

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von HCV-Nicht-Strukturproteinen auf die rezeptor-vermittelte Apoptose

Für das HCV Nicht-Strukturprotein NS5A sind verschiedene Wege der Einflussnahme auf apoptotische Prozesse/Vorgänge beschrieben. Vor allem konnte ein inhibitorischer Einfluss auf TNF α und somit die rezeptorvermittelte Apoptose beobachtet werden (Ghosh et al., 2000a, Miyasaka et al., 2003). Aber auch für andere HCV-Nicht-Strukturproteine sind Effekte auf verschiedene Apoptosemechanismen beschrieben, die zum Teil gegensätzliche Auswirkungen haben. Da jedoch bei dem Großteil dieser Untersuchungen die entsprechenden HCV Proteine allein exprimiert wurden, sollte der Einfluss der Nicht-Strukturproteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A, und NS5B auf die rezeptorvermittelte Apoptose im Kontext einer gemeinsamen Expression untersucht werden. Dies gewährleistet eine gegenseitige Beeinflussung der Proteine, wie sie auch in der infizierten Zelle stattfindet. Zu diesem Zwecke wurden zwei verschiedene subgenomische Replicon-Zelllinien verwendet.

Die verwendeten Replicon-Zellen enthalten sich autonom replizierende, subgenomische HCV-RNA, die neben einem Resistenzgen für Neomycin (G418), auch für die HCV-Proteine NS3, NS4A, NS4B, NS4A und NS5B codiert. Die untersuchten Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET basieren auf der humanen Hepatom-Zelllinie huh7 (Frese et al., 2003, Lohmann et al., 1999). Daher müssten mögliche Effekte des HCV-Replicons ein abweichendes Verhalten der Replicon-Zellen im Vergleich zu den huh7 Zellen nach sich ziehen. Die Unterschiede zwischen den beiden Replicon-Konstrukten zum Zeitpunkt der Generierung der Zelllinien huh9-13 und huh ET sind in Abbildung 9 im Abschnitt 1.4.2 wiedergegeben. Die huh ET Zellen enthalten in ihrem Replicon zusätzlich ein Luciferase-Gen (Frese et al., 2003) mit dessen Hilfe die Replikation der HCV-RNA direkt quantifiziert werden kann (Krieger et al., 2001).

4.1.1 Detektion und Induktion von TNF α -vermittelter Apoptose

Im Rahmen von Vorarbeiten wurden die Bedingungen zur Induktion von TNF α -vermittelter Apoptose in huh7, huh9-13 und huh ET Zellen etabliert. Basierend auf diesen Arbeiten wurde für die Induktion von Apoptose in allen drei Zelllinien im Folgenden eine Kombination von TNF α (1000 U/ml) und Cycloheximid (CHx, 10 μ g/ml), eine Substanz, die die Translation blockiert, verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen für zwölf Stunden mit den Substanzen inkubiert. Für die Induktion TNF α -vermittelter Apoptose wurde sowohl die Verwendung einer zusätzlichen Substanz im Falle von huh7 Zellen (Ghosh et al., 2000a,

Ergebnisse: HCV & Apoptose

Miyasaka et al., 2003), als auch bereits die Kombination mit CHx beschrieben (Pober, 1998, Reding & Ennis, 1964, Woods & Chapes, 1993).

Die Induktion TNF α -vermittelter Apoptose in huh7, huh9-13 und huh ET Zellen (Abb. 10.A, B) und der Effekt von CHx ist in Abbildung 10 wiedergegeben. Dabei wurden für die Detektion der Apoptose Western Blot-Analysen auf PARP-Spaltung (Abb. 10.C) und Analysen von Annexin-V-FITC gefärbten Zellen im Durchflusszytometer (Abb. 10.A) durchgeführt. Letztere wurden anschließend graphisch ausgewertet (Abb. 10.B).

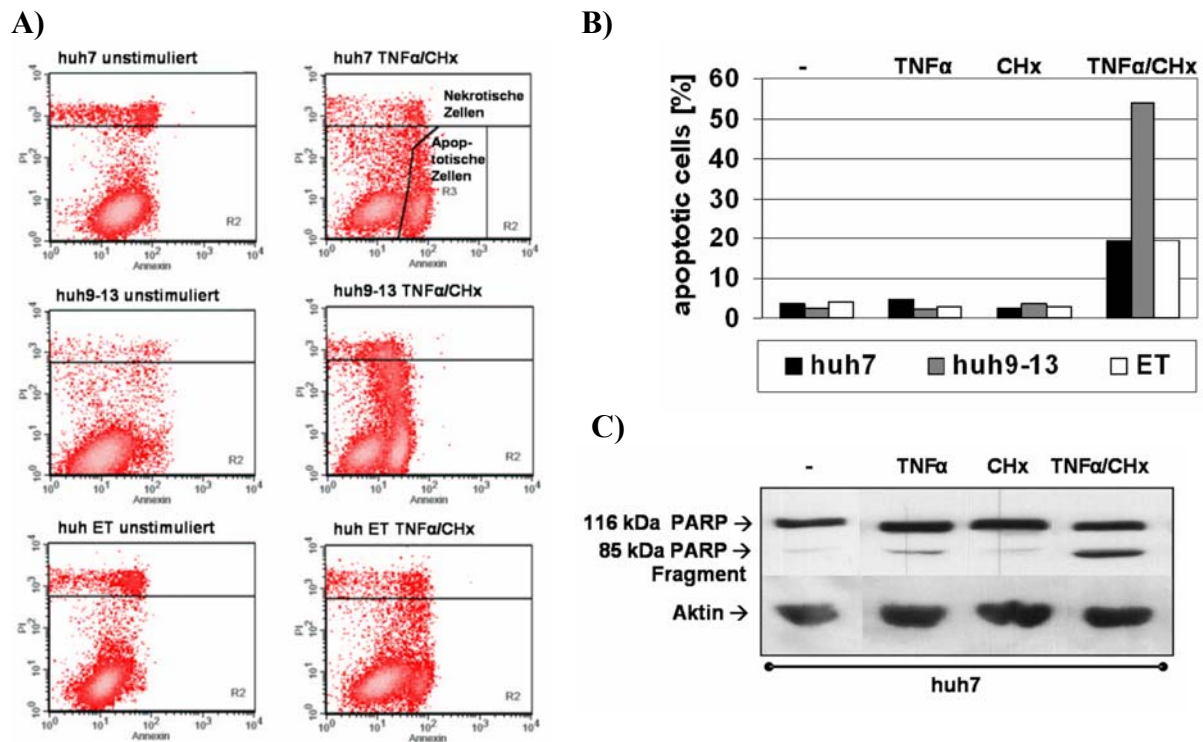


Abbildung 10: Induktion von TNF α -vermittelter Apoptose in huh7, huh9-13 und huh ET Zellen. Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET und die Kontrollzelllinie huh7 wurden wie angegeben mit TNF α und CHx für 12 h inkubiert. (A, B) Nach der Stimulation wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FITC- und Propidium-Iodid-Färbung (PI) im Durchflusszytometer analysiert. (A) Beispielmessung von huh7, huh9-13 und huh ET Zellen. (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen in den Ansätzen von huh7, huh9-13 und huh ET Zellen. (C) Western Blot zur Detektion der PARP-Spaltung in huh7-Zellen. Als Ladekontrolle wurde der Blot anschließend mit einem Aktin-spezifischen Antikörper behandelt.

Wie in Abbildung 10.A zu erkennen ist, können apoptotische Zellen nach Stimulation mit TNF α und CHx mit Annexin-V-FITC markiert und im Durchflusszytometer detektiert werden. Eine bezogen auf die Annexin-V-FITC Fluoreszenz (x-Achse) zu erhöhter Intensität (nach rechts) verschobene Population spiegelt die apoptotischen Zellen wieder. Die Gegenfärbung mit Propidium-Iodid (PI) wurde verwendet, um Zellen mit brüchiger Zellmembran zu detektieren. Dies trifft vor allem auf nekrotische, aber auch für spät

Ergebnisse: HCV & Apoptose

apoptotische Zellen zu. Diese PI-positiven Zellen sind auf der y-Achse nach oben verschoben. Um ausschließlich apoptotische Zellen zu quantifizieren, wurden, basierend auf diesem Färbeverfahren, nur die Annexin-V-FITC-positiven und PI-negativen Zellen berücksichtigt, also nur Zellen, die in der Abbildung 10.A in dem Bereich „apoptotische Zellen“ liegen.

Bei der Quantifizierung der apoptotischen Zellen des in Abbildung 10.B gezeigten Experimentes war nur dann ein signifikanter Anstieg an apoptotischen Zellen erkennbar, wenn TNF α in Kombination mit CHx verwendet worden war (huh7: ca. 20%, huh9-13: ca. 53%, huh ET: ca. 20% apoptotische Zellen). Der Einsatz von TNF α oder CHx allein erbrachte keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (alle ca. 2-5% apoptotische Zellen). Diese Tatsache wurde durch den Western Blot (Abb. 10.C) auf PARP-Spaltung im Falle der huh7 Zellen bestätigt. Nur dann ist eine deutlich verstärkte Bande für gespaltenes PARP (p85) zu erkennen, wenn die Proben mit TNF α und CHx gleichzeitig behandelt wurden. Eine geringe Bande für das Spaltprodukt tritt in allen Proben auf.

4.1.2 Unterschiedliches Verhalten von Replicon-Zellen hinsichtlich rezeptorvermittelter Apoptose

Wie in Abbildung 9.B zu erkennen, reagierten die huh 9-13 Zellen in dem gezeigten Experiment wesentlich sensitiver auf die Apoptoseinduktion als die huh7 bzw. die huh ET Zellen. Um diesen Befund zu verifizieren, wurden mehrere Experimente durchgeführt, bei denen die drei Zelllinien jeweils mit TNF α und CHx stimuliert und die Anzahl an apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FITC Färbung im Durchflusszytometer bestimmt wurde. Die Daten von drei unabhängigen Experimenten wurden statistisch ausgewertet (Abb. 11.A). Da die absolute Anzahl an apoptotischen Zellen von Versuch zu Versuch z.T. erheblichen Schwankungen ausgesetzt war, wurden, wenn nicht anders angegeben, die relative Anzahl apoptotischer Zellen nach Stimulation angegeben (Berechnung siehe: Material und Methode 4.2.5). Zudem wurden Zelllysate der verschiedenen Zelllinien mittels Western Blot auf PARP-Spaltung hin untersucht (Abb. 11.B).

Ergebnisse: HCV & Apoptose

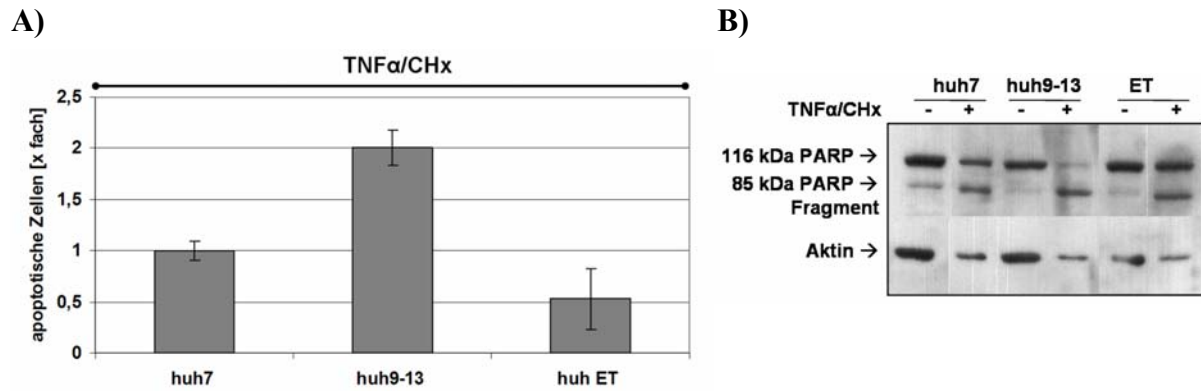


Abbildung 11: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen bezüglich TNF α -vermittelter Apoptose. Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET und die Kontrollzelllinie huh7 wurden wie angegeben mit TNF α und CHx für 12 h inkubiert. (A) Nach der Stimulation wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FITC- und Propidium-Iodid-Färbung (PI) im Durchflusszytometer analysiert. Auswertung dreier unabhängiger Experimente. Angegeben ist die relative Anzahl apoptotischer Zellen. (B) Western Blot zur Detektion der PARP-Spaltung in huh7, huh9-13 und huh ET-Zellysaten. Als Ladekontrolle wurde der Blot anschließend mit einem Aktin-spezifischen Antikörper behandelt.

Wie in Abbildung 11.A deutlich zu erkennen ist, reagierten die huh9-13 Zellen gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose ca. 2fach sensitiver als die huh7 Zellen und ca. 4fach so sensitiv wie die huh ET Zellen. Die huh ET Zellen reagierten halb so sensitiv wie die huh7 Zellen auf TNF α /CHx. Dieser Befund wurde auch durch den PARP-spezifischen Western Blot untermauert (Abb. 11.B). Hierbei ist zwar für alle drei Zelllinien eine deutliche Zunahme der PARP-Spaltbande in den stimulierten Proben im Vergleich zu den unstimulierten Proben erkennbar. Betrachtet man jedoch das Verhältnis der Bande für ungespaltenes Protein zu der Bande für gespaltenes, so lässt sich erkennen, dass der Abbau dieses Markerproteins für Apoptose im Falle der huh9-13 Zellen stärker fortgeschritten war als in den huh7 bzw. huh ET Zellen. Auch der Unterschied in der Sensitivität zwischen huh7 und huh ET lässt sich anhand des Western Blots nachvollziehen. Im Falle der huh ET Zellen ist noch mehr ungespaltenes PARP erkennbar als in den huh7 Zellen, obwohl die Aktin-Ladekontrolle sogar etwas weniger Gesamtproteingehalt anzeigt.

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Unterschied der verschiedenen Zelllinien nur im Zusammenhang mit TNF α -vermittelter Apoptose zu beobachten ist oder ob allgemein die rezeptorvermittelte Apoptose betroffen ist, wurde im folgenden an Stelle von TNF α TRAIL verwendet. TRAIL löst Apoptose über einen, dem TNF α -Signalweg sehr ähnlichen, rezeptorvermittelten Mechanismus aus. Auch im Falle von TRAIL wurde die Notwendigkeit der Kostimulation mit CHx unter Verwendung von huh7-Zellen im Western Blot-Experiment getestet (Abb. 12.A). Zur Untersuchung der einzelnen Zelllinien huh7, huh9-13 und huh ET

Ergebnisse: HCV & Apoptose

bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber TRAIL wurden die Zellen mit den Substanzen für zwölf Stunden inkubiert und der Anteil an apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. Drei unabhängige Experimente wurden statistisch ausgewertet und der Anteil an apoptotischen Zellen graphisch wiedergegeben (Abb. 12.B).

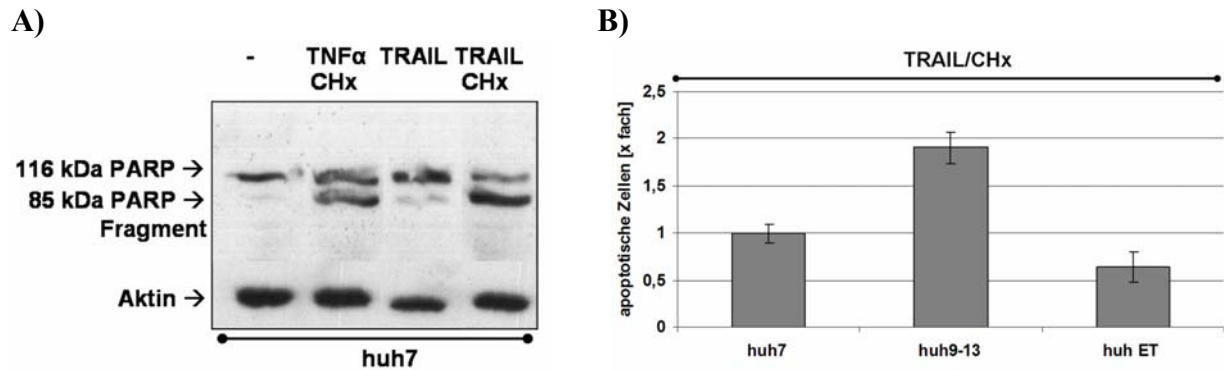


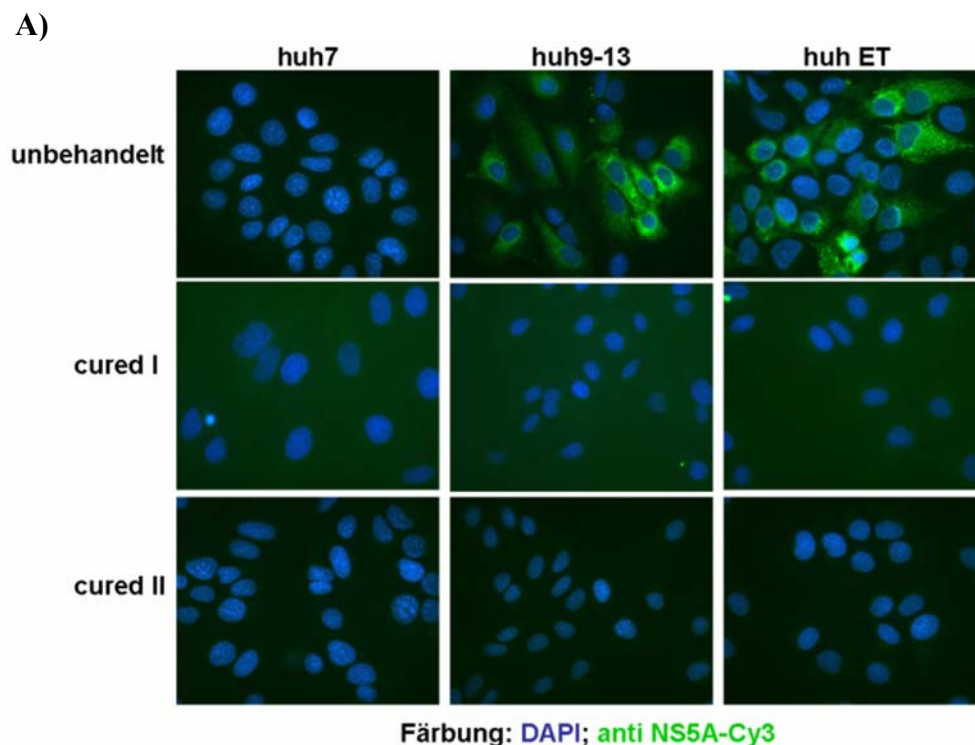
Abbildung 12: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen bezüglich TRAIL-vermittelter Apoptose. Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET und die Kontrollzelllinie huh7 wurden wie angegeben mit TRAIL und CHx für 12 h inkubiert. (A) Western Blot zur Detektion der PARP-Spaltung in huh7-Zellen. Als Ladekontrolle wurde der Blot anschließend mit einem Aktin-spezifischen Antikörper behandelt. (B) Nach der Stimulation wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FITC- und Propidium-Iodid- Färbung (PI) im Durchflusszytometer analysiert. Auswertung dreier unabhängiger Experimente. Angegeben ist die relative Anzahl apoptotischer Zellen.

In Abbildung 12.A ist zu erkennen, dass auch TRAIL nur in Kombination mit CHx Apoptose in huh7 Zellen auslöste, verdeutlicht durch das Auftreten der PARP-Spaltbande bei 86 kDa. Die Substanz allein verursachte keine signifikante Steigerung der PARP-Spaltung. Dieses Ergebnis konnte durch Annexin-V-FITC-Färbungen auch für die anderen Zelllinien bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Quantifizierung der apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie im Falle von TRAIL/CHx-stimulierten huh7, huh9-13 und huh ET Zellen (Abb. 12.B) ergab einen deutlichen Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen. Die huh9-13 Zellen zeigten erneut die größte Sensitivität (ca. 2fach gesteigert gegenüber huh7) gefolgt von den huh7 und den huh ET Zellen mit einem ca. 0,6fachen Anteil an apoptotischen Zellen verglichen mit huh7 Zellen. Somit waren im Falle der TRAIL-vermittelten Apoptose in etwa die gleichen Sensitivitäten zu beobachten wie im Falle der TNF α -vermittelten Apoptose. Die huh9-13 Zellen waren stark sensitiviert und die huh ET Zellen desensitiviert im Vergleich zu huh7 Zellen. Die Sensitivität aller Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose war wesentlich höher als im Falle der TNF α -induzierten Apoptose.

Ergebnisse: HCV & Apoptose

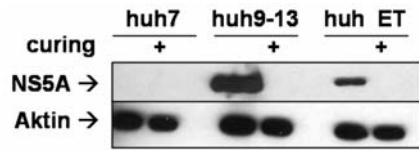
4.1.3 Entfernung der HCV-Replicon-RNA aus den Replicon-Zellen mit Hilfe von IFN α

Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Sensitivitäten der Replicon-Zellen gegenüber TNF α - und TRAIL-vermittelter Apoptose auf ihr Replicon zurückzuführen sind oder ob Unterschiede im Zellhintergrund dafür verantwortlich sind, wurde die HCV-RNA aus den Zellen entfernt, die Replicon-Zellen sozusagen von ihrem Replicon „kuriert“. Dazu wurden huh9-13, huh ET und huh7 Zellen mit IFN α behandelt und der Selektionsdruck mit G418 aufgehoben. Die Behandlung der huh7 Zellen als Kontrolle sollte mögliche Effekte durch die Interferongabe aufdecken. Nach einer Erholungsphase wurden die kurierten Zellen für die entsprechenden Experimente verwendet. Das Kurieren wurde insgesamt zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die daraus hervorgegangenen Zelllinien wurden für das erste Kurieren (*curing*) als huh7 cured I, huh9-13 cured I, huh ET cured I bezeichnet und für das zweite Kurieren als huh7 cured II, huh9-13 cured II und huh ET cured II bezeichnet. Der Erfolg des Kurierens wurde anhand von Immunfluoreszenz- (Abb. 13.A) und Western Blot- (Abb. 13.B) Experimenten untersucht, bei denen die Anwesenheit des HCV Proteins NS5A erfasst wurde. Zudem wurde im Falle der huh ET Zellen die HCV-Replikation mit Hilfe eines Luciferase-Reportergenassays quantifiziert, sowohl in Lysaten von unkurierten als auch von kurierten huh ET Zellen (Abb. 13.C).



Ergebnisse: HCV & Apoptose

B)



C)

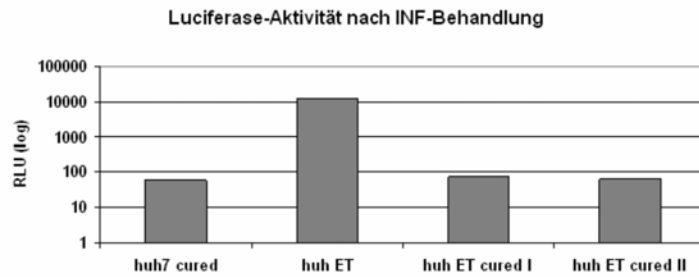


Abbildung 13: Eliminierung des HCV-Replicons aus huh9-13 und huh ET Zellen mittels Interferon α .

Huh9-13, huh ET und als Kontrolle

huh7 Zellen wurden für 11 Tage mit IFN α inkubiert. (A) Immunfluoreszenz auf NS5A in Zellen ohne *curing* bzw. nach zwei unabhängigen *curing*-Experimenten (cured I, cured II; 1. AK: anti-NS5A, 2. AK: 488 gekoppelt; grün; DAPI-Färbung: blau). (B) Western Blot auf NS5A von Proteinlysaten kurierter (cured I) und unkurierter Zellen. Als Kontrolle wurde ein Aktin-spezifischer Antikörper verwendet. (C) Luciferase-Assay mittels Proteinlysaten von huh7 (Negativkontrolle), huh ET, huh ET cured I und huh ET cured II Zellen (RLU: relative Licht Einheiten, logarithmische Auftragung).

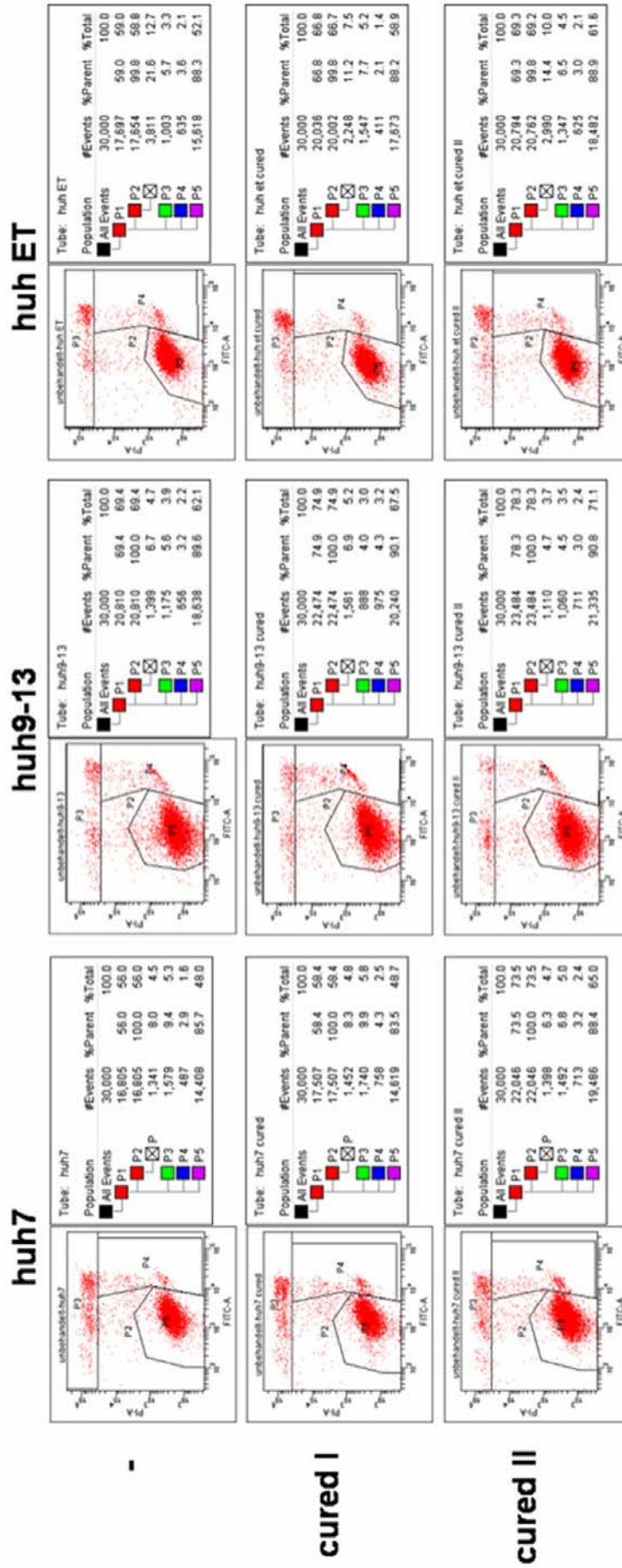
Wie in Abbildung 13 zu erkennen, konnte nach beiden Behandlungen der Replicon Zellen mit IFN α , sowohl mittels Immunfluoreszenz (Abb. 13.A) als auch mittels Western Blot (Abb. 13.B), kein NS5A mehr nachgewiesen werden. In den huh7 Zellen konnte wie zu erwarten sowohl vor als auch nach dem Kurieren kein NS5A detektiert werden. Im Falle der huh ET Zellen wurde im Luciferase-Reporterassay zudem nach den beiden *curing* Vorgängen keine gesteigerte Luciferaseaktivität mehr festgestellt (Abb. 13.C). Dabei zeigten die huh ET Zellen mit Replicon eine deutliche Luciferaseaktivität von ca. $1,2 \times 10^4$ RLU im Gegensatz zur Hintergrundaktivität von ca. 6×10^1 RLU (huh7). Bei einer fortlaufenden Kultivierung der kurieren Zellen konnte zudem keine erneute NS5A-Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.4 Einfluss des huh9-13-Replicons auf rezeptorvermittelte Apoptose

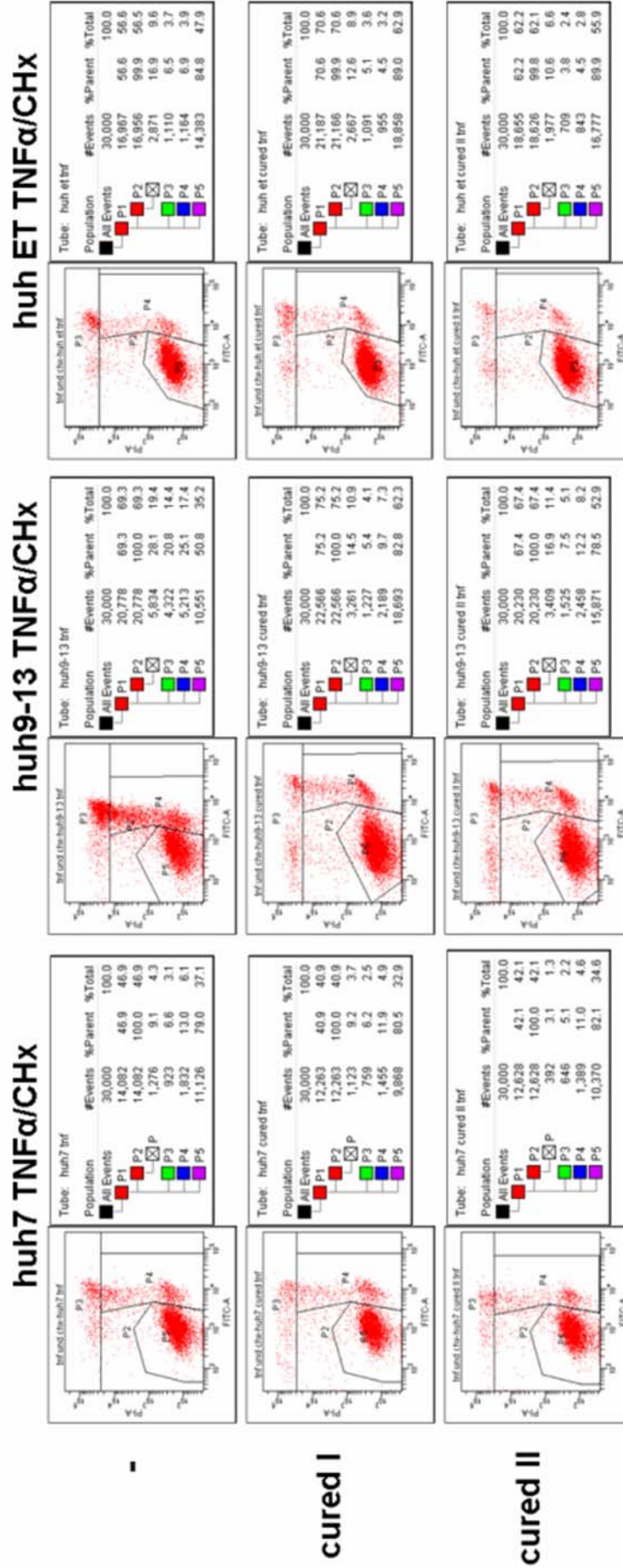
Um zu untersuchen, ob mit der Entfernung des Replicons auch die erhöhte Sensitivität der huh9-13 Zellen gegenüber TNF α - und TRAIL-abhängiger Apoptose reduziert wurde, wurden huh7, huh9-13, huh ET und die entsprechenden kurieren Zellen wie in den vorangegangenen Experimenten zunächst mit TNF α /CHx behandelt. Im Falle dieser Experimente wurden die Zellen für acht Stunden mit den Substanzen behandelt. Die Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte nach Annexin-V-FITC Färbung im Durchflusszytometer. Eine repräsentative Messung für alle Zelllinien nach TNF α /CHx Stimulation (Abb.:14.B) und die statistische Auswertung dreier unabhängiger Experimente (Abb.: 14.C) sind in Abbildung 14 wiedergegeben. Zudem sind in Abbildung 14.A beispielhaft Messungen unstimulierter Zellen gezeigt, die für die statistische Auswertung von Interesse waren. Diese wurden bei jedem Versuch mit gemessen, die resultierenden Werte waren jedoch stets vergleichbar.

Ergebnisse: HCV & Apoptose

A)



B)



Ergebnisse: HCV & Apoptose

C)

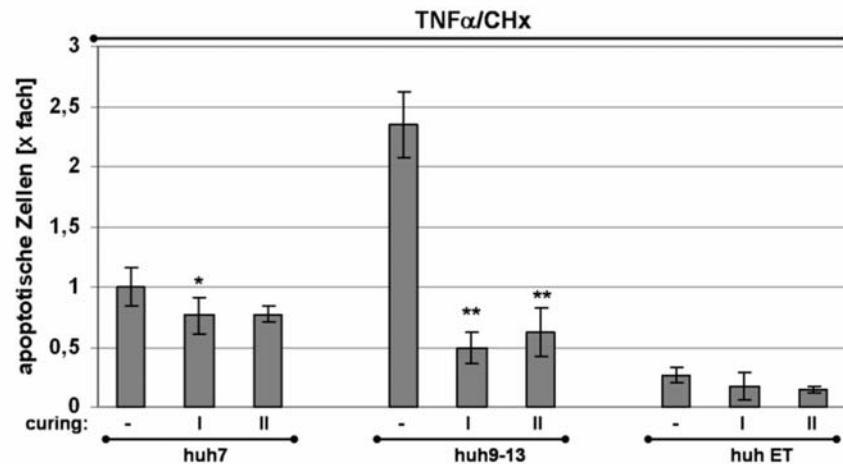


Abbildung 14: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen mit und ohne Replicon bezüglich TNF α -vermittelter Apoptose. Replicon-Zelllinien huh9-13, huh ET, Kontrollzelllinie huh7 und die kurierten Varianten ohne Replicon wurden wie angegeben mit TNF α und CHx für 8 h inkubiert. (A,B) Beispielerperimente: Nach 8 h Inkubation ohne (A) bzw. mit (B) TNF α /CHx wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FITC- und Propidium-Iodid-Färbung (PI) im Durchflusszytometer analysiert. (P3: PI-positive (nekrotische) Zellen; P4: Annexin-V-FITC-positive (apoptotische) Zellen; P5: PI- und Annexin-V-FITC-negative (vitale) Zellen) (C) Auswertung dreier unabhängiger Experimente. Angegeben ist die relative Anzahl apoptotischer Zellen.

Wie in dem Beispielerperiment in Abbildung 14.A zu erkennen ist, war die Anzahl an apoptotischen Zellen sowohl in den Ausgangszelllinien als auch in den kurierten Zelllinien ohne Apoptosestimulus gering und in etwa vergleichbar (2% - 4,5%). Nach Induktion von Apoptose mittels TNF α /CHx konnte wie erwartet ein deutlicher Anstieg an apoptotischen Zellen detektiert werden (Abb.: 14.B). Dabei zeigten die huh9-13 Zellen wieder den größten Anteil apoptotischer Zellen auf, dieser war jedoch im Falle der kurierten huh9-13 Zellen ohne Replicon drastisch reduziert. Dieses gilt für beide *curing*-Experimente (cured I, cured II). Im Falle der huh7 und huh ET Zellen lässt sich auf den ersten Blick keine Veränderung durch die IFN α -Behandlung erkennen. Die statistische Auswertung dreier Experimente, dargestellt in Abbildung 14.C zeigt jedoch einen geringen antiapoptotischen Effekt der IFN α -Behandlung im Falle der huh7 (Reduktion von 1 auf 0,8fache relative Sensitivität) und huh ET Zellen (Reduktion von ca. 0,3 auf 0,2fache relative Sensitivität), der im Falle der huh7 cured I Zellen statistisch signifikant ist ($p = 0,049$). Die Reduktion der apoptotischen Zellen fiel dagegen bei huh9-13 Zellen sehr viel stärker aus (von 2,5 auf ca. 0,5 fache relative Sensitivität) und ist für beide *curing*-Experimente hoch signifikant ($p_{\text{cured I}} = 0,002$; $p_{\text{cured II}} = 0,001$). Die Sensitivität der kurierten huh9-13 Zellen war sogar in beiden Fällen etwas geringer als die der entsprechenden huh7 Zellen. Die huh ET Zellen wiesen wie in den vorangegangenen Experimenten die geringste Sensitivität gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose auf, auch nach der IFN α -Behandlung. Dies zeigt, dass im Falle der huh ET Zellen die verminderte Sensitivität gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose im Vergleich zu der Ausgangszelllinie

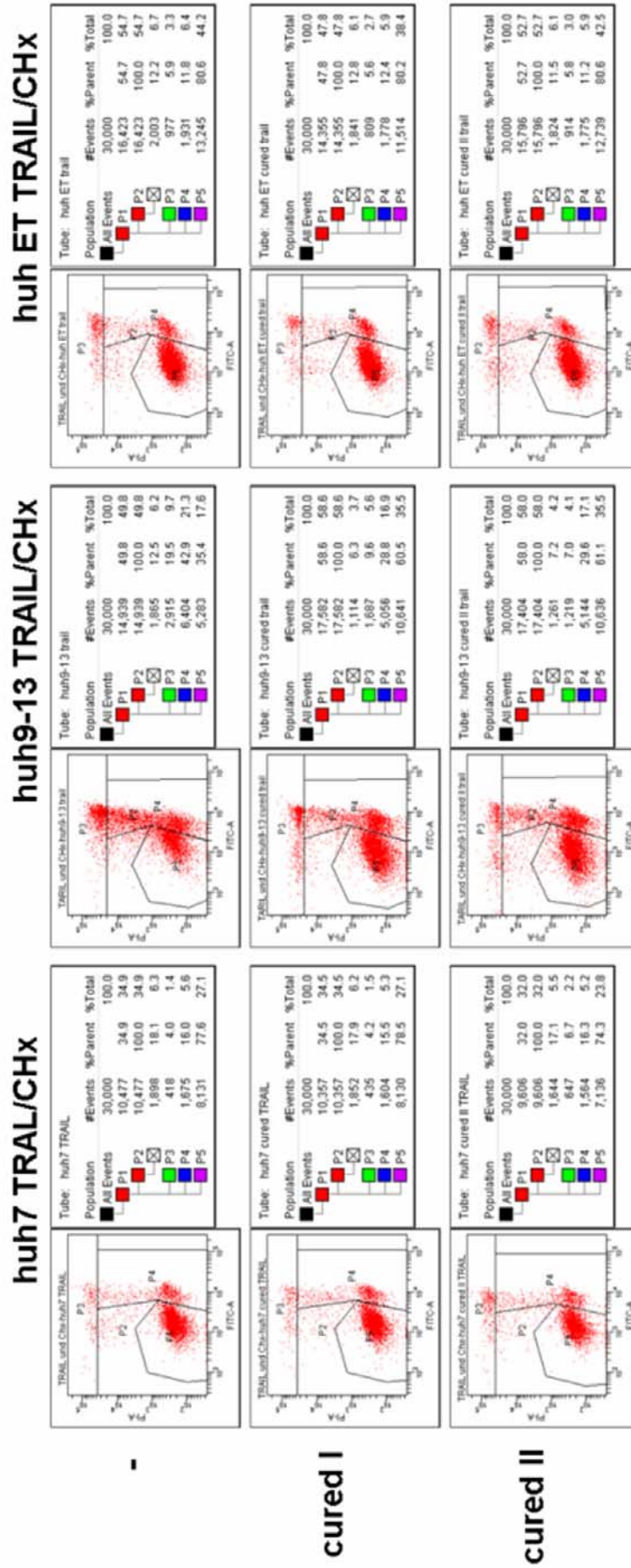
Ergebnisse: HCV & Apoptose

huh7 nicht in der Anwesenheit des HCV-Replicon begründet liegt. Die gesteigerte Sensitivität der huh9-13 Zellen scheint jedoch durch die Eliminierung des HCV-Replicon verloren gegangen zu sein. Somit ist ein proapoptotischer Effekt der HCV-Proteine bzw. des Replicons im Falle der huh9-13 Zellen zu beobachten

Um diesen Befund auch für TRAIL-vermittelte Apoptose zu überprüfen, wurden wie im vorangegangenen Experiment huh7, huh9-13, huh ET und die aus der IFN α -Behandlung hervorgegangenen Zellen cured I und cured II für fünf Stunden mit TRAIL und CHx behandelt. Um die Anzahl an apoptotischen Zellen zu quantifizieren, wurden die Zellen mit Annexin-V-FITC gefärbt und im Durchflusszytometer quantifiziert. Eine repräsentative Messung und die statistische Auswertung dreier unabhängiger Experimente sind in Abbildung 15 wiedergegeben.

Ergebnisse: HCV & Apoptose

A)



Ergebnisse: HCV & Apoptose

B)

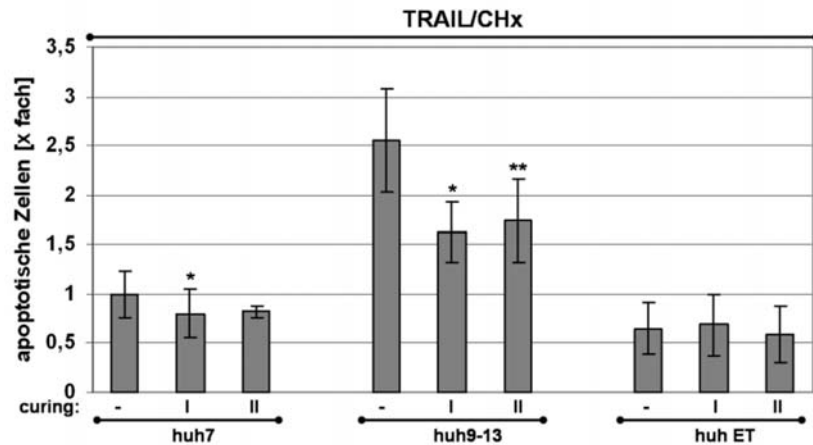


Abbildung 15: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen mit und ohne Replicon bezüglich TRAIL-vermittelter Apoptose. Replicon-Zelllinien huh9-13, huh ET, Kontrollzelllinie huh7 und die kurierten Varianten ohne Replicon wurden wie angegeben mit TRAIL und CHx für 5 h inkubiert. (A) Beispielerperiment: Nach der Stimulation wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FITC- und Propidium-Iodid-Färbung (PI) im Durchflusszytometer analysiert. (P3: PI positive (nekrotische) Zellen; P4: Annexin-V-FITC-positive (apoptotische) Zellen; P5: PI- und Annexin-V-FITC-negative (vitale) Zellen) (B) Auswertung dreier unabhängiger Experimente. Angegeben ist die relative Anzahl apoptotischer Zellen.

Wie auch im Falle von $\text{TNF}\alpha$ -induzierter Apoptose kann man bei der Verwendung von TRAIL/CHx anhand des Beispielerperimentes in Abbildung 15.A eine deutliche Abnahme an apoptotischen Zellen in den Proben der kurierten huh9-13 Zellen im Vergleich zu den unkurierten huh9-13 Zellen erkennen. Die $\text{IFN}\alpha$ -Behandlung scheint jedoch keinen großen Einfluss auf huh7 und huh ET Zellen gehabt zu haben. Dieser Eindruck wird durch die statistische Auswertung dreier Experimente bestätigt (Abb. 15.B). Wieder erkennt man jedoch eine leichte antiapoptotische Wirkung der $\text{IFN}\alpha$ -Behandlung bei huh7 Zellen (Reduktion von ca. 1 auf 0,8fache relative Sensitivität), die im Falle der huh7 cured I Zellen auch wieder statistisch signifikant ($p = 0,03$), und z.T. auch bei huh ET Zellen. Eine wesentlich stärkere Reduktion der Sensitivität gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose von ca. 2,6 auf ca. 1,7fach ist bei den huh9-13 Zellen nach der $\text{IFN}\alpha$ Behandlung zu erkennen. Diese ist signifikant ($p_{\text{cured I}} = 0,02$) bzw. hoch signifikant ($p_{\text{cured II}} = 0,006$) ist.

Festzuhalten bleibt, dass huh9-13 Zellen nach dem Verlust des HCV-Replicons eine wesentlich reduzierte Sensitivität gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose aufwiesen. Im Gegensatz dazu hatte das Entfernen des HCV-Replicon aus den huh ET Zellen keinen großen Einfluss auf deren Sensitivität gegenüber der TRAIL/CHx-Behandlung.

4.1.5 HCV-Replicon-Konstrukte haben keinen Einfluss auf mitochondrial-vermittelte Apoptose

In den bisherigen Experimenten wurden mit TNF α und TRAIL nur Substanzen verwendet, die den extrinsischen Apoptoseweg über Todesrezeptoren auslösen. Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob huh9-13 auch stärker gegenüber dem intrinsischen Apoptoseweg unter Einbeziehung der Mitochondrien sensibilisiert sind. Dazu wurde Etoposide verwendet, ein Inhibitor der DNA Topoisomerase II. Zunächst wurden die Bedingungen getestet, unter denen Etoposide in huh7 und den Replicon-Zelllinien Apoptose induziert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Vorexperimente wurden im Folgenden huh7 Zellen für zwölf Stunden mit 80 μ g/ml Etoposide in Kombination mit 10 μ g/ml CHx inkubiert. Der Erfolg dieser Kombination ist mit Hilfe eines Western Blots auf PARP-Spaltung in Abbildung 16 wiedergegeben.

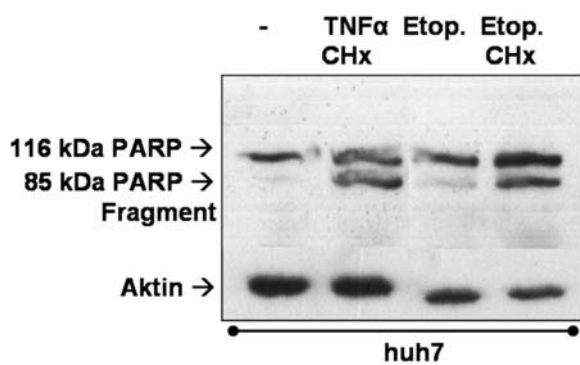
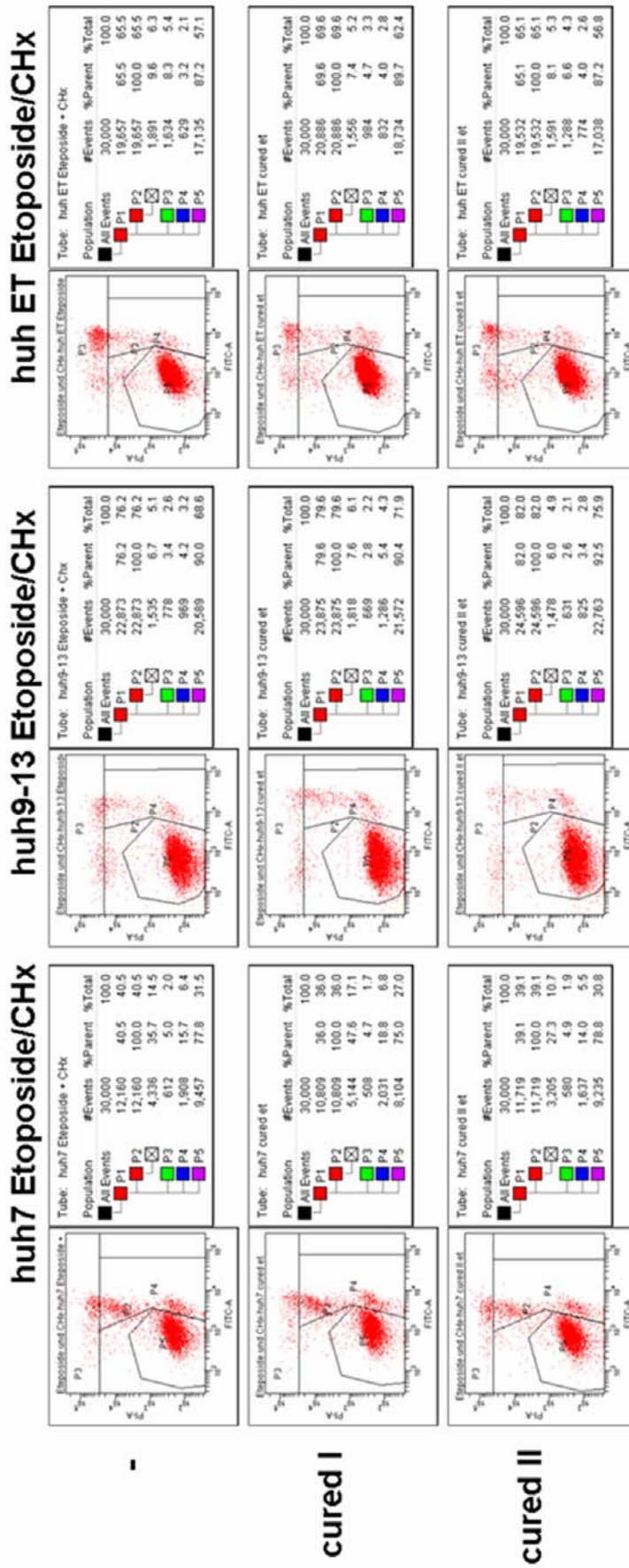


Abbildung 16: Induktion mitochondrialer Apoptose in huh7 Zellen durch Etoposide und CHx. Western Blot zur Detektion der PARP-Spaltung in huh7-Zellen nach Inkubation mit Etoposide oder mit Etoposide und CHx. Als Positivkontrolle dienten TNF α /CHx-behandelte, als Negativkontrolle unbehandelte Zellen. Als Ladekontrolle wurde der Blot anschließend mit einem Aktin-spezifischen Antikörper behandelt.

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass auch Etoposide nur in Kombination mit CHx Apoptose in huh7 Zellen auslöste, verdeutlicht durch das Auftreten der PARP-Spaltbande bei 86 kDa. Die Substanz allein verursachte so gut wie keine gesteigerte PARP-Spaltung. Dieses Ergebnis konnte zudem durch Annexin-V-FITC-Färbungen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Festlegung der Rahmenbedingungen wurden wie in den vorangegangenen Experimenten huh7, huh9-13, huh ET Zellen und die entsprechenden kurierten Varianten cured I und cured II mit Etoposide und CHx behandelt und die Anzahl apoptotischer Zellen mit Hilfe einer Annexin-V-FITC-Färbung im Durchflusszytometer quantifiziert. Eine repräsentative Messung und die statistische Auswertung dreier unabhängiger Experimente sind in Abbildung 17 wiedergegeben.

A)



Ergebnisse: HCV & Apoptose

B)

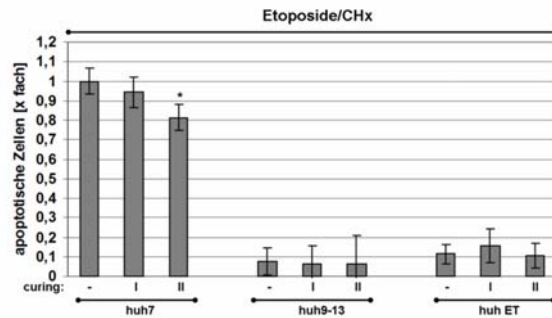
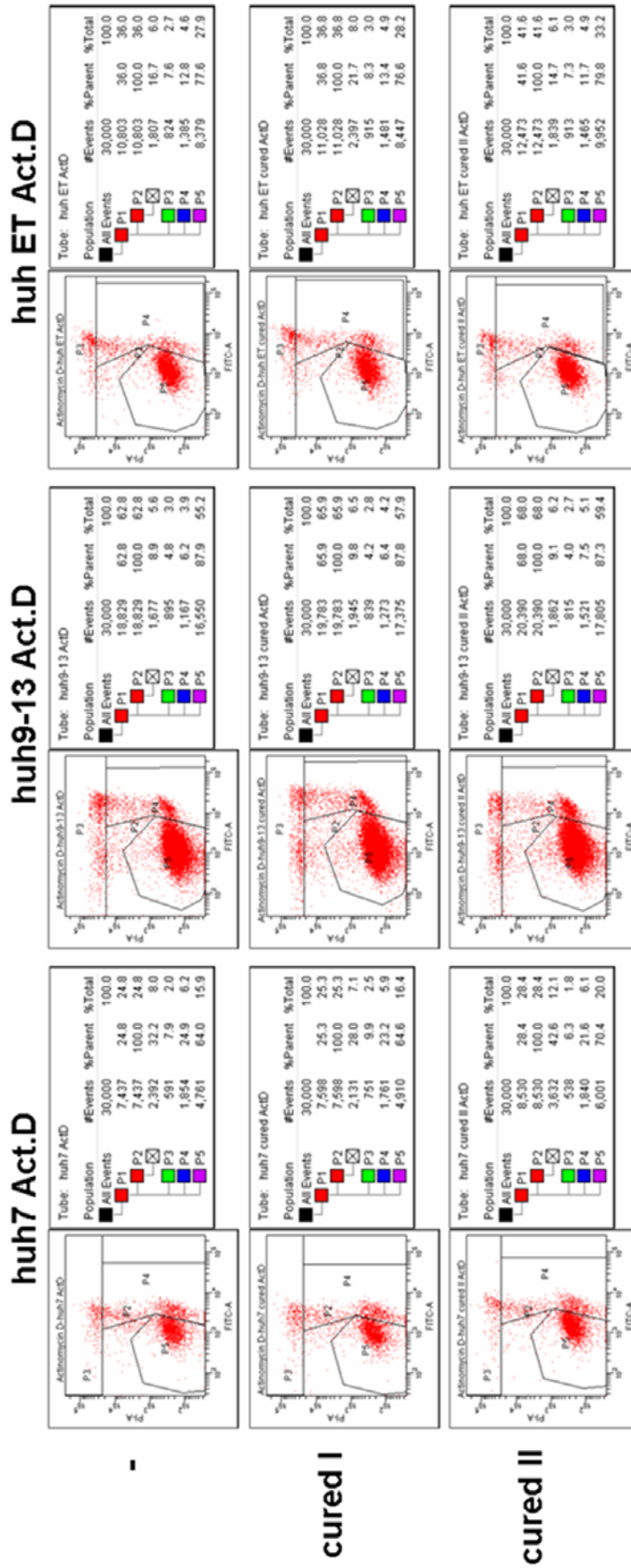


Abbildung 17: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen mit und ohne Replicon bezüglich Etoposide-vermittelter Apoptose. Replicon-Zelllinien huh9-13, huh ET, Kontrollzelllinie huh7 und die kurierten Varianten ohne Replicon wurden wie angegeben mit Etoposide und CHx für 12 h inkubiert. (A) Beispielexperiment: Nach der Stimulation wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FITC- und Propidium-Iodid- Färbung (PI) im Durchflusszytometer analysiert. (P3: PI-positive (nekrotische) Zellen; P4: Annexin-V-FITC-positive (apoptotische) Zellen; P5: PI- und Annexin-V-FITC-negative (vitale) Zellen) (B) Auswertung dreier unabhängiger Experimente. Angegeben ist die relative Anzahl apoptotischer Zellen.

Das in Abbildung 17.A gezeigte Beispielexperiment weist eine deutliche Induktion von Etoposide-vermittelter Apoptose nur im Falle von huh7 Zellen sowohl vor als auch nach $\text{INF}\alpha$ -Behandlung auf. So gut wie keine apoptotischen Zellen wurden im Falle der huh9-13 und huh ET sowohl ohne als auch nach $\text{INF}\alpha$ -Behandlung detektiert. Die Beobachtung wird auch durch die statistische Auswertung dreier Experimente bestätigt (Abb. 17.B). Die huh7 Zellen reagierten ca. 13fach sensitiver als die huh9-13 Zellen und ca. 12fach sensitiver als die huh ET Zellen. Diese Sensitivität war im Falle der kurierten huh7 Zellen nur geringfügig abgeschwächt, wobei der Effekt zumindest für die huh7 cured II Zellen statistisch signifikant war ($p = 0,03$). Eine deutliche Veränderung der Werte für huh9-13 und huh ET Zellen war nach der $\text{INF}\alpha$ -Behandlung im Falle von Etoposide-vermittelter Apoptose nicht zu erkennen. Die Tatsache, dass so gut wie keine Apoptose in den huh9-13 und huh ET Zellen unter den verwendeten Bedingungen ausgelöst wurde, konnte durch eine Verlängerung der Inkubationszeit überwunden werden (Daten nicht gezeigt).

Um diese Ergebnisse mit einer weiteren Substanz zu überprüfen, wurden die Zellen wie angegeben mit Actinomycin D (Act.D) behandelt. Act.D inhibiert die Transkription in den betroffenen Zellen und führt somit auch zur Induktion mitochondrialer Apoptose (Goldstein et al., 2000). Wie aus Vorexperimenten bekannt, führen 200 ng/ml Act.D auch ohne zusätzliches Stimulans innerhalb von zwölf Stunden zu einer deutlichen Induktion von Apoptose in huh7 Zellen (Daten nicht gezeigt). Es wurden huh7, huh9-13, huh ET Zellen und die entsprechenden kurierten Varianten cured I und cured II mit Act.D behandelt und die Anzahl apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer quantifiziert (Abb.: 18.A). Abbildung 18.B zeigt die graphische Auswertung eines Experiments.

A)



Ergebnisse: HCV & Apoptose

B)

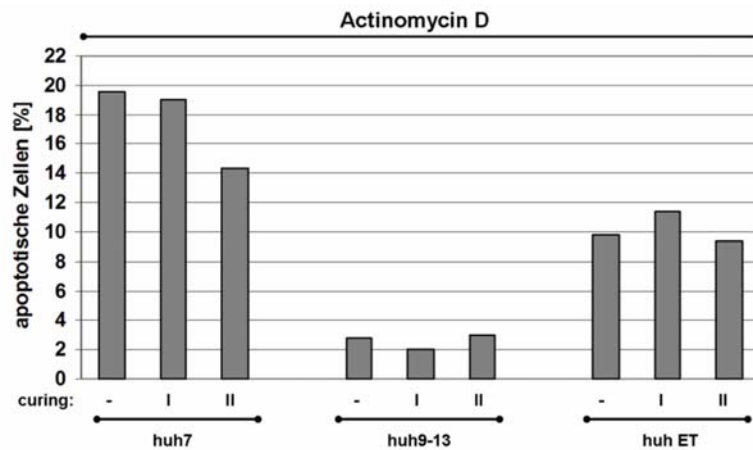


Abbildung 18: Unterschiede zwischen huh7, huh9-13 und huh ET Zellen mit und ohne Replicon bezüglich Actinomycin D-vermittelter Apoptose. Replicon-Zelllinien huh9-13, huh ET, Kontrollzelllinie huh7 und die kurierten Varianten ohne Replicon wurden wie angegeben mit Actinomycin D für 12 h inkubiert. (A) Nach der Stimulation wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FITC- und Propidium-Iodid-Färbung (PI) im Durchflusszytometer analysiert. (P3: PI-positive (nekrotische) Zellen; P4: Annexin-V-FITC-positive (apoptotische) Zellen; P5: PI- und Annexin-V-FITC-negative (vitale) Zellen). (B) Auswertung des Experiments. Angegeben ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mit Act.D-Behandlung nach Abzug der apoptotischen Zellen ohne Stimulans.

Auch die Verwendung von Act.D führt wie bei Etoposid/CHx zu einem deutlich erhöhten Anstieg an apoptotischen Zellen (Abb. 18.A) im Falle der huh7 Proben im Vergleich zu huh9-13 (ca. 10fach) und huh ET Proben (ca. 2fach) (Abb. 18.B). Im Falle der Replicon-Zelllinien lässt sich zudem kein deutlicher und einheitlicher Einfluss der IFN α -Behandlung erkennen. Wie schon bei der Verwendung von Etoposid/CHx, konnte bei den kurierten huh7 Zellen eine leichte Reduktion der Sensitivität gegenüber mitochondrialer Apoptose beobachtet werden. Diese Sensitivität scheint aber mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur IFN α -Behandlung abzunehmen (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung von Act.D verursachte unter den gewählten Bedingungen in den Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET eine gesteigerte Anzahl an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Verwendung von Etoposid und CHx. Dadurch müssten sich eventuelle Einflüsse der enthaltenen HCV Replicon-Konstrukte besser auflösen lassen. Jedoch blieb, wie erwähnt, die Entfernung der HCV Replicon-RNA aus den Zellen mittels IFN α ohne deutlichen Einfluss auf die Act.D-vermittelte Apoptose. Diese Experimente wurden mit ähnlichem Ergebnis wiederholt, jedoch schwankten die Werte aufgrund der massiven Apoptoseinduktion im Falle der huh7 Zellen so stark, dass eine Vereinheitlichung der Werte für eine gemeinsame Darstellung nicht sinnvoll erschien.

Die Experimente zeigen deutlich, dass bei der mitochondrial-vermittelten Apoptose, das Entfernen des HCV-Replicons aus den huh9-13 und huh ET ohne deutlichen Effekt blieb, ganz im Gegensatz zur rezeptorvermittelten Apoptose im Falle der huh9-13 Zellen.

Ergebnisse: HCV & Apoptose

4.1.6 Unterschiedliche Genexpression in huh9-13 und huh ET Zellen nach TNF α -Behandlung

Um mögliche Gründe, die für die dramatischen Unterschiede zwischen den Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET hinsichtlich der Sensitivität gegenüber der rezeptorvermittelten Apoptose zu detektieren, wurde die Genexpression dieser Zellen untersucht. Dazu wurden Membran-Arrays durchgeführt. Diese geben auf mRNA-Ebene einen Überblick über den Expressionsstatus verschiedener, für die Apoptose wichtiger Gene. Um die Induktion von TNF α -vermittelter Apoptose zu simulieren, wurden die Zellen vor der RNA-Präparation mehrere Stunden mit TNF α behandelt. Die radiographische Entwicklung der beiden Membranen ist in Abbildung 19 gezeigt.

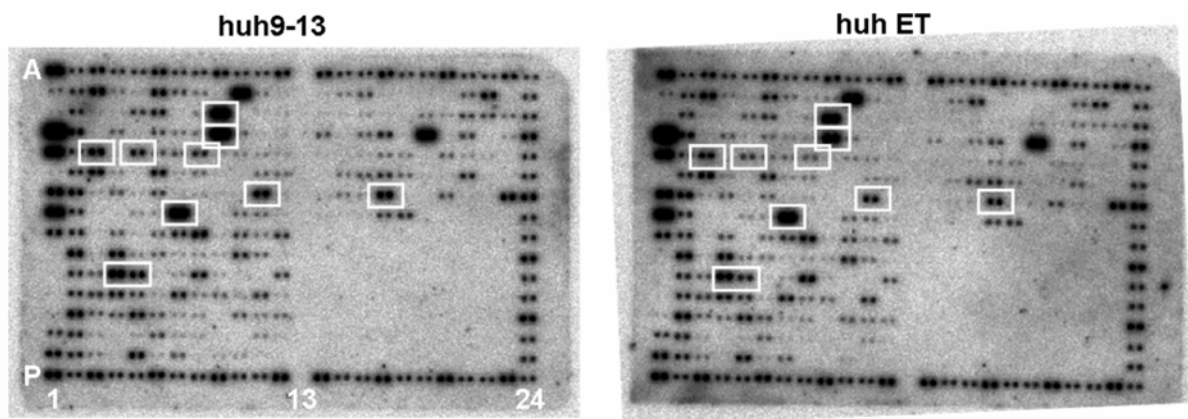


Abbildung 19: Unterschiede in der Genexpression von für die Apoptose relevanter Gene in huh9-13 und huh ET Zellen nach TNF α -Stimulation. Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET wurden mit TNF α für ca. 12 h inkubiert. Anschließend wurde Gesamt-RNA gewonnen und daraus radioaktiv markierte cDNA hergestellt. Die Membranen wurden mit der cDNA inkubiert und nach mehreren Waschschritten mit Hilfe eines *phospho-imagers* ausgewertet. Eingerahmt sind Gene, die unterschiedlich exprimiert wurden (A-P: Reihen, 1-24: Spalten).

Wie in der Abbildung 19 zu erkennen, konnten zahlreiche Gene vor relativ homogenem Hintergrund detektiert werden. Das gewährleistet, dass die Signale nicht erheblich verfälscht werden. Mit Hilfe der Kalibrierungssignale auf Position M1, N1, O1 und P1, wurde zunächst eine für die Membran spezifischer Abgleichfaktor ermittelt (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe dieses Faktors konnte man die Membranen untereinander vergleichen, ohne dass systematische Fehler eine Rolle spielten. Die Güte der Faktoren und die Homogenität der Hybridisierung der Membranen konnte mit Hilfe der Kontrollproben in den Reihen A und P und in den Spalten 2 und 24 ermittelt werden. Gleichet man diese Punkte auf die Faktoren ab und betrachtet das Verhältnis dieser nun relativen Kontrollen zwischen zwei Membranen, sollte immer der Wert eins herauskommen. Abweichungen davon spiegeln den Fehler der Membranen wider, hervorgerufen durch ungleichmäßige Hybridisierung und ungleichen

Ergebnisse: HCV & Apoptose

Hintergrund. Somit kann man eine Fehlerabschätzung vornehmen, die bei der Beurteilung, ob ein Gen unterschiedlich reguliert ist, berücksichtigt werden muss. Im Falle der vorliegenden Membranen wurde ein maximaler Fehler von +/- 0,2 festgestellt, das heißt, dass das Verhältnis der Kontrollproben der Membran der huh9-13 Zellen zu denen der Membran der huh ET Zellen im Bereich von 0,8 bis 1,2 variierte (Daten nicht gezeigt). Die häufigste Fehler lag jedoch bei +/- 0,1. Da diese Methode der Fehlerabschätzung relativ ungenau ist, wurde als Grenze ein Fehler von +/- 0,3 festgelegt. Demnach ist ein Gen als unterschiedlich reguliert anzusehen, dessen Verhältnis der relativen Intensitäten auf den Membranen größer als 1,3 ist. Zudem wurden nur Gene betrachtet, für die auf beiden Membranen ein Signal vorhanden war und nicht nur auf einer Membran ein Signal detektiert werden konnte. In solchen Fällen können nämlich schwache Signale an der Nachweisgrenze große Unterschiede „vortäuschen“. Eine Liste der Gene, die auf Grund dieser Kriterien in huh9-13 und huh ET Zellen als unterschiedlich reguliert angesehen wurden, ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: Nach TNF α -Behandlung unterschiedlich regulierte Gene in huh 9-13 und huh ET Zellen unter Verwendung eines Membranen-Arrays.

Koordinaten		relatives Signal		Signalverhältn.	betroffenes Gen	
Reihe	Spalte	huh9-13	huh ET	huh9-13/huh ET	Genbank-Nr.	Gen-Name
E	3	3,10308427	2,3660483	1,31150504	M14505	cyclin-dependent kinase 4
K	4	4,59194716	3,3283841	1,37963259	M25753	cyclin B1
E	5	2,11862277	1,5873134	1,33472241	U11791	cyclin H
K	5	2,58565374	1,91834285	1,34785799	X92669	menage a trois 1 (CAK assembly factor)
H	7	11,2865849	7,85422925	1,43700732	M15796	proliferating cell nuclear antigen
E	8	1,89860486	1,4440598	1,31476886	U15642	E2F transcription factor 5, p130-binding
C	9	12,8204458	5,8320395	2,19827828	D89667	prefoldin 5
D	9	16,4676049	6,6870746	2,46260224	L16785	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in
G	11	3,24377576	2,0342138	1,59460906	U28014	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease
G	17	3,32951781	2,10219275	1,58383089	S78085	programmed cell death 2

Wie in Tabelle 7 aufgeführt, sind insgesamt zehn Gene in huh9-13 im Vergleich zu huh ET Zellen verstärkt transkribiert worden. Die Unterschiede waren jedoch z.T. recht schwach, die maximale Steigerung der Expression betrug im Falle des *non-metastatic cells 2* Proteins nur 2,46fach. Mit PCNA, *menage a trois 1*, dem E2F Transkriptionsfaktor 5, den Zyklinen B1, H und der Zyklin-abhängigen Kinase 4 waren Proteine für DNA-Replikation, -Reparatur und

Ergebnisse: HCV & Apoptose

Zellzyklus betroffen (Andersen et al., 1997, Freeman et al., 1991, Serrano et al., 1993, Tassan et al., 1995). Bei der Steigerung von *prefoldin 5*, *Caspase 4*, *programmed cell death 2* und wiederum *non-metastatic cells 2* war die Genexpression pro-apoptotischer Gene betroffen (Kamada et al., 1997, Kawakami et al., 1995).

4.2 Beeinflussung des MAP-Kinasesignalweges durch NS5A auf der Ebene von Raf-1

Bei der Transformation einer gesunden Zelle zu einer Krebszelle ist die Fehlregulation von Signalkaskaden für das Zellwachstum eine häufig beobachtete Erscheinung (Littlewood & Evan, 1990, Sporn & Roberts, 1986). Im Falle des Raf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinasesignalweges ist eine Beeinflussung durch das NS5A-Protein des Hepatitis C Virus gezeigt worden. Dabei wurde ein inhibierender Einfluss auf der Ebene von ERK1/2 und MEK1/2 beschrieben (Georgopoulou et al., 2003, Macdonald et al., 2003, Tan et al., 1999). Effekte auf die zentrale Kinase Raf-1 wurden jedoch nicht untersucht oder beobachtet. Da aus eigenen Arbeiten aber bekannt ist, dass die Hemmung von Raf-1, aber nicht die von MEK1/2, sich negativ auf die HCV-Replikation auswirkt, wurde im Folgenden auch der umgekehrte Einfluss von NS5A auf Raf-1 untersucht. Dies ist notwendig, da eine Beeinflussung von einzelnen Komponenten des MAP-Kinasesignalweges durch virale Proteine sich nicht zwangsläufig auf den gesamten Signalweg auswirken muss, sondern einzelne Komponenten auch unterschiedlich davon betroffen sein können.

4.2.1 Expression von NS5A steigert die Phosphorylierung von Raf-1 an Serin 338

Um den Einfluss von NS5A auf die Raf-1 Phosphorylierung zu untersuchen, wurden zunächst huh7 Zellen mit dem NS5A-Expressionsvektor pcDNA-NS5A transfiziert. Mittels Western Blot-Analyse der entsprechenden Zelllysate wurde das Verhältnis von am Serinrest 338 phosphoryliertem (p-Raf-1) zu dem Gesamt-Raf-1 Gehalt bestimmt. Die Phosphorylierung von Serin 338 des Raf-1-Proteins korreliert mit seiner Aktivierung durch Ras und mit der anschließenden Aktivität gegenüber des Raf-1/ERK-abhängigen Kinasesweges (Chong et al., 2001, Mason et al., 1999). Als Kontrollen wurden Zellen entweder nur mit dem Leervektor (Negativkontrolle) transfiziert oder zusätzlich mit PMA (Phorbol-myristyl-acetat) stimuliert (Positivkontrolle). PMA ist ein strukturelles Analogon zu Diacylglycerol, das direkt die Proteinkinase C aktiviert, die ihrerseits Raf-1 phosphoryliert und somit den MAP-Kinasesweg anschaltet (Kolch et al., 1993). In Abbildung 20.A ist ein Beispiellexperiment gezeigt, in 20.B die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse: NS5A & Raf-1

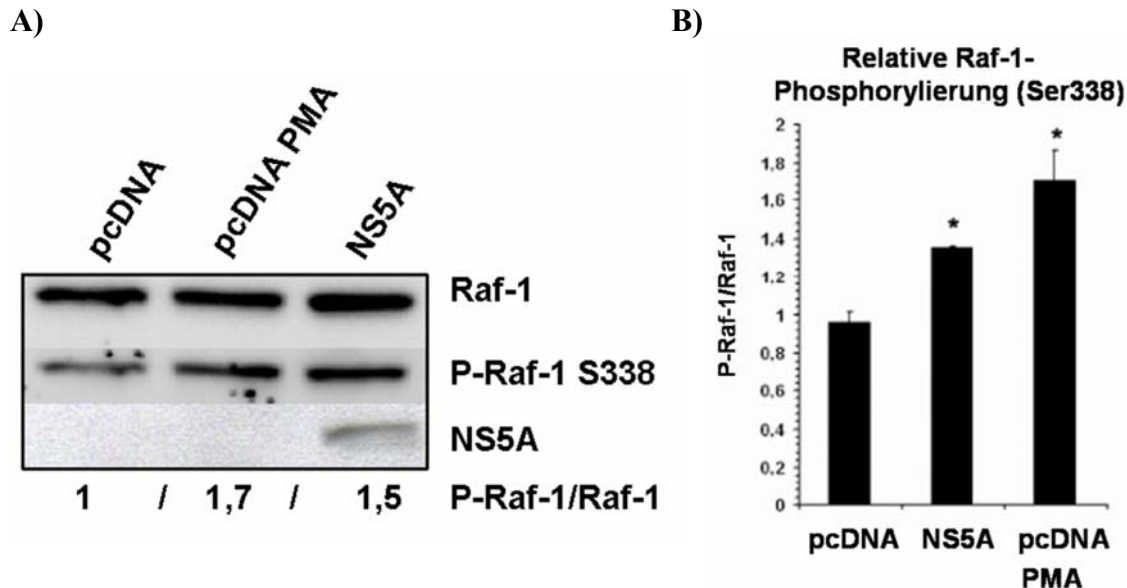


Abbildung 20: NS5A-Expression in huh7 Zellen verursacht gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung. Huh7 Zellen wurden mit pcDNA-NS5A oder pcDNA Leervektor transfiziert. Als Positivkontrolle wurden pcDNA-transfizierte Zellen vor der Ernte 20 min. mit PMA stimuliert. (A) Western Blot auf phosphoryliertes Raf-1 (P-Raf Ser338) und gesamtes Raf-1 und Quantifizierung der Signale. Die Expression von NS5A wurde wie angegeben kontrolliert. Angegeben sind die Verhältnisse der Signale für p-Raf-1 zu Raf-1. (B) Zusammenfassung der Signalverhältnisse von p-Raf-1 zu Raf-1 aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz der Verhältnisunterschiede wurde mit dem t-Test ermittelt.

Die Quantifizierung der Signale für Raf-1 und p-Raf-1 (Ser338) lassen, wie in Abbildung 20.A beispielhaft gezeigt, eine gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung für den Fall der NS5A Expression erkennen. Auch die PMA-Kontrolle verursachte wie erwartet eine gesteigerte Phosphorylierung. Die NS5A-vermittelte Steigerung betrug mit 1,5fach eine ähnliche Größenordnung wie die durch PMA hervorgerufene (Faktor 1,7). Eine erfolgreiche NS5A-Expression wurde mit Hilfe eines Western Blots auf NS5A überprüft. Die Zusammenfassung der Werte dreier unabhängiger Experimente ergab im Mittel eine statistisch signifikante Steigerung der Raf-1 Phosphorylierung durch NS5A und der Kontrolle mit PMA im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 20.B).

Grundsätzlich ist für dieses und die nachfolgenden Experimente festzuhalten, dass ein direkter Vergleich der gezeigten Banden nicht unbedingt die angegebenen Signalverhältnisse widerspiegelt. Es müssen die verschiedenen Sensitivitäten der verwendeten Antikörper und die unterschiedlichen Belichtungszeiten berücksichtigt werden. Zudem wurden die Signalverhältnisse zum besseren Vergleich innerhalb eines Experimentes auf das p-Raf-1/Raf-Verhältnis im Falle der huh7 Zellen abgeglichen.

Da sich Effekte, die bei der Untersuchung einzelner viraler Proteine beobachtet werden, häufig im Kontext einer Koexpression der anderen viralen Proteine anders darstellen, wurde der Phosphorylierungsstatus von Raf-1 im HCV Repliconsystem untersucht. Verwendet

Ergebnisse: NS5A & Raf-1

wurden die beiden stabilen subgenomischen Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET. Proteinlysate beider Zelllinien und Kontrolllysate von huh7 Zellen ohne und nach PMA Stimulation wurden bezüglich ihres Gehalts an Raf-1 und p-Raf-1 untersucht. Gezeigt ist sowohl ein exemplarischer Western Blot als auch die gemittelte Quantifizierung der Signale aus drei unabhängigen Experimenten (Abb. 21).

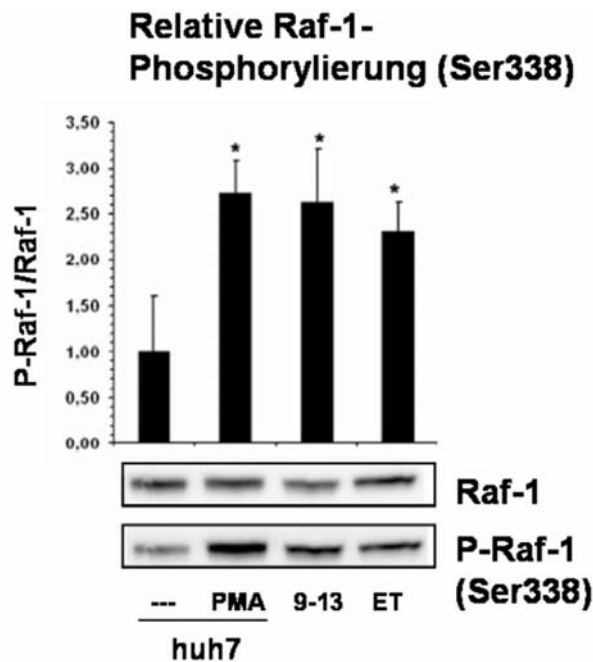


Abbildung 21: Gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung in HCV Replicon-Zellen im Vergleich zu huh7 Zellen. Proteinlysate der Replicon-Zelllinien huh9-13, huh ET und (zum Vergleich) von naiven huh7 Zellen wurden mittels Western Blot-Analyse auf ihren Gehalt an phosphoryliertem Raf-1 (p-Raf Ser338) hin untersucht. Die Signale für p-Raf-1 (Ser338) wurden ins Verhältnis zum Gesamt-Raf-1-Gehalt gesetzt. Als Positivkontrolle wurden huh7 20 min. vor der Ernte mit PMA stimuliert. In der Graphik ist die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten wiedergegeben. Die Signifikanz der Verhältnisunterschiede wurde mit dem t-Test ermittelt.

Diese Experimente ergaben eine statistisch signifikant erhöhte Raf-1-Phosphorylierung im Falle der beiden Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET. Diese Steigerung lag mit ca. 2,3 - 2,4fach im Bereich des durch PMA in huh7 Zellen hervorgerufenen Effektes (Abb. 21). Somit konnte nicht nur im Falle einer separaten NS5A-Expression sondern auch bei der Expression von NS5A mit anderen viralen Proteinen eine gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung festgestellt werden.

4.2.2 NS5A führt nicht zu einer erhöhten Phosphorylierung von MEK1/2 an Serin 217/221

Da eine gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung am Serinrest 338 eine gesteigerte Kinaseaktivität von Raf-1 gegenüber MEK1/2 erwarten lässt, wurde der Phosphorylierungszustand von MEK1/2 an den Aminosäuren Serin 217/221 überprüft. Die Serinreste 217/221 (im Kaninchen, in humanen Zellen sind die korrespondierenden Reste 218 und 222 betroffen)

Ergebnisse: NS5A & Raf-1

werden durch aktives Raf-1 phosphoryliert, und sollten demnach im Falle einer Raf-1-Aktivierung nach Transfektion von pcDNA-NS5A gesteigert phosphoryliert werden (Bondzi et al., 2000, Zheng & Guan, 1994). In Abbildung 22.A sind die entsprechenden Raf-1- bzw. p-Raf-1-Western Blots gezeigt. In Abbildung 22.B die korrespondierenden MEK1/2- bzw. p-MEK1/2-Western Blots. Als Kontrollen dienten zum einen eine Transfektion mit Leervektor und zum anderen eine Stimulation der Zellen mit PMA.

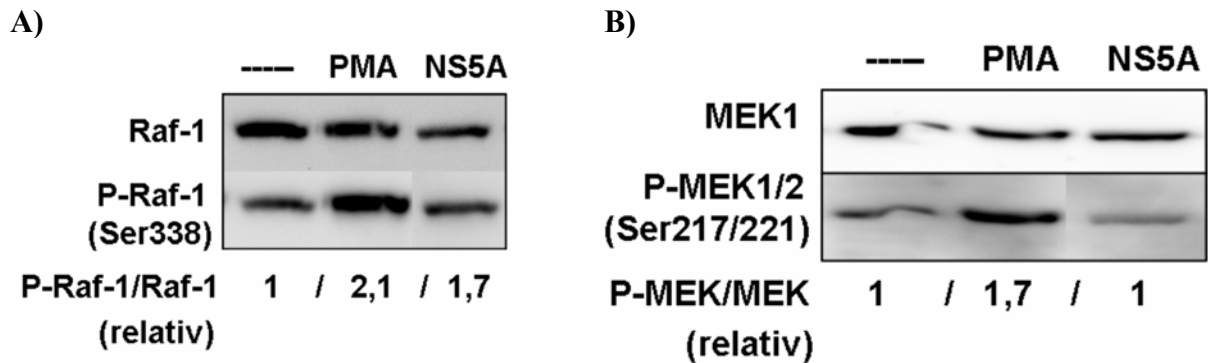


Abbildung 22: Eine durch NS5A gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung führt nicht zu einer gesteigerten MEK1/2-Phosphorylierung. Huh7 Zellen wurden mit pcDNA-NS5A oder pcDNA Leervektor transfiziert. Als Positivkontrolle wurden pcDNA transfizierte Zellen vor der Ernte 20 min. mit PMA stimuliert. (A) Western Blot auf phosphoryliertes Raf-1 (p-Raf Ser338) und gesamtes Raf-1 und Quantifizierung der Signale. (B) Western Blot zur Quantifizierung des Gehaltes an phosphoryliertem MEK1/2 (p-MEK1/2 Ser217/221) zu Gesamtgehalt (MEK1). (A, B) Angegeben sind die Verhältnisse der Signale für p-Raf-1 zu Raf-1 bzw. p-MEK1/2 zu MEK1.

Die Quantifizierungen in der Abbildung 22.A zeigen deutlich die NS5A- bzw. PMA-abhängige gesteigerte Raf-1 Phosphorylierung. Entgegen der Erwartung konnte jedoch keine gesteigerte MEK1/2 Phosphorylierung im Falle einer NS5A Expression festgestellt werden. Das Verhältnis von p-MEK1/2 zu MEK1 nach NS5A-Transfektion war gleich dem der Negativkontrolle. Anhand der gesteigerten MEK1/2 Phosphorylierung im Falle einer PMA Stimulation erkennt man jedoch, dass die reguläre Signalweiterleitung von Raf-1 auf MEK1/2 in dem gewählten System grundsätzlich funktionierte (Abb. 22.B).

4.2.3 Die Aminosäuren 302-449 von NS5A sind ausreichend für die Raf-1-Aktivierung

Um die Domäne von NS5A einzugrenzen, die für die Steigerung der Raf-1-Phosphorylierung verantwortlich ist, wurden verschiedene N- und C-terminale NS5A-Deletionskonstrukte kloniert und ihre Expression überprüft. Da das für die NS5A-Detektion verwendete Antiserum unter Nutzung des Konstruktes AS 211-449 generiert wurde, wurde ein Teil der C-terminalen Deletionsmutanten (AS 1-163, 1-211) mit einem V5- und hexa-Histidin-tag versehen. Für die C-terminalen Deletionsmutanten ohne tag (AS 1-326, 1-378) konnte zuvor in einem Expressionssystem mit Insektenzellen gezeigt werden, dass sie von

Ergebnisse: NS5A & Raf-1

dem verwendeten Serum erkannt werden (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 23 sind sowohl die Konstrukte (A) als auch eine Tabelle (B) gezeigt, die die Expression und Lokalisation dieser innerhalb der Zelle dargelegt. Zudem ist in Teil (C) ein beispielhafter Western Blot der N-terminalen Deletionskonstrukte gezeigt.

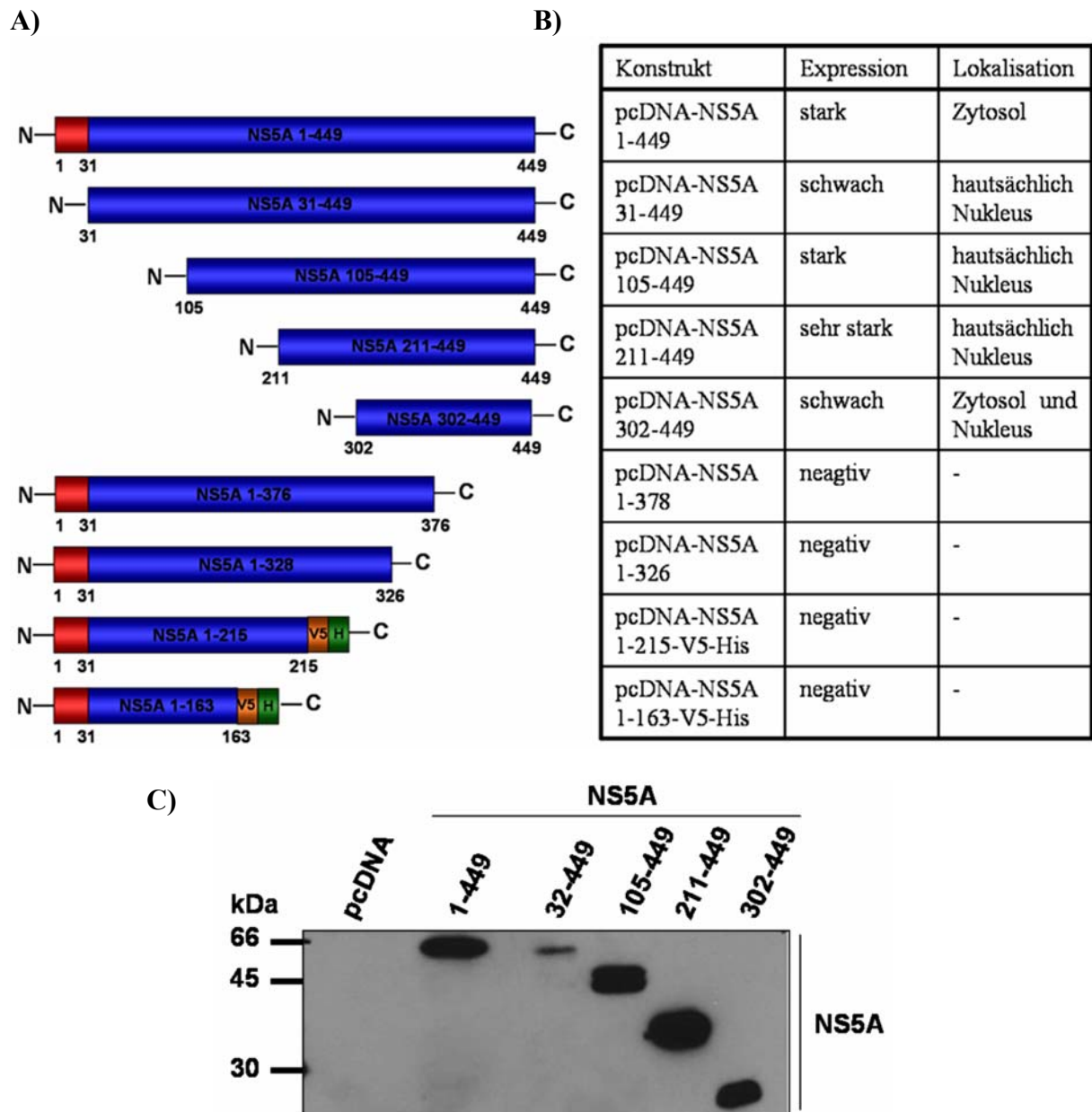


Abbildung 23: NS5A-Expressionskonstrukte zur Eingrenzung der für die gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung verantwortlichen Domäne, ihre Expression und Lokalisation. (A) Verschiedene N- und C-terminalen Deletionskonstrukte von NS5A wurden in pcDNA3.1 (-) bzw. pcDNA3.1/V5-His-Topo Vektoren kloniert. (rot: Membrananker; blau: restliche NS5A Sequenz; gelb: V5-Epitop; grün: 6xHis-Epitop) (B) Tabelle zur Expression und Lokalisation der Deletionsmutanten. (C) Western Blot auf die N-terminalen Deletionsmutanten nach Expression in huh7 Zellen.

Es musste festgestellt werden, dass eine Bildung der C-terminalen Deletionskonstrukte mittels Western Blot und Immunfluoreszenz nicht nachweisbar war, weder unter Verwendung des V5-spezifischen noch des NS5A-spezifischen Serums (Daten nicht gezeigt). Anhand des

Ergebnisse: NS5A & Raf-1

Western Blots auf NS5A in Abbildung 23.C) kann man aber erkennen, dass alle N-terminalen Deletionskonstrukte nach Transfektion exprimiert wurden. Zudem zeigten sie im SDS-Gel die erwarteten Größen. Die Menge der einzelnen Deletionskonstrukte schwankte z.T. erheblich. Am stärksten wurde das Konstrukt 211-449 gebildet, am schwächsten das Konstrukt 32-449, welchem nur der N-terminale Membrananker fehlte. Das NS5A-Protein mit der kompletten Sequenz (1-449) und die Konstrukte 105-449 und 302-449 wurden in etwa gleichstark gebildet, wobei im Falle des 105-449 Konstruktes eine Doppelbande zu detektieren war. Weiterhin konnte mittels Immunfluoreszenz beobachtet werden, dass die N-terminalen Deletionsmutanten 31-449, 105-449 und 211-449 vornehmlich im Kern lokalisiert waren (Daten nicht gezeigt, Zusammenfassung Abb.23.B). Dieses war für die beiden letzteren aus eigenen Arbeiten bereits bekannt (Burckstummer et al., 2006). Das Konstrukt 302-449 war gleichmäßig in der Zelle verteilt, also sowohl im Zellkern als auch im Zytosol vorhanden. Das Volle-Länge-Konstrukt 1-449 wurde, wie schon bekannt, im Zytosol detektiert, mit einer perinucleären Akkumulation (Daten nicht gezeigt, Zusammenfassung Abb.23.B). Aus der Tatsache heraus, dass die C-terminalen Deletionskonstrukte nicht produziert wurden, wurden die folgenden Experimente nur mit dem Volle-Länge-Protein (1-449) und mit den N-terminalen Deletionskonstrukten durchgeführt.

Um die Verhältnisse von p-Raf-1 zu Raf-1 nach Expression der Deletionskonstrukte zu quantifizieren, wurden die entsprechenden Vektoren in huh7 Zellen transfiziert. Es wurden jeweils 2,5 µg Gesamt-DNA pro Ansatz verwendet. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren und nicht mit PMA stimuliert bzw. mit PMA stimuliert wurden. Proteinlysate der Zellen wurden mittels Western Blot auf die Anwesenheit von Raf-1 und p-Raf-1 untersucht und die entsprechenden Signale quantifiziert. Die Verhältnisse der Signale sind in Abbildung 24 angegeben.

Ergebnisse: NS5A & Raf-1

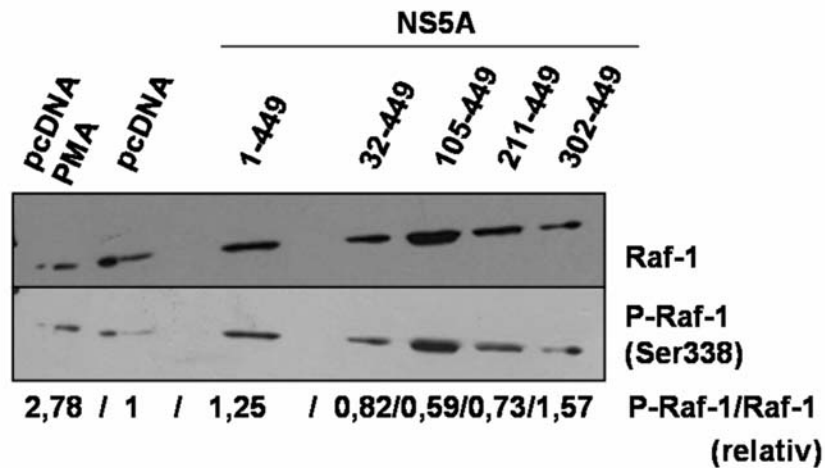


Abbildung 24: Abhängigkeit der Raf-1-Phosphorylierung von verschiedenen N-terminalen NS5A-Deletionskonstrukten. pcDNA-NS5A (1-449) und die verschiedenen N-terminalen Deletionskonstrukte pcDNA-32-449, 105-449, 215-449 und 302-449 wurden wie angegeben in huh7 Zellen transfiziert. Als Kontrollen wurden pcDNA-transfizierte huh7 Zellen mit (Positivkontrolle) und ohne (Negativkontrolle) 20 minütiger PMA Stimulation verwendet. Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot wie angegeben auf ihren p-Raf-1 und Raf-1 Gehalt hin untersucht. Angegeben sind die Verhältnisse der Signale für p-Raf-1 zu Raf-1.

Bei dem Vergleich der Raf-1-Bandenintensitäten mit denen der phosphorylierten Form konnte man sowohl für die Positivkontrolle mit PMA als auch nach Transfektion mit dem volle Länge Protein eine, wenn auch im Falle des NS5A geringe (1,25fach), Steigerung von p-Raf-1 erkennen (Abb. 24). Die Konstrukte 32-449, 105-449 und 211-449 verursachten eine Verminderung der p-Raf-1-Menge, wobei der Effekt nach Transfektion mit dem 211-449 Konstrukt mit ca. 2fach am stärksten ausfiel. Das kürzeste Konstrukt 302-449 verursachte hingegen mit 1,57fach eine deutliche Steigerung der Raf-1-Phosphorylierung.

Somit ist anzunehmen, dass die für die gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung verantwortliche Sequenz im Bereich der Aminosäuren 302-449 anzusiedeln ist. Um zu untersuchen, ob die 302-449 NS5A-Sequenz die notwendige Sequenz für die gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung im Falle des kompletten NS5A-Konstrukt ist, müssten C-terminale Konstrukte untersucht werden. Diese konnten aber wie schon erwähnt nicht zur Expression gebracht werden.

4.2.4 Die NS5A-vermittelte Aktivierung von Raf-1 ist unabhängig von der Proteinkinase C

Um zu überprüfen, ob die NS5A-abhängige Raf-1-Phosphorylierung Proteinkinase C (PKC)- und Ras-vermittelt ist (Dumaz & Marais, 2005), sollten diese Mechanismen im nachfolgenden Experiment inhibiert werden und die Raf-1-Phosphorylierung in Abhängigkeit zu NS5A gemessen werden. Für die Hemmung der PKC wurde der PKC-Inhibitor Gö 6976 verwendet. Als Kontrollen wurden die MEK1/2-Inhibitoren PD 98059 und U0126 verwendet, die eine PKC-vermittelte Raf-1 Phosphorylierung nicht inhibieren sollten. Für die Inhibition von Ras wurden die Zellen mit der transdominant-negativen Ras-Mutante RasN17 transfiziert

Ergebnisse: NS5A & Raf-1

(App et al., 1991, Cook et al., 1993, Wood et al., 1992). Als Kontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen. Ebenfalls eine transdominant-negative Variante wurde verwendet, um Raf-1 selbst zu inhibieren, nämlich Raf-C4. Diese C-terminale Deletionsmutante enthält nur noch die regulatorische Domäne von Raf-1 (Miltenberger et al., 1993). Auch für dieses Transfektionsexperiment wurde eine Kontrolle mit Leervektor durchgeführt.

Zunächst wurde die Funktionalität der Inhibitoren auf Ebene der ERK-Phosphorylierung überprüft. Dazu wurden die Ansätze nach Vorinkubation mit den Substanzen Gö 6976, PD 98059 und U0126 mit PMA stimuliert. Auch im Falle der Kinase-Mutante Raf-C4 und der entsprechenden Kontrolle wurden die Zellen mit PMA inkubiert. Da PMA direkt die Proteinkinase C aktiviert, wurde für die Kontrolle zur Untersuchung der Ras-Abhängigkeit EGF verwendet, ein Wachstumsfaktor, der zu einer Ras vermittelten Raf-1 Aktivierung führt (App et al., 1991). Die Verhältnisse von p-ERK zu ERK in den Proteinlysaten wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt und die Daten graphisch ausgewertet (Abb. 25).

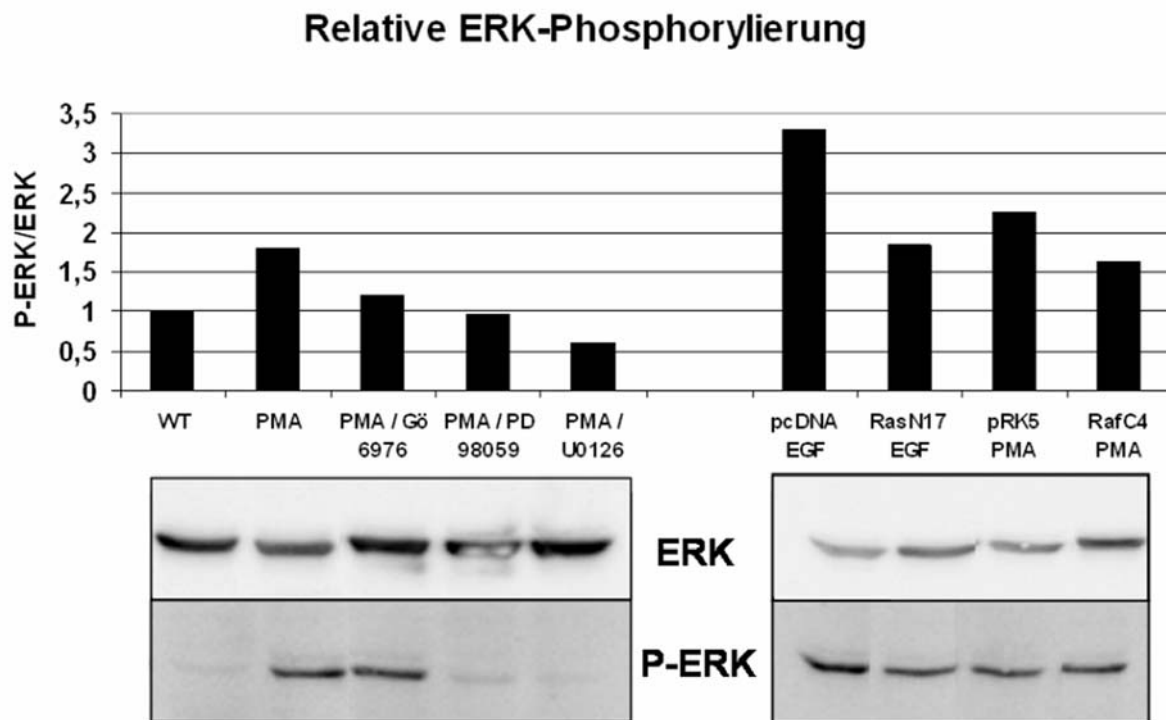


Abbildung 25: Funktionalität verschiedener Inhibitionsmechanismen für den Raf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinaseweg. Western Blot-Analysen und anschließende graphische Auswertung zum Verhältnis von p-ERK zu ERK in huh7 Zellen in Abhängigkeit verschiedener Inhibitionsmechanismen für den ERK-abhängigen MAP-Kinaseweg. Huh7 Zellen wurden dafür wie angegeben mit verschiedenen Inhibitoren für PKC (Gö 6976) bzw. MEK1/2 (PD 98059, U0126) vorbehandelt bzw. mit transdominant-negativen Mutanten für Raf-1 (Raf-C4) oder Ras (RasN17) transfiziert und später wie angegeben mit PMA oder EGF für 20 min. stimuliert.

Für die chemischen Inhibitoren verdeutlichen die Ergebnisse aus Abbildung 25, dass alle drei Substanzen inhibierend auf die PMA-induzierte p-ERK-Bildung wirkten. Dabei ist aber festzuhalten, dass der PKC-Inhibitor Gö 6976 bei der eingesetzten Menge nicht in der Lage

Ergebnisse: NS5A & Raf-1

war, die durch PMA verursachte ERK-Phosphorylierung vollständig zu hemmen. Auch bei der Transfektion mit den trans-dominant negativen Kinasen wurde eine inhibierende Wirkung auf die ERK-Phosphorylierung, induziert entweder durch PMA oder EGF, beobachtet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Inhibitionsmethoden funktional waren.

In Abbildung 26 sind die Western Blots zur Bestimmung der p-Raf-1/Raf-1 Verhältnisse und die dazugehörige Graphik gezeigt, die im Zusammenhang mit einer NS5A-Expression beobachtet wurden. Dafür wurden die Zellen mit NS5A allein oder mit den Vektoren für die transdominant-negativen Mutanten bzw. den entsprechenden Leervektoren als Kontrolle wie angegeben transfiziert. Im Falle der chemischen Inhibitoren wurden diese nach 24 h zu den Zellen hinzugefügt. Nach weiteren 24 h wurden die Ansätze geerntet und die Proteinlysate mittels Western Blot untersucht.

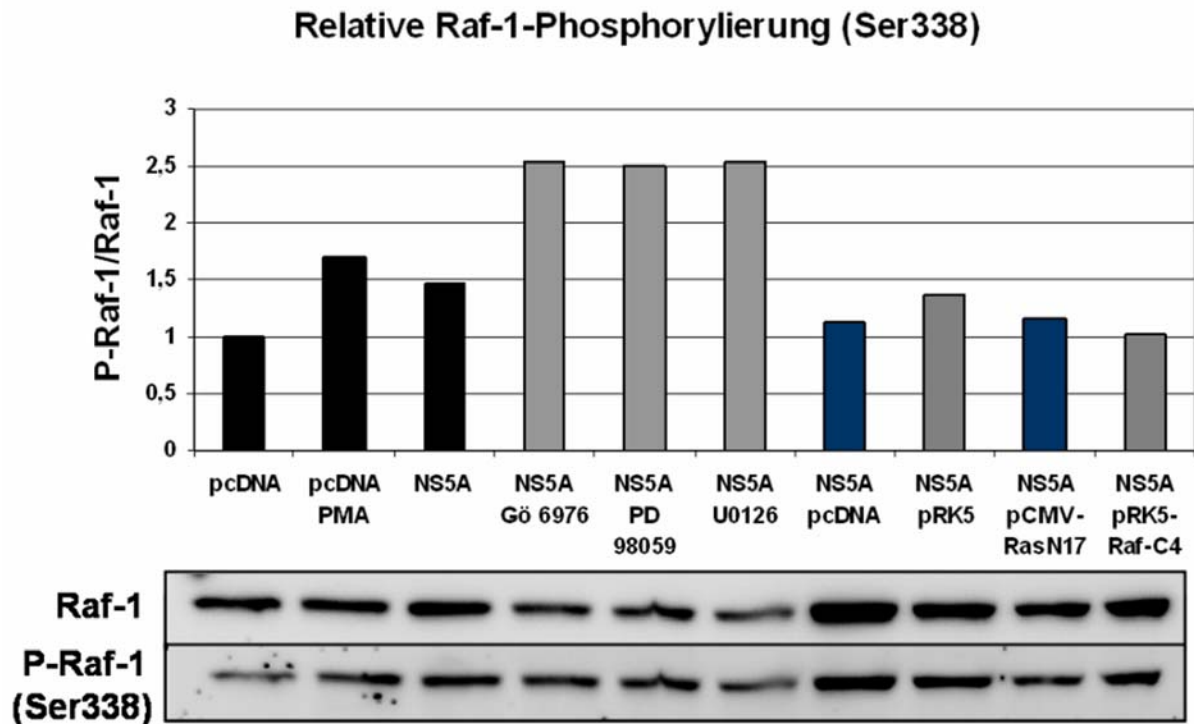


Abbildung 26: Einfluss verschiedener Inhibitionsmechanismen für den Raf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinaseweg auf die NS5A-vermittelte Raf-1-Phosphorylierung. Western Blot, Quantifizierung und graphische Auswertung zum Verhältnis von p-Raf-1 zu Raf-1 in huh7-Proteinlysaten nach Transfektion mit pcDNA-NS5A bzw. pcDNA als Kontrolle. Huh7 Zellen wurden dafür wie angegeben mit pcDNA-NS5A, pcDNA bzw. mit transdominant-negativen Mutanten für Raf-1 (Raf-C4) oder Ras (RasN17) transfiziert oder mit den verschiedenen Inhibitoren für PKC (Gö 6976) bzw. MEK1/2 (PD 98059, U0126) behandelt. Als Positivkontrolle wurden pcDNA transfizierte Zellen 20 min. vor der Ernte mit PMA stimuliert.

Wie anhand der ersten drei Bahnen des Experimentes in Abbildung 26 zu erkennen ist, hat auch in diesem Fall die Steigerung der Raf-1-Phosphorylierung sowohl durch PMA als auch

Ergebnisse: NS5A & Raf-1

durch NS5A funktioniert. Die durch NS5A gesteigerte Phosphorylierung konnte sich jedoch nicht mit dem PKC-Inhibitor reduzieren lassen, sondern der Einsatz von Gö 6976 steigerte stattdessen die Raf-1-Phosphorylierung. Auch die beiden MEK1/2-Inhibitoren PD 98059 und U0126 steigerten die Raf-1-Phosphorylierung um einen ähnlichen Faktor wie der PKC Inhibitor. Im Falle der transdominant-negativen Mutanten konnte schon bei der Verwendung der Kontrollplasmide eine Reduzierung des p-Raf-1-Signals beobachtet werden, am stärksten im Falle des pcDNA Leervektors, die Kontrolle für RasN17. Die Transfektion von RasN17 erzeugte keine weitere Verminderung. Dagegen blieb nach Transfektion mit leerem pRK5 Vektor, der Kontrolle für Raf-C4, eine deutliche erhöhte Raf-1-Phosphorylierung erhalten. Der Einsatz von Raf-C4 reduzierte diesen Wert auf den Wert ohne NS5A-Transfektion. Somit bleibt festzuhalten, dass in diesem experimentellen Ansatz die Inhibition sowohl der Proteinkinase C als auch von MEK1/2 die NS5A-vermittelte Anhebung der Raf-1-Phosphorylierung noch weiter steigerte. Die Inhibition von RasN17 scheint keinen Einfluss auf diesen NS5A Effekt gehabt zu haben, wobei die Werte keine abschließende Aussage zulassen. Die Inhibition von Raf-1 selbst durch Raf-C4 zeigte hingegen einen inhibitorischen Einfluss auf die gesteigerte Bildung von p-Raf-1 im Zusammenhang mit NS5A.

4.3 Analyse einer NS5A-transgenen Maus als Modell für HCV-assozierte Pathologien der Leber

Mit Hilfe der hier vorgestellten transgenen Maus (Stamm: FVB/N) für das HCV-Protein NS5A sollte dessen möglicher Einfluss auf die Leberzellen und die HCV-assozierte Pathogenese untersucht werden. Besonders interessant war hierbei die Fragestellung, ob NS5A zur Entstehung eines HCV-assozierten hepatozellulären Karzinoms (*hepatocellular carcinoma*, HCC) beiträgt. Somit wurde besonderes Augenmerk auf pathologische Veränderungen in der Leber NS5A-transgener Mäuse gerichtet.

Die Klonierung der Expressionskassette (Abb. 27) und die Generierung der transgenen Tiere war Teil einer vorangegangenen Doktorarbeit (Bürckstümmer T, 2005).



Abbildung 27: Leberspezifische DNA-Expressionskassette für His-NS5A-V5. Um eine leberspezifische NS5A-Expression zu gewährleisten, wurde ein *Albumin-Promotor-* und *Enhancer-*Element verwendet. Zusätzlich wurde ein β -Globin-Intron für eine gesteigerte Expression sowie ein Polyadenylierungssignal für die Stabilisierung der mRNA verwendet. Die NS5A-Sequenz (HCV-Genotyp 1b; Genbank-Nr.: D16435) ist 5' von einer Sequenz für einen hexa-His-tag und 3' von einer Sequenz für einen V5-tag flankiert. (*6xHis*: hexa-Histidin-tag; *V5*: V5-tag; *poly-ad. Sign.*: Polyadenylierungssignal)

Da das Hepatitis C Virus vornehmlich Leberzellen infiziert, wurde eine leberspezifische Expression des Transgens angestrebt. Um dies zu gewährleisten wurde, wie in Abbildung 27 zu sehen, die Expression der NS5A-codierenden Sequenz unter die Kontrolle eines *Albumin-Enhancer/Albumin-Promotor-*Elementes gestellt, für das bereits eine solide und spezifische Expression in der Leber beschrieben wurde (Chisari, 1989, Pinkert et al., 1987). Weiterer Bestandteil der Expressionskassette ist ein beta-Globin-Intron, das die Expression des Transgens verstärkt (Brinster et al., 1988).

Am 5'-Ende der NS5A-codierenden Sequenz befindet sich die Sequenz für einen Hexa-Histidin-tag und am 3'-Ende eine V5-tag-codierende Sequenz. Diese beiden tags sollen sowohl die Anreicherung als auch die Detektion des Proteins erleichtern. Um die transkribierte RNA zu stabilisieren, wurde am 3'-Ende der Expressionssequenz ein Signal für die Polyadenylierung der RNA angefügt. Für das NS5A wurde die entsprechende Sequenz des HCV-Genotyps 1b (Genbank-Nr.: D16435) verwendet.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

4.3.1 Expression von NS5A in transgenen Mäusen

Um die transgenen Tiere von den Wildtyp-Tieren (WT) zu unterscheiden, wurde ein PCR-Ansatz gewählt, bei dem sowohl ein Primerpaar für das Transgen als auch ein Primerpaar für Tubulin verwendet wurde. Letzteres diente als Kontrolle der DNA-Präparation. In Abbildung 28.A ist beispielhaft ein Agarosegel einer PCR von vier Mäusen gezeigt, in Abbildung 28.B ein Western Blot zur Detektion von NS5A in den Leberlysaten der genotypisierten Tiere.

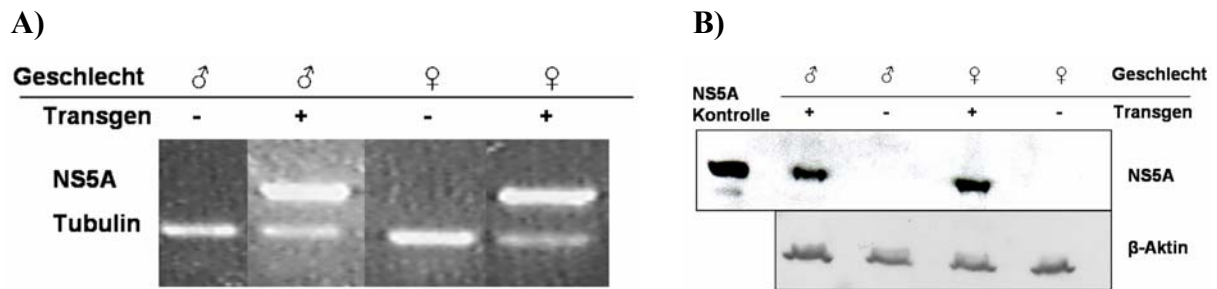


Abbildung 28: Nachweis von NS5A in transgenen Mäusen auf DNA- und Protein-Ebene. (A) Nachweis des Transgens auf DNA-Ebene: Es wurden NS5A-spezifische Primer und als Kontrolle für die DNA-Präparation Tubulin-spezifische Primer zusammen in einem PCR-Ansatz verwendet. Als DNA-Template diente genomische DNA gewonnen aus Mausschwanzspitzen. In dem gezeigten Beispiel wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse getestet. (B) Nachweis der Expression des Transgens in Proteinlysaten von Lebern verschiedener Mäuse auf Western Blot-Ebene unter Verwendung eines V5-spezifischen Antikörpers. Als Ladekontrolle wurde ein Aktin-spezifischer Antikörper verwendet.

In der ersten und dritten Bahn der Abbildung 28.A ist eine spezifische DNA-Bande für das Transgen nach der Genotypisierungs-PCR zu erkennen. Die Tubulinkontrolle zeigt in allen Proben eine erfolgreiche DNA-Präparation an. Die Analyse entsprechender Leberlysate auf Proteinebene zeigte, wie in Abbildung 28.B zu erkennen ist, dass sowohl bei männlichen als auch weiblichen Mäusen die Expression des Transgens im Western Blot detektiert werden konnte. Zudem erfolgte die Expression in den Tieren, die auch mittels PCR als positiv identifiziert worden waren. Für den Western Blot wurde ein Antikörper verwendet, der den V5-Tag erkennt. Als Kontrolle, ob in allen Proben äquivalente Mengen Gesamtprotein vorhanden waren, wurde der Blot anschließend mit einem Antikörper gegen β-Aktin behandelt. Diese Kontrolle zeigt, dass in allen Spuren vergleichbare Mengen Protein geladen wurden. Somit kann man davon ausgehen, dass eine Expression von NS5A in den Mäusen stattfindet, die als transgen genotypisiert wurden. Ein vergleichbares Ergebnis im Western Blot konnte auch mit einem Antiserum gegen das NS5A-Protein selbst erreicht werden, jedoch war die Sensitivität wesentlich geringer (Daten nicht gezeigt). In allen weiteren Western Blot-Experimenten wurde daher der V5-spezifische Antikörper verwendet.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Da bei der Erzeugung der transgenen Maus nicht nur ein, sondern vier Mikroinjektionsereignisse vorgenommen worden waren, wurden zunächst vier einzelne transgene Mauslinien für das NS5A-Protein erzeugt, so genannte *founder*-Linien. Im Verlaufe der Arbeiten wurde jedoch nur mit zwei Linien weitergearbeitet. Diese Linien werden im Folgenden als *founder* 01 und *founder* 03 bezeichnet. Um mögliche Unterschiede in der Expression des Transgens zwischen den beiden *founder*-Linien zu detektieren, wurden Leberlysate von männlichen Tieren der *founder*-Linie 01 bzw. 03 mittels Western Blot auf die Expression von NS5A hin untersucht (Abb.29).

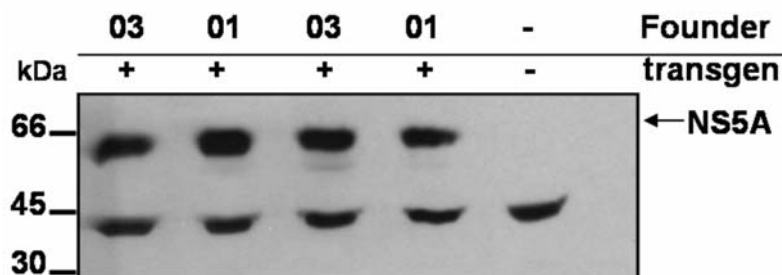


Abbildung 29: Expressionsvergleich von NS5A in verschiedenen *founder*-Linien. Vergleich der Expression von NS5A in zwei *founder*-Linien, die durch zwei unabhängige Mikroinjektionsvorgänge generiert wurden. Dazu wurden Proteinlysate von Lebern transgener Männchen der *founder* 03 und 01 mittels Western Blot-Analyse auf ihren NS5A-Gehalt hin verglichen (AK: α V5).

Zusätzlich zur Bande von NS5A ist in Abbildung 29 eine unspezifische Bande bei ca. 40 kDa in allen Tieren zu detektieren. Im Vergleich zu dieser sind keine starken Unterschiede in der NS5A-Expression zwischen den beiden *founder*-Linien 01 und 03 zu erkennen.

Um zu überprüfen, wo das NS5A-Protein in den Zellen lokalisiert ist, wurden Gefrierschnitte von Lebergeweben unter Verwendung eines V5-spezifischen Antiserums immunhistologisch untersucht (Abb. 30). Zur Detektion wurde ein Cy3-gekoppelter Zweitantikörper verwendet.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

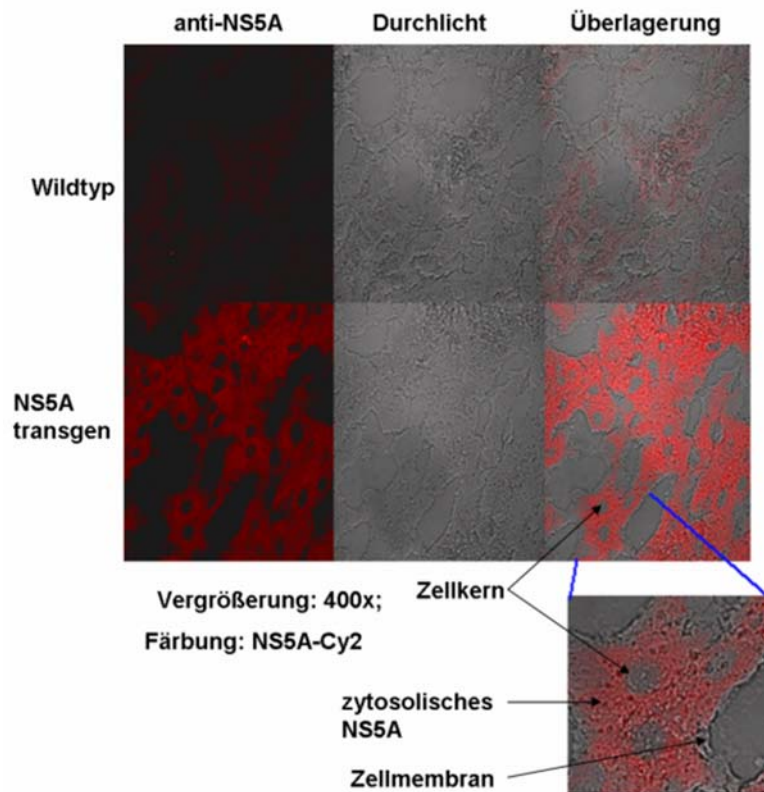


Abbildung 30: Nachweis von NS5A mittels Immunfluoreszenzfärbung. Gefrierschnitte von Lebern transgener und WT-Mäusen wurden in der Immunfluoreszenzfärbung auf eine NS5A-Expression hin untersucht. Dazu wurde anti-V5 Primärantikörper und ein mit Cy3 gekoppelter Sekundärantikörper verwendet (Vergrößerung: 400x).

Anhand der Immunfluoreszenzfärbungen in Abbildung 30 erkennt man eine deutliche rote Fluoreszenz für NS5A in allen untersuchten Leberzellen der transgenen Maus. Der Färbung nach ist das Protein im Zytosol und verstärkt perinucleär lokalisiert. Es ist keine Färbung im Zellkern zu erkennen.

4.3.2 Leberspezifische und stabile NS5A-Expression in transgenen Mäusen

Um die Leberspezifität der Expression zu überprüfen wurden Proteinlysate von verschiedenen Organen mittels Western Blot auf die Anwesenheit von NS5A überprüft (Abb. 31).



Abbildung 31: Leberspezifische NS5A-Expression. Um die Leberspezifität der Expression des Transgens zu überprüfen, wurden Proteinlysate verschiedener Organe mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Anwesenheit von NS5A wurde mit einem V5-spezifischen Antikörper überprüft. Als Ladekontrolle diente ein ERK2-spezifischer Antikörper.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Bei dem in Abbildung 31 gezeigten Western Blot-Experiment wurden Proteinlysate von Leber, Herz, Milz, Lunge und Niere untersucht. Nur im Leberlysate konnte NS5A nachgewiesen werden. Auch bei einer Überbelichtung des Blots konnte im Falle der anderen Organe keine entsprechende Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In diesem Experiment wurde als Ladekontrolle ein Antikörper gegen ERK2 verwendet, da im Falle der Proben aus Herzgewebe β -Aktin als Kontrolle ungeeignet ist.

Als weiterer Teil der Expressionsstudie wurde untersucht, ob das Transgen sowohl in jungen als auch in alten Tieren exprimiert wird. Dazu wurden Leberlysate von drei, fünf, neun und zwölf Monate alten männlichen und weiblichen Tieren mittels Western Blot auf NS5A untersucht (Abb. 32).

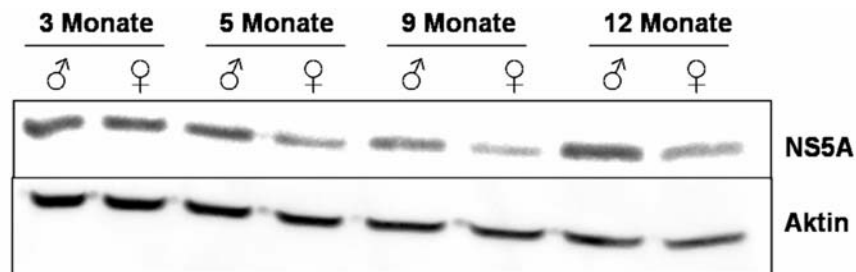


Abbildung 32: Nachweis von NS5A in Mäusen verschiedenen Alters. Um die Expression des Transgens in Mäusen verschiedenen Alters zu überprüfen, wurden Proteinlysate von 3, 5, 9 und 12 Monate alten Mäusen mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Anwesenheit von NS5A wurde mit einem V5-spezifischen Antikörper überprüft. Als Ladekontrolle diente ein Aktin-spezifischer Antikörper.

Für alle Altersklassen ist im Falle des in Abbildung 32 gezeigten Western Blots eine solide NS5A Expression zu erkennen. Bei den weiblichen Tieren sind zumeist etwas geringere Mengen an NS5A zu erkennen als bei den männlichen.

4.3.3 NS5A verursacht keine pathologischen Veränderungen in den Lebern transgener Mäuse

Eine grundlegende Frage bei der Untersuchung einer möglichen kanzerogenen Wirkung von NS5A ist, ob die NS5A-transgenen Tiere spontan Lebertumore entwickeln oder nicht. Um diese Frage zu beantworten, wurden sowohl transgene als auch nicht-transgene Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten getötet und die Leber makroskopisch auf das Auftreten von Tumoren untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass transgene und nicht-transgene Tiere der verschiedenen Altersgruppen aus denselben Würfen stammten. Zudem waren in den Gruppen Tiere verschiedener Founderlinien, dieses ist aber im Weiteren nicht aufgeschlüsselt. In Tabelle 8 ist die Anzahl der Tiere der Altersgruppen drei, neun, zwölf und 17 Monate und die entsprechende Tumorfrequenz wiedergegeben.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Tabelle 8: Häufigkeit spontaner Tumore bei NS5A transgenen (trg) und nicht transgenen (wt) Mäusen.

Alter (Monate)	wt/trg	Anzahl (♂/♀)	Lebertumore	Andere Tumore
3	wt	8 (4/2)	0	0
3	trg	6 (4/4)	0	0
9	wt	8 (4/4)	0	1
9	trg	10 (4/6)	0	0
12	wt	9 (4/5)	0	0
12	trg	10 (4/6)	0	0
17	wt	6 (2/4)	0	0
17	trg	7 (2/5)	0	0
Summe	wt/trg	31/33	0	1

Wie aus der Tabelle 8 zu entnehmen ist, konnte bei keinem Tier ein Lebertumor beobachtet werden. Zudem wurde in nur einer Maus ein anderer Tumor beobachtet.

Daraufhin wurden von mehreren Lebern der Untersuchungsreihen Paraffinschnitte hergestellt und diese histologisch untersucht. Um die Zellmorphologie besser beurteilen zu können wurden die Schnitte mit Hämatoxilin und Eosin (H/E-Färbung) gefärbt (Abb. 33).

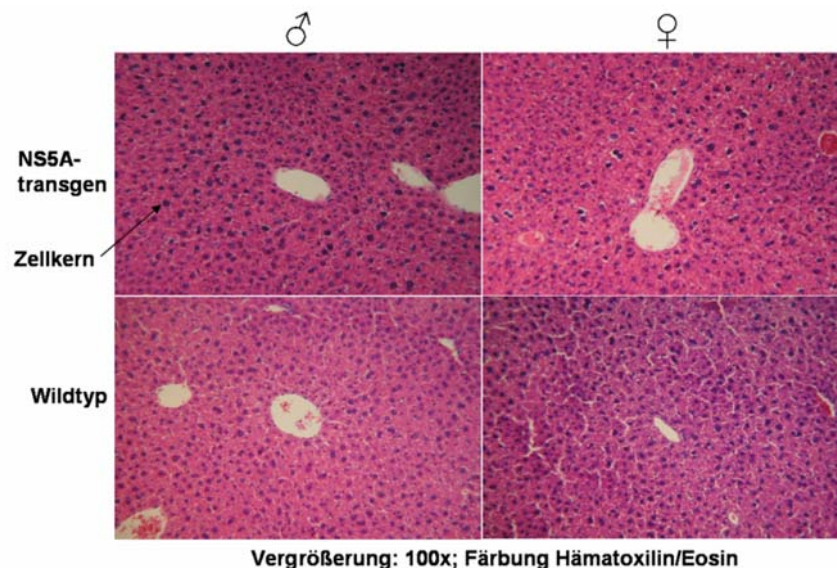


Abbildung 33: Histologische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren. Färbung von Paraffinschnitten von Lebergewebe mit Hämatoxilin und Eosin. Es wurden Paraffinschnitte von Lebern NS5A-transgener und nicht transgener Mäuse untersucht.

In Abbildung 33 sind beispielhaft Hämatoxilin/Eosin-Färbungen von Lebern transgener bzw. nicht transgener Männchen sowie Weibchen gezeigt. Bei diesen Untersuchungen bestätigten sich die makroskopischen Befunde. Wie anhand der gezeigten Präparate zu erkennen ist, wurden weder Lebertumore entdeckt, noch eine präneoplastische oder andere Veränderungen des Lebergewebes der NS5A-transgenen Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Um eine mögliche Veränderung des Stoffwechsels in den transgenen Leberzellen zu begutachten, wurde als weitere histologische Färbemethode die PAS-Färbung (Perjodaäreschiff'sches Reagenz) mit einer Hämatoxylin-Gegenfärbung durchgeführt. Dabei färbt PAS das in der Leber befindliche Glykogen purpur an. Somit können mit dieser Färbemethode mögliche Veränderungen des Glykogenspeichers in den Lebern sichtbar gemacht werden. In Abbildung 34 sind beispielhaft Präparate von transgenen und nicht transgenen Lebern gezeigt.

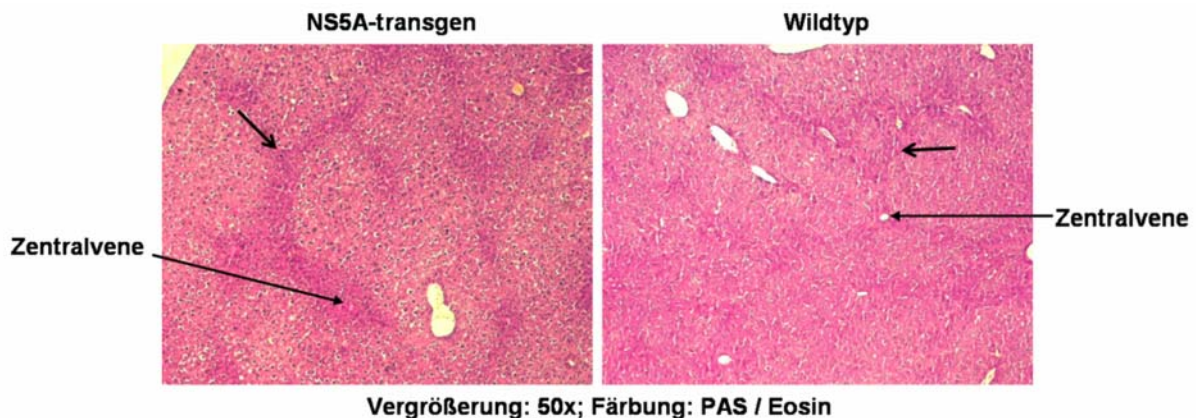


Abbildung 34: Histologische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren. Färbung von Paraffinschnitten von Lebergewebe mit PAS und Eosin. Es wurden Paraffinschnitte von Lebern NS5A-transgener und nicht transgener Mäuse untersucht.

Wie man in Abbildung 34 erkennen kann, gibt es nach der PAS-Färbung schwächer und intensiver gefärbte Bereiche (Pfeile). Dies spiegelt den unterschiedlichen Glykogengehalt in den verschiedenen Leberbereichen wieder und ist auf Auf- bzw. Abbauvorgänge zurückzuführen. Jedoch sind keine Unterschiede der Glykogenanfärbung zwischen NS5A-transgenen und nicht transgenen Lebern zu erkennen. Die Expression des Transgens scheint daher keinen Einfluss auf die Glykogenspeicherung und somit auf einen zentralen Stoffwechselweg in den Leberzellen zu haben.

Als Marker für eine Veränderung des Proliferationsverhaltens NS5A-transgener Lebern im Vergleich zu Wildtyp-Lebern wurde der PCNA-Gehalt verschiedener Leberlysate untersucht. Die Expression des *proliferating cell nuclear antigen (PCNA)* ist eng mit der Zellproliferation gekoppelt. Zudem ist PCNA ein wichtiger Faktor zentraler DNA-Reperaturmechanismen und hat Einfluss auf die Zellzykluskontrolle (Maga & Hubscher, 2003). Eine gesteigerte PCNA-Expression konnte bereits im Zusammenhang mit hepatozellulärem Karzinomen beobachtet werden (Chen et al., 2002). Um den PCNA-Gehalt in verschiedenen Mauslebern zu untersuchen, wurden Proteinlysate von je vier transgenen und nicht transgenen, drei Monate alten Maus-Männchen mittels Western Blot auf PCNA untersucht und die jeweiligen

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Signalintensitäten quantifiziert. Als Mengenreferenz wurden die Blots mit einem anti-Aktin Antikörper behandelt. Auch diese Bandenintensitäten wurden quantifiziert. Das Verhältnis von PCNA- zu Aktinsignal ist sowohl für die einzelnen Tiere als auch für die Mittelwerte der transgenen bzw. nicht transgenen Tiere in Abbildung 35 wiedergegeben.

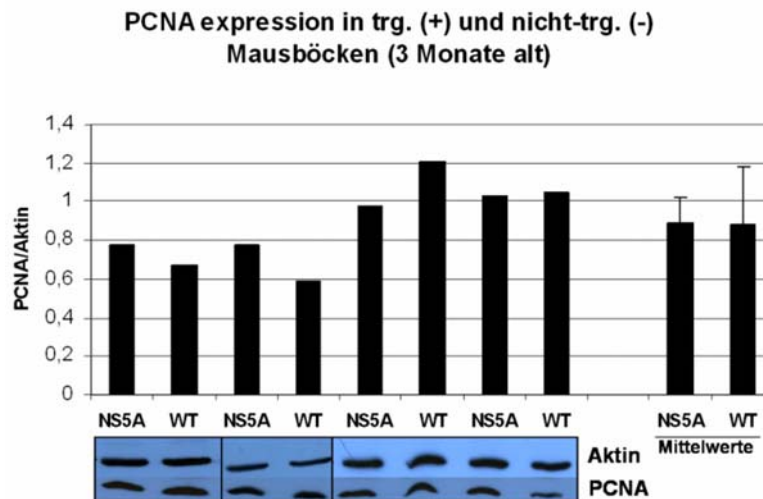


Abbildung 35: PCNA-Expression in den Lebern von transgenen und nicht transgenen Mäusen. Mittels Western Blot wurden die Mengen an PCNA im Vergleich zu Aktin in Leberlysaten von NS5A-transgenen 3 Monate alten Mausmännchen und Wildtyp-Kontrolltieren bestimmt. Das relative Verhältnis von PCNA- zu Aktinsignalen der gezeigten Western Blots ist im Diagramm wiedergegeben. Die letzten beiden Balken repräsentieren den Mittelwert (Summe der PCNA/Aktin Verhältnisse einer Gruppe, dividiert durch die Anzahl der Tiere einer Gruppe) aller aufgeführten transgenen bzw. nicht transgenen Tiere.

An Hand der Abbildung 35 ist im Mittel kein signifikanter Unterschied zwischen NS5A transgenen und nicht transgenen Tieren hinsichtlich der PCNA-Expression zu erkennen. Somit konnte keine Veränderung von PCNA als Marker für das Proliferationsverhalten NS5A-transgener Mausleberzellen festgestellt werden.

4.3.4 NS5A zeigt keine Tumorpromotor-Eigenschaften nach Bestrahlungs-Ereignissen

Wie in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, ist NS5A alleine nicht in der Lage, in Lebern transgener Mäuse eine Tumorbildung zu induzieren, Gewebsveränderungen hervorzurufen bzw. das Proliferationsverhalten zu beeinflussen. Die Entstehung von Karzinomen ist jedoch ein Prozess, der über mehrere Stufen verläuft; nicht nur ein Ereignis ist verantwortlich für die Transformation gesunder Zellen zu Tumorzellen. So unterteilt man die Entstehung eines Karzinoms in drei Stufen: die Initiation, die Promotion und die Tumorbildung (Progression) (Nita et al., 2002). Um zu untersuchen, ob bei gegebenem Initiationsereignis NS5A eine Tumorpromotor-ähnliche Wirkung hat, wurden transgene und nicht transgene Tiere einer subletalen Dosis von 3 Gy Gamma-Strahlen ausgesetzt und nach

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

zwei, vier bzw. sechs Monaten ihre Lebern auf Tumorbildung makroskopisch untersucht. Die verwendete Dosis zeigte bereits im Zusammenhang mit p53-defizienten Mäusen eine kanzerogene Wirkung (Kaizu et al., 2000). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Tumorfrequenzen bei NS5A-transgenen und nicht transgenen Mäusen nach Bestrahlung mit 3 Gy Gamma-Strahlung.

Monate nach Bestrahlung	wt/trg	Anzahl (♂/♀)	Leber Tumore	Andere Tumore
2	wt	11 (5/6)	0	0
2	trg	12 (6/6)	0	0
4	wt	12 (6/6)	0	0
4	trg	12 (6/6)	0	0
6	wt	10 (5/5)	0	0
6	trg	12 (7/5)	0	0
Summe	wt/trg	33/36	0	0

Wie der Tabelle 9 zu entnehmen ist, wurde weder in den untersuchten Lebern noch in anderen Geweben ein makroskopisch sichtbarer Tumor entdeckt.

Um eine größere Bandbreite von Leberschädigungen zu detektieren, wurde den Tieren 2 Monate nach Bestrahlung Blut entnommen und das Serum auf den Gehalt von Glutamat-Pyruvat-Transferase (GPT bzw. ALT) hin untersucht. Dieses vornehmlich im Zytosol von Leberzellen vorkommende Enzym kann als Marker für Schädigungen der Leberzellen verwendet werden, da es bei Zerstörung von Lebergewebe z.B. im Falle einer Hepatitis gehäuft in die Blutbahn eintritt. In Abbildung 36 sind die mittleren GPT-Aktivitäten in den Seren von zwölf männlichen bzw. elf weiblichen transgenen sowie jeweils zehn männlichen und weiblichen nicht transgenen Tieren wiedergegeben.

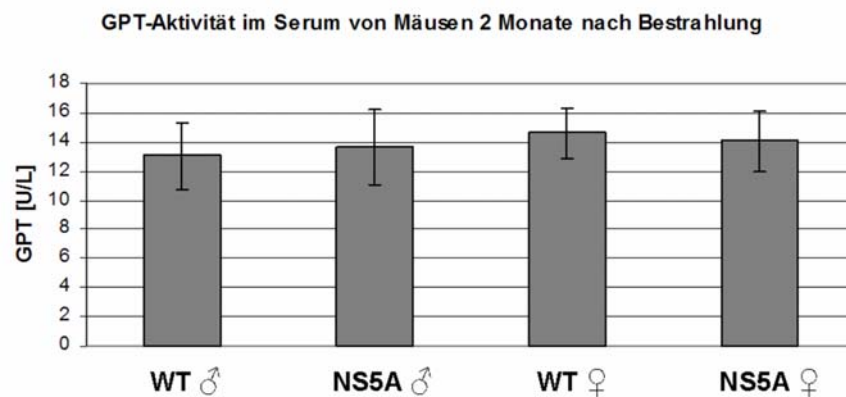


Abbildung 36: Mittlere GPT-Aktivität in Seren von transgenen und WT-Mäusen. Um eine mögliche Leberschädigung zu detektieren, wurde die GTP-Aktivität im Serum von insgesamt 43 Tieren bestimmt. Angegeben sind enzymatische Einheiten pro Liter Serum (U/L).

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Wie aus Abbildung 36 zu entnehmen ist, wurden im Mittel keine Unterschiede in der GPT-Aktivität zwischen den Seren transgener und nicht transgener Männchen bzw. Weibchen detektiert. Dies spricht dafür, dass die Bestrahlung in den Lebern der verschiedenen Tiergruppen nicht zu unterschiedlichen Schädigungsgraden geführt hat.

Um zu untersuchen ob eine mögliche Veränderung des Lebergewebes mikroskopisch zu beobachten ist, wurden die Lebern der Tiere, die zwei bzw. sechs Monate nach der Bestrahlung getötet wurden, histologisch untersucht. Dazu wurden zunächst H/E-Färbungen von Paraffin-Schnitten angefertigt und begutachtet. In Abbildung 37 sind beispielhaft H/E-gefärbte Schnitte von NS5A-transgenen und nicht transgenen Lebergeweben sechs Monate nach Bestrahlung gezeigt.

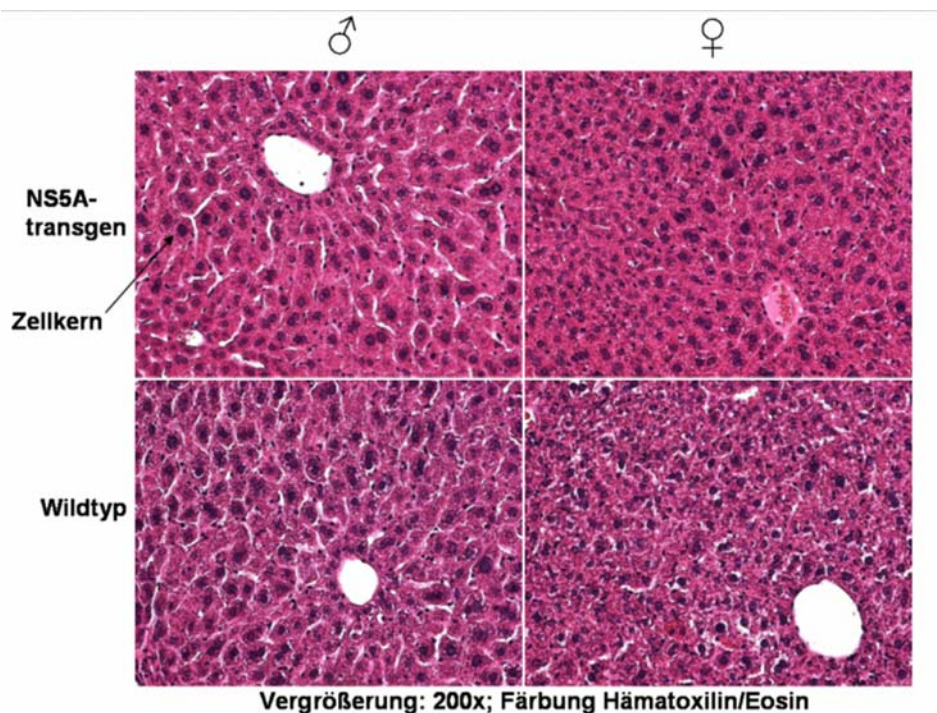


Abbildung 37: Histologische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren 6 Monate nach Bestrahlung. Färbung von Paraffinschnitten von Lebergeweben mit Hämatoxylin und Eosin. Es wurden Paraffinschnitte von Lebern NS5A-transgener und nicht transgener Mäuse untersucht.

Wie durch das Beispiel in Abbildung 37 verdeutlicht, wurden zwischen den Geweben transgener und entsprechender Kontrolltiere keine Unterschiede in der Zellmorphologie beobachtet. Dies war sowohl zwei (Daten nicht gezeigt) als auch sechs Monate nach Bestrahlung der Fall.

Weitere histologische Untersuchungen wurden mit Hilfe der PAS/Eosin-Färbung durchgeführt. Auf diese Weise gefärbte Schnitte wurden von Mauslebern, die zwei Monate nach Bestrahlung präpariert worden waren, angefertigt. Präparate von NS5A-transgenen und nicht transgenen Tieren sind beispielhaft in Abbildung 38 gezeigt.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

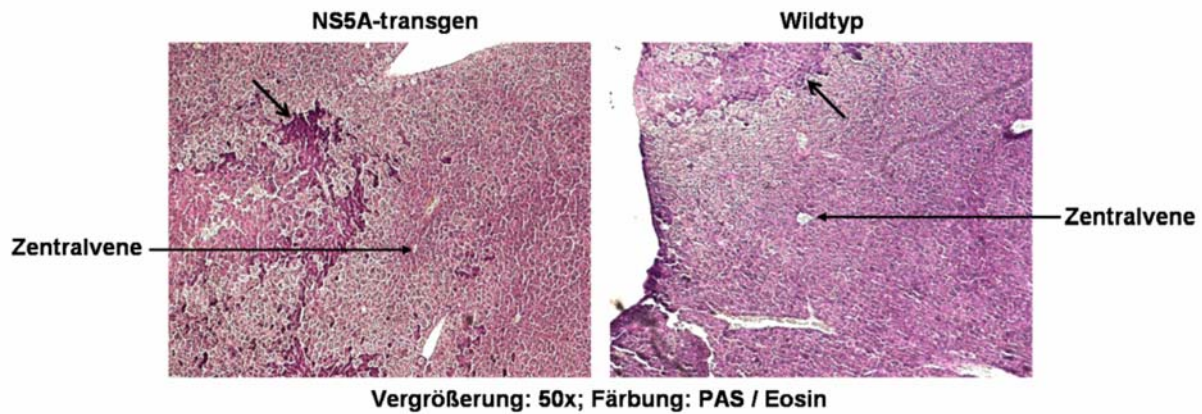


Abbildung 38: Histologische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren 2 Monate nach Bestrahlung. Färbung von Paraffinschnitten von Lebergeweben mit PAS und Eosin. Es wurden Paraffinschnitte von Lebern NS5A-transgener und nicht transgener Mäuse untersucht.

In einigen Schnitten konnten, wie in Abbildung 38 gezeigt, starke Heterogenitäten der PAS-Färbung detektiert werden (Pfeile). Dies war jedoch sowohl in NS5A-transgenen als auch nicht transgenen Mäusen der Fall. Hierbei war eine leichte Tendenz zu erkennen, wonach Teile von Leberpräparaten transgener Tiere häufiger intensiv gefärbt waren. Das könnte auf eine Fehlregulierung des Glykogenhaushaltes der betroffenen Zellen im Falle transgener Tiere zwei Monate nach Bestrahlung hindeuten.

Um die Expression von glykosylierten Oberflächenproteinen der Zelle, die z.B. bei der Zell-Zell-Erkennung eine Rolle spielen, zu untersuchen wurden Lectinfärbungen von Paraffinschnitten von transgenen und nicht transgenen Lebergeweben angefertigt. Verglichen mit dem Ausgangsgewebe kann sich das Expressionsmuster bestimmter Glykoproteine bei der Bildung von Tumoren verändern. (Laack et al., 2002, Schumacher et al., 1994). Mit Hilfe der Lectine CMA und WGA wurden solche Änderungen z.B. im Zusammenhang mit Hauttumoren untersucht (Sames et al., 2001). Mit Hilfe von SMA I wurde zudem eine gesteigerte alpha2,6Sialysierung von N-Glykanan im Falle von transgenen Mäusen mit hepatozellulärem Karzinom beschrieben (Pousset et al., 1997). Die Lectinfärbungen wurden von Prof. Dr. U. Schumacher und Mitarbeitern (Universitäts-Krankenhaus Hamburg Eppendorf) angefertigt. Die entsprechenden Tiere wurden zwei Monate nach Bestrahlung getötet. In Tabelle 10 sind die verwendeten Lectine, die von ihnen zu erkennende Struktur und eine eventuelle beobachtete Färbung in den Präparaten angegeben.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Tabelle 10: Für histochemische Untersuchungen verwendete Lectine, ihre Zuckerspezifität und Resultat der Färbung. *Fuc* Fukose, *Gal* Galaktose, *GalNAc* N-acetyl Galaktosamin, *Glc* Glukose, *GlcNAc* N-acetyl Gluksamin, *Man* Mannose, *NeuAc* Neuraminsäure; (-) keine Färbung; (+) vorhandene Färbung (Jorns et al., 2003).

Ursprungsspezies	Abkürzung	Zuckerspezifität	Färbung
<i>Ulex europaeus</i>	UEA I	α -Fuc	-
<i>Canavalia ensiformis</i>	Can A	α -Man, D-Glc	-
<i>Galanthus nivalis</i>	GNA	α -Man	-
<i>Viscum album l</i>	ML I	Gal	+
<i>Helix pomatia</i>	HPA	D-GalNAc	-
<i>Chelidonium majus</i>	CMA	D-GlcNAc/Chitotriosa	+
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	D-GlcNAc	+
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	Neu5Ac α 2,3Gal/GalNAc	-
<i>Sambucus nigra</i>	SNA I	Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc	+
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA-L	Komplexer Typ	-

Wie aus der Tabelle 10 zu entnehmen ist, führte die Verwendung der Lectine HPA, CanA, PHA-L, UEA I und MAA nicht zu einer Färbung. Das bedeutet, dass keine Glykoproteine mit α -Fukose, α Mannose, D-Glukose, D-N-acetyl-Galaktosamin oder Zuckerresten des komplexen Typus auf den Oberflächen der Leberzellen erkannt wurden, weder in den transgenen noch in den nicht transgenen Tieren. Die erfolgreichen Färbungen mittels ML I, CMA, WGA und SNA I zeigten eine Expression von Galaktose, D-N-acetyl-Glukosamin, D N-acetyl-Glukosamin und N-Acetylgalaktosamin auf der Oberfläche der Zellen an. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren detektiert. Dies ist in Abbildung 39 beispielhaft für die Färbung mit SNA I gezeigt.

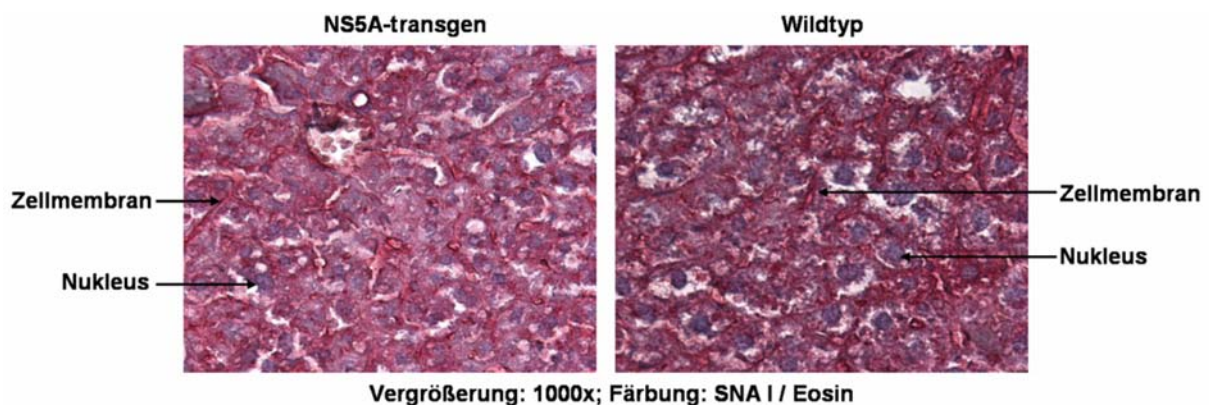


Abbildung 39: Histochemische Untersuchung von NS5A-transgenen Mäusen und WT-Kontrolltieren nach Bestrahlung. Färbung von Paraffinschnitten von Lebergewebe mit Hilfe des biotinylierten Lectins SNA I und anschließender Detektion mit Avidin-gekoppelter alkalischer Peroxidase. Es wurden Paraffinschnitte von Lebern NS5A-transgener und nicht-transgener Mäuse untersucht.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Wie anhand der Lectinfärbungen in Abbildung 39 zu erkennen ist, wurde keine Veränderung in der Präsentation der untersuchten Glykosylierungsmuster auf den Oberflächen von Leberzellen zwei Monate nach Bestrahlung festgestellt.

4.3.5 NS5A-bedingte Änderung der Genexpression in Leberzellen

Um einen Überblick zu erhalten, ob NS5A das Genexpressionsmuster innerhalb des Lebergewebes ändert, wurden Genexpressionchips von je drei transgenen (*founder* 01) und Wildtyp-Tieren in Auftrag gegeben (*Core Facility Genomics* der Universität Freiburg; <http://www.genomics.uni-freiburg.de>). Insgesamt konnten 52 Gene identifiziert werden, die im Falle der NS5A-transgenen Tiere mindestens um den Faktor 1,5 verstärkt exprimiert waren und 44, die mindestens 1,5fach vermindert exprimiert waren. Für all diese Gene gilt statistisch im t-Test mindestens eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$, somit sind die Unterschiede als signifikant anzusehen. Die Gene, für die in der Literatur eine nähere Beschreibung gefunden werden konnte, sind in Tabelle 11 und 12 wiedergegeben.

Tabelle 11: Verstärkt exprimierte Gene in NS5A-transgenen Mäusen.

Angegeben sind Gene, die in NS5A-transgenen Mäusen mehr als 1,5fach stärker exprimiert wurden als in nicht transgenen Tieren. Es wurden je drei Tiere pro Gruppe untersucht. Die Änderungen wurden bei einer statistischen Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

In transgenen Tieren verstärkt exprimierte Gene	Symbol	Nähere Information	Transgen/WT	
			p-Wert	x fach
Neurotrophin receptor associated death domain, mRNA (cDNA clone MGC:48230 IMAGE:1547029)	Nradd	Opioid-Rezeptor	0,03	2,39
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 6, mRNA (cDNA clone MGC:18492 IMAGE:4194164)	Serpina6	Reproduktion	0,03	2,17
Inhibin beta-B (Inhbb), mRNA	Inhbb	Testikuläres Peptidhormon	0,04	2,01
RalA binding protein 1 (Ralbp1), mRNA	Ralbp1	Zytoskelet	0,03	1,94
Mitogen-activated protein kinase 4, mRNA (cDNA clone MGC:73474 IMAGE:6821544)	Mapk4	Zellzyklus	0,04	1,81
Glucagon-like peptide 1 receptor (Glp1r), mRNA	Glp1r	Glykogenmetabolismus	0,03	1,78
Phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent) (Pla2g4c), mRNA	Pla2g4c	Embryonalentwicklung	0,03	1,72
Component of oligomeric golgi complex 2 (Cog2), mRNA	Cog2	Golgi-Vesikel-Transport	0,05	1,71
Lymphoid-restricted membrane protein (Lrmp), mRNA	Lrmp	Integrales ER-Membranprotein in Lymphozyten	0,04	1,65
BCL2-like 11 (apoptosis facilitator), transcript variant 1, mRNA (cDNA clone MGC:28730 IMAGE:4459720)	Bcl2l11	Apoptose	0,02	1,64
Nuclear receptor coactivator 2 (Ncoa2), mRNA	Ncoa2	Glukokortikoid-rRezeptor interagierendes Protein 1 (GRIP1)	0,02	1,63
Polycystic kidney disease 2 (Pkd2), mRNA	Pkd2	Ca ²⁺ -Kanal, Zellzyklus	0,04	1,61
Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Pmaip1), mRNA	Pmaip1	Apoptose	0,01	1,59
Dual specificity phosphatase 9 (Dusp9), mRNA	Dusp9	Entwicklung	0,04	1,58
Synaptophysin, mRNA (cDNA clone MGC:25678 IMAGE:4507116)	Syp	Synaptische Vesikel	0,01	1,58

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Glycoprotein m6b, mRNA (cDNA clone MGC:35819 IMAGE:3981536)	Gpm6b	Proteolipid, Myelin	0,04	1,58
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3 (Xrcc3), mRNA	Xrcc3	DNA-Reperatur	0,03	1,55
Neurexin III, mRNA (cDNA clone MGC:67582 IMAGE:6406001)	Nrxn3	Protein auf der Zelloberfläche von Neuronen, Signaltransduktion (Ca ²⁺)	0,02	1,55
PDZ domain containing RING finger 3, mRNA (cDNA clone MGC:11956 IMAGE:3600603)	Pdzn3	Ubiquitinierung?	0,04	1,54
Protocadherin 7 (Pcdh7), mRNA	Pcdh7	Zell-Zell Erkennung?	0,05	1,54
Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase, mRNA (cDNA clone IMAGE:3155246)	Icmt	Karboxylierung von Proteinen mit CAAX-Sequenz, Ras-Signalweg	0,03	1,53
GIPC PDZ domain containing family, member 2, mRNA (cDNA clone MGC:18334 IMAGE:4238716)	Semcap2	TGFβ-Rezeptor III Bindung/Signalweiterleitung, Membranprotein	0,00	1,52

Tabelle 12: Vermindert exprimierte Gene in NS5A-transgenen Mäusen.

Angegeben sind Gene, die in NS5A-transgenen Mäusen mehr als 1,5fach vermindert exprimiert wurden als in nicht transgenen Tieren. Es wurden je drei Tiere pro Gruppe untersucht. Die Änderungen wurden bei einer statistischen Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

				Transgen/WT	
In transgenen Tieren vermindert exprimierte Gene	Symbol	Nähere Information	p-Wert	x-fach	
MOR mRNA for mu opioid receptor	Oprm1	Opioidrezeptor	0,03	-1,50	
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (Map4k4), mRNA	Map4k4	TNFα/Jun Signalweg	0,04	-1,51	
Cadherin 8 (Cdh8), mRNA	Cdh8	Zell-Zell Adhesion	0,05	-1,53	
Ras and Rab interactor 2 (Rin2), mRNA	Rin2	Endozytose, Ras-Signalweg	0,04	-1,53	
Striatin, calmodulin binding protein 3 (Strn3), mRNA	Strn3	Calmodulin-Signalweg	0,02	-1,54	
Aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2, mRNA (cDNA clone MGC:6055 IMAGE:3490519)	Aldh3a2	Aldehydmetabolismus	0,00	-1,55	
Myelin transcription factor 1-like (Myt1l), mRNA	Myt1l	In Neuronen; Entwicklung und Differenzierung	0,00	-1,60	
Myosin IXa, mRNA (cDNA clone IMAGE:6849802)	4732465J09 Rik	Motorprotein	0,01	-1,61	
Cdc42 GTPase-activating protein (Cdgap), mRNA	Cdgap	Verbindung zwischen MAPK- and Rac1 Signalweg, Zytoskelett	0,00	-1,66	
Ubiquitin specific peptidase 24, mRNA (cDNA clone MGC:41753 IMAGE:1381175)	Usp24	Proteindegradation?	0,01	-1,81	
F-box protein 10, mRNA (cDNA clone MGC:107720 IMAGE:6836944)	Fbxo10	Proteinubiquitinierung	0,00	-1,84	
Taxilin alpha (Txlna), mRNA	Txln	Vesikeltransport	0,05	-1,85	
Protocadherin gamma subfamily A, 10, mRNA (cDNA clone MGC:40648 IMAGE:5400956)	Pcdhga12	Zell-Zell Erkennung / Adhäsion	0,00	-1,87	
HECT domain containing 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:3708271)	Hectd1	Proteinubiquitinierung	0,00	-1,89	
Programmed cell death 10, mRNA (cDNA clone MGC:19291 IMAGE:4022513)	Pcd10	Apoptose	0,04	-1,99	

Wie aus den Tabellen 11 und 12 zu entnehmen ist, sind Gene verschiedener Funktion von einer veränderten Expression im Falle der NS5A-transgenen Mäuse auf mRNA Ebene

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

betroffen. Dazu gehören neben Genen, die für Proteine codieren, die in verschiedenen Signalwegen für Zellproliferation, Differenzierung und Entwicklung (blau) eine Rolle spielen, auch Gene für Proteine aus dem Bereich der Protein-Ubiquitinierung und -Degradation (rot), Apoptose (violett) und einige Gene aus dem Bereich Zell-Zell-Erkennung, Vesikel-Transport und Zell-Skelett/Struktur (grün). Die Expressionsunterschiede sind jedoch mit maximal +2,39 und -1,99 nicht sehr ausgeprägt. Eine Zusammenfassung der Daten ist in Abbildung 40 gegeben.

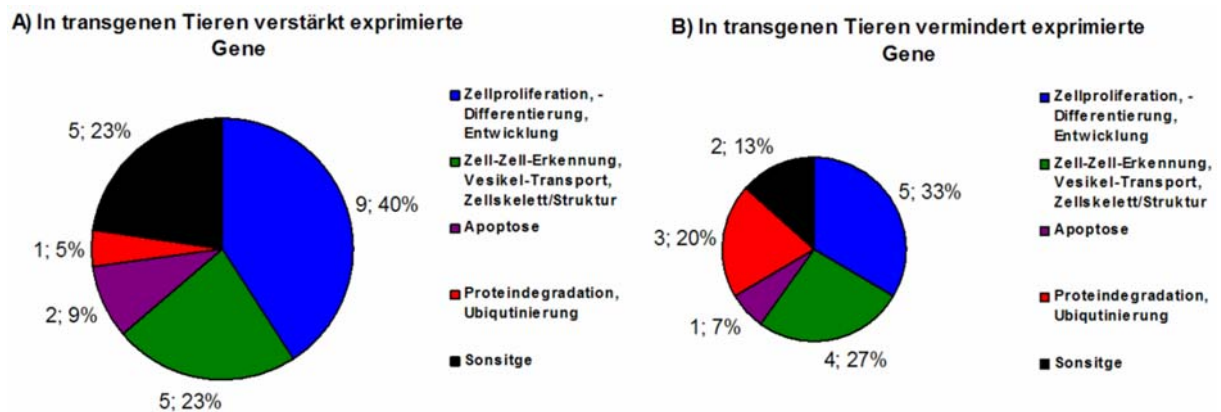


Abbildung 40: Zusammenfassung und Zuordnung der durch das Transgen beeinflussten Gene. Angegeben sind Anzahl und prozentualer Anteil von Gengruppen, deren Expression durch das Transgen verstärkt (A) bzw. vermindert (B) wird.

4.3.6 NS5A-bedingte Veränderung des Proteinexpressionsmusters in Leberzellen

Da die Fehlregulation der aufgeführten Gene vergleichsweise schwach ausfällt und die Veränderung der Genexpression auf mRNA-Ebene nicht immer zu einem veränderten Proteinmuster führen muss, wurden parallel Untersuchungen durchgeführt, die Veränderungen der Proteinexpression zeigen können. Dazu wurden durch einen Kooperationspartner (Herr Uwe Tessmer; Heinrich-Pette Institut, Hamburg) Lysate von Lebern dreier NS5A-transgener (*founder* 01) und Wildtyp-Mäuse mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. In der ersten Dimension wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Dieses wurde für zwei pH-Bereiche separat durchgeführt, für pH 4-7 und pH 6-9. Daraufhin wurden die Proteine in der zweiten Dimension nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mittels Silberfärbung angefärbt. Unterschiede in der Expression der einzelnen Proteine wurden durch Vergleich der Gele von transgenen und nicht transgenen Mäusen ermittelt, beispielhaft wiedergegeben in Abbildung 41.

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

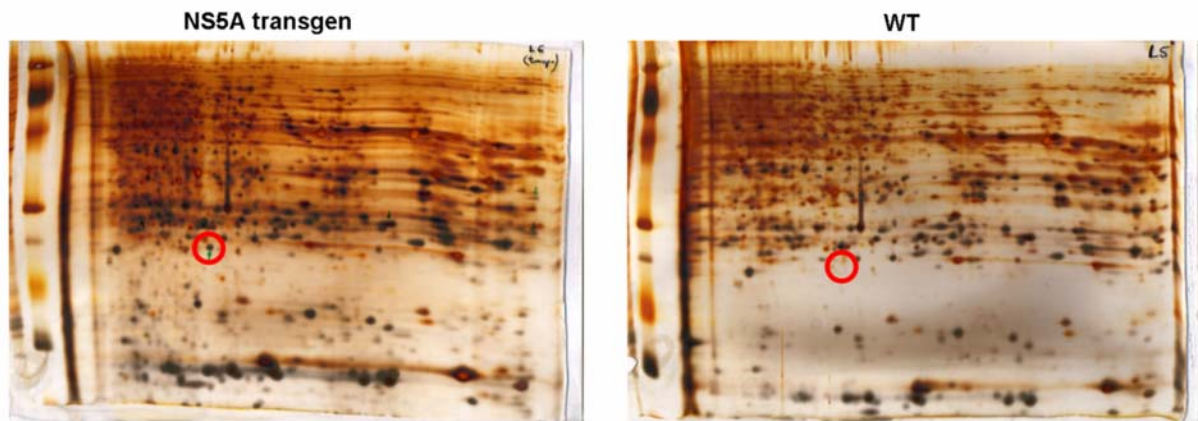


Abbildung 41: Unterschiede in der Proteinexpression, untersucht mit 2-D-Gel-Analysen von Leberlysaten. Silberfärbung von zweidimensionalen Proteingelen. Es wurden Lebern von 3 transgenen Tieren der *founder*-Linie 01 (A, Beispiel) und drei Kontrolltieren (B, Beispiel) analysiert. (roter Kreis: Nur im Falle von NS5A-transgenen Tieren detektiertes Protein)

Bei dem Vergleich der Silberfärbungen der Gele aller transgenen- und Kontroll-Tiere konnten Änderungen der Proteinexpression im Falle der NS5A-exprimierenden Tiere beobachtet werden. Es wurden sowohl Proteine detektiert, die in transgenen Tieren verstärkt gebildet wurden als in den Kontroll-Tieren, als auch welche, die vermindert gebildet wurden. Jedoch konnte vor allem ein Protein beobachtet werden, das im Falle aller drei transgenen Tiere vorhanden war, aber im Falle aller nicht transgenen Mäuse nicht detektiert werden konnte (Abb. 41: roter Kreis). Die verwendete Färbemethode ließ jedoch keine abschließende massenspektrometrische Analyse des Proteins zu. Versuche dieses Protein auch mit Färbungen darzustellen, die eine Identifizierung zulassen würden, schlugen leider auf Grund der schlechteren Sensitivitäten fehl (Daten nicht gezeigt). Somit konnte das Protein, dessen Expression im Falle der transgenen Tiere induziert worden war, nicht identifiziert werden.

4.3.7 NS5A interferiert mit antiviralen Mechanismen in transgenen Mäusen

Um den Einfluss von NS5A auf die IFN-abhängige Virusabwehr eines infizierten Organismus zu untersuchen, wurden transgene und Kontroll-Mäuse mit dem Lymphozytären Choriomenigitis Virus (LCMV) infiziert und anschließend nach sechs bzw. zwölf Tagen die Titer bestimmt. Die Infektion mit LCMV ruft normalerweise eine starke IFN-Antwort hervor, die für die frühe Phase der Virusbekämpfung von großer Bedeutung ist (Biron et al., 2002). Für NS5A ist hingegen ein negativer Einfluss auf die IFN-Antwort beschrieben (vergl. 1.2.2). Derartige Versuche wurden an Mäusen durchgeführt, die transgen für den gesamten offenen Leserahmen des Hepatitis C Virus waren (Blindenbacher et al., 2003). Eine Infektion unter den gewählten Bedingungen verläuft nach einem bekannten Muster, welches zum Tag 6 den Höhepunkt der Infektion erreicht und bei Tag 14 mit der Viruseliminierung endet (Lehmann-

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

Grube et al., 1985). Das Virus befällt den gesamten Organismus, und daher lässt sich der Virustiter im Blut oder in Lysaten der Organe bestimmen. Die Titer unterscheiden sich organabhängig. Dabei weist die Milz die höchsten Titer auf und wird daher zumeist für die Titerbestimmungen verwendet (Lehmann-Grube, 1971). In dem vorliegenden Experiment wurden für die Titerbestimmung Lysate der Milz als Kontrolle verwendet. Die Analyse der LCMV-Titer in der Leber sollte Auskunft darüber geben, ob NS5A einen Einfluss auf die Infizierbarkeit dieses Organs oder die Virus-Eliminierung hat. Aufgrund der Eigenschaften von NS5A waren somit erhöhte LCMV-Titer in den Lebern der NS5A-transgenen Tiere zu erwarten. Dieses Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Michael Bruns durchgeführt (HPI, Hamburg).

Untersucht wurden zu jedem Zeitpunkt je drei transgene (*founder 01*) und nicht transgene Tiere. Die Mittelwerte der Titer von Milz und Leber sind in Abbildung 42.A und B wiedergegeben. Zusätzlich wurde die Aktivität des Leberenzym GPT als Marker für die Leberschädigung bestimmt (Abb. 42.C).

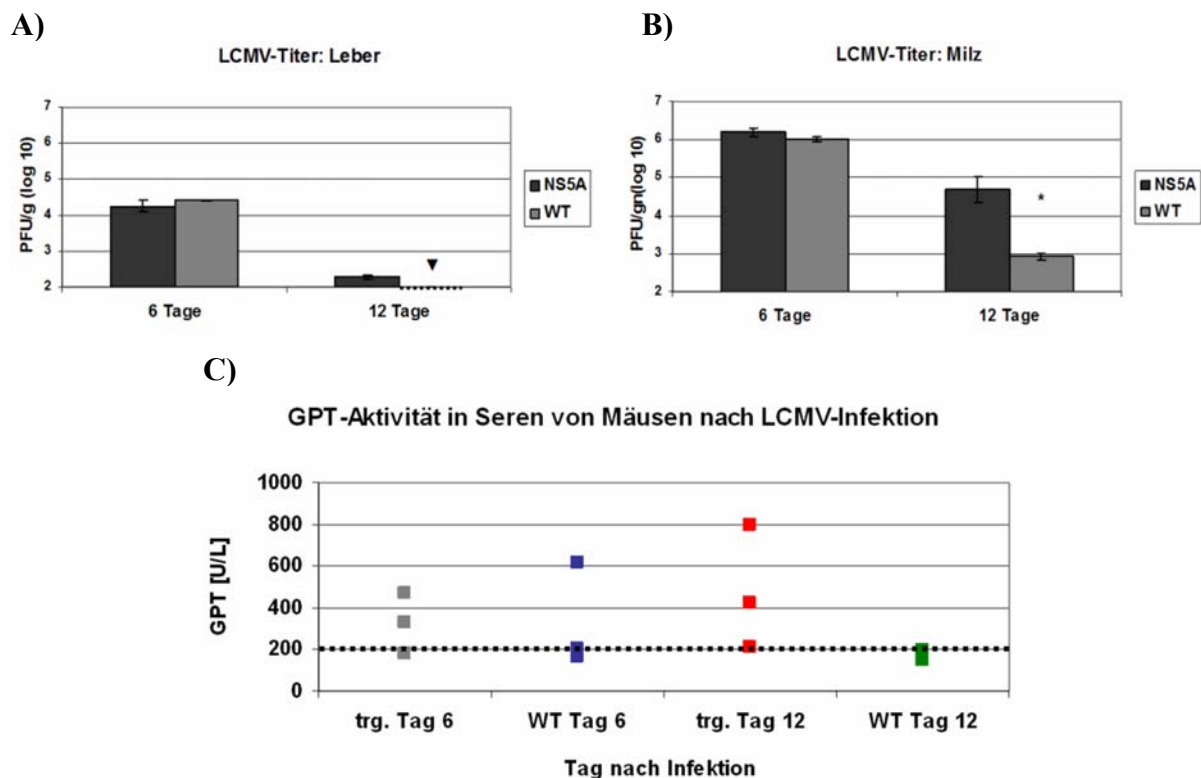


Abbildung 42: NS5A interferiert mit antiviralen Mechanismen in transgenen Mäusen. Transgene und Kontrollmäuse wurden mit 10^5 PFU LCM Virus infiziert. Nach 6 bzw. 12 Tagen wurden die Virustiter in der Leber (A) und der Milz (B) bestimmt. Untersucht wurden in jeder Gruppe je 3 Tiere. (* $p = 0,0075$; ▼ Wert unter Detektionslimit). (C) Bestimmung der GPT-Aktivität in den Seren der untersuchten Mäuse 6 und 12 Tage nach der Infektion (ein ■ entspricht einem Tier).

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

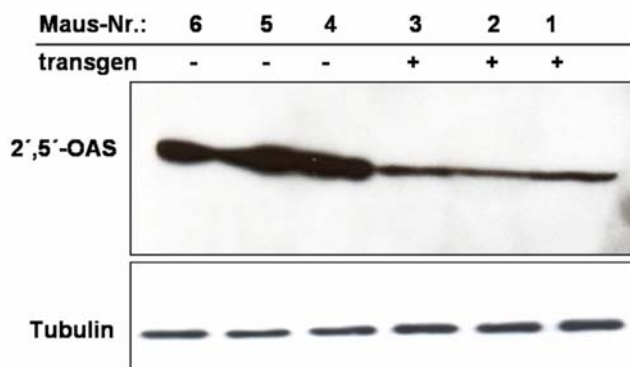
Wie anhand der Graphiken in Abbildung 42.A und B zu erkennen waren sowohl bei den transgenen Tieren als auch bei den Kontrolltieren nach sechs Tagen die LCMV-Titer in der Leber und in der Milz ähnlich (Leber: 10^4 ; Milz: 10^6). Die Titer lagen zudem deutlich über dem Detektionslimit von 10^2 *Plaque-forming Units/g* (PFU/g Gewebe). Zum Tag zwölf erkennt man im Falle der Milz (Abb. 42.B) einen stark erhöhten Titer bei den NS5A-transgenen Tieren. Der Unterschied betrug fast 10^2 PFU/g, was ca. 10^3 infektiösen Partikeln bei einer Mausinfektion entspricht (MIU). Bei den Kontrolltieren lag der Titer mit ca. $10^{2,9}$ PFU/g noch knapp über der Detektionsgrenze. Dies verdeutlicht die fortgeschrittene Viruseliminierung zu diesem Zeitpunkt im Falle der Kontrolltiere. Es ist festzuhalten, dass die Titerwerte für die einzelnen Tiere eng beieinander lagen, so dass die beobachteten Unterschiede nicht auf möglichen Variationen bei der Titerbestimmung beruhen. So ist der Unterschied der untersuchten Milzen von NS5A-transgenen und Kontrolltieren signifikant ($p = 0,0075$). Die LCMV-Titer der untersuchten Lebern (Abb. 42.A) lagen bei den Kontrolltieren am Tag 12 unter dem Detektionslimit. Die Titer der transgenen Lebern waren mit ca. $10^{2,3}$ PFU/g nur knapp über der Grenze, jedoch konnte ein vergleichbarer Titer bei allen transgenen Tieren gemessen werden.

Die Analyse des GPT-Gehaltes im Serum der infizierten Mäuse (Abb. 42.C) zeigte sowohl bei WT-Tieren als auch bei transgenen Tieren nach sechs Tagen Infektion erhöhte Werte (> 200 U/ml). Nach zwölf Tagen der Infektion war die GPT-Aktivität bei allen drei WT-Tieren auf unter 200 U/ml abgefallen. Im Gegensatz dazu waren die GPT-Werte in zwei der drei NS5A-transgenen Tiere noch stark erhöht, was auf eine verstärkte Leberschädigung durch die anhaltende Infektion hindeutet.

Um zu untersuchen, ob eine Blockade der IFN-Antwort die Inhibition der Viruseliminierung verursachte, wurde die Expression IFN-abhängiger Gene in Leberlysaten von transgenen und nicht transgenen Tieren untersucht. Um möglichst die frühe Phase der IFN-Antwort zu analysieren, wurden dafür Proben des Tags 6 nach Infektion verwendet. Es wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen die Expression von 2',5'-OAS (Abb. 43.A) und PKR (Abb. 43.B) untersucht. In beiden Fällen handelt es sich um zentrale Proteine der zellulären Virusabwehr, deren Expression IFN-abhängig reguliert ist (Rebouillat & Hovanessian, 1999, Samuel, 2001)

Ergebnisse: NS5A-transgene Maus

A)



B)

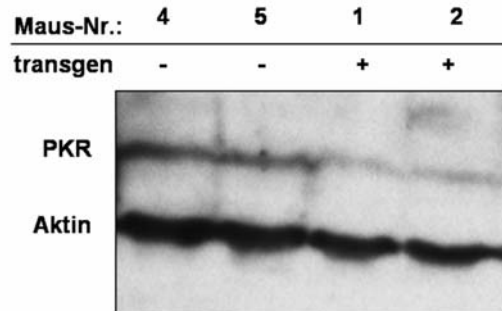


Abbildung 43: NS5A inhibiert die Expression IFN-abhängiger antiviraler Gene. Western Blot auf die Expression von IFN-abhängigen Genen sechs Tage nach der LCMV-Infektion in Leberlysaten von transgenen und nicht-transgenen Mäusen. (A) Detektion von 2',5'-OAS in Lysaten von je 3 Mauslebern. Zweiter Blot auf Tubulin zum Abgleich der Proteinmengen. (B) Detektion von PKR in Lysaten von je 2 Mauslebern. Gleichzeitige Detektion von Aktin zum Proteinabgleich.

Wie in Abbildung 43 zu erkennen, ist gerade die Expression von 2',5'-OAS (Abb. 43.A) aber auch die der PKR (Abb. 43.B) in den NS5A-transgenen Tieren sechs Tage nach der LCMV-Infektion stark reduziert. Dabei wurden im Falle der Mäuse 1, 2, 4 und 5 beide Markerproteine untersucht. Die Proteinmengen-Kontrolle (Tubulin) des 2',5'-OAS-Blots wurde zwar mit einer anderen Membran durchgeführt, es wurden jedoch dieselben Probenvolumina für beide Gele verwendet und zuvor ein Proteinabgleich der einzelnen Proben durchgeführt, so dass pro Bahn die gleiche Menge Gesamtprotein aufgetragen wurde. Zudem konnten bei der Expression von 2',5'-OAS der beobachtete Effekt mit Hilfe von RT-PCRs auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).