

6 Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus ist ein membranumhülltes Virus mit einem +SS-RNA Genom aus der Familie der *Flaviviridae*. Sein Genom codiert für die Strukturproteine Core, E1 und E2, für das p7-Protein und für die Nicht-Strukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Die Funktion der meisten dieser Proteine ist zumindest teilweise bekannt. So sind einige der Proteine in der Lage, verschiedene zentrale Mechanismen der Wirtszelle zu modulieren, wie z.B. Apoptose und Signalkaskaden für Wachstum und Differenzierung. Jedoch blieben die bisherigen Befunde zum Teil widersprüchlich. Das Nicht-Strukturprotein 5A ist zum Beispiel in der Lage, den Raf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinaseweg zu beeinflussen. Aufgrund dieser und verschiedener anderer Beobachtungen, die die Interferenz von NS5A mit anderen zentralen Signalwegen von Zellen beschreiben, wird dem Protein eine Rolle bei der HCV-assoziierten Entstehung von Leberpathologien bis hin zur HCC-Bildung zugeschrieben.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss der HCV-Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET auf die rezeptorvermittelte Apoptose untersucht werden. Dabei konnte mit Hilfe von Western Blot-Analysen auf PARP-Spaltung und durchflusszytometrischen Quantifizierungen apoptotischer Zellen nach Annexi-V-FITC-Färbung, eine gesteigerte Sensitivität von huh9-13 aber nicht von huh ET Replicon-Zellen im Bezug auf TNF α - und TRAIL-vermittelte Apoptose, verglichen mit der Ausgangszelllinie huh7, beobachtet werden. Die Unterschiede hinsichtlich rezeptorvermittelter Apoptose spiegelten sich auch im Expressionsmuster von apoptoserelevanten Genen wieder, wie durch Membranen-Arrays beobachtet werden konnte. Nach Entfernung der HCV-Replicon-RNA aus den Zellen mittels IFN α -Behandlung zeigten so behandelte huh9-13 Zellen keine gesteigerten Sensitivitäten mehr, was somit einen Einfluss des entsprechenden Replicons auf die rezeptorvermittelte Apoptose offenbart. Im Falle der huh ET Zellen hatte die IFN-Behandlung keinen Effekt. Zudem konnte durch die Verwendung der Substanzen Etoposide und Actinomycin D gezeigt werden, dass der intrinsische Apoptoseweg über die Mitochondrien durch die HCV-Replicons nicht beeinflusst wurde. Es wurde dabei aber ein starker Einfluss des jeweiligen Zellhintergrundes beobachtet. Diese Daten bieten eine gute Grundlage, um weitere gezielte Versuche zum Einfluss von HCV auf Apoptosemechanismen durchzuführen. Zudem verdeutlichen die Daten die extreme Bedeutung der richtigen Kontrollen und der sorgfältigen Wahl des Modellsystems bei Untersuchungen zum Einfluss von HCV auf zelluläre Prozesse.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt von NS5A auf den Raf-1/ERK-abhängigen MAP-Kinasesignalweg näher untersucht. Bei der Verwendung von phosphospezifischen

Zusammenfassung

Antikörpern konnte nach NS5A-Expression eine gesteigerte Phosphorylierung von Raf-1 an dem Serinrest 338 beobachtet werden. Jedoch wurde keine Steigerung der MEK1/2-Phosphorylierung an den Serinresten 217/221 festgestellt. Durch die Verwendung von NS5A-Deletionsmutanten konnte eine Region von AS 302-449 identifiziert werden, die für die Steigerung der Raf-1 Phosphorylierung ausreichend war. Dabei korrelierte die Lokalisation der Deletionsmutanten mit der Art des Effektes auf die Raf-1-Phosphorylierung. Durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren konnte zudem gezeigt werden, dass die Raf-1-Phosphorylierung unabhängig von der PKC-Aktivität war. Basierend auf der Beobachtung, dass die NS5A-vermittelte Raf-1-Aktivierung unabhängig von MEK1/2 ist, können weitere Experimente zu alternativen Funktionen von Raf-1 außerhalb des MAP-Kinasewegs führen.

Ein dritter Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung einer neuen NS5A-transgenen Maus zur Untersuchung einer möglichen Rolle von NS5A bei der HCV-assoziierten Leberschädigung. Die Mäuse wurden mittels PCR genotypisiert und mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte eine robuste, leberspezifische und über die Zeit stabile NS5A-Expression in männlichen sowie in weiblichen Tieren festgestellt werden. Zudem war die Expressionsstärke bei zwei verschiedenen *founder*-Linien vergleichbar. Es konnte keine Tumorentstehung oder Zellschädigung in den Lebern von transgenen Tieren festgestellt werden, auch nicht nach der Bestrahlung der Tiere mit einer subletalen Dosis von 3 Gy. Um Transgen-bedingte Änderungen der Genexpression zu untersuchen, wurden *Microarray*- und Proteomanalysen von transgenen und nicht transgenen Tieren durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene die Expression unterschiedlicher Gene durch NS5A beeinflusst wurde. Um den postulierten inhibitorischen Effekt von NS5A auf die IFN-Antwort zu untersuchen, wurden transgene und WT-Mäuse mit LCMV infiziert. Dabei konnte im Falle der transgenen Tieren eine inhibierte Viruseliminierung und eine gesteigerte GTP-Aktivität in den Seren nachgewiesen werden. Auf molekularer Ebene wurde in transgenen Lebern eine verminderte Induktion von 2',5'-OAS und PKR festgestellt. Diese Daten sprechen für einen inhibitorischen Einfluss von NS5A auf die IFN-abhängige antivirale Antwort der Zellen, was zu einer Chronifizierung der HCV-Infektion beitragen könnte. Auf diesen Daten aufbauende Studien können somit zu neuen Erkenntnissen und einem neuen Bild von NS5A im Kontext einer chronischen HCV-Infektion mit assoziierter Leberschädigung führen.