS5A auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der unter anderem bei der Zellwachstumsregulierung eine Rolle spielt, beschrieben. Zum einen gibt es Untersuchungen, die die Aktivierung von NF- κ B durch NS5A, auch im Zusammenhang mit STAT-3, beschreiben. Diese Aktivierung verläuft demnach über eine NS5A-induzierte Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes und über die Induktion von *reactive oxygen species* (ROS) (Gong et al., 2001). Von Hayakawa et al. (Hayakawa et al., 2003) wurde jedoch gezeigt, dass eine Bildung von ROS nicht mit einer NF- κ B-Aktivierung zusammenhängt. Zudem wurde im Kontext einer Interaktion von NS5A mit dem *TNF-receptor-associated factor 2* (TRAF2) eine verminderte TNF α -vermittelte NF- κ B-

Einleitung: NS5A

Aktivierung (Park et al., 2003) beschrieben, zusammenhängend mit einer gesteigerten Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) nach TNF α Stimulation (Park et al., 2003). Ein grundsätzlicher Einfluss von NS5A auf den NF- κ B-Signalweg wird aber durch Microarray-Daten unterstützt. Danach verändert NS5A die Expression mehrerer Gene, die Bindungsstellen für NF- κ B in ihrem Promotor enthalten (Girard et al., 2004).

Für die regulatorische p85-Untereinheit der Phosphoinositide-3 Kinase (PI3 Kinase) ist eine Interaktion mit NS5A beschrieben, die für die Aktivierung der katalytischen Untereinheit der PI3 Kinase verantwortlich sein soll (Street et al., 2004). Dadurch werden unter Einbeziehung der Kinase Akt proapoptische Faktoren inaktiviert (Street et al., 2005). Ebenfalls negativ auf Apoptose und positiv auf die Proliferation wirkt sich laut Sarcar et al. (Sarcar et al., 2004) die NS5A-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 aus.

Eine direkte aktivierende Wirkung auf die Transkription wurde für ein N-terminales Deletionskonstrukt von NS5A in Hefen und huh7 Zellen beschrieben (Kato et al., 1997).

Wiederum direkten Einfluss auf den Zellzyklus soll NS5A über die Interaktion mit der Cyklin-abhängigen Kinase Cdk1 haben. Cyklin-abhängige Kinasen sind für die geordnete Abfolge von G-, M- und S-Phase in proliferierenden Zellen verantwortlich. In HeLa und *Chang liver cells* wird die Interaktion von NS5A mit Cdk1 für eine Verkürzung der S-Phase und eine Verzögerung der G₂/M-Phase verantwortlich gemacht. Daraus resultiert eine durch NS5A verminderte Proliferationsrate (Arima et al., 2001).

Weiterhin wurden Interaktionen von NS5A mit dem Transkriptionsfaktor SRCAP (Ghosh et al., 2000b) und einigen weiteren zellulären Proteinen wie Amphiphysin II, hVAP-33, Karyophyrin β 3 publiziert (Chung et al., 2000, Tu et al., 1999, Zech et al., 2003). Im Falle des SNARE ähnlichen Proteins hVAP-33 (*human vesicle-associated membrane protein-associated protein of 33 kDa*) wurde ein Zusammenhang mit dessen Bindung an NS5A und an andere HCV-Proteine und der HCV-Replikation im Replicon-System hergestellt (Gao et al., 2004). Amphiphysin II hingegen zeigt einen Einfluss auf die Phosphorylierung von NS5A (Masumi et al., 2005). Jedoch konnte keine dieser Interaktionen im Zuge von *yeast-two hybrid* Experimenten bestätigt werden (Ahn et al., 2004).

Auf Grund der vielen verschiedenen und z.T. widersprüchlichen beobachteten Wirkungen von NS5A auf zelleigene Signalwege gibt es noch kein schlüssiges Modell für eine mögliche Wirkung von NS5A auf die HCV-infizierte Zelle. Jedoch machen diese Befunde NS5A zu einem viel versprechenden Kandidaten bei der Suche nach Proteinen des Hepatitis C Virus, die in die Wachstums- und Differenzierungsregulation der Wirtszelle eingreifen und somit für die Entwicklung von Leberzelltumoren im Falle einer HCV-Infektion verantwortlich sind.

Einleitung: NS5A

Dieses Eingreifen von NS5A basiert, fasst man die bisherigen Daten zusammen, vermutlich auf der Deregulation von Signalkaskaden.

1.2.3 HCV/NS5A und Apoptose

Als einer der zentralen Abwehrmechanismen von Organismen, die von Viren beeinflusst werden, gilt der programmierte Zelltod, die so genannte Apoptose. Auf die molekularen Mechanismen der Apoptose wird in einem späteren Abschnitt näher eingegangen (vergl. 1.3). Im Zusammenhang mit HCV gibt es Beobachtungen, wonach die Expression einzelner oder mehrerer HCV-Proteine Einfluss auf die Apoptose hat. Für das komplette HCV-Genom, codierend für alle HCV-Proteine, wurde beispielsweise in HepG2 Zellen eine Apoptose induzierende Wirkung beschrieben (Kalkeri et al., 2001). Dieser Effekt wurde jedoch nur mit unspezifischen Detektionsverfahren wie Trypan-Ausschluß und DNA-Leiterdetektion untersucht. Zudem sind HepG2 Zellen nicht besonders permissiv für die HCV-Replikation im Replicon-System, was bedeutet, dass sie zumindest im Bezug auf die HCV-Replikation kein gutes Modellsystem darstellen.

Für das HCV-Core-Protein wurden überwiegend proapoptotische Effekte beobachtet. Demnach erhöht das Core-Protein die Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose in huh7 unter möglicher Einbeziehung des mitochondrialen Signalweges (Chou et al., 2005). Auch ein PKR- und TNF-abhängiger proapoptotischer Effekt des Core-Proteins wurde beschrieben (Realdon et al., 2004, Zhu et al., 1998). Sowohl für das Core- als auch das NS3-, NS5A- und NS5B-Protein gibt es Hinweise auf Apoptose induzierende Eigenschaften. Diese Untersuchungen wurden jedoch in dendritischen Zellen durchgeführt (Siavoshian et al., 2005). Teilweise in HepG2 Zellen wurden Versuche durchgeführt, bei denen das NS3-Protein eine proapoptotische Wirkung nach Transfektion im Zusammenhang mit Caspase8 aufweist und wonach es zudem B-Zellen gegenüber Fas-vermittelter Apoptose sensitiviert (Prihod'ko et al., 2004). Aber auch ein antiapoptotisches Potential des NS3-Proteins konnte im Zusammenhang mit dessen Interaktion mit p53 registriert werden (Tanaka et al., 2006). Für das NS4A-Protein ist hingegen ein Caspase 8 unabhängiger proapoptotischer Einfluss in der Leberzelllinie huh7 beschrieben (Nomura-Takigawa et al., 2006). Dabei sind huh7 Zellen im Falle einer NS4A-Expression sensitiver gegenüber Actinomycin D-induzierter mitochondrieller Apoptose. In diesem Kontext wurde derselbe Effekt auch für ein subgenomisches Replicon gezeigt, welches neben dem NS4A auch die restlichen Nicht-Strukturproteine 3, 4B, 5A und 5B bildet. Ein Einfluss von NS4A auf Caspase8 und TNF α , also auf rezeptorvermittelte Apoptose, konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

Einleitung: NS5A

Im Falle des NS5A-Proteins gibt es verschiedene Beobachtungen, die einen Einfluss auf unterschiedliche Apoptose-Mechanismen beschreiben. So beschreiben Gale et al. (Gale et al., 1998), dass NS5A in der Lage ist, die Aktivität der Proteinkinase R (PKR) zu hemmen. In diesem Zusammenhang interferiert die Anwesenheit von NS5A in NIH 3T3 (Maus Embryo Fibroblasten) Zellen mit Interferon-abhängiger Apoptose, ausgelöst durch doppelsträngige RNA. In HeLa Zellen konnte jedoch kein Einfluss von NS5A auf die PKR-Aktivität beobachtet werden. Zudem war NS5A nicht in der Lage, Apoptose, ausgelöst durch Etoposide (mitochondrialer Weg) oder TRAIL (extrinsischer Weg), zu hemmen (Ezelle et al., 2001). Ebenfalls in HeLa Zellen soll die Interaktion von NS5A mit der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) einen negativen Einfluss auf BAD-abhängige Apoptose haben. Diese Interaktion aktiviert den PI3K-AKT-Signalweg, was zu einer Aktivierung von AKT und somit zur Phosphorylierung von BAD führt. Dieses wiederum wirkt antiapoptotisch (He et al., 2002). Eine Aktivierung der PI3 Kinase durch NS5A und eine dementsprechende Inhibition der Apoptose, ausgelöst durch Serumentzug bzw. Etoposide, konnte zudem auch in huh7 Zellen und auch in Replicon-Zellen bestätigt werden (Street et al., 2004).

Weiterhin wurde eine direkte Interaktion von NS5A mit dem Transkriptionsfaktor p53 in HepG2 Zellen gefunden. Dadurch kann NS5A die transkriptionelle Aktivatorfunktion des Tumor-suppressors p53 inhibieren, was wiederum einer antiapoptotischen Wirkung gleichkommt (Majumder et al., 2001, Qadri et al., 2002). Auch inhibiert NS5A in p53-defizienten Hep3B Zellen eine durch künstliche p53-Expression ausgelöste Apoptose (Lan et al., 2002). Weiterhin wurden Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren SRCAP, PTX1 und TBP beschrieben. Im Falle von SRCAP wurde eine geringere Promotoraktivität von p21 festgestellt, ein Protein, welches die Aktivität einiger CDKs inhibiert und proapoptotisch wirken soll. Somit käme die Bindung von NS5A und SRCAP einer antiapoptotischen Wirkung gleich (Ghosh et al., 2000b). Auch die Bindung von NS5A an Bax ist beschrieben. Diese Interaktion wird in HepB3 Zellen mit der Fähigkeit von NS5A in Verbindung gebracht, Natrium-Phenylbutyrat (NaPB) induzierte Apoptose zu inhibieren (Chung et al., 2003). NaPB inhibiert die Deacetylierung von Histonen und beeinflusst so die Gentranskription, wodurch ein intrinsischer Apoptoseweg ausgelöst werden kann, der von p53 unabhängig ist (Chung et al., 2003).

Deutlicher und einheitlicher sind jedoch Befunde zum Einfluss von NS5A auf TNF α -vermittelte Apoptose. So inhibiert NS5A sowohl in HepG2 Zellen (Ghosh et al., 2000a, Lin et al., 2003) als auch in huh7 Zellen (Miyasaka et al., 2003) die TNF α -vermittelte Apoptose. Zudem konnte in einem transgenen Mausmodell für NS5A exprimierende Leberzellen eine

Einleitung: Apoptose

verringerte Apoptosesensitivität gegenüber $\text{TNF}\alpha$, nicht aber gegenüber Fas festgestellt werden (Majumder et al., 2002). Obwohl sowohl durch Fas als auch durch $\text{TNF}\alpha$ die rezeptorvermittelte Apoptose induziert wird, verhielten sich die transgenen Mäuse unterschiedlich in ihrer Reaktion auf die beiden Substrate. Ein Grund für die unterschiedliche Wirkung soll die beschriebene Interaktion von NS5A mit TRADD sein, welche die Funktion von TRADD hemmt. Da TRADD bei der Fas-induzierten Apoptose keine Rolle spielt, wird dieser Apoptosemechanismus durch NS5A nicht behindert (Majumder et al., 2002).

Zusammengenommen gibt es mehrere Hinweise darauf, dass das NS5A-Protein gerade im Zusammenhang mit $\text{TNF}\alpha$ -vermittelter Apoptose ein antiapoptotisches Potential besitzt. Die Untersuchungen zu den anderen HCV-Proteinen im Bezug auf den programmierten Zelltod sind weniger umfangreich und ein abschließendes Urteil kann nicht gefällt werden. Zudem ist fast nichts darüber bekannt, wie sich die möglichen unterschiedlichen und zum Teil als gegensätzlich beschriebenen Effekte der einzelnen Proteine im Polyproteinkontext verhalten. Auch die Zellsysteme, in denen viele der Untersuchungen durchgeführt wurden, sind kritisch zu beurteilen, da viele Experimente nicht in Leberzelllinien und z.T. noch nicht einmal in humanen Zelllinien durchgeführt wurden. Dies schränkt die Aussagekraft dieser Experimente ein. Aber auch Arbeiten mit humanen Leberzelllinien müssen berücksichtigen, dass sich diese teilweise stark in zentralen Voraussetzungen für bestimmte Apoptosemechanismen unterscheiden. So exprimieren HepG2 Zellen kleine Mengen an intaktem p53, wohingegen huh7 Zellen mutiertes p53 mit verlängerter Lebensdauer exprimieren und Hep3B Zellen sogar überhaupt kein p53 mehr bilden (Muller et al., 1997).

1.3 Apoptose

1.3.1 Apoptose allgemein

Ein Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von HCV auf verschiedene Apoptose-Wege. Apoptose ist ein bei Vielzellern weit verbreiteter Prozess, bei dem Zellen in eine Art programmierten Zelltod gehen. Apoptose ist gekennzeichnet durch definierte Abläufe und Mechanismen. Sowohl in der Embryonalentwicklung als auch bei der Homöostase in adulten Geweben ist Apoptose anzutreffen. Betroffen sind entweder Zellen, die Ihre Aufgabe erfüllt haben und vom Organismus nicht mehr benötigt werden oder geschädigte Zellen. Zudem ist Apoptose ein Schlüsselmechanismus des betroffenen Organismus in der Bekämpfung von Viren und anderen Infektionen (Meier et al., 2000).

Eine Fehlregulation der Apoptose kann zu pathologischen Erscheinungen führen wie z.B. die Ausbildung von Autoimmunkrankheiten und Tumoren im Falle einer zu geringen

Einleitung: Apoptose

Aktivierbarkeit der Apoptose (Chen & Goeddel, 2002, Green & Evan, 2002, Thompson, 1995). Eine verstärkte Apoptose kann umgekehrt zu Immunschwäche und zu neurodegenerativen Krankheiten führen (Chen & Goeddel, 2002).

Es gibt verschiedene Stimuli, die Apoptose induzieren können. Zum einen führt die Bindung extrazellulärer Liganden der TNF-Superfamilie (TNF α , TNF-*related apoptosis-inducing ligand* (TAIL) und Fas Ligand (FasL)) (Leong & Karsan, 2000) an entsprechende Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie (TNF-R, TRAIL-R, Fas/CD95) zur Trimerisierung der Rezeptoren und damit zur Induktion der so genannten rezeptorvermittelten Apoptose der Zelle (Krammer, 2000).

Zum anderen kann es durch UV-Strahlen und Chemotherapeutika zur DNA-Schädigung und Perforation der äußeren Mitochondrienmembran kommen. Dieses hat eine Freisetzung von Cytochrom c zur Folge und führt somit zur Initiation des intrinsischen Apoptose-Weges (Patterson et al., 2000, Wang, 2001).

Das gemeinsame Ereignis der meisten Apoptose-Signalwege ist die Initiierung der Caspase-Kaskade. Caspasen sind Cysteinproteasen und spalten ihre Substrate hinter einem Aspartatrest (Earnshaw et al., 1999). Caspasen werden auf Grund ihrer Funktion in zwei Gruppen unterteilt: Initiator-Caspasen (Caspase 8, 9, 10 und 12) sowie Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7) (Earnshaw et al., 1999). In der Zelle liegen die Caspasen als inaktive Vorläuferproteine (Procaspasen) vor, die nach der Induktion der Apoptose über ihre *death effector domain* (DED) an Adaptoren wie FADD (*fas associated death domain protein*) oder Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) binden und zu einem aktiven Enzymkomplex dimerisieren (Boatright et al., 2003, Donepudi et al., 2003, Renatus et al., 2001). Im Falle einer Apoptose-Initiation läuft eine komplexe Caspasen-Kaskade ab, bei der Caspasen selber von Caspasen aktiviert werden. Wird Apoptose ausgelöst, werden zunächst Initiator-Caspasen wie Caspase 8 oder 9 aktiviert, die wiederum die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 prozessieren und damit aktivieren. Die Effektor-Caspasen sind verantwortlich für typische morphologische Merkmale einer apoptotischen Zelle. Sie spalten das Zytoskelett und die Kernmatrix, aktivieren Endonukleasen, die zur Entstehung der charakteristischen apoptischen DNA-Leiter führen und spalten Proteine, die bei der intrazellulären Signalübertragung entscheidende Funktionen übernehmen bzw. solche, die die Reparatur der DNA übernehmen. Somit sind die Effektor-Caspasen für den Abbau essentieller zellulärer Proteine und dadurch für die Ausschaltung der betroffenen zellulären Mechanismen verantwortlich (Chang & Yang, 2000, Nunez et al., 1998).

Einleitung: Apoptose

1.3.2 Mitochondriale Apoptose

Der intrinsische Weg der Apoptose über die Mitochondrien wird durch die Bcl-2-Proteine reguliert. Proteine dieser Familien bilden über ihre BH-Domänen (*Bcl-2 homology domain*) Heterodimere und das Gleichgewicht der verschiedenen Familienmitglieder entscheidet über die Apoptoseantwort. Durch eine DNA-Schädigung kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, der u.a. die Expression von proapoptotischen Genen wie Bax und Bak der Bcl-2 Familie induzieren kann. Bax und Bak verändern das Membranpotential der äußeren Mitochondrienmembran und machen diese somit durchlässig für Proteine. Genauso kann dieser Apoptoseweg durch perforierende Chemikalien eingeleitet werden. Es kommt zur Freisetzung mitochondrialer Proteine wie DIABLO/Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*) und Cytochrom c (Patterson et al., 2000). Das aus den Mitochondrien freiwerdende Cytochrom c assoziiert mit Apaf-1 und der Initiator-Caspase 9. Durch dieses sogenannte Apoptosom (Wang, 2001) wird die Caspase 9 proteolytisch aktiviert. Die Caspase 9 prozessiert wiederum die Caspasen 3 und 7 (Rodriguez & Lazebnik, 1999) und führt u.a. zur Spaltung des DNA-Reparaturenzyms Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP).

Die Caspase-Aktivität wird außerdem durch die Inhibitoren der Apoptose (IAP) reguliert. Der bekannteste, XIAP, unterdrückt die Aktivität von Caspase 9 und 3, indem er mit aktivierten Caspasen assoziiert (Deveraux et al., 1999). Die mitochondrialen Proteine DIABLO/Smac lösen die IAP's von den aktivierten Caspasen und fördern so den apoptotischen Prozess (Du et al., 2000, Verhagen et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde zur Induktion mitochondrialer Apoptose hauptsächlich Etoposide verwendet. Etoposide ist ein Glykosidderivat des Podophyllotoxins aus der Wurzel des immergrünen amerikanischen Maiapfels (*Podophyllum peltatum*). Es wird als chemotherapeutisches Mittel (Zytostatikum) zur Behandlung von Tumoren eingesetzt. Es hemmt die Topoisomerase II. Durch das Schneiden beider DNA-Stränge ist die Topoisomerase II in der Lage, die DNA-Verdrillung bzw. die Entwindung zu regulieren. Etoposid stabilisiert eine kovalent an die DNA gebundene Übergangsform der Topoisomerase II. Das Ergebnis ist eine Anhäufung von DNA-Strangbrüchen. Nehmen die DNA-Strangbrüche überhand, wird über den Transkriptionsfaktor p53 die mitochondriale Apoptose eingeleitet (Baldwin & Osheroff, 2005, Karpinich et al., 2002).

1.3.3 Rezeptorvermittelte Apoptose

Bei der rezeptorvermittelten Apoptose binden über einen homologen extrazellulären Bereich Zytokine wie TNF α , TRAIL und FasL an ihre Rezeptoren. Von den Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie ist bekannt, dass sie als Homotrimere vorliegen (Jones et al., 1989). Man

Einleitung: Apoptose

vermutet, dass die Ligandenbindung zu einer Oligomerisierung der angesprochenen Rezeptoren führt (Banner et al., 1993). Da die TNF-Rezeptoren keine intrinsischen katalytischen Eigenschaften besitzen, benötigen sie Adaptermoleküle aus dem Zytosol, um ihre Funktionen vermitteln zu können. Sequenzvergleiche der intrazellulären Domänen zeigen die Existenz eines homologen Abschnitts von ca. 80 AS. Diese Region wird als *death domain* (DD) bezeichnet, da durch sie die Weiterleitung zytotoxischer Signale ermöglicht wird (Itoh & Nagata, 1993, Tartaglia et al., 1993). Die Funktion dieser *death*-Rezeptoren (Todesrezeptoren) ist vor allem die Übertragung apoptotischer Signale, vermittelt über die DD-Adapterproteine FADD und TRADD (*TNF-R1-associated death domain protein*). Die *death domain* von FADD und TRADD interagiert mit der *death effector domain* (DED) der Initiator-Caspase 8, was zur Dimerisierung und damit zur Aktivierung von Caspase 8 führt. Über diesen extrinsischen Weg, also die Aktivierung der *death*-Rezeptoren, wird zudem die Initiator-Caspase 10 aktiviert. Die aktivierten Initiator-Caspasen 8 und 10 prozessieren Effektor-Caspasen 3, 6 und 7. Diese Proteasen wiederum spalten wichtige zelluläre Proteine u.a. Strukturproteine und Proteine, die in DNA-Replikation und DNA-Reparatur involviert sind, wie z.B. PARP (Chang & Yang, 2000, Nunez et al., 1998, Soldani & Scovassi, 2002).

Apoptose ist u.a. ein Mechanismus der Wirtsabwehr gegen virale Infektionen (Lau et al., 1998). Bei einer viralen Infektion produzieren und sezernieren Makrophagen und T-Helfer-Zellen (Th 1-Zellen) $\text{TNF}\alpha$, welches in virusinfizierten Zellen Apoptose induzieren kann. Viele virale Genome kodieren aber Proteine, die in der Lage sind, Apoptosesignalwege der Zelle zu modulieren, um den Zelltod zu verhindern, wie z.B. Beispiel das LMP1-Protein des Epstein-Barr Virus, das E1B 19k Protein humaner Adenoviren (O'Brien, 1998) und das NS5A-Protein des Hepatitis C Virus (Ghosh et al., 2000a, Lin et al., 2003). Alle drei Proteine interferieren u.a. mit den $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Signalwegen. Es wird angenommen, dass diese Virus-Wirt-Interaktion im Falle von HCV dem Virus ermöglicht, in den Hepatocyten des Wirtes zu persistieren (Marusawa et al., 1999). Dies verursacht eine chronische Leberentzündung und die Bildung eines hepatozellulären Karzinoms (Muratori & Gibellini, 2001, Toubi et al., 2001).

Im Zuge der vorgestellten Untersuchungen wurde für die Induktion der rezeptorvermittelten Apoptose u.a. $\text{TNF}\alpha$ verwendet. $\text{TNF}\alpha$ ist ein Hauptmediator entzündlicher Reaktionen. Es verdankt seinen Namen der Fähigkeit, in bestimmten Tumoren *in vivo* Nekrose zu verursachen. Humanes lösliches $\text{TNF}\alpha$ ist ein nicht-glykosyliertes Protein von 17 kDa und einer Länge von 157 AS. Es entsteht durch die Prozessierung der Membranform von 26 kDa (Fiers, 1991, Moss et al., 1997). Hauptsächlich wird $\text{TNF}\alpha$ von Makrophagen und T-

Einleitung: Apoptose

Lymphozyten als Antwort auf Infektionen exprimiert (Baud & Karin, 2001). Dabei wird es nur von aktivierten Zellen als Reaktion auf Stimuli wie LPS (Lipopolysaccharid), TNF α selbst und IFN- γ gebildet. TNF α vermittelt seine Funktionen über zwei verschiedene Rezeptoren: TNF-R1 und TNF-R2. Obwohl die Affinität von TNF α zum TNF-R2 ca. fünf mal stärker ist als zum TNF-R1 (van Horssen et al., 2006), ist letzterer biologisch relevanter, da über den TNF-R1 die meisten biologischen Funktionen vermittelt werden (Locksley et al., 2001, Rothe et al., 1994). Gerade im Hinblick auf die Apoptose-Induktion durch TNF α scheint der TNF-R1 entscheidend zu sein, da der TNF-R2 keine DD enthält. Es wird jedoch angenommen, dass der TNF-R2 signalverstärkend für den TNF-R1 wirkt (MacEwan, 2002).

Der TNF-R1 wird mit Ausnahme von Erythrozyten nahezu überall exprimiert, daher sind die meisten Zelltypen zumindest geringfügig empfänglich für TNF-vermittelte Signale, was das breite Wirkungsspektrum dieses Zytokins erklärt (Schulze-Osthoff et al., 1998).

Die Liganden der TNF-Familie sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Tracey & Cerami, 1993, Vandenabeele et al., 1995). Danach können TNF-Liganden zur Aktivierung von drei verschiedenen Signaltransduktionswegen führen, die entweder in der Auslösung von Apoptose oder in der Aktivierung von NF κ B oder c-Jun enden. Welcher Weg induziert wird, hängt vom Liganden, dem Rezeptor, der Bindungsstärke und der Anwesenheit anderer pro- bzw. antiapoptotischer Signale ab. Für die Induktion von TNF α -vermittelter Apoptose ist der TNF-R1 verantwortlich, da er im Gegensatz zu TNF-R2 eine Todesdomäne enthält, mit der er apoptotische Signale vermitteln kann. Im inaktiven Zustand von TNF-R1 verhindert das Protein SODD (*silencer of death domain*) eine Selbstaggregation der Todesdomänen. Dieses Protein löst sich nach Bindung von TNF α vom Rezeptorkomplex und ermöglicht dadurch erst die Bindung von Adaptermolekülen (Jiang et al., 1999) wie TRADD (*TNF-R1-associated death domain protein*). Es wird ein endogener TNF-R1 *death-inducing signalling complex* (DISC) assembliert, in dem über TRADD auch FADD rekrutiert wird (He und Ting, 2002). Dies wird über die Todesdomänen dieser Proteine vermittelt (Boldin et al., 1996, Chinnaiyan et al., 1996, Hsu et al., 1996b). Die Rekrutierung von FADD in den TNF-R1-DISC ist essentiell für die Induktion der Apoptose. Unterhalb der FADD-Rekrutierung erfolgt die TNF-R1-, Fas-, TRAIL-R1- und TRAIL-R2-vermittelte Apoptose über einen gemeinsamen Signalweg. Über die Interaktion der *death effector domain* (DED) von FADD und der Initiator-Caspase 8 wird letztere zum DISC hinzugefügt (Medema et al., 1997). Die dadurch induzierte Oligomerisierung von Caspase 8 führt zu deren autoproteolytischen Spaltung und Aktivierung (Muzio et al., 1998). Von der aktiven Caspase 8 aus führen zwei verschiedene Wege zum

Einleitung: Apoptose

apoptotischen Zelltod. Entweder aktiviert Caspase 8 direkt die Effektor-Caspase 3 oder es kommt zu einer Amplifikation des apoptotischen Caspase 8-Signals über einen Mitochondrien-abhängigen Mechanismus. Dabei bewirkt Caspase 8 eine Spaltung von Bid, einem Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie (Li et al., 1998, Luo et al., 1998). Das Spaltprodukt von Bid (tBid) initiiert am Mitochondrium die Freisetzung von Cytochrom c (Chou et al., 2005, LeBlanc et al., 2002, Li et al., 1998, Luo et al., 1998). Die darauf folgende Bildung des Apoptosoms induziert über Caspase 9 die Caspase 3-Aktivierung. Die aktivierte Caspase 3 spaltet wiederum Caspase 8 und schließt auf diese Weise eine apoptotische Amplifikations-schleife (Engels et al., 2000, Tang et al., 2000, Wieder et al., 2001). Mittels Caspase 8 und Bid gibt es somit eine Verbindung zwischen den extrinsischen und dem intrinsischen Apoptoseweg.

Neben der Induktion von Apoptose ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B durch TNF α über TNF-R1 induzierbar. Unter dem Begriff NF κ B sind dimere Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie zusammengefasst, die nach Stimulation vom Zytoplasma in den Kern wandern (Ghosh et al., 1998). Nach der Ligandenbindung wird, wie auch bei der Induktion der Apoptose, das Adaptermolekül TRADD in den TNF-R1-Komplex rekrutiert (Hsu et al., 1996b). Dieses Molekül steht sowohl am Beginn der TNF α -vermittelten Apoptose als auch der TNF α -induzierten Aktivierung von NF κ B. TRADD ermöglicht dann die Bindung von TRAF2 (*TNF-receptor associated factor*) und RIP (*receptor interacting protein*) an den Rezeptorkomplex (Hsu et al., 1996a, Hsu et al., 1996b, Takeuchi et al., 1996). TRAF2 wiederum rekrutiert den IKK-Komplex (I κ B Kinase-Komplex) in den Rezeptorkomplex (Devin et al., 2001). Der IKK-Komplex ist ein Multiproteinkomplex, der sich im Wesentlichen aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β und einer regulatorischen Untereinheit zusammensetzt. Im nicht aktivierten Zustand liegt der Transkriptionsfaktor NF κ B im Zytoplasma vor, gebunden an seinem Inhibitor I κ B. Die durch RIP (Devin et al., 2000) aktivierten Kinasen IKK α und β phosphorylieren I κ B an zwei konservierten Serinresten, was dessen Ubiquitynylierung und nachfolgenden Abbau durch das 26S Proteasom bewirkt. Dadurch wird NF κ B frei, transloziert in den Kern und bewirkt dort die Transkription der entsprechenden Zielgene (Kelliher et al., 1998, Maniatis, 1997, Nakano et al., 1998, Stancovski & Baltimore, 1997). Diese wirken der Apoptose z.T. entgegen (Chu et al., 1997, Schwenzler et al., 1999, Wang et al., 1998). Die Aktivierung von NF κ B durch TNF α kann jedoch auch über die PI(3)-Kinase unter Einbeziehung von Akt (Proteinkinase B) verlaufen (Ozes et al., 1999).

Einleitung: Apoptose

Durch Interaktionen zwischen den TNF-R1-vermittelten Signalwegen entsteht ein regulatorisches Netzwerk zwischen Apoptose oder Zellproliferation. Dabei wirkt eine NFκB-Aktivierung und anschließende Transkription spezifischer Überlebensgene der Apoptoseinduktion entgegen. Umgekehrt spaltet aktivierte Caspase 8 den Faktor RIP und wirkt somit wiederum einer NFκB-Aktivierung entgegen (Lin et al., 1999).

Als weiteres Stimulans für die Induktion von rezeptorvermittelter Apoptose wurde TRAIL verwendet. Neben der membranständigen Form existiert eine durch enzymatische Spaltung entstehende lösliche Form (Mariani & Krammer, 1998). Die biologisch aktive Form von TRAIL ist ebenfalls ein Trimer (Cha et al., 1999, Hymowitz et al., 1999, Mongkolsapaya et al., 1999). Für TRAIL sind fünf Rezeptoren bekannt, die alle Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie sind. Jedoch besitzen TRAIL-R1 (DR4) (Pan et al., 1997, Schneider et al., 1997) und TRAIL-R2 (DR5) (Schneider et al., 1997) als einzige TRAIL-Rezeptoren eine funktionelle Todesdomäne zur Vermittlung apoptotischer Signale. Mehrere Untersuchungen haben die Apoptoseinduktion durch TRAIL in transformierten Zellen, jedoch nicht in normalen Zellen zeigen können (Ashkenazi et al., 1999, Walczak et al., 1999). Nach Ligandenbindung kommt es an den DR4 und 5 direkt zur Rekrutierung von FADD und der Initiator-Caspase 8. Die TRAIL-Rezeptoren mit Todesdomäne benutzen demnach den Fas DISC-Komplex. Die weitere Signaltransduktion läuft dem TNF-R1 entsprechend. Die apoptotische Amplifikationsschleife durch Caspase 8 und Bid ist auch über TRAIL induzierbar. Im Gegensatz zu TNFα induziert TRAIL bevorzugt apoptotische Signale, obwohl TRAIL ebenfalls NFκB und JNK aktivieren kann (Mühlenbeck *et al.*, 1998). In dem Zusammenhang zeigten Kumar-Sinha *et al.* 2001, dass es erst nach vier Stunden Inkubation mit TRAIL zu einer Aktivierung des NFκB Signalweges kommt. Dies weist auf eine indirekte bzw. sekundäre Konsequenz der TRAIL-Stimulation hin (Sheridan et al., 1997). Eine schematische Zusammenfassung von für diese Arbeit wichtigen Ereignissen bei der mitochondrialen und rezeptorvermittelter Apoptose ist in Abbildung 7 wiedergegeben.

Einleitung: Apoptose

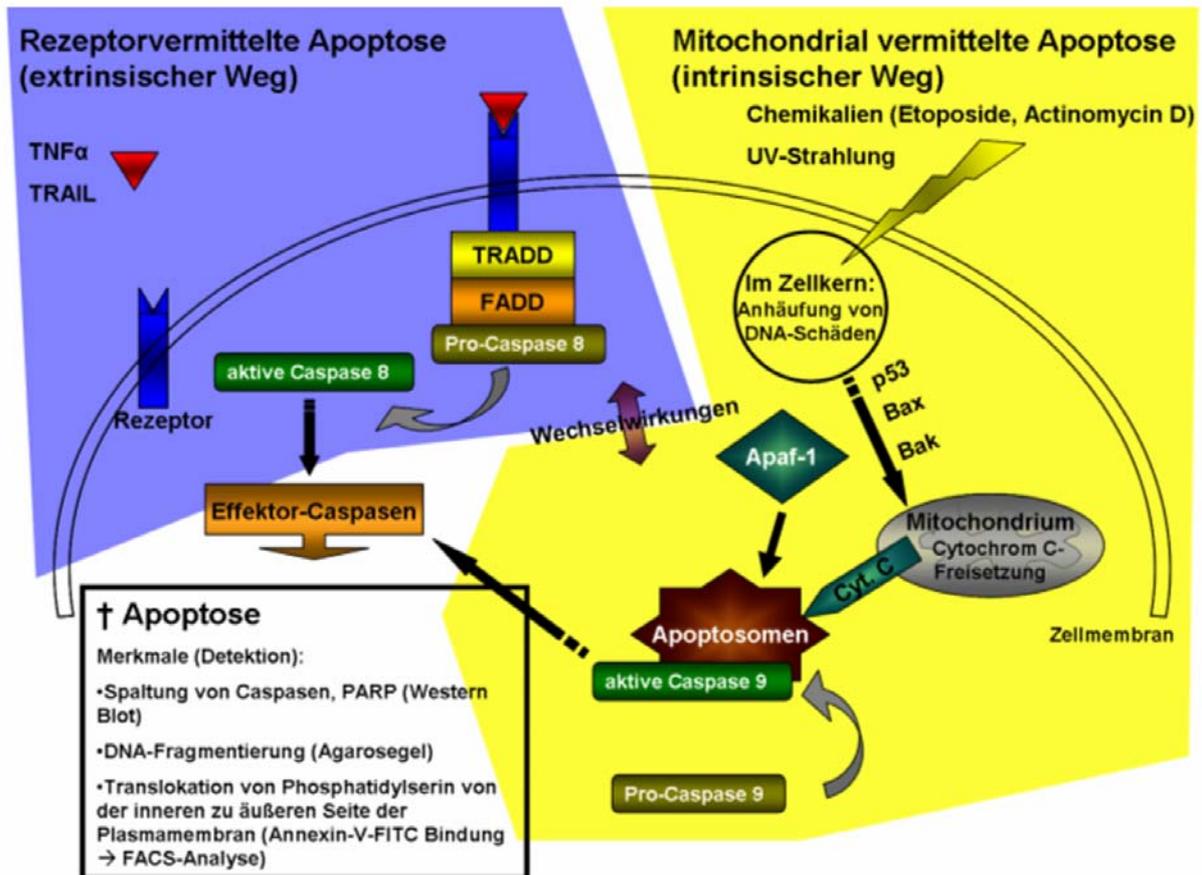


Abbildung 7: Schematische Darstellung der für diese Arbeit wichtigen Ereignisse der rezeptorvermittelten und mitochondrialen Apoptose. (Für Erleuterungen siehe Text 1.3.2 & 1.3.3)

1.3.4 Merkmale der Apoptose

Für die typischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen sind u.a. die Effektor-Caspasen verantwortlich. Zu Beginn der Apoptose ist eine Verringerung des Zellvolumens und der Kontaktverlust zu benachbarten Zellen zu beobachten. Das Chromatin kondensiert und die Zelle fängt an, Membranausstülpungen zu bilden (*membrane blebbing*), die sich schließlich in Form von *apoptotic bodies* von der Zelle abschnüren. Diese membranumhüllten Vesikel werden *in vivo* von phagozytierenden Zellen aufgenommen und eliminiert. Ein frühes Merkmal der Apoptose ist der Verlust der Membranasymmetrie, hierbei ändern sich Ausrichtung und Verteilung von Phosphatidylserin (PS) in der Zellmembran. Normalerweise ist Phosphatidylserin auf der zytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran lokalisiert. In apoptotischen Zellen tritt PS durch Umorientierung vermehrt in die Außenseite der Plasmamembran über (Fadell et al., 1999), was dafür sorgt, dass phagozytierende Zellen die apoptotischen Zellen erkennen und deren Zellreste internalisieren. Dieses Merkmal wird im Falle der Färbung von apoptotischen Zellen mit Annexin-V ausgenutzt. Annexin-V, ein 35kDa großes Protein, bindet spezifisch über Calciumionen an PS. Mittels Fluorophor

Einleitung: Apoptose & Modellsysteme

(FITC)-gekoppeltem Annexin-V können apoptotische Zellen im Durchflusszytometer oder mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Im Zellkern apoptotischer Zellen werden durch die Effektor-Caspasen spezifische Calcium- und Magnesium-abhängige DNasen aktiviert, welche die genomische DNA an den internukleosomalen Verbindungsstellen innerhalb der Chromatinstruktur spalten. Dieses Merkmal kann in Agarosegelen als so genannte DNA-Leiter beobachtet werden. Ein weiteres frühes Merkmal der Apoptose ist die proteolytische Spaltung des Reparaturenzyms PARP durch aktivierte Caspasen. (Soldani et al., 2001) PARP bindet normalerweise spezifisch an DNA-Strangbrüche, wie sie bei beginnender Apoptose durch Nukleasen entstehen, und repariert diese. Die Spaltung von PARP verhindert die DNA-Reparatur und somit den Eintritt in die S-Phase. Diese Spaltung kann mit entsprechenden Antikörpern im Western Blot nachgewiesen werden. Zudem können als weitere Untersuchungsmethoden direkt die Spaltung von Caspasen oder die Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol detektiert werden.

1.4 Modellsysteme

1.4.1 Zellen

Bei der Untersuchung HCV- bzw. NS5A-vermittelter Effekte innerhalb der Zelle spielt die Wahl des Modellsystems eine wichtige Rolle. Das Hepatitis C Virus infiziert im Menschen vor allem Leberzellen (Sansonno et al., 1995a, Sansonno et al., 1995b), wodurch die Leber im Laufe einer chronischen Infektion geschädigt wird. Somit sind für Zellkulturversuche primäre humane Hepatozyten am besten für die Erforschung von HCV geeignet. Es lassen sich auch adulte primäre humane Leberzellen *in vitro* mit HCV infizieren, jedoch sind diese Zellen nur begrenzt verfügbar und nur eine geringe Zeit verwendbar (Fournier et al., 1998). Hinzu kommt die hohe Varianz der Zellen - je nach genetischem Hintergrund, Alter und Lebensumständen der Spenderpersonen. Dieses kann sich auf die Infizierbarkeit der Zellen auswirken (Rumin et al., 1999). Humane immortalisierte Leberzelllinien entstanden aus Leberzelltumoren. Solche etablierten Zelllinien wie huh7 (Nakabayashi et al., 1982) und HepG2 Zellen (Diamond et al., 1980) können die Probleme der Arbeit mit primären Zellen teilweise lösen, haben aber andere Nachteile. Zum einen unterscheiden sich verschiedene Leberzelllinien in ihrem Verhalten gegenüber bestimmten Stimuli und teilweise sogar in ihrer Morphologie (eigene Daten). Dabei ist die Beurteilung, welches Verhalten physiologischer ist, z.T. nicht möglich. Zum anderen lassen sich Zellen von Leberzelllinien oft besonders schlecht transfizieren (eigene Daten), so dass sie für viele Experimente, bei denen eine gute Transfektionseffizienz benötigt wird, ungeeignet sind. Auch sind die Genome dieser Zellen

Einleitung: Modellsysteme

genetisch instabil (Windisch et al., 2005). Ein zusätzliches Problem ist, dass sich bei getrennter Kultivierung unterschiedliche Subklone einer Zelllinie entwickeln können, die nicht mehr vorbehaltlos miteinander vergleichbar sind (Lindenbach et al., 2005, Wakita et al., 2005).

Trotzdem sind im Falle der HCV-Forschung huh7 Zellen eine häufig verwendete Zelllinie, da es mit ihrer Hilfe gelang, das Replicon-Modell für HCV zu etablieren, worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird (vergl. 1.4.2). Andere Zelllinien sind weniger geeignet für das HCV-Repliconmodell (Bartenschlager & Lohmann, 2000). Neben dem Replicon konnte in huh7 Zellen bzw. huh7-Subklonen zudem vor kurzem von drei Arbeitsgruppen ein HCV-Infektionsmodell für die Zellkultur etabliert werden (Lindenbach et al., 2005, Wakita et al., 2005, Zhong et al., 2005). Mit dessen Hilfe kann die HCV Infektion besser erforscht werden, da nun auch frühe Ereignisse der Infektion zugänglich sind, wie beispielsweise das Andocken des Virus an die Zelle und die Virus-Aufnahme. Für solche Fragestellungen stand in der Vergangenheit nur ein auf so genannten Pseudopartikeln basierendes System zur Verfügung (Bartosch et al., 2003). Es stellte sich dabei heraus, dass verschiedene Subklone von huh7 Zellen unterschiedlich permissiv sind, sowohl für das Infektionsmodell, als auch für die HCV-Replikation (Blight et al., 2002, Lindenbach et al., 2005, Wakita et al., 2005). Untersuchungen zu den molekularen Ursachen dieser Beobachtung zeigten, dass im Falle des besonders permissiven Subklons huh7.5 eine Mutation des *rig-I*-Gens verantwortlich ist (Sumpter et al., 2005). Durch die dadurch bedingte Mutation des RIG-I-Protein ist dessen Signalweiterleitung unterbrochen und daher in den betroffenen Zellen ein Teil der Interferonantwort inhibiert. Letztere ist wiederum für die normalerweise schlechte HCV-Replikation nach Transfektion der HCV-RNA in huh7 Zellen verantwortlich (Sumpter et al., 2005).

Die Tatsache, dass sich das Hepatitis C Virus bei einer Infektion in ausdifferenzierten und sich nicht teilenden Hepatozyten vermehrt, huh7 Zellen aber sich teilende und schwach differenzierte Zellen sind, zeigt einen Schwachpunkt dieses Systems auf. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass huh7 Zellen, die nach Behandlung mit DMSO ausdifferenzieren und sich nicht mehr teilen, sehr permissiv für eine HCV-Infektion sind und eine persistierende Infektion ausbilden können (Sainz & Chisari, 2006). Die Schwierigkeiten mit den verschiedenen Zellsystemen machen deutlich, dass bei der Untersuchung von HCV vermittelten Effekten die Wahl des Expressionssystems eine entscheidende Rolle spielt.

Auf Grund der Schwierigkeiten mit Leberzelllinien, wurden bisher viele Versuche zur Untersuchung des Einflusses von NS5A und anderen HCV Proteinen in nicht-Leberzelllinien

Einleitung: Modellsysteme

durchgeführt (siehe: 1.2.2; 1.2.3). Da sich aber die Ausgangszellen, aus denen diese Linien entstanden sind, in vielen Merkmalen von Leberzellen unterscheiden, ist die physiologische Relevanz von Befunden, die in solchen Zelllinien generiert wurden, fraglich.

1.4.2 Das HCV-Replicon-System

Ein Teil der Experimente dieser Arbeit wurde mit Replicon-Zellen durchgeführt. Im Falle des Hepatitis C Virus wurde das Replicon-System 1999 von Lohmann *et al.* etabliert (Lohmann *et al.*, 1999). Dabei handelte es sich ursprünglich um subgenomische RNA-Konstrukte, die die Nicht-Strukturproteine vom NS2- bzw. NS3- bis zum NS5B-Protein codieren, einschließlich des 3' nicht-translatierten Bereiches (NTR) von HCV. Am 5'-Ende enthalten die Konstrukte die HCV-IRES (*internal ribosomal entry site*), die die Expression eines Neomycin-Resistenzgenes reguliert, entweder ab Nukleotid 1-377 oder 1-389. Eine darauf folgende IRES des Enzephalomyocarditis Virus (ECMV) reguliert die Expression der HCV-Gene. Mit Hilfe des Resistenzgenes, dessen Expression über die HCV-IRES an die Replikation der RNA gekoppelt ist, konnten nach Transfektion der RNA in huh7 Zellen Zellklone isoliert werden, die sich replizierende HCV-RNA enthielten. Dabei sind die HCV-Proteine NS3-NS5B ausreichend für eine erfolgreiche Replikation. Eine Übersicht über den experimentellen Ansatz ist in Abbildung 8 wiedergegeben.

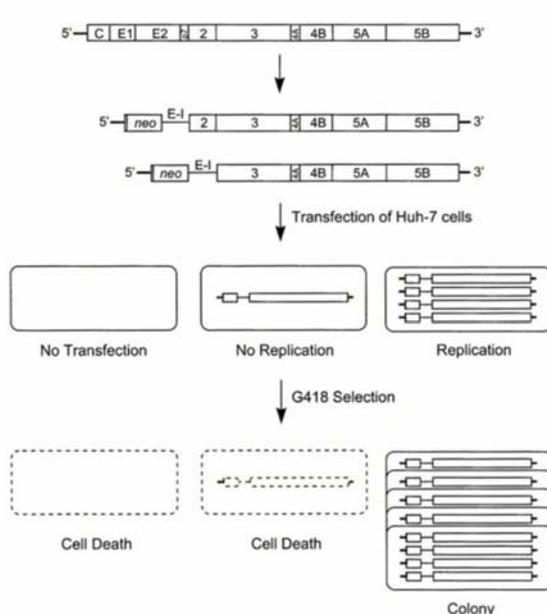


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Replicon-Modells. Nach *in vitro* Transkription werden huh7-Zellen mit Replicon-RNA transfiziert und die Zellen in Gegenwart von G418 kultiviert. Im Falle einer erfolgreichen Transfektion mit anschließender Replikation der RNA können die Zellen in Gegenwart von G418 wachsen. Einzelne resistente Klone wurden anschließend kultiviert. Zellen ohne RNA oder mit ineffizienter Replikation werden durch die Selektionsbedingungen eliminiert (Bartenschlager & Lohmann, 2000).

Bei diesen ersten Arbeiten entstand aus einem Klon die Replicon-Zelllinie huh9-13, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand (Lohmann *et al.*, 1999). Die Zelllinie wurde eingehend charakterisiert und die Expression der codierten Proteine und die effiziente Replikation nachgewiesen (Pietschmann *et al.*, 2001). Die zweite Zelllinie, die in dieser Arbeit benutzt

Einleitung: Modellsysteme

wurde, war die huh ET Linie (bzw. Zellklon huh9B). Das dabei verwendete Replicon enthält zusätzlich vor dem Resistenzgen ein Gen für das Reporterenzym Luciferase und ein darauf folgendes Ubiquitinierungssignal. Mit der Hilfe der Luciferase, deren Expression ebenfalls an die RNA-Replikation gekoppelt ist, kann man letztere leicht und sensitiv quantifizieren (Frese et al., 2003). Die Abbildung 9 verdeutlicht den Aufbau der beiden verwendeten Replicon-Zelllinien.

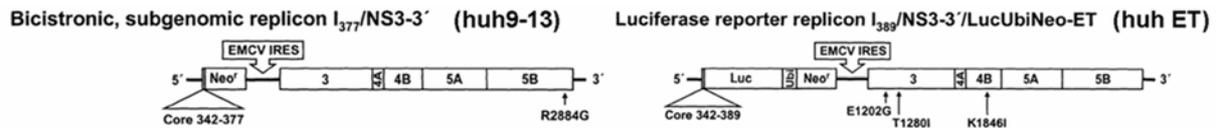


Abbildung 9: Replicon-Konstrukte der Zelllinien huh9-13 und huh ET. huh9-13 Zellen (bizistronisches Replicon): HCV-IRES 1-377, EMCV-IRES, Nicht-Strukturproteine NS3-NS5B, zellkulturadaptive Mutation im NS5B-Protein (R2884G). huh ET Zellen (bizistronisches Replicon): HCV-IRES 1-389, Luciferase-Gen, Ubiquitinierungssignal, EMCV-IRES, Nicht-Strukturproteine NS3-NS5B, Zellkulturadaptive Mutation im NS3- (E1202G; T1280I) und NS4B-Protein (K1846I) (Aminosäure- und Nukleotid-Angaben bezogen auf ein komplettes HCV-Genom [EMBL Datenbank-Nummer: AJ238799]; Abbildung verändert nach: (Frese et al., 2003)).

Wie in Abbildung 9 zu erkennen, unterscheiden sich die beiden verwendeten Replicon-Konstrukte zusätzlich in vier verschiedenen Mutationen, den so genannten zellkulturadaptiven Mutationen. Dies sind im Vergleich zur Ausgangssequenz Con1 (Genotyp 1b) definiert auftretende Mutationen, die bei der Etablierung der stabilen Replicon-Zelllinien entstehen und die effiziente Replikation der RNA in den Zellen ermöglichen (Krieger et al., 2001, Lohmann et al., 2001). Diese Mutationen betreffen zum Teil auch das NS5A-Protein, wobei sie sich auch auf dessen Phosphorylierung auswirken können. Dabei wurde die Tendenz beobachtet, dass Mutationen, die die Replikation begünstigen, die Hyperphosphorylierung von NS5A vermindern, so dass man einen negativen Einfluss von hyperphosphoryliertem NS5A auf die HCV-Replikation annimmt (Appel et al., 2005). Jedoch verhindern Mutationen, die in Zellkulturen eine effiziente Replikation erlauben, teilweise eine produktive Replikation im Schimpansen (Bukh et al., 2002), was die physiologische Relevanz dieser Mutationen fraglich macht.

Später wurden auch Replicon-Systeme mit dem gesamten HCV-Genom des Genotyps 1b etabliert, diese führten aber nicht zur Bildung infektiöser Partikel (Pietschmann et al., 2002). Auch andere HCV Genotypen wurden im Replicon-Modell untersucht (Blight et al., 2003). Dabei gelang es schließlich, Replicon-Konstrukte des Genotyps 2a herzustellen, die infektiöse Partikel in der Zellkultur produzierten (Lindenbach et al., 2005, Wakita et al., 2005, Zhong et al., 2005). Mit Hilfe dieser neuen Infektionsmodelle für HCV können nun Fragestellungen untersucht werden, die zuvor schwer zugänglich waren, wie z.B. das Einschleusen des Virus

Einleitung: Modellsysteme

in die Zelle, das Endpacken des Virus, die frühen Mechanismen der Etablierung der Infektion und die Virusbildung.

1.4.3 Das transgene Mausmodell für HCV

Zur Erforschung der HCV Infektion im Tiermodell steht derzeit nur der Schimpanse zur Verfügung. Erste Infektions-Experimente wurden bereits durchgeführt, noch bevor HCV als infektiöses Agens bekannt war (Alter et al., 1978). Da die meisten Versuche aus ethischen und finanziellen Gründen nicht in diesem Modell durchgeführt werden können, wurde in der HCV-Forschung, wie auch in anderen Forschungsbereichen, auf das transgene Mausmodell zurückgegriffen. Transgene Mäuse sind etablierte Modelle unter anderem für die Untersuchung der Eigenschaft viraler Proteine, als Tumorpromotor zu wirken (Chisari et al., 1989, Hildt et al., 2002, Koike, 2002). Dieses ist im Falle der Hepatitis C Infektion von besonders großem Interesse, da im Falle einer HCV Infektion die Faktoren, die für die Lebertumor-entstehung verantwortlich sind, noch nicht bekannt sind.

Im Zuge verschiedener Untersuchungen wurden Modelle etabliert, in denen die Mäuse entweder für eines oder mehrere Proteine des Hepatitis C Virus transgen waren. So wurden auch mehrere transgene Mausmodelle für das komplette HCV-Genom beschrieben. Diese zeigten in einem experimentellen Ansatz in der Leber nur Steatose-Bildung (Blindenbacher et al., 2003). Bei der Verwendung eines anderen Mausmodells konnte zudem auch ein gesteigertes Leberkrebs-Vorkommen festgestellt werden, obwohl in diesen Mäusen keine Immunantwort bezüglich des Transgens zu beobachten war und es somit zu keinen Entzündungsreaktionen, ausgelöst durch das Immunsystem, kam (Lerat et al., 2002). In beiden Fällen ist aber eine Inhibition der Viruseliminierung zu beobachten; im Falle einer Infektion der Mäuse entweder mit LCMV oder einem replikationsdefizienten adenoviralen Vektor (Blindenbacher et al., 2003, Disson et al., 2004). Dies könnte auf eine Inhibition Fas-induzierter Apoptose in der Leber zurückzuführen sein, wie es für ein Mausmodell beschrieben ist, bei dem das Core, E1-, E2- und NS2-Protein exprimiert wird (Machida et al., 2001). Neben diesem Modell existiert zudem ein Modell für das Core-Protein zusammen mit E1 und E2 (Honda et al., 1999) und eines mit dem Core-Protein nur in Kombination mit dem E2-Protein (Pasquinelli et al., 1997). Zudem gibt es verstärkte Forschungen zu Mäusen, die allein transgen für das Core-Protein sind. Auch hierbei gibt es widersprüchliche Beobachtungen, wonach das Core-Protein für die Bildung von Steatose bis hin zur HCC-Entstehung verantwortlich sein soll (Moriya et al., 1998), bzw. nur nach zusätzlicher Leberschädigung in der Lage ist, die Tumorgenese in Lebern transgener Mäuse zu beschleunigen (Kato et al., 2003). Auch die Expression des Core-Proteins in T-Lymphozyten

Einleitung: Modellsysteme

fürte zur Ausbildung von Steatosen und einer HCC-Bildung in der Leber (Soguero et al., 2002). Die Expression des NS3-Proteins in Kombination mit dem NS4A-Protein in einer transgenen Maus führt zwar nicht zur Leberschädigung, jedoch wiesen diese transgenen Tiere eine erhöhte Resistenz gegenüber TNF α -induzierter Leberschädigung auf, nicht aber gegenüber Fas-induzierter (Frelin et al., 2006). Ein ähnlicher Befund wurde im Zusammenhang mit einer NS5A-transgenen Maus gemacht, die *per se* keine Leberpathologien aufwies (Majumder et al., 2002, Majumder et al., 2003). Im Falle dieses Mausmodells wurde der Genotyp 1a verwendet, im Falle des - in dieser Arbeit vorgestellten transgenen Mausmodells für NS5A der Genotyp 1b. Letzterer ist gerade im Falle der Replicon-Systeme der zumeist verwendete Genotyp. Zudem gibt es Berichte, wonach der Genotyp 1b am häufigsten mit der Entstehung von HCV-assoziiertem Leberkrebs einhergeht (Hatzakis et al., 1996, Zein et al., 1996). Weiterhin ist beschrieben, dass NS5A dieses Genotyps mit der Interferonantwort interferiert (Pascu et al., 2004, Tan & Katze, 2001). Bei transgenen Mausmodellen zu NS5A muss berücksichtigt werden, dass das NS5A-Protein nur in Anwesenheit von mindestens NS4A in beiden möglichen Formen vorkommt, nämlich der basal- und der hyperphosphorylierten Form. Somit ist möglicherweise das Vorhandensein der basal-phosphorylierten Form alleine nicht ausreichend, um das ganze Potential von NS5A bezüglich Leberpathologien und anderen Effekten während einer HCV-Infektion in einem Mausmodell widerzuspiegeln.

Ein anderer Ansatz zur Erforschung von HCV mit Hilfe von Mäusen ist die Transplantation von humanen Hepatozyten in immundefiziente Mäuse, so genannte SCID-Mäuse. Es konnte gezeigt werden, dass Hepatitis C Viren verschiedener Genotypen in der Lage waren, in den humanen Leberzellen dieser Tiere zu replizieren (Mercer et al., 2001). Jedoch ist ein solches System stark limitiert, da zum einen die humane Leber je nach Spender unterschiedliche Eigenschaften haben kann und zum anderen mit dem fehlenden Immunsystem ein zentraler Bestandteil der Virus/Wirt-Interaktion fehlt, der mit großer Wahrscheinlichkeit gerade im Falle einer HCV-Infektion für die entstehenden Leberpathologien verantwortlich ist.