

5 Diskussion

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

Etwa für die Hälfte der HCV-Proteine findet man in der Literatur widersprüchliche Befunde in Bezug auf ihren Einfluss auf verschiedene Apoptosemechanismen. Auch im Falle von NS5A konnte entgegen Beobachtungen anderer von unserer Arbeitsgruppe kein Einfluss von NS5A auf die TNF α -vermittelte Apoptose beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Verantwortlich für die unterschiedlichen Beobachtungen der verschiedenen Arbeitsgruppen sind mutmaßlich abweichende experimentelle Bedingungen, wie z.B. die jeweils verwendeten Zelllinien, unterschiedliche Proteinsequenzen und Art der Expression (z.B. transient oder stabil). Bei der experimentellen Analyse der verschiedenen HCV-Proteine muss zudem berücksichtigt werden, dass diese sich teilweise anders verhalten können, wenn sie allein oder mit anderen viralen Proteinen gemeinsam exprimiert werden. Dieses Phänomen ist gerade für das NS5A-Protein bereits beschrieben worden. So wird z.B. die hyperphosphorylierte Form des NS5A-Proteins vom hier verwendeten Genotyp 1b nur im Falle einer Koexpression mit anderen viralen Proteinen gebildet (Koch & Bartenschlager, 1999). Auch eine durch Koexpression bedingte Modulation der Wirkung anderer HCV-Proteine in der Zelle ist nicht unwahrscheinlich. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob HCV-Proteine im Falle einer Koexpression einen Einfluss auf die rezeptorvermittelte Apoptose haben. Die gewonnenen Ergebnisse könnten dann als Ausgangspunkte für gezielte Untersuchungen zum Einfluss der einzelnen Proteine hinsichtlich der Apoptose dienen.

Für die Versuche wurden die Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET verwendet. Diese Zellen enthalten jeweils sich selbst replizierende subgenomische HCV-RNA, die für die Nicht-Strukturproteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B codiert. Das Replicon der huh ET Zellen beinhaltet zusätzlich ein Luciferasegen, mit dem eine direkte Quantifizierung der Replikation möglich ist. Da beide Replicon-Zelllinien auf dem Hintergrund der huh7 Zellen generiert wurden, diente diese Zelllinie als Kontrolle.

5.1.1 Detektion und Induktion von TNF α -vermittelter Apoptose

Bei der Festlegung der Rahmenbedingungen konnte mittels Annexin-V-FITC/PI-Färbung und anschließender Quantifizierung der apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer bzw. Western Blot-Analysen zur Detektion der Spaltung von PARP gezeigt werden, dass Apoptose im Falle der verwendeten Zellen nur bei Kombination von TNF α mit dem

Diskussion: HCV & Apoptose

Translationsinhibitor Cycloheximid (CHx) induziert werden konnte. Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden anderer überein, nach denen huh7 Zellen, HepG2 Zellen und selbst primäre Maushepatozyten mit TNF α allein nicht in Apoptose versetzt werden können (Ghosh et al., 2000a, Leist et al., 1994, Miyasaka et al., 2003). Mittels Immunfluoreszenz zur Detektion von NF κ B konnte dessen Translokation vom Zytosol in den Zellkern gezeigt werden, was eine Aktivierung des TNF α -Rezeptors TNF-R1 durch das verwendete TNF α verdeutlicht (Daten nicht gezeigt).

5.1.2 Unterschiedliches Verhalten verschiedener Replicon-Zelllinien hinsichtlich rezeptorvermittelter Apoptose

Bei den Untersuchungen zur TNF α -vermittelten Apoptose stellte sich heraus, dass die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich sensitiv gegenüber der TNF α /CHx-Behandlung waren. Mittels FACS und Western Blot wurde die stärkste Induktion von TNF α -vermittelter Apoptose in huh9-13 Zellen im Vergleich zu huh7 Zellen detektiert (2fach). Huh ET Zellen zeigten jedoch eine um 0,5fach verminderte Sensitivität im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten wurden durch PARP-spezifische Western Blot-Analysen bestätigt. Das Problem dieser Analysemethoden ist jedoch, dass bei fortgeschrittener Apoptose nicht nur die Spaltbande erscheint, sondern auch das ungespaltene PARP und - bei starker Apoptoseinduktion bzw. langen Inkubationszeiten - zudem die Spaltbande selber verschwindet, da auch das gespaltene PARP weiter abgebaut wird. Deshalb kann trotz starker Apoptoseinduktion die PARP-Spaltbande vergleichsweise schwach ausfallen. Um die Apoptoseinduktion zuverlässiger zu charakterisieren, wurde daher das Verhältnis von gespaltenem zu ungespaltenem PARP bzw. die Abnahme der Gesamtmenge an PARP betrachtet.

Bei der Untersuchung der TRAIL-vermittelten Apoptose, die der TNF α -vermittelten Apoptose sehr ähnlich ist (Kimberley & Screaton, 2004, MacEwan, 2002), zeigte sich, dass auch TRAIL nur in Kombination mit CHx in huh7 Zellen Apoptose induzierte. Bei dem Vergleich der drei Zelllinien ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der Induktion mit TNF α /CHx. Die huh9-13 Zellen zeigten eine ca. 2fach höhere Sensitivität als die huh7 Zellen, und die huh ET waren ca. 0,6fach unempfindlicher.

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

Überraschend an diesen Befunden war zum einen die Tatsache, dass die huh9-13 Zellen wesentlich sensitiver waren als die huh7 Kontrollzellen. Man würde eher eine anti-apoptotische Wirkung der HCV-Proteine erwarten, versuchen doch Viren in der Regel die Apoptose der infizierten Zelle zu verhindern, um eine optimale Ausbreitung des Virus zu

Diskussion: HCV & Apoptose

erreichen. Zum anderen war es überraschend, dass sich beide Replicon-Zelllinien gegensätzlich verhielten. Für die unterschiedlichen Sensitivitäten der beiden Replicon-Zelllinien gegenüber TNF α - und TRAIL-vermittelter Apoptose gibt es zwei Erklärungsmodelle. Einerseits könnte das HCV-Replicon und damit die gebildeten HCV-Proteine auf die entsprechenden Signalwege Einfluss nehmen. Andererseits könnten die Unterschiede auch durch den Zellhintergrund bedingt sein. Bei solchen subklonalen Effekten handelt es sich um Unterschiede der Zellen, die durch die getrennte Kultivierung hervorgerufen werden. Zwar basieren die Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET auf den huh7 Zellen, jedoch haben sie z.T. eine unterschiedliche Passagenzahl, und auch die HCV-Replicon-Konstrukte können bei langer Kultivierungszeit einen verändernden Einfluss auf die Zellen haben (Lohmann et al., 2003). So ist beschrieben, dass Replicon-Zellen nach Verlust ihres Replicons wesentlich besser für die Generierung neuer Replicon-Zellen und für die Produktion von viralen Partikeln geeignet sind als normale huh7 Zellen (Lohmann et al., 2003, Zhong et al., 2005). Zudem gibt es selbst innerhalb der huh7 Zellen verschiedene Subklone, die sich bei der Generierung von Replicon-Zellen unterschiedlich verhalten (Blight et al., 2002, Lohmann et al., 2003).

Um den Einfluss eines solchen subklonalen Effekts zu überprüfen, wurde das Replicon in zwei unabhängigen Experimenten aus den Zelllinien huh9-13 und huh ET mit Hilfe von IFN α entfernt. Die Replicon-Zellen wurden gewissermaßen „kuriert“. Diese Methode wurde bereits von Frese *et al.* 2001 beschrieben. Die Kontrollbehandlung der huh7 Zellen sollte mögliche Effekte durch die Interferongabe aufdecken. Western Blot- und Immunfluoreszenz-Daten, in denen nach der IFN α -Behandlung kein NS5A mehr zu detektieren war, zeigten, dass von einer signifikanten Reduktion der HCV-Proteine und somit der Replicon-RNA ausgegangen werden kann. Da nach längerer Kultivierungszeit bei den entsprechenden Zellen keine erneute NS5A-Expression über Immunfluoreszenz detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), ist somit nicht von einer wiederholten Amplifikation der HCV-RNA und der entsprechenden Proteine auszugehen. Wie von Frese *et al.* 2001 beschrieben, ist schon bei einer viertägigen IFN α -Gabe auf RNA-Ebene das Replicon nahezu vollständig eliminiert. Eine weitere und hochsensitive Nachweismethode wurde im Falle der huh ET Zellen angewendet. Da das Replicon dieser Zellen eine *firefly* Luciferase exprimiert, wurden Proteinlysate von huh ET und den entsprechenden kurierten Zellen auf eine Luciferaseaktivität hin überprüft. Es zeigte sich, dass die huh ET Zellen nach der IFN α -Behandlung keine detektierbare Menge an Luciferase exprimierten und somit auch keine HCV-Replikation mehr stattgefunden hatte. Obwohl gerade der Luciferaseassay sehr sensitiv ist, (Krieger et al., 2001) ist es nicht

Diskussion: HCV & Apoptose

ausgeschlossen, dass das Kurieren der Repliconzellen auf der RNA-Ebene nicht vollständig war. Daher ist nur von einem Verlust eines signifikanten Teils des HCV-Replicons auszugehen.

5.1.4 Einfluss des huh9-13-Replicons auf rezeptorvermittelte Apoptose

Versuche mit den von ihrem Replicon befreiten huh9-13 und huh ET Zellen bezüglich TNF α -vermittelter Apoptose ergaben, dass die kurierten huh9-13 Zellen (huh9-13 cured I bzw. cured II) keine gesteigerte Sensitivität mehr gegenüber der Apoptoseinduktion aufwiesen. Tatsächlich war die Anzahl apoptotischer Zellen nach IFN α -Behandlung sogar etwas geringer als bei den Kontrollzellen huh7 bzw. huh7 cured I/cured II. Die geringere Anzahl apoptotischer Zellen im Falle der huh ET Zellen gegenüber den huh7 Zellen wurde durch die IFN α -Behandlung nicht gesteigert, sondern eher noch weiter reduziert. Eine leichte Reduktion in der Anzahl apoptotischer Zellen aufgrund der IFN α -Behandlung konnte auch im Falle der huh7 Zellen detektiert werden, so dass von einem leichten inhibitorischen Effekt der IFN α -Behandlung auf die TNF α -vermittelte Apoptose ausgegangen werden kann. Unter Berücksichtigung dieses Befundes kann man für die unkurierten und kurierten huh ET Zellen keinen Unterschied bei einer TNF α /CHx-Stimulation feststellen, der auf die Anwesenheit des HCV-Replicons zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu zeigt die starke Reduktion der Sensitivität der huh9-13 Zellen nach der Entfernung des HCV-Replicons von ca. 2,4fach auf ca. 0,5fach einen deutlichen proapoptotischen Einfluss der HCV-RNA bzw. der darauf codierten Proteine. Dieser Unterschied konnte statistisch als sehr signifikant dargestellt werden.

Auch bei der TRAIL-vermittelten Apoptose konnte im Falle der huh9-13 Zellen nach der IFN α -Behandlung eine signifikante bzw. sehr signifikante Reduktion der apoptotischen Zellen von ca. 2,5fach auf ca. 1,7fach im Vergleich zu huh7 Zellen beobachtet werden. Gleichzeitig konnte kein entsprechender Anstieg der Annexin-V-positiven Zellen bei den kurierten huh ET festgestellt werden. Auch eine Abnahme der Apoptoserate durch IFN α konnte in diesem Fall bei den huh ET Zellen nicht beobachtet werden, jedoch war die Standardabweichung zu hoch, um einen genauen Schluss zuzulassen. Die huh7 Zellen zeigten nach der IFN α -Therapie wieder eine schwache aber z.T. signifikante Reduktion der Sensitivität, die jedoch mit einer Abnahme von 1fach auf ca. 0,7-0,8fach deutlich geringer ausfiel als die Abnahme der Sensitivität im Falle der huh9-13 Zellen.

Grundsätzlich gilt, dass die Sensitivität aller Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose wesentlich höher war als im Falle der TNF α -induzierten Apoptose. Dadurch ergab sich die Schwierigkeit dar, dass in den huh9-13 sehr frühzeitig die Apoptose ausgelöst wurde, bevor

Diskussion: HCV & Apoptose

bei den anderen Zelllinien apoptotische Zellen überhaupt detektiert werden konnten. Bei der Festlegung der Inkubationszeit musste daher ein Bereich gewählt werden, in dem noch lebende huh9-13 Zellen nachweisbar waren und in dem bei den anderen Zelltypen sterbende Zellen schon deutlich detektiert werden konnten. Auch zu dem gewählten Zeitpunkt von fünf Stunden im Falle der TRAIL-Stimulation waren schon sehr viele huh9-13 Zellen spätapoptotisch, wurden durch die Gegenfärbung mit PI erfasst und gingen somit nicht als apoptotisch mit in die Statistik ein. Dieses verschiebt die Statistik hin zu niedrigeren Werten für apoptotische huh9-13 Zellen ohne $\text{IFN}\alpha$, was wiederum den Reduktionseffekt nach dem Kurieren schmälert. Nichtsdestotrotz ist zu erkennen, dass huh9-13 Zellen nach dem Verlust des HCV-Replicon eine wesentlich reduzierte Sensitivität gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose aufwiesen. Das Entfernen des HCV-Replicons aus den huh ET Zellen hatte hingegen keinen Einfluss auf deren Sensitivität gegenüber der TRAIL/CHx-Behandlung. Die Tatsache, dass die kurierten huh9-13 Zellen im Falle von TRAIL immer noch 1,7fach sensitiver als die huh7 Zellen waren kann zwei Gründe haben. Zum einen könnte ein oben beschriebener subklonaler Effekt eine Rolle gespielt haben und somit der Zellhintergrund verantwortlich sein. Da die huh9-13 Zellen eine wesentlich höhere Passagenzahl aufwiesen (ca. 300) als die huh ET Zellen (ca. 60), könnte der Zellhintergrund im Falle der huh9-13 Zellen durch die lange Anwesenheit des Replicons nachhaltig verändert worden sein. Zum anderen könnten die Replicon-Zellen mit der $\text{IFN}\alpha$ -Behandlung nicht vollständig von der HCV-RNA befreit worden sein und ein verbliebener Rest vermittelte somit die etwas gesteigerte Sensitivität im Falle von TRAIL-induzierter Apoptose. Dafür spricht, dass alle Zelllinien wesentlich sensitiver auf TRAIL und CHx reagierten als auf $\text{TNF}\alpha$ /CHx. Demnach war diese geringe Restmenge an HCV-RNA bzw. -Proteinen im Falle von $\text{TNF}\alpha$ nicht ausreichend, um einen Effekt zu vermitteln.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl im Falle von $\text{TNF}\alpha$ - als auch von TRAIL-vermittelter Apoptose das Replicon der huh9-13 Zellen einen proapoptotischen Effekt vermittelt. Der Unterschied zwischen huh7 und huh ET Zellen hingegen geht nicht auf das Replicon zurück, sondern ist mutmaßlich durch den Zellhintergrund bedingt.

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

Eine weitere wichtige Frage ist, ob die huh9-13 Zellen durch ihr Replicon nur hinsichtlich rezeptorvermittelter Apoptose sensitiviert sind, oder ob auch der intrinsische Apoptoseweg über die Mitochondrien betroffen ist. Dazu wurde die Substanz Etoposide verwendet, die ebenfalls nur bei Kombination mit CHx zur Induktion von Apoptose führte. Etoposide

Diskussion: HCV & Apoptose

inhibiert die Topoisomerase II, was zu einer Anhäufung von Strangbrüchen führt und somit über p53 den intrinsischen Apoptoseweg unter Einbeziehung der Mitochondrien aktiviert (Karpinich et al., 2002, Kaufmann et al., 1993). Die Untersuchung der unbehandelten huh7, huh9-13 und huh ET Zellen und deren kurierter Varianten führte zu drei entscheidenden Resultaten: Erstens zeigten die huh9-13 Zellen keine gesteigerte Sensitivität gegenüber mitochondrialer Apoptose im Vergleich zu huh7 bzw. huh ET Zellen, sondern waren sogar am unempfindlichsten. Zweitens konnte weder für die huh9-13 noch für die huh ET Zellen ein Einfluss der HCV-Replicon-RNA festgestellt werden, da sich die Anzahl apoptotischer Zellen durch die IFN α -Behandlung nicht änderte. Drittens wiesen die huh7 Zellen unabhängig von der IFN α -Behandlung eine im Vergleich zu den beiden Replicon-Zelllinien drastisch gesteigerte Sensitivität gegenüber Etoposide und CHx auf. Verglichen mit den huh9-13 Zellen waren die huh7 Zellen sogar mehr als 10fach sensitiver. Diese Unterschiede schienen durch den Zellhintergrund bedingt zu sein, verursacht möglicherweise durch die Anwesenheit des Replicons oder durch den permanenten Selektionsdruck mit G418 im Falle der huh9-13 und huh ET Zellen, so dass sich auch deren kurierter Äquivalente von den huh7 Zellen unterschieden. Die IFN α -Behandlung der huh7 Zellen führte allerdings zu einer leichten Reduktion der Annexin-V-positiven Zellen. Jedoch ist unter Berücksichtigung der Messdaten zu vermuten, dass dieser Effekt temporär war, da er immer geringer wurde, je länger die IFN α -Gabe zurücklag (Daten nicht gezeigt).

Ein grundsätzliches Problem bei den Versuchen mit Etoposide waren die stark unterschiedlichen Sensitivitäten. Auf der einen Seite ließen sich huh7 Zellen deutlich stimulieren, auf der anderen Seite die huh9-13 und huh ET Zellen nur geringfügig. Dadurch war die Wahl der Inkubationszeit wie im Falle der TRAIL-Stimulation schwierig. Bei Experimenten mit verlängerten Inkubationszeiten und erhöhten Mengen an Etoposide konnte jedoch auch in huh9-13 und huh ET Zellen deutlich Apoptose induziert werden (Daten nicht gezeigt), und die Verhältnisse zwischen den Zelllinien entsprachen den gezeigten Ergebnissen. Zusätzlich schien es im Falle der Etoposide-Stimulation bei den huh7 Zellen so, als ob es gewisse Subpopulationen gab, in denen unterschiedlich schnell Apoptose ausgelöst wurde. Es konnte nämlich beobachtet werden, dass es nach 12 h Inkubation relativ wenig frühapoptotische Zellen gab, aber verhältnismäßig viele spätapoptotische und das, obwohl noch viele vitale Zellen vorhanden waren. Dieses Verhalten könnte aber auch auf den unterschiedlichen Zellzyklusstadien beruhen, in denen sich die Zellen eines Kulturgefäßes befinden.

Diskussion: HCV & Apoptose

Um die Etoposide-Daten zu verifizieren, wurde der Transkriptions-Inhibitor Actinomycin D (Act. D) verwendet, der ebenfalls zur Induktion des intrinsischen Apoptoseweges führt (Goldstein et al., 2000). Auf die Act. D-Stimulation reagierten alle Zelllinien wesentlich sensitiver als auf Etoposide, wodurch auch in huh9-13 und huh ET Zellen deutlich nachweisbare Apoptoseraten erreicht werden konnten. Das Muster der Sensitivitäten war ähnlich wie bei der Verwendung von Etoposide/CHx. Die huh9-13 Zellen zeigten erneut die geringste Sensitivität (huh7 ca. 10fach sensitiver), gefolgt von den huh ET Zellen (huh7 ca. 2fach sensitiver). Das Apoptoseverhalten änderte sich auch nach der Beseitigung der Replicon-RNA nicht deutlich. Die Sensitivität der huh7 Zellen gegenüber Act. D war wie im Falle von Etoposide am höchsten. Auch konnte wieder eine leichte Reduktion der Annexin-V-positiven Zellen im Falle der IFN α -behandelten huh7 Zellen festgestellt werden, wobei dieser Effekt wiederum mit fortlaufender Kultur ohne IFN α abzunehmen schien (Daten nicht gezeigt).

Die Reduktion der Sensitivität von huh7 Zellen gegenüber Apoptose nach IFN α -Behandlung stellt die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen. Eine leichte Reduktion wurde zuvor schon bei der Verwendung von TNF α und TRAIL beobachtet, obwohl die huh7 Zellen vor den entsprechenden Versuchen mindestens drei Wochen ohne IFN α kultiviert worden waren. Somit muss sich durch die Behandlung mit IFN α ein permanenter bzw. lang anhaltender antiapoptotischer Effekt in den Zellen etabliert haben. Möglich ist auch, dass IFN α während der Anwendung einen Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt hat, der Zellen mit verminderter Apoptosesensitivität begünstigte.

Bezüglich des intrinsischen Apoptoseweges bleibt festzuhalten, dass die untersuchten Replicon-Zellen huh9-13 und huh ET nicht durch die HCV-RNA und die entsprechenden gebildeten Proteine in ihrem Verhalten verändert wurden. Dies konnte sowohl durch die Verwendung von Etoposide/CHx als auch von Act. D gezeigt werden. Jedoch waren starke Effekte des Zellhintergrundes zu beobachten, sowohl beim Vergleich von huh7 mit den Replicon-Zellen als auch beim Vergleich der Replicon-Zelllinien untereinander.

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

Um Anhaltspunkte für die Ursache der Unterschiede bezüglich der rezeptorvermittelten Apoptose zu erhalten, wurde in huh9-13 und huh ET Zellen die Genexpression auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurden Membran-Arrays verwendet, auf denen verschiedene für die Apoptose relevante Gene vertreten waren. Um auch Gene zu erfassen, die möglicherweise

Diskussion: HCV & Apoptose

erst im Falle einer Stimulation unterschiedlich reguliert werden, wurden die Zellen zuvor mit TNF α behandelt.

Es konnte beobachtet werden, dass bei huh9-13 Zellen im Vergleich zu huh ET Zellen zehn Gene mindestens 1,3fach stärker transkribiert wurden. Vier dieser Gene wurden sogar mehr als 1,5fach stärker exprimiert. Steigerungen dieser Größenordnung erscheinen zwar nicht sehr hoch, jedoch sind sie im Vergleich mit den Kontrollen auf den Membranen eindeutig. Die Kontrollen unterscheiden sich meist nur um +/- 1,1 bis maximal +/- 1,2. Somit liegt zumindest ein 1,5facher Unterschied deutlich über dem Fehler, der bei dem Vergleich der Membranen auftritt.

Die Gene, die zwischen 1,3fach und 1,5fach stärker in huh9-13 Zellen exprimiert wurden, sind alle in die Regulation des Zellzyklus involviert bzw. wirken sich positiv auf die Zellteilung aus (Andersen et al., 1997, Freeman et al., 1991, Serrano et al., 1993, Tassan et al., 1995). Mit diesem Ergebnis stimmt die Beobachtung überein, dass sich die huh9-13 Zellen schneller teilen als die huh ET Zellen. Die verstärkte Expression solcher Gene ist daher nahe liegend und wahrscheinlich auch ursächlich und muss sich nicht zwangsläufig direkt auf die Apoptosesensitivität auswirken. Bei den Genen, die mehr als 1,5fach stärker exprimiert wurden, handelt es sich bei Caspase 4 und dem *programmed cell death 2* (PDCD2)-Protein um Genprodukte, die direkt mit Apoptose in Verbindung gebracht werden (Kamada et al., 1997, Kawakami et al., 1995). Dabei korreliert die herabgesetzte Expression von PDCD2 mit einer Reduktion von Apoptose (Baron et al., 2002, Kawakami et al., 1995). Analog könnte eine gesteigerte PDCD2-Expression mit einer erhöhten Apoptosesensitivität der huh9-13 Zellen übereinstimmen. Im Falle von Caspase 4 ist eine Initiator-Caspase betroffen, die in der Lage ist, Caspase 1 zu aktivieren, über deren genauere Funktion aber noch nicht viel bekannt ist (Siegel, 2006). Auch eine Aktivierung von Caspase 4 durch Caspase 8 und eine darauf folgende Spaltung von Caspase 3 wird vermutet (Kamada et al., 1997), was eine gesteigerte Sensitivität gegenüber rezeptorvermittelter Apoptose im Falle der huh9-13 Zellen erklären könnte, da Caspase 8 wiederum bei der rezeptorvermittelten Apoptose eine entscheidende Rolle spielt. Die stärksten Unterschiede mit ca. 2fach erhöhter Expression in huh9-13 Zellen gegenüber huh ET Zellen weisen die Gene für das *non-metastatic cells 2 protein* (NM23B; oder auch *nucleoside diphosphate kinase B*; NDK B; Nm23-H2) und die *prefoldin subunit 5* (bzw. *C-myc-binding protein*; Mm-1) auf. Beide Genprodukte werden mit dem Transcriptionsaktivator c-Myc in Verbindung gebracht. Das Genprodukt des Oncogens *c-myc* spielt sowohl in der Apoptose als auch bei der Zelldifferenzierung und Zellproliferation eine entscheidende Rolle (Hoffman et al., 1996, Obya et al., 1999). Mm-1 bindet c-Myc und

Diskussion: HCV & Apoptose

inhibiert somit die E-Box-abhängige transkriptionelle Aktivität von c-Myc. Zudem wurden Mutationen von Mm-1 vermehrt in Tumorzellen gefunden (Fujioka et al., 2001). Auch die Nukleosid-Diphosphat-Kinase Nm23-H2 steht in Verbindung mit c-Myc, fungiert sie doch als Transkriptionsaktivator des *c-myc* Gens (Postel et al., 1993). Eine verminderte Expression von Nm23-H2 wurde in Tumorzellen mit hohem Potential zur Bildung von Metastasen beobachtet, wobei im Falle von hepatozellulären Karzinomen eher eine Reduktion des verwandten Proteins Nm23-H1 beobachtet wurde (Fishman et al., 1994, Iizuka et al., 1995). Dass Viren diese Gruppe der Nukleosid-Phosphat-Kinasen beeinflussen, wurde bereits für das *Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C* (EBNA3C) gezeigt, das mit dem Nm23-H2 verwandten Nm23-H1 Protein assoziiert (Subramanian et al., 2001).

Schlussfolgernd sollte eine gesteigerte Expression der Proteine Mm-1 und Nm23-H2 einer Zelltransformation durch erhöhte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli entgegenwirken. Dieses könnte die Beobachtungen in den huh9-13 Zellen erklären, die im Vergleich zu huh ET Zellen neben einer gesteigerten Expression der beiden Gene Mm-1 und Nm23-H2 auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Apoptose aufwiesen.

5.1.7 Zusammenfassende Betrachtungen und Ausblick

Weitere Experimente müssen klären, ob auch im Falle der kurierten Replicon-Zellen diese Unterschiede in der Genexpression vorhanden sind. Weiterhin müssen die Expressionsunterschiede auch auf Proteinebene verifiziert werden. Zudem ist anzunehmen, dass sich die HCV-Proteine nicht unbedingt direkt auf die Expression der Gene auswirken sondern eher die Funktion und Aktivität zellulärer Proteine wie z.B. der entsprechenden Transkriptionsfaktoren verändern. Diese Wirkungsweise ist vor allem für das NS5A-Protein beschrieben worden (Macdonald & Harris, 2004). Die Suche nach den beteiligten Proteinen und Abläufen der betroffenen Apoptosewege innerhalb der Zelle wird durch die gezeigten Experimente jedoch eingeschränkt. Da sowohl TNF α - und TRAIL-vermittelte Apoptose betroffen sind, ist ein Einwirken des Replicons auf einen oder mehrere gemeinsame Schritte dieser Apoptosearten wahrscheinlich. Da aber die mitochondriale Apoptose nicht betroffen ist, ist eine Einflussnahme auf gemeinsame Mechanismen von extrinsischem und intrinsischem Weg eher unwahrscheinlich. Ein gemeinsamer Mechanismus ist z.B. die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 sowohl durch Caspase 8 als auch durch Caspase 9, eine zentrale Caspase der mitochondrial aktivierten Apoptose (Hakem et al., 1998, Srinivasula et al., 1998). Eine durch Caspase 9 aktivierte Caspase 3 ist wiederum in der Lage, eine Spaltung von Caspase 8 zu verursachen und führt auf diese Weise zu einer apoptotischen Amplifikationsschleife (Engels et al., 2000, Tang et al., 2000, Wieder et al., 2001). Diese Amplifikation des Signales ist

Diskussion: HCV & Apoptose

gerade in Hepatozyten wichtig für die Apoptoseinduktion (Ding & Yin, 2004). Eine Verbindung zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Apoptoseweg besteht zudem durch die Aktivierung von Caspase 9 durch Caspase 8 und eine Caspase 8-abhängige Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Srinivasan et al., 1998). Letzteres wird über Spaltung von Bid durch Caspase 8 bewirkt (Li et al., 1998, Luo et al., 1998). Da aber der intrinsische Apoptoseweg durch das Replicon in den huh9-13 Zellen nicht betroffen ist, sollte die Einflussnahme bei einem Ereignis oberhalb der Aktivierung von Caspase 8 anzusiedeln sein.

Ein gemeinsamer Schnittpunkt des TNF α - und TRAIL-Apoptoseweges ist die Rekrutierung von TRADD und FADD an den Rezeptor. Über die dadurch ermöglichte Aktivierung von Caspase 8 wird die Caspase-abhängige Apoptosemaschinerie in Gang gesetzt (Chen & Goeddel, 2002, Kimberley & Screaton, 2004). Somit ist eine Einflussnahme der Replicon-Proteine in den huh9-13 Zellen entweder auf der Ebene der TRADD/FADD-Rekrutierung an den Rezeptor und der dadurch vermittelten Caspase 8-Aktivierung zu vermuten oder durch Änderung der Proteinexpression z.B. der Rezeptoren hervorgerufen. Letzteres wird aber zumindest durch die Daten der Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene nicht gestützt. Die Suche nach dem Mechanismus könnte durch die Verwendung von Fas-Liganden weiter eingengt werden. Auch die Fas-Ligand-induzierte Apoptose wird über Rezeptoren vermittelt (Nagata, 1997). Im Gegensatz zu TNF α - und TRAIL-induzierter Apoptose ist TRADD aber nicht notwendig, sondern FADD kann direkt an den Fas-Rezeptor binden (Muzio et al., 1996). Würden Experimente mit Fas zu ähnlichen Ergebnissen führen, wäre eine Einflussnahme des Replicons auf der Ebene von FADD und Caspase 8 wahrscheinlich, anderenfalls ist der Effekt eher auf der Ebene der Rezeptor/TRADD bzw. TRADD/FADD-Interaktion zu suchen.

Auf der Seite der HCV-Proteine ist die Suche nach einem möglichen Effektorprotein durch die Unterschiede der beiden Replicon-Konstrukte eingeschränkt. Dazu muss die Annahme gemacht werden, dass sich zu dem Zeitpunkt der Versuche die beiden Replicon-Konstrukte hauptsächlich nur in den beschriebenen zellkulturadaptiven Mutationen unterschieden. Diese Annahme muss in weiteren Experimenten überprüft werden. Da das huh ET-Replicon keinen Einfluss auf die Apoptose zeigte, kann auch davon ausgegangen werden, dass das zusätzlich exprimierte Luciferase-Protein keinen Einfluss in diesem System hatte. Auch ein Einfluss der in beiden Replicon-Konstrukten etwas unterschiedlichen HCV-IRES zu Beginn des ersten offenen Leserahmens ist sehr unwahrscheinlich, da sie sich nur in der Anzahl von zwölf Basen unterscheiden. Nimmt man also an, dass sich die für die Apoptose relevanten Unterschiede auf die Sequenz der HCV-Proteine beschränken, so sind das NS3-, NS4B- und

Diskussion: HCV & Apoptose

das NS5B- Protein betroffen. Sowohl für das NS3- als auch für das NS5B-Protein gibt es bereits Beobachtungen, wonach beide Proteine proapoptotische Eigenschaften haben sollen (Prihod'ko et al., 2004, Siavoshian et al., 2005). Dabei wurde im Falle von NS3 eine erhöhte Caspase 8-Aktivität beobachtet. Da diese Caspase 8 charakteristisch für den extrinsischen Apoptoseweg ist, passen die Berichte zu den vorgestellten Ergebnissen. Zudem wurde von Kalkari *et al.* (2001) eine Apoptose-induzierende Wirkung durch ein HCV-RNA-Genom beschrieben. Einen proapoptotischen Effekt eines subgenomischen Replicons konnten Nomura-Takigawa *et al.* 2006 im Zusammenhang mit NS4A detektieren. Jedoch war dieser Effekt im Falle einer Act. D-induzierten Apoptose beobachtet worden, was durch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten nicht gestützt wird. Die aufgeführten Untersuchungen zeigen aber, dass sich HCV-Proteine, die sich in beiden verwendeten Replicon-Konstrukten unterscheiden, positiv auf die Induktion von Apoptose auswirken können.

Weiterhin kann sich eine Mutation eines viralen Proteins auch auf andere Proteine auswirken, wie im Falle der NS5A-Hyperphosphorylierung in Abhängigkeit zu Mutationen im NS4B-Protein gezeigt werden konnte (Appel et al., 2005). Auch für die huh ET Zellen konnte eine starke Reduktion der NS5A-Hyperphosphorylierung im Gegensatz zu huh9-13 Zellen beobachtet werden, obwohl dieses Protein nicht direkt von den Zellkultur-adaptiven Mutationen betroffen ist (Daten nicht gezeigt). Deshalb wirken sich möglicherweise die Mutationen in NS3, NS4B und NS5B nicht direkt, sondern über die Modulation anderer HCV-Proteine wie NS5A auf Apoptosemechanismen aus. Gerade im Hinblick auf das NS5A-Protein zeigen jedoch die meisten Untersuchungen einen antiapoptotischen Effekt sowohl auf TNF α -vermittelte Apoptose (Ghosh et al., 2000a, Miyasaka et al., 2003) als auch auf den intrinsischen Apoptoseweg (Street et al., 2004). Bei letzteren Untersuchungen wurde sogar eine antiapoptotische Wirkung eines Replicons in huh7 Zellen bei der Verwendung von Etoposide beobachtet. Jedoch unterscheidet sich das verwendete Protokoll erheblich von dem hier vorgestellten Verfahren.

Trotz all dieser Überlegungen bleibt die Frage nach der physiologischen Relevanz und dem Nutzen eines solchen proapoptotischen Effektes, da das Virus eigentlich bestrebt sein sollte, eine bestmögliche Virusausbreitung und Vermehrung zu erreichen. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich unvollständige HCV-Genome - es wurden Zelllinien mit subgenomischen Replicons verwendet - proapoptotisch auswirken können, um so Zellen zu eliminieren, die defekte Genome replizieren. Somit würde die Produktion infektiöser Viren begünstigt. Das komplette HCV-Genom wiederum könnte sich aber antiapoptotisch verhalten, wie im Falle des Hepatitis B Virus. Bei diesem Virus ist auch eine proapoptotische Wirkung von

Diskussion: HCV & Apoptose

subgenomischen Sequenzen zu beobachten (persönliche Mitteilung, Su et al., 2001; Su & Schneider, 1997), während das komplette Genom antiapoptotisch wirkt (Lu et al., 2005, Nakanishi et al., 2005). Die Verwendung des seit kurzem zur Verfügung stehenden Zellkultur-Infektionsmodells für HCV sollte helfen, diese Frage zu beantworten. Da das Hepatitis C Virus häufig chronifiziert und dabei eine hohe Virusproduktion nicht unbedingt von Vorteil ist um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, ist zudem denkbar, dass über eine erleichterte Apoptose zu stark virusproduzierende Zellen eliminiert werden. Dieses wiederum könnte für die Chronifizierung der Infektion von Vorteil sein.

Da sich beide Replicon-Konstrukte unterschiedlich verhalten, muss zudem die Frage gestellt werden, welches Replicon den Zustand in der infizierten Zelle besser widerspiegelt. Die attraktivste Vermutung wäre die Annahme mehrerer HCV-Subpopulationen im Falle einer Infektion, die sich in ihrer Auswirkung auf die rezeptorvermittelte Apoptose unterscheiden und die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion auftreten. Das Auftreten solcher Variationen der HCV-Sequenz (Quasispeziesbildung) im Verlauf einer Infektion wurde schon bei Infektionsversuchen mit Schimpansen gezeigt (Major et al., 1999).

Beide untersuchten Replikon-Konstrukte sind artifiziell. Das zeigt sich schon an der Tatsache, dass sich die HCV-RNA nur in teilenden huh7 Zellen gut repliziert, wohingegen aber infizierte Leberzellen so gut wie gar nicht proliferieren (Pietschmann et al., 2001). Zudem führen zellkulturadaptive Mutationen innerhalb der HCV-Sequenz, die eine erfolgreiche Replikation in der Zellkultur erlauben, zum Verlust der Infektiosität im Schimpansenmodell (Bukh et al., 2002).

Nichtsdestotrotz liefern die diskutierten Experimente wichtige Anhaltspunkte für die genauere Erforschung der Wechselwirkung des Hepatitis C Virus mit dem zentralen Zellmechanismus der Apoptose. Da mit „stabilen“ Zelllinien gearbeitet wurde und somit keine Transfektionsereignisse nötig waren, konnte zudem eine große Fehlerquelle gerade in Bezug auf Apoptose umgangen werden. Bei einer Transfektion werden Zellen zum einen durch die fremde Nukleinsäure und zum anderen durch die Überproduktion eines Fremdproteins gestresst bzw. geschädigt, was die Ergebnisse verfälschen könnte. Wenn im Falle von transienten Replicon-Zellen für die Transfektion zudem RNA verwendet wird, können durch die bei der Replikation auftretenden doppelsträngigen RNA-Moleküle antivirale Mechanismen aktiviert werden (Biron, 1999, Pflugheber et al., 2002). Die verwendeten Repliconzellen hingegen enthielten das Replicon schon seit zahlreichen Passagen. Zudem wurde mit der Verwendung von Annexin-V-Färbungen eine Detektionsmethode gewählt, die sowohl Apoptose über den intrinsischen als auch extrinsischen Weg detektiert. Auch lässt sie eine genaue Quantifizierung

Diskussion: HCV & Apoptose

der apoptotischen Zellen zu. Durch die Kombination mit einer PI-Färbung kann zuverlässig eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen getroffen werden.

Es wurde im Laufe der Experimente deutlich, wie wichtig die Wahl des Modellsystems ist, in dem Versuche zu einer bestimmten Fragestellung durchgeführt werden, auch in Hinblick auf die Vergleichbarkeit verschiedener Ergebnisse zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen. Bei den dargelegten Arbeiten wurde ein starker Einfluss des Zellhintergrundes auf die untersuchten Effekte beobachtet. Solch ein Einfluss wurde zuvor schon bei der Etablierung des Infektionsmodells für HCV beobachtet (Lindenbach et al., 2005, Wakita et al., 2005). Das verdeutlicht die Anfälligkeit von Arbeiten mit Zellsystemen wie z.B. huh7 Zellen, die von sich aus eine hohe Genominstabilität besitzen und sich in Kultur fortlaufend zu verändern scheinen (Windisch et al., 2005). Diese Veränderungen können sich dann, wie gezeigt, drastisch auf untersuchte Fragestellungen auswirken. Verdeutlicht wurde diese Veränderung des Zellhintergrundes durch die Tatsache, dass sich die huh9-13 Zellen schon morphologisch deutlich von den huh7 und huh ET Zellen unterscheiden. Dieser Unterschied blieb auch nach der Eliminierung des Replicons bestehen. Im Gegensatz dazu teilten sich die huh ET Zellen etwas langsamer als die huh7 bzw. huh9-13 Zellen. Obwohl viele Ergebnisse zu der Fragestellung der Wechselwirkung von HCV und Apoptose in Nicht-Leberzelllinien durchgeführt wurden (Ezelle et al., 2001, Francois et al., 2000, Prikhod'ko et al., 2004, Siavoshian et al., 2005), ist die Verwendung von Leberzelllinien im Falle eines lebertropen Virus wie HCV aber trotzdem der Verwendung anderer Zellsysteme vorzuziehen.

Um die Ergebnisse zum Einfluss der HCV-Replicon-Konstrukte auf rezeptorvermittelte Apoptose zu verifizieren, sollten in Zukunft Experimente durchgeführt werden, bei denen die entsprechenden Replicon-Konstrukte in Zellen transfiziert und daraufhin die Sensitivitäten verglichen werden. Dabei sollten Versuche, bei denen das ET-Replicon in kuriierte huh9-13 Zellen transfiziert wird und umgekehrt, Aufschluss darüber geben, ob möglicherweise nur die Kombination eines gewissen Zellhintergrundes mit einem speziellen Replicon zu einem beobachteten Effekt führt.

Abschließend ist festzuhalten, dass sich mit den verwendeten Replicon-Zelllinien kein Einfluss der HCV-Proteine NS3-NS5B auf die mitochondrial-vermittelte Apoptose detektieren ließ. Es konnte jedoch ein starker proapoptotischer Einfluss eines HCV-Replicons im Zusammenhang mit der rezeptorvermittelten Apoptose gezeigt werden, anscheinend abhängig von bestimmten Mutationen innerhalb der HCV-Sequenz oder möglicherweise in Abhängigkeit vom Zellhintergrund.

5.2 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). Auch im Falle von Tumoren, die durch Viren wie HBV und HCV verursacht werden, sind Änderungen der Regulationsmechanismen für Zellwachstum und Differenzierung bekannt. (Brecht, 2004, Kisseljov, 2000, Levrero, 2006, Stoker, 1974). Dabei spielen häufig die viralen Proteine eine entscheidende Rolle (Miller & Raab-Traub, 1999).

Ein zentraler Signalweg für Zellwachstum und Differenzierung ist der Raf-1/ERK-abhängige MAP-Kinaseweg. Die Fehlregulation dieser Signalkaskade durch virale Faktoren ist z.B. für das HBV-X-, das HBV-PreS2- (Hildt & Hofschneider, 1998, Hildt et al., 2002, Klein & Schneider, 1997) und das Hepatitis E Virus-ORF3-Protein beschrieben worden (Korkaya et al., 2001). Zudem ist der MAP-Kinaseweg in vielen Tumorarten fehlreguliert (Miller & Raab-Traub, 1999, Rapp et al., 1983). Auch in hepatozellulären Karzinomen (HCC) konnte eine gesteigerte Aktivität von Abschnitten dieses Signalweges beschrieben werden. Zudem beeinflussen Hepatitis B, C und E Viren, deren Auftreten mit der Entstehung von HCCs in Verbindung gebracht wird, die MAP-Kinasesignalweiterleitung (Huynh et al., 2003, Panteva et al., 2003). Daher ist bei der Untersuchung molekularer Mechanismen der Virus-assoziierten Krebsentstehung die Erforschung der Einflüsse der entsprechenden Viren auf den MAP-Kinase-Signalweg von großer medizinischer Bedeutung.

Im Falle des NS5A-Proteins wurde bereits ein inhibitorischer Einfluss auf den Raf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinaseweg auf der Ebene der Aktivierung von MEK1/2 und ERK beobachtet (Macdonald et al., 2003, Tan et al., 1999). In eigenen Arbeiten konnte zudem festgestellt werden, dass sich die Inhibition von Raf-1, aber nicht die von MEK1/2 negativ auf die HCV-Replikation auswirkt. Daher sollte im Zuge der vorgestellten Arbeit der Einfluss von NS5A auf den MAP-Kinasesignalweg direkt auf Ebene von Raf-1 untersucht werden.

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

Bei Transfektionsexperimenten stellte sich heraus, dass sich die transiente Expression von NS5A steigend auf die Phosphorylierung des Serinrests 338 (Ser338) von Raf-1 auswirkt. Die Phosphorylierung des Serinrests 338 geht mit der Aktivierung innerhalb der MAP-Kinase-Kaskade einher und ist für diese notwendig (Chong et al., 2001, Mason et al., 1999).

Diskussion: NS5A & Raf-1

Die beobachtete Steigerung der Ser338-Phosphorylierung durch NS5A fiel mit dem Faktor 1,4 relativ schwach aus. Aber auch die Positivkontrolle von PMA-stimulierten Zellen war mit dem Faktor 1,7 nicht viel stärker. Die Signifikanz der beobachteten Effekte konnte durch mehrfache Wiederholungen sichergestellt werden. Die schwachen Steigerungen der Raf-1-Phosphorylierung selbst nach PMA-Stimulation sind mutmaßlich dadurch begründet, dass die Zellen in Anwesenheit von FCS kultiviert wurden. In diesem Zusatz sind auch Wachstumsfaktoren enthalten, die den MAP-Kinaseweg aktivieren und somit zu einer hohen Hintergrundaktivität im System führen. Diese wurde teilweise durch die Reduktion des FCS-Zusatzes herabgesetzt. Ein anderes grundlegendes Problem ist die Tatsache, dass es sich bei den verwendeten huh7 Zellen um eine Hepatomzelllinie handelt (Nakabayashi et al., 1982) und solche Krebszelllinien *per se* häufig aktive Wachstumssignalkaskaden aufweisen (Huynh et al., 2003, Sporn & Roberts, 1986). Diese Basalaktivität könnte nur mit einem Wechsel des Zellsystems umgangen werden. Da jedoch die etablierten Replicon-Systeme und Infektionsmodelle alle in huh7 Zellen generiert wurden und z.T. auch nur diese Zelllinie für die Replikation bestimmter HCV-Replicon-RNA permissiv ist (Lohmann et al., 2003), erschien die Verwendung dieser Zellen am sinnvollsten.

Die Untersuchung der auf huh7 Zellen basierenden Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET, erbrachte ebenfalls eine gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung am Ser338. In diesem Zusammenhang fiel sowohl die beobachtete Steigerung der Raf-1-Phosphorylierung in den Replicon-Zellen als auch die in der Positivkontrolle mit dem Faktor 2,5 deutlich stärker aus als in den vorangegangenen Experimenten. Trotz relativ großer Standardabweichungen stellten sich die Effekte als statistisch signifikant heraus.

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

Die Aktivierung von Raf-1 an Ser338 führt normalerweise zur Aktivierung von MEK1/2 durch die Phosphorylierung an den Serinresten 217 und 221 durch Raf-1 (Bondzi et al., 2000, Zheng & Guan, 1994). Jedoch konnten Experimente, die den Phosphorylierungsstatus von Ser217/221 untersuchten, keine Steigerung der MEK1/2-Phosphorylierung erkennen lassen und das, obwohl im selben Experiment eine deutlich gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis konnte durch ein zweites Experiment bestätigt werden, bei dem die Intensitäten der Signale jedoch nicht stark genug für eine sichere Quantifizierung waren. Zurückzuführen ist dies auf die relativ schwachen Signalintensitäten bei den Arbeiten mit den Antikörpern gegen die phosphorylierten Spezies von Raf-1, aber vor allem gegen die von MEK1/2. Das liegt unter anderem daran, dass die Expression der

Diskussion: NS5A & Raf-1

untersuchten Proteine in der Zelle im Vergleich z.B. zum *house-keeping* Gen Aktin gering ist. Hinzukommt, dass nicht jedes MEK1/2- bzw. Raf-1-Molekül phosphoryliert vorliegt. Daher ist die Menge der jeweiligen phosphorylierten Spezies und somit die Signale im Western Blot geringer als die der gesamten Raf-1- bzw. MEK1/2-Population. Das Problem der schwachen Intensitäten konnte nur teilweise durch lange Belichtungszeiten und hochsensitive Detektionsreagenzien relativiert werden.

Die Daten zur MEK1/2-Phosphorylierung werden von Arbeiten anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe unterstützt, wonach sich die NS5A-Expression weder auf die Phosphorylierung von ERK noch auf die Aktivierung der MAPK-abhängigen Transkriptionsfaktoren AP-1 und SRF (*serum response factor*) auswirkt (Bürckstümmer T, 2005).

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

Um den Bereich im NS5A-Protein einzugrenzen, der für die gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung verantwortlich ist, wurden verschiedene N- und C-terminale Deletionsmutanten von NS5A generiert. Da das Antiserum, mit dem die Detektion von NS5A durchgeführt wurde, mit einem N-terminalen Deletionkonstrukt generiert worden war, mussten an einen Teil der C-terminalen Deletionskonstrukte ein V5- bzw. hexa-His-*tag* angefügt werden um die Detektierbarkeit zu gewährleisten (vergl. Abb. 23.A). Die Funktionalität des Serums gegenüber den anderen Konstrukten konnte bereits mit Hilfe eines Insektenzell-Expressionssystem gezeigt werden. Im Falle von huh7 Zellen konnte jedoch weder für die C-terminalen Deletionskonstrukte ohne *tag* noch für die mit *tag* eine Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund dafür könnte der Membrananker am N-Terminus dieser Konstrukte sein, der einer erfolgreichen Expression entgegenwirkt. Wahrscheinlich aufgrund seiner physiologischen Struktur wurde trotz des Membranankers (Aminosäuren 1-30) nur das komplette NS5A-Protein (AS 1-449) ausreichend exprimiert.

Die Expression der N-terminalen Deletionskonstrukte fiel unterschiedlich stark aus (vergl. Ab3. 22.C), wobei im Falle der 105-449 NS5A-Variante im SDS-Gel eine Doppelbande detektiert wurde. Da in dem 105-449 NS5A-Protein noch die Serinreste enthalten sind, die für die Hyperphosphorylierung essentiell sind, ist davon auszugehen, dass es sich um unterschiedlich phosphorylierte Formen handelt, wobei die obere Bande dabei der hyperphosphorylierten Form entsprechen würde. Ähnliche hyperphosphorylierte Varianten des NS5A-Proteins, die ohne die Expression anderer HCV-Proteine gebildet werden, wurden

Diskussion: NS5A & Raf-1

bereits beschrieben (Asabe et al., 1997). Solche Konstrukte sind hilfreiche Instrumente bei der Untersuchung der Natur und Funktion der Hyperphosphorylierung des NS5A-Proteins.

Im Falle des Konstrukts 302-449 fehlen dem Protein einige potentielle Epitope, die theoretisch durch das Serum erkannt werden könnten. Daher ist die relativ schwache Intensität des zugehörigen Signals nicht unbedingt Ausdruck einer schwachen Expression.

Bei den Untersuchungen zur Raf-1-Phosphorylierung in Abhängigkeit von den N-terminalen NS5A-Deletionskonstrukten konnte beobachtet werden, dass sowohl das komplette NS5A als auch das kürzeste Konstrukt (302-449) eine gesteigerte Phosphorylierung von Raf-1 an Ser338 verursachten. Dabei fiel die Steigerung mit ca. 1,5fach im Falle des 302-449 Konstruktes trotz vergleichbarer Expression deutlich stärker aus als im Falle des kompletten NS5A (1,25fach). Überraschenderweise inhibierten die anderen Deletionsmutanten eine Raf-1-Phosphorylierung, wobei das 105-449 Konstrukt den größten Effekt zeigte (0,59fach), gefolgt von dem 211-449 (0,73fach) und dem 32-449 Konstrukt (0,82fach). Unter Berücksichtigung der Expressionsunterschiede kann man für die Mutanten 31-449, 105-449 und 211-449 vergleichbare Wirkungen auf die Phosphorylierung von Ser338 annehmen, wobei das Konstrukt 105-449 die deutlichste inhibierende Wirkung zeigt. Angesichts der vornehmlich nuklearen Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutanten kann die Inhibition mit der Tatsache erklärt werden, dass Raf-1 aufgrund einer Interaktion mit in den Zellkern gelangt, wie bereits in eigenen Arbeiten zu beobachten war (Burckstummer et al., 2006). Somit stünde ein Großteil von Raf-1 nicht mehr der Phosphorylierung an der Innenseite der Zellmembran zur Verfügung, die normalerweise nach der Stimulation eines entsprechenden Rezeptors stattfindet (Magnuson et al., 1994). Die beobachteten Effekte erlauben aber keine Aussage darüber, ob die Konstrukte nicht doch in der Lage wären, die Raf-1-Phosphorylierung zu steigern, sofern sie vornehmlich im Zytosol lokalisiert wären. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass das Konstrukt 302-449 die Raf-1-Phosphorylierung steigert. Im Unterschied zu den anderen verkürzten NS5A-Varianten ist dieses Protein sowohl im Zellkern als auch im Zytosol gleich verteilt. Daher steht mutmaßlich sowohl genug NS5A als auch Raf-1 im Zytosol zur Verfügung, um eine gesteigerte Phosphorylierung von Raf-1 zu ermöglichen und zu detektieren. Zudem zeigt dieses Ergebnis, dass die NS5A-Sequenz 302-449 ausreichend ist, um die gesteigerte Ser338-Phosphorylierung zu verursachen, vorausgesetzt, sie hat keine artifiziellen Ursachen, wie z.B. eine unphysiologische Faltung des Proteins. Weitere Experimente müssen klären, ob auch die ganze Sequenz notwendig ist. Zudem zeigen die Daten, dass die Membranständigkeit von NS5A nicht Voraussetzung ist, um eine gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung am Ser338 hervorzurufen.

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

Die Überlegungen des vorangegangenen Abschnitts führen zu der Frage, welcher molekulare Mechanismus dem beschriebenen Phänomen zugrunde liegt. Um diese Frage zu untersuchen, wurden zwei für eine Raf-1-Aktivierung verantwortliche Proteine, Ras und Proteinkinase C (PKC), inhibiert. Zudem wurde der Einfluss einer Inhibition von Raf-1 selbst untersucht. Gleichzeitig wurde die Funktionalität der verwendeten Inhibitionsmethoden auf Ebene der ERK-Phosphorylierung überprüft. Da ERK von MEK1/2 aktiviert wird, sollten sich Inhibitoren der oberhalb liegenden Schritte der Signalkaskade negativ auf die ERK-Phosphorylierung auswirken. Dabei wurde festgestellt, dass im Falle einer PMA-Stimulation der PKC-Inhibitor Gö 6976 in der Lage war, die ERK-Phosphorylierung zu hemmen, wenn auch nicht vollständig. Die als Kontrolle verwendeten MEK-Inhibitoren PD 98059 und U0126 waren in der Lage, die Stimulation vollständig zu unterdrücken. Die geeigneten Konzentrationen der Inhibitoren waren zuvor von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe ermittelt worden (Daten nicht gezeigt). Da keine befriedigenden Inhibitoren für Ras und Raf-1 zur Verfügung standen, wurden die Zellen in diesen Ansätzen mit so genannten transdominant-negativen Mutanten dieser Proteine transfiziert. Diese Mutanten inhibieren bei einer Überexpression die Aktivität des entsprechenden Wildtyp-Proteins. Im Falle von Ras wurde die Mutante RasN17 und im Falle von Raf-1 die Deletionsmutante RafC4 verwendet (Cook et al., 1993, Miltenberger et al., 1993, Wood et al., 1992). Beide Mutanten waren nach Transfektion in der Lage, eine PMA- bzw. EGF-induzierte Phosphorylierung von ERK zu inhibieren. Im Falle von RasN17 wurde EGF verwendet, um sicher zu stellen, dass eine Aktivierung von Raf-1 über den EGF-Rezeptor verläuft und somit Ras involviert ist (Kolch, 2000). PMA hingegen führt direkt über eine Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Raf-1-Phosphorylierung (Castagna et al., 1982, Kolch et al., 1993).

Bei der Verwendung der verschiedenen Inhibitionsverfahren im Zusammenhang mit der NS5A-induzierten Raf-1-Phosphorylierung wurden die Zellen wie angegeben zusätzlich zu NS5A mit den entsprechenden transdominant-negativen Mutanten transfiziert oder mit den Substanzen inkubiert. Die Auswertung der Kontrollen dieses Experimentes zeigte eine deutliche Steigerung der Raf-1-Phosphorylierung durch NS5A (Faktor 1,5) und PMA (ca. Faktor 1,7; Positivkontrolle). Sowohl die Verwendung des PKC-Inhibitors Gö 6976 als auch der MEK-Inhibitoren PD 98059 und U0126 erbrachten weitere Steigerungen der Raf-1-Phosphorylierung über den Wert der NS5A-vermittelten hinaus (alle ca. Faktor 2,5). Da der Einsatz des PKC-Inhibitors keine Reduktion der NS5A-vermittelten Raf-1-Phosphorylierung zur Folge hatte, ist es wahrscheinlich, dass NS5A nicht über die PKC auf die

Diskussion: NS5A & Raf-1

Phosphorylierung von Raf-1 einwirkt. Die Steigerung des p-Raf-1-Gehaltes durch die MEK-Inhibitoren, die als Negativkontrolle gedacht waren, kann durch die Blockade einer *feed-back*-Schleife erklärt werden. So kann bei Aktivierung des MAP-Kinasesignalweges aktives ERK durch die Phosphorylierung von Raf-1 dieses direkt inaktivieren und somit den Signalweg abschalten (Dumaz & Marais, 2005). Ist dieser Mechanismus durch die MEK-Inhibitoren blockiert, könnte es bei gegebenem Stimulus zu einer Anhäufung von aktiviertem, also am Ser338-phosphoryliertem Raf-1 kommen. Sollte das Modell auch auf den PKC-Inhibitor anzuwenden sein, so müsste aktivierte PKC in Zellen ohne Inhibitor einen negativen Einfluss auf die NS5A-vermittelte Steigerung der Phosphorylierung am Serinrest 338 haben, möglicherweise über den MAP-Kinasesignalweg selbst unter Verwendung der erwähnten *feed-back*-Schleife. Somit könnte eine Inhibition der *feed-back*-Schleife auch in diesem Falle zu der Steigerung der Raf-1-Phosphorylierung führen. Bei derlei Überlegungen ist eine parallele und möglicherweise von dem konventionellen MAP-Kinaseweg unabhängige Einflussnahme von NS5A auf Raf-1 anzunehmen. Die unterschiedlichen Mechanismen könnten z.B. durch eine unterschiedliche Lokalisation voneinander getrennt sein.

Bei der Verwendung der transdominant-negativen Mutanten konnte im Falle von Ras kein Unterschied zwischen kontrolltransfizierter und mit RasN17 transfizierter Probe erkannt werden. Jedoch war schon im Falle der Kotransfektion mit pcDNA (Kontrolle) keine deutliche Steigerung durch NS5A mehr sichtbar (Faktor 1,13). Insofern war auch kein deutlicher Effekt durch RasN17 zu erwarten.

Bei der Analyse des Einflusses von RafC4 wurde in diesem Zusammenhang unter Berücksichtigung der kontrolltransfizierten Probe eine Reduktion auf den Basalwert festgestellt. Somit scheint sich die Inhibition von Raf-1 selbst negativ auf die NS5A-vermittelte Steigerung von p-Raf-1 auszuwirken. Grundlage könnte eine mögliche NS5A-induzierte Autophosphorylierung von Raf-1 sein. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung der Interaktion von NS5A mit Raf-1 unterstützt (Burckstummer et al., 2006). Zu dieser Annahme passt auch die beobachtete Steigerung der Ser338-Phosphorylierung durch die MEK-Inhibitoren. Eine mögliche Unterbrechung der *feed-back*-Schleife und die daraus resultierende Blockade einer Inaktivierung von Raf-1 durch ERK könnte eine Verstärkung der durch NS5A ausgelösten Steigerung der Raf-1-Phosphorylierung nach sich ziehen, die durch Raf-1 selbst amplifiziert wird. Da RafC4 aber vornehmlich im Zellkern lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt), ist auch eine Translokation von normalem Raf-1 in den Zellkern im Zuge einer RafC4-Raf-1-Interaktion denkbar. In diesem Fall würde dem Zytosol von Raf-1 entzogen und dieses könnte somit nicht mehr aktiviert werden. Die RafC4-vermittelte Inhibition wäre dann

Diskussion: NS5A & Raf-1

nur ein indirekter Effekt und würde keine Aussage über den Aktivierungsmechanismus von Raf-1 zulassen.

Um genauere Aussagen zu machen, müssen weitere Analysen mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen durchgeführt werden. So könnte im Falle der Raf-1-Inhibition eine andere transdominant-negative Mutante verwendet werden, die nicht in den Zellkern transloziert, wie z.B. die Raf-S621A Mutante (Dent et al., 1995, Morrison et al., 1993). Zudem müssen andere Kinasen mit in die Untersuchungen einbezogen werden, von denen bekannt ist, dass sie Raf-1 aktivieren können, wie z.B. PAK oder Src (Dumaz & Marais, 2005).

5.2.5 Zusammenfassende Betrachtungen und Ausblick

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich eine Expression von NS5A steigend auf die Phosphorylierung von Raf-1 am Serinrest 338 auswirkt. Dies konnte auch in zwei Replicon-Zelllinien, die neben anderen HCV-Proteinen auch NS5A exprimieren, bestätigt werden. Jedoch wurde keine NS5A-abhängige Steigerung der MEK1-Phosphorylierung an Ser217/221 beobachtet. Andere Arbeitsgruppen beschreiben hingegen eine Inhibition von ERK und MEK1/2 durch NS5A (Georgopoulou et al., 2003, Macdonald et al., 2003, Tan et al., 1999). Diese Inhibition von ERK konnte ebenfalls in einer Replicon-Zelllinie desselben Genotyps, der in den vorgestellten Experimenten verwendet wurde, bestätigt werden (Macdonald et al., 2005). Da aber bekannt ist, dass die Phosphorylierung von Raf-1 am Ser338 mit dessen Aktivität bezüglich der Phosphorylierung von MEK1/2 einhergeht, stellt sich die Frage nach der Wirkung der gesteigerten Raf-1-Phosphorylierung. In *in vitro*-Phosphorylierungsassays konnte eine gesteigerte Phosphorylierung von rekombinantem MEK durch immunpräzipitiertes Raf-1 sowohl im Falle von NS5A-transfizierten Zellen als auch im Falle von huh9-13 Replicon-Zellen gezeigt werden (Burckstummer et al., 2006). Somit korreliert die durch NS5A-induzierte Phosphorylierung von Raf-1 am Ser338 mit einer gesteigerten Aktivität gegenüber MEK *in vitro*. Jedoch müssen innerhalb der Zelle Mechanismen greifen, die *in vivo* eine Phosphorylierung von MEK durch NS5A-aktiviertes Raf-1 inhibieren. Eine Möglichkeit wäre, dass die Interaktion von NS5A und Raf-1 eine Bindung zwischen MEK1/2 und Raf-1 verhindert und somit keine MEK1/2-Phosphorylierung stattfinden kann. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Steigerung der Raf-1-Aktivität durch NS5A innerhalb der Zelle räumlich von MEK1/2 getrennt stattfindet. Durch die NS5A/Raf-1-Interaktion könnte Raf-1 an den Ort transloziert werden, an dem es für seine Funktion innerhalb des HCV-Lebenszyklus gebraucht wird. Mit dieser Theorie übereinstimmend konnte in Replicon-Zellen gezeigt werden, dass Raf-1 mit NS5A in punktförmigen Strukturen, möglichen

Diskussion: NS5A & Raf-1

Replikationskomplexen, kolokalisiert und dass sich das Fehlen von Raf-1 negativ auf die HCV-Replikation auswirkt (Burckstummer et al., 2006). Zudem wird diese Hypothese durch die Experimente mit den NS5A-Deletionsmutanten gestützt. Dabei wurde eine unterschiedliche Beeinflussung der Raf-1-Phosphorylierung in Abhängigkeit zur NS5A-Lokalisation beobachtet. Frühere Experimente beschreiben dementsprechend die gemeinsame Translokation von Raf-1 und NS5A-Deletionsmutanten in den Zellkern (Burckstummer et al., 2006). Auch für das HCV-Core-Protein konnte mittels *in vitro* Kinaseassays eine die Raf-1-Aktivität steigernde Wirkung beobachtet werden (Aoki et al., 2000). Ein synergistischer Effekt von NS5A- und Core-Protein auf die Funktionalität von Raf-1 wäre denkbar, zumal ein ähnlicher synergistischer Effekt auf den MAP-Kinaseweg schon für das LHBS- und das X-Protein von HBV postuliert wurde (Stockl et al., 2003).

Es wird vermutet, dass der inhibitorische Effekt von NS5A auf die ERK-Aktivität durch die Interaktion von NS5A mit Grb2 vermittelt wird, ein Faktor des MAP-Kinaseweges oberhalb von Raf-1 (Macdonald et al., 2004, Tan et al., 1999). Eine NS5A-vermittelte direkte Raf-1-Aktivierung wäre jedoch unabhängig von Grb2. Da aber in eigenen Experimenten keine NS5A-abhängige Aktivierung des Signalweges unterhalb von Raf-1 beobachtet wurde, müssen zwei voneinander entkoppelte Vorgänge existieren, wenn sowohl die NS5A-induzierte Hemmung des MAP-Kinase-Signalweges über die Grb2-Interaktion als auch eine gleichzeitige vom MAP-Kinaseweg unabhängige Raf-1-Aktivierung zutreffen. Beide Mechanismen wären über die Beteiligung von Raf-1 miteinander verbunden.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen auch, dass der gewählte Ansatz mit phospho-spezifischen Antikörpern die *in vivo*-Situation z.T. besser beschreiben kann, als *in vitro*-Phosphorylierungsassays. In folgenden Experimenten dieser Art müssen weitere, für die Regulation von Raf-1 wichtige, Phosphorylierungsstellen untersucht werden. Dies sollte ein genaueres Bild der NS5A-abhängigen Aktivierung von Raf-1 liefern. So ist nämlich auch die Phosphorylierung von Raf-1 an den Tyrosinresten 340 und 431 (Tyr340/341) im Zusammenhang mit einer Raf-1-vermittelten MEK-Aktivierung beschrieben (Huser et al., 2001). In Endothelzellen wurde zudem beobachtet, dass es bei einer Phosphorylierung von Raf-1 an Tyr340/341 zu einer Aktivierung des MEK/ERK-Weges kam, eine Phosphorylierung von Ser338/339 aber zu einer MEK-unabhängigen Translokation von Raf-1 zur Mitochondrienmembran führte (Alavi et al., 2003). Somit könnte die durch NS5A-induzierte Phosphorylierung von Ser338 möglicherweise eine von MEK losgelöste Funktion haben, wie z.B. die Translokation zum Ort der HCV-Replikation, die Phosphorylierung von HCV-Proteinen oder die Aktivierung oder Inhibition MEK-unabhängiger Signalwege. Ein Beispiel

Diskussion: NS5A & Raf-1

dafür ist die Raf-1-abhängige NF κ B-Aktivierung (Li & Sedivy, 1993). Da auch eine NS5A-abhängige Aktivierung von NF κ B angenommen wird (Gong et al., 2001, Waris et al., 2003), könnte man einen Mechanismus der NF κ B-Aktivierung unter Einbeziehung des Einflusses von NS5A auf Raf-1 vermuten. Weiterhin könnte auch die Raf-1-vermittelte Phosphorylierung von NS5A selbst ein möglicher Effekt der Raf-1-Aktivierung sein. Daten von Mitarbeitern deuten auf eine Phosphorylierung von NS5A durch Raf-1 hin (Bürckstümmer T., 2005). Somit ist eine sich selbst regulierende NS5A-Phosphorylierung mittels Raf-1 denkbar. Da der Phosphorylierungsstatus von NS5A bei der Replikation eine Rolle zu spielen scheint (Appel et al., 2005), könnte somit die Beobachtung erklärt werden, wonach sich die Inhibition von Raf-1 negativ auf die HCV-Replikation auswirkt (Burckstummer et al., 2006).

Weiterhin ist seit geraumer Zeit eine Rolle von Raf-1 innerhalb der durch Mitochondrien vermittelten Apoptose bekannt (Troppmair & Rapp, 2003). Sollte die durch NS5A erhöhte Raf-1-Phosphorylierung Einfluss auf damit verbundene Funktionen nehmen, könnte NS5A möglicherweise über die Modulation intrinsischer Apoptosewege einen Beitrag zur Entstehung eines HCV-assoziierten hepatozellulären Karzinoms leisten. Jedoch lassen die vorgestellten eigenen Arbeiten zur intrinsischen Apoptose solch eine Annahme unwahrscheinlich erscheinen (vergl. 5.1.5).

Weitere Experimente sollten zum einen die Domäne innerhalb von NS5A, die für die gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung verantwortlich ist, genauer eingrenzen und zum anderen klären, über welche Kinase dieser Effekt tatsächlich vermittelt wird. Zudem muss geklärt werden, welchen Effekt die gesteigerte Ser338-Phosphorylierung auf die Zelle oder das Virus hat. Für diese und weitere Experimente ist mit den gezeigten Daten ein Anfang gemacht, der möglicherweise nicht nur zu neuen Erkenntnissen der Funktion von Raf-1 innerhalb des HCV-Lebenszyklus, sondern auch zur Aufklärung alternativer Funktionen von Raf-1 in Unabhängigkeit vom MAP-Kinaseweg führen kann.

Festzuhalten ist, dass sich NS5A positiv auf die Raf-1-Phosphorylierung am Ser338 auswirkt, und dieses mutmaßlich vom MAP-Kinaseweg unabhängige Konsequenzen hat.

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

Ein weit verbreitetes Modell zur Untersuchung der Eigenschaften viraler Proteine sind transgene Mäuse (Koike et al., 2002, Nita et al., 2002). Mit dieser Methode konnte beispielsweise die kanzerogene Wirkung des HBV X-Proteins gezeigt werden (Kim et al., 1991). Auch für das Hepatitis C Virus wurden bereits transgene Mäuse verwendet, um z.B. die Rolle des Core-Proteins bei der HCC-Entstehung zu analysieren (Moriya et al., 1998, Soguero et al., 2002).

Um den Einfluss des HCV Nicht-Strukturproteins 5A auf die Leber und seine Funktion *in vivo* untersuchen zu können, wurde ein transgenes Mausmodell für NS5A auf dem Hintergrund von FVB/N-Mäusen etabliert. Da NS5A eine Vielzahl von zellulären Mechanismen beeinflusst, die unter anderem auch beim Zellwachstum und Differenzierung eine Rolle spielen (vergl. 1.2.2 und 1.2.3), wird von einer zentralen Rolle des NS5A-Proteins in der HCV-assozierten Entstehung von hepatozellulären Karzinomen (HCC) ausgegangen (Block et al., 2003). Diese These sollte mit dem vorgestellten Mausmodell *in vivo* untersucht werden. Als NS5A-Sequenz wurde der HCV-Genotyp 1b verwendet, da HCV-Infektionen dieses Genotyps sich nur in wenigen Fällen mit einer IFN-Therapie behandeln lassen (Di Bisceglie, 2002, Garson et al., 1995). Daher kommt es im Falle des Genotyps 1b auch verstärkt zur Chronifizierung der Erkrankung und zur Entstehung von Leberpathologien wie Zirrhosen und der Entstehung von HCCs (Hatzakis et al., 1996, Zein et al., 1996).

5.3.1 Expression von NS5A in transgenen Mäusen

Da NS5A-transgene Mäuse und Wildtyp-Tiere äußerlich nicht zu unterscheiden waren, mussten die Tiere mittels PCR genotypisiert werden. Um Effekten vorzubeugen, die durch eine Insertion des Transgens in ein zelleigenes Gen zustande kommen könnten, da dieses zerstört werden würde, wurden die Tiere im heterozygoten Zustand gehalten. In vielen Fällen kann nämlich die Funktion eines so zerstörten Gens durch das gleiche Gen auf dem entsprechenden zweiten Chromosomen ersetzt werden. Dadurch vermindert sich das Risiko eines Phänotyps, der nicht durch die Expression des Transgens hervorgerufen wird. Ein weiteres Risiko bei der Integration des Transgens in die genomische DNA ist, dass auch der verwendete Promotor des Transgens ein benachbartes zelluläres Gen artifiziell beeinflussen könnte. Um solche Effekte zu identifizieren, wurde mit zwei *founder*-Linien gearbeitet (*founder* 01 und 03). Unterschiedliche *founder*-Linien sind transgene Mauslinien, die in unabhängigen Mikroinjektionsereignissen generiert wurden. Diese enthalten dasselbe Transgen, jedoch ist es sehr unwahrscheinlich, dass es zweimal an derselben Stelle des

Diskussion: NS5A-transgene Maus

Genoms integriert wurde. Daher ist auszuschließen, dass bei zwei unterschiedlichen *foundern* zweimal derselbe artifizielle Effekt verursacht wird.

Die Expression des Transgens konnte mit Hilfe von Western Blot-Analysen von Leberlysaten bestätigt werden. Dabei wurde ein Antikörper verwendet, der den V5-*tag* des Transgens erkennt. Die dem Transgen entsprechende Bande konnte in der erwarteten Größe von ca. 60 kDa detektiert werden. Auch die Verwendung eines NS5A-spezifischen Antiserums erbrachte eine Bande an derselben Position, wodurch nachgewiesen wurde, dass es sich bei der detektierten Bande um NS5A handelte (Daten nicht gezeigt). Jedoch war die Sensitivität des NS5A-spezifischen Antiserums wesentlich geringer als die des V5-spezifischen. Deshalb wurden weitere Western Blot-Analysen bezüglich der Expression des Transgens mit dem V5-spezifischen Antikörper durchgeführt. Es ließen sich in den Western Blot-Experimenten keine Spaltprodukte von NS5A detektieren, wohl aber eine unspezifische Nebenbande, die bei ca. 43 kDa von dem anti V5-*tag* Antikörper erkannt wurde.

Bei dem Vergleich der Transgenexpression im Falle der beiden *founder* 01 und 03 zeigte sich, dass in beiden Fälle ein Protein derselben Größe detektiert wurde. Das bestätigt die Annahme, dass es sich bei dem detektierten Protein jeweils um NS5A handelt und nicht um ein durch das Transgen induziertes Gen. Weiterhin lässt sich aus den Ergebnissen erkennen, dass das komplette Gen in das Genom integriert wurde und NS5A vollständig exprimiert wird. Diese Annahme wird zudem dadurch bestätigt, dass zum einen auch die Verwendung eines Vorwärts-Primers, der im β -Globin-Intron bindet, für eine erfolgreiche Genotypisierungs-PCR verwendet werden konnte, somit also der 5'-Bereich des Transgens vollständig ist. Zum anderen bestätigt die Detektion des V5-*tags* eine vollständige 3'-Sequenz. Bei beiden *founder*-Linien wurde in etwa dieselbe Expressionstärke des Transgens beobachtet. Somit ist von einer vergleichbaren Anzahl von Integraten in das Mausgenom auszugehen. Diese Beobachtung konnte auch durch Southern Blot-Analysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Lokalisation des Transgens innerhalb der Zellen zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnte die zytoplasmatische Lokalisation von NS5A in allen untersuchten Leberzellen beobachtet werden. NS5A konnte dabei verstärkt um den Zellkern herum detektiert werden. Das spricht für eine Lokalisation unter anderem am ER, was für NS5A auch im Falle des Replicon-Modells beschrieben wurde (Lohmann et al., 1999, Pietschmann et al., 2001). Dass NS5A nicht im Zellkern anzutreffen war, zeigt, dass die Funktion des N-terminalen Membranankers trotz vorgeschaltetem hexa-His-*tag* nicht beeinflusst ist. Würde dessen Funktion durch den *tag* aufgehoben sein, würde

Diskussion: NS5A-transgene Maus

man - wie im Falle von N-terminalen Deletionsmutanten - NS5A auf Grund seiner NLS im Zellkern vermuten (vergl. 4.2.3). Es ist daher festzuhalten, dass NS5A im transgenen Mausmodell so lokalisiert ist, wie es aus vielen Untersuchungen her bekannt ist. Somit sollte eine mögliche Einflussnahme nicht durch eine artifizielle Lokalisation unterbunden sein.

5.3.2 Leberspezifische und stabile NS5A-Expression in transgenen Mäusen

Bei der Untersuchung eines leberspezifischen Virus sollte die Expression des Transgens auf die Leber begrenzt sein. Deshalb wurde ein *Albumin-Promotor/Enhancer*-Konstrukt verwendet. Mit Hilfe der Untersuchung von Lysaten verschiedener Organe wie Leber, Herz, Milz, Lunge und Niere konnte die leberspezifische Expression von NS5A bestätigt werden. Durch die Analyse von Mäusen verschiedenen Alters konnte zudem eine klare Transgenexpression bei jungen (drei Monate) und alten (zwölf Monate) Tieren festgestellt werden. Bei weiblichen Tieren wurde zumeist im Vergleich zu ihren männlichen Artgenossen eine leicht schwächere Expression festgestellt. Somit ist von einer stabilen Expression des Transgens in allen untersuchten Mäusen auszugehen, was gerade im Hinblick auf Langzeitexperimente entscheidend ist. Zudem ist durch die Leberspezifität der Expression gesichert, dass mögliche Effekte in der Leber keine Sekundärscheinungen sind, die durch Schädigungen anderer Organe durch das Transgen hervorgerufen wurden (z.B. Metastasierung).

5.3.3 NS5A verursacht keine pathologischen Veränderungen in den Lebern transgener Mäuse

Bei der Untersuchung eines möglichen Einflusses von NS5A auf die Histologie der Leber transgener Tiere wurden Mäuse verschiedenen Alters hinsichtlich Leberschädigungen untersucht. Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Lebensbedingungen der Tiere zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Kontrolltiere den gleichen Würfen entstammten. Die transgenen Tiere unterschieden sich weder im Aussehen noch im Gewicht von den untersuchten Kontrolltieren (Daten nicht gezeigt). Bei der Untersuchung von mindestens 33 transgenen Tieren und 31 Wildtyp-Tieren im Alter zwischen drei und zwölf Monaten konnten zudem keine makroskopischen Veränderungen der Leber, wie z.B. Tumore, entdeckt werden. Auch histologische Untersuchungen mit Hilfe von H/E-gefärbten Paraffinschnitten von Leberpräparaten erbrachten keine Unterschiede zwischen den Lebern von transgenen Tieren und Kontrolltieren, unabhängig von der *founder*-Linie (Daten nicht gezeigt). Da Färbungen mit Hämatoxylin und Eosin unspezifisch den Zellkern bzw. das Zytosol anfärben, gibt diese Methode nur Auskunft über die Form, den allgemeinen Zustand

Diskussion: NS5A-transgene Maus

der Zelle und die Zellart bzw. Infiltrationen anderer Zellen in das Gewebe. Jedoch können keine Aussagen über eventuelle frühe transformierende Vorgänge oder Änderungen des Stoffwechsels getroffen werden. Um Letzteres zu untersuchen, wurden PAS-Färbungen von Paraffinschnitten angefertigt. PAS färbt den Glykogenspeicher innerhalb der Leberzellen an (Zhu et al., 2004). Jedoch erbrachten Vergleiche von PAS-gefärbten transgenen und Wildtyp-Lebern keine Unterschiede. Somit ist nicht von NS5A-bedingten Veränderungen innerhalb dieses zentralen Stoffwechselweges in den Leberzellen auszugehen.

Um eine mögliche Veränderung des Proliferationsverhaltens der transgenen Leberzellen zu erkennen, wurden Leberlysate verschiedener männlicher Tiere auf ihren PCNA-Gehalt hin untersucht. PCNA kommt hauptsächlich in proliferierenden Zellen vor (Baserga, 1991). Da sich Leberzellen einer gesunden Leber nicht mehr teilen, würde bei einem möglichen Einfluss des Transgens hin zur Zellproliferation eine gesteigerte PCNA-Expression erwartet werden. Die Fehlregulation der Zellteilung ist Grundvoraussetzung für die Entstehung eines Tumors im Falle eines HCCs (Nita et al., 2002). Beim Vergleich von vier transgenen und vier Wildtyp-Tieren gleichen Alters konnten jedoch im Mittel keine Unterschiede in der PCNA-Expression festgestellt werden. Eine normale Zellproliferation wird zudem durch den Befund unterstützt, dass sich transgene und nicht transgene Lebern im Durchschnitt in Größe und Gewicht nicht unterscheiden (Daten nicht gezeigt) und kein verstärktes Auftreten von apoptotischen Zellen in einer der beiden Gruppen in den histologischen Präparaten beobachtet werden konnte. Dieses wäre aber bei einer Fehlregulation der Zellteilung zu erwarten gewesen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich die Expression von NS5A weder auf die Histologie, die Physiologie noch auf die Zellteilung der betroffenen Lebern auswirkt. Es konnten mit Hilfe der verwendeten Methoden keine Unterschiede zu den Kontrollorganen festgestellt werden.

5.3.4 NS5A zeigt keine Tumorpromotor-Eigenschaften nach Bestrahlungs-Ereignissen

Die gezeigten Daten verdeutlichen, dass NS5A allein nicht die Bildung von Tumoren auslösen kann. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass das Protein erst nach einem erfolgten kanzerogenen Initiations-Ereignis eine Tumor-Promotor-Wirkung zeigt. Daher wurden die Tiere mit Gamma-Strahlung in einer subletalen Dosis von 3 Gy bestrahlt, um eine Tumorbildung zu initiieren. Nach zwei, vier bzw. sechs Monaten wurden die Tiere getötet und die Lebern auf Tumorbildung hin untersucht. Es konnten jedoch weder bei 36 transgenen

Diskussion: NS5A-transgene Maus

noch bei 33 Kontrolltieren Lebertumore beobachtet werden. Zudem wurde keine Tumorbildung in anderen Organen der Mäuse entdeckt.

Das Fehlen jeglicher Tumorbildung legt die Vermutung nahe, dass die Bestrahlungsdosis zu gering war. Jedoch ist diese Dosis zuvor im Zusammenhang mit p53-defizienten Mäusen erfolgreich verwendet worden (Kaizu et al., 2000). Diese Experimente wurden aber mit Mäusen des Stammes C3H durchgeführt. In dem vorgestellten transgenen Mausmodell für NS5A wurden Tiere des FVB/N-Stammes verwendet. Für diese Mäuse ist beschrieben, dass sie auch in höherem Alter sehr wenige spontane Tumore entwickeln (<http://jaxmice.jax.org/strain/001800.html>). Daher ist davon auszugehen, dass diese Mäuse auch im Falle von Bestrahlungen relativ „Tumor-resistent“ sind und es daher besser geeignete Mausstämme für derartige Experimente gibt. Laufende Rückkreuzungen des Transgens in einen C57/Bl6-Maushintergrund ermöglichen in naher Zukunft neue Bestrahlungsexperimente unter besseren Voraussetzungen des Maushintergrundes.

Um eine möglicherweise beginnende Leberschädigung durch die Kombination von Transgen und Bestrahlung zu erkennen, wurde der Gehalt von Glutamat-Pyruvat-Transferase (GPT bzw. ALT) im Serum von transgenen Mäusen und Kontrolltieren zwei Monate nach Bestrahlung untersucht. Dabei ergaben sich jedoch im Mittel keine Unterschiede im GPT-Gehalt der Seren. Daher ist zwei Monate nach Bestrahlung nicht von einer andauernden Schädigung der transgenen Lebern auszugehen.

Auch bei histologischen Untersuchungen transgener und nicht transgener Tiere mittels H/E-Färbung wurden sechs Monate nach Bestrahlung keine Unterschiede der NS5A-exprimierenden Lebern in Vergleich zu den Kontrollorganen beobachtet. Zudem wurden in allen untersuchten Tieren keine deutlichen Anzeichen einer Tumorbildung entdeckt, die sich aber innerhalb eines halben Jahres manifestiert haben sollten und somit detektierbar sein sollten.

Auch im Falle der bestrahlten Tiere wurden PAS-Färbungen angefertigt, die aber - wie auch bei den nicht bestrahlten Tiere - keine klaren Unterschiede zwischen transgenen und nicht transgenen Mäusen erbrachten. Jedoch waren nach der Bestrahlung in der PAS-Färbung vermehrt abgegrenzte Regionen mit starker PAS-Färbung zu beobachten, was auf eine Fehlregulation des Glykogenhaushaltes in den betroffenen Zellen hindeutet. Diese Areale schienen im Falle der transgenen Tiere in größerem Ausmaß aufzutreten als bei den Kontrolltieren. Jedoch war dieser Befund nicht besonders ausgeprägt.

Um Expressionsänderungen von Oberflächen-Glykoproteinen der Zellmembran der Leberzellen zu untersuchen, wurden Lectin-Färbungen von Leberpräparaten angefertigt.

Diskussion: NS5A-transgene Maus

Glykoproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Erkennung und der Verankerung der Zellen im Gewebe. Bei der Transformation normaler Zellen zu Krebszellen ändert sich häufig auch deren Glykosylierungsmuster (Laack et al., 2002, Schumacher et al., 1994). Dabei geht die Malignität des Tumors z.T. mit der Anwesenheit bestimmter Glykosylierungsmuster einher (Hakomori, 1989, Bhavanandan 1991) und in vielen Fällen kann ein linearer Zusammenhang zwischen dem Metastasierungspotential eines Tumors und der Konzentration an bestimmten Zuckerresten beobachtet werden (Fogel 1983, Bresalier 1990, Sawada 1994). Derartige Veränderungen können mit Hilfe von Lectinen detektiert werden und wurden durch die Verwendung von insgesamt zehn unterschiedlichen Lectinen zwei Monate nach Bestrahlung in den Mausethern untersucht. Es konnten jedoch keine Unterschiede im Muster der untersuchten Zuckerreste bei transgenen Lebern und Kontrolllebern detektiert werden. Dabei erbrachte die Verwendung von sechs Lectinen in beiden Fällen keine Anfärbung, bei vier verwendeten Lectinen zeigte sich hingegen sowohl in NS5A-transgenen als auch nicht transgenen Tieren eine deutliche Anfärbung. Somit ist nicht davon auszugehen, dass sich das Transgen auf die Expression der untersuchten Glycoproteine auswirkt und transformierende Vorgänge hervorruft oder begünstigt, die sich in einem veränderten Glycosylierungsmuster widerspiegeln.

Somit erbrachten alle durchgeführten Untersuchungen an transgenen und nicht transgenen Mäusen nach Bestrahlung mit Gamma-Strahlung keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Daher ist nicht davon auszugehen, dass NS5A einen positiven Einfluss auf die Entstehung oder Promotion von Lebertumoren hat. Es wurden zudem keine Anzeichen für eine anderweitige Leberschädigung, wie z.B. eine Zirrhose, beobachtet. Die Ergebnisse werden dadurch allerdings relativiert, dass nach der Bestrahlung keinerlei Tumorbildung bei den Tieren beobachtet wurde.

5.3.5 NS5A-bedingte Änderung der Genexpression in Leberzellen

Um einen Überblick darüber zu erhalten, ob durch die Expression von NS5A die Expression anderer Gene verändert wird, wurden Genexpressions-Studien von den Lebern dreier transgener bzw. nicht transgener Mäuse der *founder*-Linie 01 durchgeführt. Die *Micro-Array* Analysen umfassten 15.000 Gene. Dabei stellte sich bei NS5A-transgenen Lebern im Falle von 52 Genen eine verstärkte Expression auf mRNA-Ebene heraus und im Falle von 44 Genen eine verminderte. Davon ließen sich von den positiv regulierten Genen 22 bekannten Proteinprodukten zuordnen, im Falle der negativ regulierten Gene waren es 15. Der Großteil der Gene mit veränderter Expression betraf die Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Entwicklung (9 verstärkt exprimiert (↑), 5 vermindert exprimiert (↓)).

Diskussion: NS5A-transgene Maus

Eine weitere häufig vertretene Gruppe betraf Gene der Zell-Zell-Erkennung, des Vesikel-Transports und der Zellskelett/Struktur (5 ↑, 4 ↓). Insgesamt unterliegen drei Gene einer abweichenden Regulation, die im Zusammenhang mit Apoptose beschrieben sind (2 ↑, 1 ↓) und vier, die bei der Proteindegradation bzw. der Proteinubiquitinierung eine Rolle spielen (1 ↑, 3 ↓). Die restlichen Gene sind diesen Gruppen nicht zuzuordnen und betreffen unterschiedliche Mechanismen (5 ↑, 2 ↓). Bei den Genen für Zellproliferation, Differenzierung und Entwicklung ist hervorzuheben, dass drei Gene, die im Umfeld von MAP-Kinasesignalwegen eine Rolle spielen, verstärkt (*Mitogen-activated protein kinase 4*, *Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase*, *GIPC PDZ domain containing family*) und drei vermindert exprimiert werden (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4*, *Ras and Rab interactor 2 (Rin2)*, *Cdc42 GTPase-activating protein (Cdgap)*). Da eine Einflussnahme von NS5A auf MAP-Kinase-Signalwege von unserer und anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde, könnten diese Daten neue Ansätze bei der Untersuchung dieser Wechselwirkung erbringen.

Die Einflussnahme von NS5A auf die Expression von insgesamt neun Genen aus der Gruppe der Zell-Zell-Erkennung, Vesikel-Transport und Zellskelett/Struktur ist in Hinblick auf eine mögliche Rolle von NS5A bei der HCC-Entstehung von Interesse, da bei der Transformation von Zellen auch Mechanismen der Zell-Zell-Erkennung und Zell-Adhäsion von Änderungen betroffen sind (Nita et al., 2002). Vor allem Cadherine spielen bei der Zell-Zell-Interaktion eine zentrale Rolle (Conacci-Sorrell et al., 2002). Eine veränderte Expression von Cadherinen steht zudem im Zusammenhang mit der Entwicklung von HCCs (Qin & Tang, 2002). Somit könnte die in transgenen Mäusen beobachtete verminderte Expression von Cadherin 8, einem Protein, das schon im Zusammenhang mit Nierenzell-Karzinomen beschrieben wurde (Blaschke et al., 2002), einen positiven Einfluss von NS5A auf eine Tumorentstehung widerspiegeln. Bei den betroffenen Genen der Apoptose ist vor allem die reduzierte Expression des *programmed cell death 10 (pdc10)* Gens bemerkenswert, da bei den Untersuchungen zum Verhalten des HCV-Replicons bezüglich Apoptose eine veränderte Expression des verwandten Gens *programmed cell death 2* beobachtet wurde (vergl. 4.1.6; und 5.1.6). Zudem werden Mutationen im *pdc10* Gen für pathologische Veränderungen im Gehirn verantwortlich gemacht (Bergametti et al., 2005). Daher lassen diese Ergebnisse einen möglichen Einfluss von HCV auf die Wirtszelle über die Expressionsregulation von *pdc*-Genen vermuten.

Im Falle der Gene der Proteindegradation bzw. der Proteinubiquitinierung ist auffallend, dass diese ziemlich einheitlich vermindert exprimiert werden (3 von 4), wobei die Rolle des

Diskussion: NS5A-transgene Maus

verstärkt exprimierten *PDZ domain containing RING finger 3* Gens in Zusammenhang mit der Proteinubiquitinierung noch fraglich ist (Katoh, 2004). Im Falle der drei vermindert exprimierten Gene ist nur wenig zu den Genprodukten bekannt. Für F-Box Proteine (*F-Box protein 10*) und E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen (*HECT domain containing 1*) ist jedoch ein positiver Einfluss auf die Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation beschrieben, der auch bei der Regulation des Zellzyklus eine große Rolle spielt (Kipreos & Pagano, 2000, Pagano, 1997, You & Pickart, 2001). Daher sollte sich deren verminderte Expression negativ auf die Proteindegradation und somit möglicherweise auf das Durchlaufen des Zellzyklus auswirken. Die beobachteten Expressionsunterschiede interessanter Gene sollten zukünftig auf Proteinebene verifiziert und mögliche daraus resultierende Effekte analysiert werden. Zu klären ist außerdem, über welche Mechanismen NS5A die Expression bestimmter Gene beeinflusst. Für N-terminal verkürzte NS5A-Varianten ist beschrieben, dass sie direkt als Transkriptionsfaktoren wirken können (Kato et al., 1997), und es wurden auch N-terminale Deletionmutanten im Zellkern nachgewiesen (vergl. 4.2.3). Zudem weist das NS5A-Protein eine konservierte nukleäre Lokalisations-Sequenz auf, deren Funktion innerhalb des viralen Lebenszyklus noch nicht geklärt ist. Jedoch ist unter Berücksichtigung der Tatsache, dass NS5A aufgrund seines Membranankers und seiner Rolle bei der HCV-Replikation vornehmlich am ER lokalisiert ist und innerhalb des Replicon-Systems noch keine definierten NS5A-Spaltprodukte im Kern nachgewiesen wurden, die Vermutung einer direkten Funktion von NS5A als Transkriptionsfaktor eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist die Beeinflussung der Genexpression durch NS5A über eine Einflussnahme auf verschiedene Signalkaskaden, an deren Ende die Regulation der Genexpression steht, wie z.B. die MAP-Kinase-Signalkaskaden. Die Beeinflussung solcher zellulären Mechanismen ist für das NS5A-Protein mehrfach beschrieben worden (vergl. 1.2.2). Auch die direkte Bindung von NS5A an bzw. die Einflussnahme von NS5A auf Transkriptionsfaktoren ist denkbar und wurde schon beobachtet (Ghosh et al., 2003, Ghosh et al., 2000b, Qadri et al., 2002).

Es ist festzuhalten, dass NS5A in der Lage ist, die Expression verschiedener zellulärer Gene zu modulieren. Dies könnte NS5A befähigen, die HCV-Replikation zu beeinflussen und HCV-assoziierte Leberpathologien zu verursachen.

5.3.6 NS5A-bedingte Veränderung des Proteinexpressionsmusters in Leberzellen

Um neben der Genexpression auf mRNA-Ebene auch einen Überblick über Veränderungen der Genexpression in NS5A-transgenen Mäusen auf Proteinebene zu erhalten, wurden Proteomanalysen durchgeführt. Dazu wurden Leberlysate von je drei transgenen (*founder 01*)

Diskussion: NS5A-transgene Maus

und nicht transgenen Mäusen mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Neben mehreren Proteinen, die sich in ihrer Expression in Abhängigkeit von NS5A etwas zu unterscheiden schienen (Daten nicht gezeigt), ist vor allem ein Protein in den entsprechenden Silbergelelektrophoren aufgefallen. Dabei handelte es sich um ein Protein, welches in allen transgenen Lebern deutlich exprimiert wurde, in den Lebern der Kontrolltiere aber nicht detektiert werden konnte. Das Protein hat eine ungefähre molekulare Masse von 25-26 kDa und einen isoelektrischen Punkt bei ca. pH 6,8-6,95. Aufgrund seiner molekularen Masse kann das Protein nicht das Transgen selbst repräsentieren. Ein definiertes Fragment des Transgens ist nicht auszuschließen, jedoch eher unwahrscheinlich, da bei vorangegangenen Western Blot-Analysen nie ein derartiges Fragment beobachtet worden war. Bei einer Suche mithilfe der Datenbank www.expasy.ch wurden 15 Gene gefunden, die bei einer Abweichung des pI von 0,1 und der molekularen Masse von 5% die Kriterien erfüllen würden. Dabei handelt es sich jedoch nicht um Gene, die bei den Micro-Array-Experimenten auf mRNA-Ebene als verstärkt exprimiert detektiert wurden.

Der auftretende Punkt, der auch mehr als ein Protein repräsentieren könnte, wurde nur mittels der hochauflösenden Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven & Dernick, 1988) beobachtet. Dabei werden die Proteine im Gel so fixiert, dass eine spätere Analyse mithilfe der Massenspektrometrie nicht mehr möglich ist. Bei Anfärbungen mit einer anderen weniger sensitiven Silberfärbungsmethode bzw. mit einer Coomassie-Färbung konnte das Protein nicht nachgewiesen werden. Nur die Verwendung verschiedener Antikörper gegen die möglichen Kandidaten-Proteine könnte im Western Blot Experiment noch die Identität dieses Proteins aufklären. Zudem muss das Ergebnis noch in der zweiten *founder*-Linie 03 reproduziert werden, um eine artifizielle Induktion der Proteinexpression durch das Integrat selbst auszuschließen.

Somit kann nur festgehalten werden, dass sich NS5A scheinbar auf die Proteinexpression in den Lebern transgener Mäuse auswirkt, die Identität des am auffälligsten regulierten Proteins konnte jedoch nicht geklärt werden.

5.3.7 NS5A interferiert mit antiviralen Mechanismen in transgenen Mäusen

Um den Einfluss von NS5A auf die Virusabwehr des betroffenen Organismus zu untersuchen, wurden transgene und Kontroll-Mäuse mit LCM-Virus infiziert und nach sechs bzw. zwölf Tagen die Virustiter in der Leber und der Milz bestimmt. Sechs Tage nach der Infektion, also zu dem Zeitpunkt, bei dem die LCMV-Infektion ihren Höhepunkt erreicht haben sollte (Lehmann-Grube et al., 1985), konnten noch keine Unterschiede zwischen den transgenen

Diskussion: NS5A-transgene Maus

und nicht transgenen Tieren bezüglich des LCMV-Titers detektiert werden. Das bedeutet, dass NS5A keinen Einfluss auf die Infektiosität oder Replikation des Virus bzw. auf die Empfänglichkeit der Mäuse gegenüber einer LCMV-Infektion zu haben scheint. Jedoch wurde ein erhöhter Titer, bei den Milzen sogar ein stark erhöhter Titer, im Falle der transgenen Tiere nach zwölf Tagen detektiert, also zu einem Zeitpunkt, bei dem die Viruseliminierung bei einer akuten Infektion fast abgeschlossen ist (Lehmann-Grube et al., 1985). Somit ist die Fähigkeit des Wirtes herabgesetzt, das Virus zu eliminieren. Da die Titer aller untersuchten Kontroll-Lebern nach zwölf Tagen unterhalb der Nachweisgrenze lagen, kann nicht abschließend geklärt werden, wie stark sie sich von denen der transgenen Lebern unterschieden. Im Falle der transgenen Lebern war der Titer aber bei allen untersuchten Tieren zu bestimmen und lag somit trotz des geringen Wertes reproduzierbar über dem Titer der Kontroll-Lebern. Zudem weisen zwei der drei transgenen Tiere deutlich erhöhte GPT-Werte im Serum im Vergleich zu den Kontrolltieren nach zwölf Tagen Infektion auf. Dies lässt auf eine stärkere Leberschädigung, hervorgerufen durch eine gesteigerte Virusproduktion, in den transgenen Lebern zu diesem Zeitpunkt schließen. Dass die Virusproduktion zu einer erhöhten Leberschädigung führt, zeigte die gesteigerte GPT-Aktivität in den Seren sowohl von transgenen- als auch von WT-Mäusen am Tag 6 der Infektion.

Für die Tatsache, dass die Titer-Unterschiede zwischen transgenen Tieren und Kontrolltieren auch und vor allem bei den Milzen zu beobachten waren, gibt es zwei Erklärungsmodelle. Zum einen ist es möglich, dass der Albumin-Promotor in der Milz nicht absolut stillgelegt ist und somit eine kleine Menge an NS5A exprimiert wird, die jedoch nicht mit den angewendeten Techniken detektiert werden konnte. Diese Annahme müsste durch sensitivere Techniken, wie z.B. RT-PCR, überprüft werden. Das NS5A-Protein könnte somit direkt einen Einfluss auf die Zellen der Milz haben und auf diese Weise die Virusbeseitigung in dem Organ modulieren. Zum anderen ist es aber eher wahrscheinlich, dass die Viruseliminierung durch NS5A nur in der Leber gehemmt ist, da das Transgen auf Proteinebene nur in der Leber nachgewiesen werden konnte. Die Folge wäre, dass in der Leber permanent Virus produziert wird, wohingegen der Rest des Organismus den Virus eliminiert. Über den Blutkreislauf würden die Viren aus der Leber in die anderen Organe und damit auch in die stark durchblutete Milz gelangen und dort den Titer im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöhen. Der beobachtete Effekt in der Milz wäre in diesem Fall nur sekundär. Da die Titer in der Leber im Vergleich zur Milz ca. zwei Größenordnungen niedriger waren, waren die Leberwerte schwer zu bestimmen. Neue Experimente, bei denen die Tiere zu einem früheren

Diskussion: NS5A-transgene Maus

Zeitpunkt der Viruseliminierung untersucht werden, sollten im Falle der Lebern deutlichere Daten erbringen.

Die verminderte Expression IFN-induzierter Gene, wie die für 2',5'-OAS und PKR in NS5A-transgenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren, zeigt deutlich einen negativen Einfluss des Transgens auf die antivirale IFN-Antwort. Dadurch ist die schlechtere Viruseliminierung im Falle der transgenen Mäuse zu erklären. Neben anderen Mechanismen spielt nämlich die Ausschüttung von Zytokinen wie IFN durch T-Zellen und die dadurch induzierte Expression antiviraler Proteine in den infizierten Zellen bei der Virusabwehr und -eliminierung auch im Falle von LCMV eine entscheidende Rolle (Lehmann-Grube et al., 1985, Samuel, 2001). Die Ergebnisse zeigen auch, dass der negative Einfluss von NS5A auf die antivirale IFN-Antwort nicht nur auf der Interaktion von NS5A mit der PKR und die dadurch bedingte mögliche Inaktivierung des Enzyms beruht (Gale et al., 1997), sondern direkt die Menge IFN-induzierter Genprodukte negativ reguliert ist. Bei einer Blockade der PKR-Aktivität durch NS5A müsste man aber sogar gesteigerte Proteinmengen erwarten, da die PKR nicht mehr in der Lage sein sollte, den eukaryontischen Initiationsfaktor 2 der Translation (eIF-2) zu phosphorylieren. Eine Phosphorylierung von eIF-2 durch PKR führt im Falle einer Infektion normalerweise zur Blockade der Translation und somit zu einer verminderten Proteinbildung (Samuel, 2001).

Für die Beobachtung der reduzierten Mengen an 2',5'-OAS und PKR ist es wahrscheinlich, dass die Transkription der Gene betroffen ist, NS5A also direkten oder indirekten Einfluss auf die entsprechenden Transkriptionsfaktoren hat. Diese Vermutung wird dadurch gerechtfertigt, dass zum einen eigene Experimente für 2',5'-OAS eine Reduktion der mRNA in transgenen Tieren zeigen (Daten nicht gezeigt) und zum anderen mehrere Arbeitsgruppen nach IFN-Behandlung eine verringerte Expression IFN-induzierter Gene bei gleichzeitiger NS5A-Expression in Zellkultur beobachtet haben (Geiss et al., 2003, Girard et al., 2002). Dabei wurde in huh7 Zellen sogar eine verminderte 2',5'-OAS-Expression gemessen (Girard et al., 2002). Der Mechanismus, über den NS5A die Expression solcher Gene beeinflusst, könnte über eine Induktion der Interleukin-8 (IL-8)-Expression verlaufen. Eine NS5A-induzierte IL-8-Expression wurde bereits von zwei Arbeitsgruppen nachgewiesen (Girard et al., 2002, Polyak et al., 2001). Dabei wurde zusätzlich eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von IL-8 und einer verminderten antiviralen IFN-Antwort beobachtet. Wie NS5A die IL-8-Expression beeinflusst, ist bislang noch nicht geklärt. Eine direkte Funktion von NS5A als Transkriptionsfaktor ist dabei denkbar. Auch eine NF κ B-vermittelte Einflussnahme ist wahrscheinlich, da einerseits NS5A in der Lage ist, NF κ B zu aktivieren (Gong et al., 2001)

Diskussion: NS5A-transgene Maus

und andererseits der IL-8-Promotor auch NF κ B-abhängig ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass der IL-8-Promotor für die NS5A-induzierte Induktion der Genexpression in Reporterexperimenten eine intakte NF κ B-Bindungssequenz benötigte (Polyak et al., 2001). Jedoch konnte in eigenen Experimenten keine verstärkte IL-8-Expression auf mRNA-Ebene in transgenen Tieren festgestellt werden (vergl. 4.3.5). Es ist aber denkbar, dass diese erst durch die LCMV-Infektion induziert wurde.

Untersuchungen mit einem Mausmodell, welches den gesamten offenen Leserahmen von HCV als Transgen enthält, zeigten in entsprechenden Experimenten mit LCMV ein ähnliches Verhalten, nämlich eine reduzierte Viruseliminierung und eine inhibierte IFN-Antwort (Blindenbacher et al., 2003). Es ist somit wahrscheinlich, dass im Falle dieses Mausmodells der beobachtete Effekt auf die LCMV-Infektion und die IFN-Antwort durch das NS5A-Protein vermittelt wurde.

5.3.8 Zusammenfassende Betrachtungen und Ausblick

Auch wenn die Expression von NS5A in der Leber einer transgenen Maus mutmaßlich nicht das gesamte Potential des Proteins offenbart und auch artifizielle Beobachtungen möglich sind, geben die Daten gute Anhaltspunkte bei der Erforschung der Funktion und Wirkung von NS5A innerhalb der mit HCV infizierten Zelle.

Da NS5A-transgene Mäuse weder spontan noch nach Bestrahlung induzierte Leberpathologien aufwiesen, erscheint eine direkte kanzerogene Wirkung von NS5A unwahrscheinlich. Selbst mit indirekten Methoden wie des Vergleiches der PCNA-Expression oder der Detektion bestimmter Glycosylierungsmuster auf den Leberzellen wurden keine Unterschiede zwischen NS5A-transgenen und Wildtyp-Tieren detektiert, auch nicht nach erfolgter Bestrahlung. Die Analyse einer bereits existierenden transgenen Maus für das NS5A-Protein des Genotyps 1a hatte ebenfalls keine pathologischen Veränderungen der Leber ergeben (Majumder et al., 2003). Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass das NS5A-Protein aufgrund des Maushintergrundes nicht seine normale Aktivität entwickelt und somit nicht zur Entstehung von Gewebsveränderungen beitragen kann. Jedoch zeigen Untersuchungen von Mäusen, die transgen für das Core-Protein von HCV bzw. das komplette HCV-Genom sind, die Entstehung von Leberpathologien wie Lebersteatose und HCCs (Lerat et al., 2002, Moriya et al., 1998). Dies legt nahe, dass die Expression von HCV-Proteinen auch bei Mäusen zur Leberschädigung führen kann und somit dieses Modellsystem auch für die Erforschung von NS5A hinsichtlich HCV-assoziierten Leberschädigungen geeignet ist. Da das NS5A-Protein zu keinem beobachtbaren Effekt in den Lebern transgener Mäuse führte, lässt somit entweder auf eine untergeordnete Rolle dieses Proteins bei der HCC-

Diskussion: NS5A-transgene Maus

Entstehung im Falle einer HCV-Infektion schließen oder man muss annehmen, dass NS5A seine vollständige Funktion und Wirkung nur im Kontext einer Koexpression mit anderen viralen Proteinen ausüben kann.

Die Regulation der Expression bestimmter Gene sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene verdeutlicht jedoch eine biologische Aktivität von NS5A in dem Mausmodell. Ob diese Effekte auch vor dem Hintergrund humaner Zellen zu beobachten sind und zudem für die HCV-Infektion eine Rolle spielen, müssen weitere Experimente klären. Da keine Leberpathologien beobachtet wurden, ist anzunehmen, dass sich die Änderungen der Genexpression auf andere Bereiche, wie z.B. die Leberregeneration auswirken. In ersten Experimenten in Kooperation mit Dr. Sabine Werner (ETH Zürich, Schweiz) konnte tatsächlich ein Einfluss von NS5A auf die Leberregeneration bei Mäusen beobachtet werden. Demnach wiesen transgene Lebern ein erhöhtes Proliferationsverhalten nach partieller Hepatektomie auf (Daten nicht gezeigt).

Einen klaren Hinweis auf die Rolle des NS5A-Proteins innerhalb der HCV-Infektion erbrachten die Infektions-Experimente mit LCMV. Dabei zeigte sich in NS5A-transgenen Mäusen eine verminderte Fähigkeit, diese „Sekundärinfektion“ zu eliminieren, anscheinend aufgrund einer Blockade der Expression IFN-induzierter antiviraler Gene. Dabei könnte gerade die Wahl des NS5A-Genotyps entscheidend gewesen sein, da ein Zusammenhang zwischen Inhibition der IFN-Antwort und einer gehäuft auftretenden chronischen HCV-Infektion bei Viren des hier verwendeten Genotyps 1b angenommen wird (Pascu et al., 2004, Tan & Katze, 2001).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass die Rolle von NS5A innerhalb der HCV-Infektion - neben einer Funktion bei der Virusreplikation - vor allem im Bereich der Inhibition antiviraler Mechanismen der Leberzellen anzusiedeln ist und weniger bei der direkten Induktion von Leberschäden. Somit trägt NS5A sehr wahrscheinlich einen großen Anteil an der häufig auftretenden Chronifizierung der HCV-Infektion.

Zudem konnte erstmalig im Tiermodell eine Reduktion der IFN-Antwort und eine mutmaßlich dadurch bedingte verminderte Viruseliminierung auf NS5A zurückgeführt werden. Die vorgestellte transgene Maus erwies sich daher als äußerst hilfreich bei der Untersuchung der Funktion von NS5A *in vivo*. Auf diesen Experimenten aufbauend können in Zukunft weitere Untersuchungen den genaueren Mechanismus der Inhibition des IFN-Signalweges entschlüsseln und weiterführende Erkenntnisse und Arbeitsmodelle in der NS5A-Forschung ermöglichen.

Diskussion: NS5A-transgene Maus

So wird beispielsweise in naher Zukunft der Einfluss von NS5A auf die NS3-abhängige Immunantwort in transient NS3/NS4-transgenen Mäusen untersucht werden. Zudem soll durch Verpaarung von NS5A-transgenen Tieren mit NS3/NS4A-transgenen Mäusen der Effekt der Koexpression dieser HCV-Proteine auf die Leber untersucht werden. Dabei wird erwartet, dass die Koexpression von NS5A mit NS3/NS4A zur Bildung der p58-hyperphosphorylierten Form von NS5A in den Mäusen führt. Diese Variante von NS5A könnte andere Effekte innerhalb der Leberzellen als die bislang exprimierte p56-Variante haben. Diese Experimente werden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Matti Sällberg (Karolinska Institut, Stockholm, Schweden) durchgeführt. Auf diesem Wege wird auch in Zukunft das vorgestellte Mausmodell für NS5A zu neuen Erkenntnissen im Zusammenhang mit NS5A-vermittelten Effekten während der HCV-Infektion führen.

5.4. Arbeitshypothese

Unter Berücksichtigung bereits veröffentlichter Untersuchungen lassen sich die gewonnenen Daten der verschiedenen Experimente zu einer Arbeitshypothese zusammenfassen, die von einer zentralen Funktion der beobachteten NS5A-vermittelten Raf-1-Phosphorylierung ausgeht (Abb. 44).

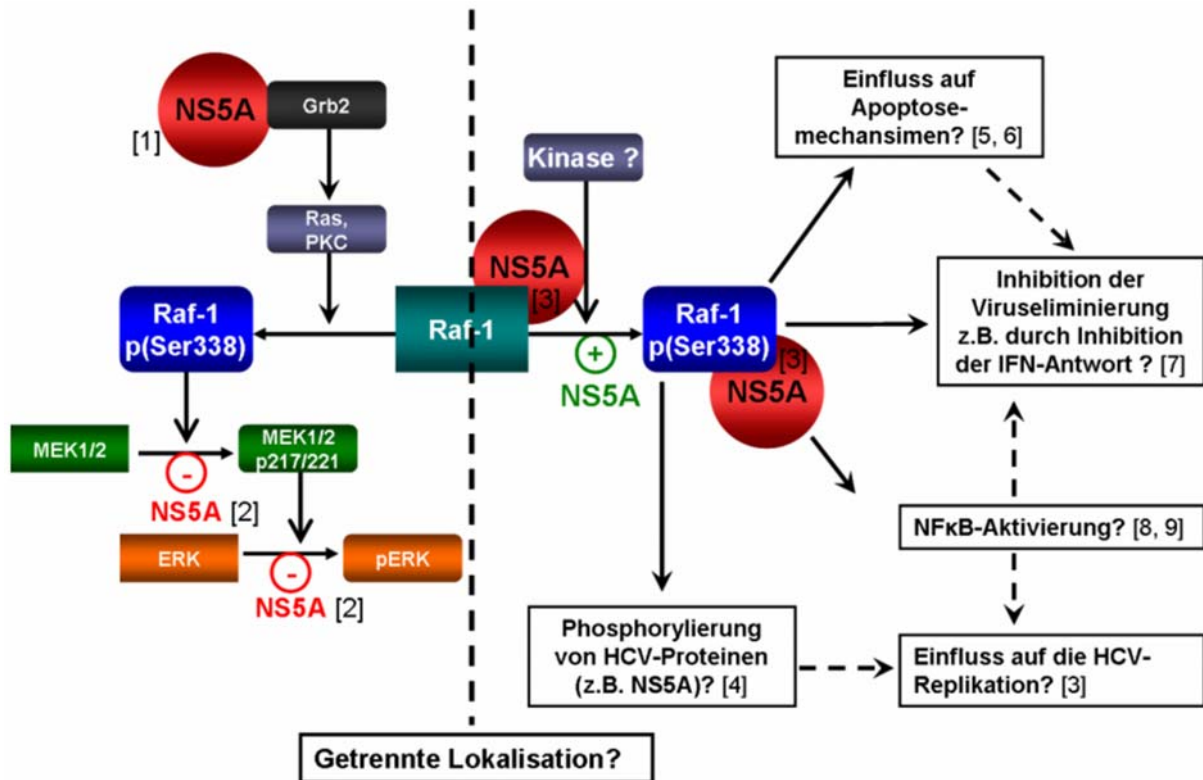


Abbildung 44: Arbeitshypothese zum Einfluss der NS5A-vermittelten Raf-1-Phosphorylierung im Zusammenhang mit einer HCV-Infektion. Die eventuell durch die Interaktion von NS5A mit Grb2 hervorgerufene Inhibition der MEK1/2- und ERK-Phosphorylierung ist durch eine unterschiedliche Lokalisation von der NS5A-vermittelten Raf-1-Aktivierung getrennt. Letztere wird mutmaßlich durch die Interaktion von NS5A mit Raf-1 hervorgerufen und führt zu den verschiedenen Beobachtungen, die im Zusammenhang mit einer NS5A-Expression, der HCV-Replikation oder einer gesteigerten Raf-1-Phosphorylierung, losgelöst vom MAP-Kinaseweg, stehen. (Kinase wird aktiviert: \longrightarrow ; direkte Phosphorylierung: \longrightarrow ; aktiviert/verursacht: \longrightarrow ; +: Aktivierung; -: Inhibition) ([1] (Tan et al., 1999); [2] (Georgopoulou et al., 2003); [3] (Burckstummer et al., 2006); [4] Bürckstümmer T., 2005; [5] (Troppmair & Rapp, 2003); [6] (Alavi et al., 2003); [7] Eigene Daten; [8] (Li & Sedivy, 1993); [9] (Waris et al., 2003))

Durch die unterschiedliche Lokalisation der NS5A-vermittelten Raf-1-Aktivierung und der NS5A-vermittelten Inhibition der MEK1/2- und ERK-Phosphorylierung, die mutmaßlich von der NS5A/Grb2-Interaktion abhängig ist, könnten die beiden scheinbar widersprüchlichen Ereignisse miteinander vereinbar sein. Für die gesteigerte Raf-1-Phosphorylierung an Serin 338 könnte die Interaktion von NS5A mit Raf-1 verantwortlich sein, entweder durch die Aktivierung einer Raf-1-Autophosphorylierung oder die Rekrutierung einer zusätzlichen Kinase. Aktiviertes Raf-1 wiederum könnte NS5A oder andere HCV-Proteine

Diskussion: Arbeitshypothese

phosphorylieren und somit auf die HCV-Replikation Einfluss nehmen. Zudem ist Raf-1 in der Lage, NFκB zu aktivieren, wodurch die NS5A-vermittelte NFκB-Aktivierung erklärt werden könnte. Eine NFκB-Aktivierung könnte zu einer IL-8-Expression führen, die wiederum die Induktion antiviraler IFN-abhängiger Gene inhibieren könnte. Über diesen oder alternative Wege könnte sich aktiviertes Raf-1 somit negativ auf antivirale Mechanismen der infizierten Zelle auswirken. Dabei ist neben der Inhibition der IFN-Antwort auch die Inhibition von Apoptosemechanismen denkbar. Somit wäre die Eliminierung infizierter Zellen unterbrochen und die Infektion könnte nicht erfolgreich bekämpft werden, wofür die Daten der LCMV-Infektionsexperimente sprechen. Auch die Inhibition von Raf-1 durch IFN über einen PKC-unabhängigen Weg konnte bereits gezeigt werden (Xu et al., 1994). Das umgekehrte Ereignis ist daher nicht ausgeschlossen. Ein NS5A-vermittelter negativer Einfluss auf Apoptosemechanismen konnte aus eigenen Arbeiten zwar nicht bestätigt werden, jedoch könnten die diskutierten Probleme des experimentellen Systems einen solchen Effekt verdecken. Zudem zeigt die Modulation der Apoptose in huh9-13 Zellen, dass die untersuchten HCV-Proteine, also auch NS5A, potentiell Apoptosemechanismen beeinflussen können.

Zusammengenommen liefern die gewonnenen Ergebnisse wichtige Erkenntnisse zu Effekten und zur Funktion von NS5A im Falle einer Infektion und sie liefern neue Ansätze für eine Vielzahl von Experimenten. Dabei führen die gezeigten Daten zu einem Modell, wonach NS5A - möglicherweise über die Aktivierung von Raf-1 - antivirale Mechanismen wie die IFN-Antwort hemmt und somit zur Chronifizierung einer HCV-Infektion beiträgt.