

Regulation viraler Replikation im subgenomischen HCV-Replikon System: Einfluß von Eisen und Anisoosmolarität

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

angefertigt in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Holger Fey

aus Mönchengladbach

November, 2008

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD. Dr. A. Erhardt

Korreferent: Prof. Dr. W. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2009

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Betreuers in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

H. Fey, B. Sitek, T. Gehrmann, K. Stühler, H.E. Meyer, D. Häussinger, A. Erhardt (2008); *Anisoosmolarity alters HCV replication in the subgenomic hepatitis C virus replicon system* (Poster); Publication No. 1018; American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 59th Annual Meeting, San Francisco, USA.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1	Summary	2
2	Einleitung	3
	2.1 Hepatitis C und das Hepatitis C Virus	3
	 2.1.1 Definition und Epidemiologie	3 4 5 5 5 6 7 9
	2.2 Eisenstoffwechsel	. 11
	 2.2.1 Stoffwechsel nicht Häm-gebundenen Eisens 2.2.2 Erhalt und Störung der Eisenhomöostase 2.2.3 Zelluläres Eisen – Funktion und Toxizität 2.2.4 Eisen und Hepatitis C 	11 12 13 14
	2.3 Zellhydration und Zellfunktion	15
	 2.3.1 Dynamik der Zellvolumenhomöostase 2.3.2 Virale Replikation in Abhängigkeit der Zellhydration 2.4 Zielsetzung 	15 17 17
3	Material und Methoden	. 19
·	3.1 Materialien	. 19
	 3.1.1 Geräte 3.1.2 Kits 3.1.3 Verbrauchsmaterialien 3.1.4 Chemikalien und Medien 3.1.5 Lösungen und Puffer 3.1.6 Oligonukleotide 3.1.7 Antikörper 3.1.8 Zelllinien 	19 20 20 21 22 24 24 24
	3.2 Methoden	25
	 3.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien 3.2.2 Einfrieren und Auftauen humaner Zellen 3.2.3 Zytotoxizitätsassay 3.2.4 Proteinanalye 3.2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford 3.2.4.2 SDS-Gelelektrophorese 3.2.4.3 Western-Blot Analyse 	25 26 26 26 26 26 27 27
	3.2.4.4 Immunodetektion	27

	3.2.5	Differentielle Proteinanalyse	. 28
	3.2.5.1	Präparation der Gesamtproteine und Proteinbestimmung	. 28
	3.2.5.2	2 Proteinmarkierung für die 2D-DIGE	. 28
	3.2.5.3	3 2D-Gelektrophorese	. 28
	3.2.5.4	Bilderfassung und Bild-Analyse	. 29
	3.2.6	Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie	. 29
	3.2.6.7	Probenvorbereitung und in-Gel Trypsinverdau	. 29
	3.2.0.2	2 Identifikation mittels Massenspektrometrie	. 30
	3.2.7	RNA Isolierung	. 31
	3.2.8	RNA Qualitatspestimmung	. 31
	3.Z.9 2.2.40	Regeneration von Silkasaulen	. 3 I
	3.2.10 2.2.11	DNA Mikroarray Hybridiciorung	. 32 ເລ
	J.Z. I I 2 D 11	1 DNA Iviki Jallay Hybridislerully	. ວ∠ 22
	3 2 11	2 DNA Mikroarray Analyse	. ປ∠
	3 2 1 2	Berliner Blau Färbung zum Nachweis von Fisen	. 00 34
	3212	Statietik	. 34
	0.2.10		. 54
4	Ergeb	nisse	. 35
	0 11 Einf	iluß ainar Eisanübarladung auf dia HCV Panlikatian im	
•	t.ı ∟ını sub	genomischen Replikon-Modell	. 35
	4 4 4		
	4.1.1	Figen auf die HCV/ Deplikation	25
	1114	Eisen auf die HCV-Replikation Mossung der Änderung der HCV/ Poplikationsrate mittels	. 35
	4.1.1.	Peal-Time PCP	35
	1113	Nachweis der Änderung der HCV/Penlikationsrate mittels	. 55
	7.1.1.2	Western-Blot	37
	4113	Kontrolle der Befunde durch Färbung, sowie Verwendung	. 07
	7.1.1.	dreiwertigen Eisens, anderer zweiwertiger Metallionen und	
		Fe ²⁺ –Chelatoren	. 38
	4.1.1.4	Bestimmung der RNA-Qualität unter den ausgewählten	
		Versuchsbedingungen	. 40
	4.1.1.5	5 Zytotoxitätstests	. 41
	4.1.2	Einfluß von Eisenüberladung auf das Genexpressionsprofil	
		der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie	. 43
	4.1.3	Differentielle Proteinexpression durch Eisenüberladung in der	
		humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie	. 44
4	1.2 Einf	luß von Anisoosmolarität auf die HCV-Replikation im	
	sub	genomischen Replikon-Modell	. 49
	421	Effekt anisoosmotisch induzierter Zellvolumenänderung auf	
	1.2.1	die HCV-Replikation	49
	4211	Messung der Änderung der HCV-Replikationsrate mittels	
		Real-Time PCR	. 49
	4.2.12	2 Nachweis der Änderung der HCV-Replikationsrate mittels	
		Western-Blot	. 53
	4.2.1.3	Bestimmung der RNA-Qualität unter den ausgewählten	
		Versuchsbedingungen	. 55
	4.2.1.4	4 Zytotoxitätstests	. 55

4	.2.2	Einfluß von Anisoosmolarität auf das Genexpressionsprofil der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie	56
4	.2.3	Anisoosmolarität in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie	58
5	Disku	ssion	62
5.1	Hen sub	nmung der HCV-Replikation bei Eisenüberladung im genomischen Replikon-Modell	63
5	.1.1	Genexpressionsänderungen bei Eisenüberladung in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie	66
5	.1.2	humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie	68
5.2	Einf sub	fluß von Anisoosmolarität auf die HCV-Replikation im genomischen Replikon-Modell	69
5 5	.2.1 .2.2	Genexpressionsänderungen unter dem Einfluß von Anisotonizität in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie Proteinexpressionsänderungen unter dem Einfluß von Anisotonizität in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie	71 74
6	Litera	turverzeichnis	77
7	Abkür	zungsverzeichnis	94
7.1	Allg	jemeines	94
7.2	Ami	inosäuren	96
8	Curric	culum Vitae	97
9	Danks	sagung	98
10	Anhar	ng	99
11	Absch	nlußerklärung 1	25

1 Zusammenfassung

Eisen ist für den Menschen ein essentielles Spurenelement. Eine Störung in der Eisen-Homöostase hat somit weitreichende Konsequenzen. Erhöhte Eisenindices finden sich häufig bei der chronischen Hepatitis C Infektion und korrelieren mit einem schlechteren Ansprechen auf die antivirale Therapie mit Interferon. Der Zustand der Zellhydration ist ein weiterer Parameter für Veränderungen der viralen Replikation. So wird z. B. bei Polio–, Sindbis– und Hepatitis B Viren die Replikation bei Hydrationszunahme vermindert und bei Hydrationsabnahme verstärkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde im *in vitro* Modell des subgenomischen HCV-Replikons der Einfluß von Eisen sowie von Anisoosmolarität auf die Replikation des Hepatitis C Virus untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei Eisenüberladung *in vitro* die HCV-Replikation signifikant vermindert ist. Dieser Effekt wird durch Einsatz von Eisenchelatoren wieder aufgehoben. Durch Untersuchungen mit verschiedenen Osmolyten wurde nachgewiesen, daß im subgenomischen Replikon Modell die HCV-Replikation osmosensitiv ist. Dabei führte eine hyperosmotisch induzierte Dehydration zu einer signifikanten Verstärkung und Hypoosmolarität zu einer signifikanten Reduktion der viralen Replikation.

Ergänzend wurde der Einfluß von Eisenüberladung bzw. Anisoosmolarität auf Genund Proteinexpression untersucht. Die Analyse der differentiellen Genexpression erfolgte über einen Leber-spezifischen cDNA Array für über 1500 humane Gentranskripte. Die differentielle Proteinexpression wurde mittels 2D-DIGE plus gekoppelter HPLC und ESI-Qq-TOF Massenspektrometrie verfolgt. Bei Eisenüberladung wurden 63 mRNAs induziert und 136 mRNAs reprimiert. Neun differentiell regulierte Proteinspots führten zur Identifizierung von sechs nichtredundanten Proteinen. In Folge von Anisotonizität waren 62 mRNAs nur unter hypoosmotischen, 218 mRNAs nur bei hyperosmotischen und 64 mRNAs allgemein bei anisoosmotischen Bedingungen reguliert. Bei Hydrationsänderung zeigten 45 Proteinspots eine differentielle Regulation. Von diesen konnten 33 Proteine identifiziert werden, davon vier bei Hypoosmolarität und 29 bei Hyperosmolarität. Insgesamt konnten 19 nicht-redundante Proteine ermittelt werden.

1 Summary

Iron is an essential nutrient for humans and dysregulation of iron homoeostasis has extensive consequences. Elevated iron indices are frequently found in chronic Hepatits C Virus infection and correlate with impaired responsiveness to antiviral therapy with interferons. The cellular hydration state is another parameter for alterations of viral replication, as already described for the Polio, Sindbis and Hepatitis B Virus. Replication of these viruses is reduced upon increased hydration and elevated upon dehydration.

The aim of the present study was to determine the influence of iron and of anisoosmolarity on viral replication using the *in vitro* model of the subgenomic HCV replicon.

The present results show that HCV replication *in vitro* is significantly decreased upon iron loading. Application of iron chelators effectively counteracts this influence. Furthermore the application of different osmolytes showed that in the subgenomic replicon system HCV replication is osmo-sensitive. Hyperosmotically mediated dehydration resulted in a significant increase and hypoosmolarity in a significant decrease of viral replication.

Subsequently, effects of iron loading and of anisoosmolarity respectively on differential gene and protein expression were studied. Gene expression analysis was performed via a liver-specific cDNA array comprising more than 1500 human transcripts. Analysis of differential protein expression was conducted via 2D-DIGE plus coupled HPLC and ESI-Qq-TOF mass spectrometry. As a result of iron loading expression was induced for 63 mRNAs and reduced for 136 mRNAs. In addition nine differentially expressed protein spots led to the identification of six non-redundant proteins. In consequence of anisotonicity 62 mRNAs were regulated due to hypoosmotic, 218 mRNAs due to hyperosmotic and 64 mRNAs due to anisoosmotic conditions in general. Moreover hydration changes revealed 45 differential protein spots. Thirtythree thereof could be assigned to known proteins, four of those upon hypoosmolarity and 29 upon hyperosmolarity. Overall 19 non-redundant proteins were identified.

2 Einleitung

2.1 Hepatitis C und das Hepatitis C Virus

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Hepatitis C ist eine Erkrankung, die durch eine virale Infektion der Leber entsteht. Das Hepatitis C Virus (HCV) wurde 1989 als Erreger der sog. Non-A-/Non-B-Hepatitis identifiziert [1]. Einziger natürlicher Wirt des HCV ist der Mensch [2]. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) gab es im Jahr 2000 weltweit etwa 170 Mio. chronisch HCV infizierte Menschen, was etwa 3% der Weltbevölkerung entspricht. Jährlich kommt es zu etwa 3 bis 4 Mio. Neuinfektionen (<u>http://www.who.int/</u>). Eine Darstellung der weltweiten relativen Häufigkeit von Hepatitis C zeigt Abb. 2.1.



Abb. 2.1: Weltweite Prävalenz der Hepatitis C (1999) (Quelle: http://www.who.int/)

Im Gegensatz zur Hepatitis B mit insgesamt über 400 Mio. chronisch infizierten, wovon der überwiegende Teil in den Endemiegebieten in Südost-Asien, China und Afrika lebt [3, 4], ist Hepatitis C auch ein Problem der sog. Industrieländer [5, 6]. Nach Information des Robert Koch Instituts (RKI) geht man nach Schätzungen von 3 bis 5 Mio. Virenträgern in Europa aus. In Deutschland sind zwischen 400.000 und 500.000 Menschen chronisch mit HCV infiziert (<u>http://www.rki.de/</u>). Diese Daten zeigen, daß Hepatitis C ein globales gesundheitspolitisches Problem ist.

2.1.2 Erkrankung und Therapie

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus erfolgt parenteral durch direkten Kontakt mit infiziertem Blut [7]. Etwa 20% aller akuten Hepatiden entstehen auf Grundlage einer Infektion mit HCV [8]. Nur ein geringer Anteil der HCV-Infektionen heilt selbstständig aus, bei 60% bis 85% der HCV-infizierten Patienten entwickelt sich eine chronische Infektion [9]. Eine Progression zur Leberzirrhose findet, über eine fortschreitende Fibrosierung der Leber, bei etwa 10% bis 20% der chronisch infizierten Patienten statt. Bei etwa 1% bis 5% dieser Patienten entsteht im Verlauf der nachfolgenden 20 bis 30 Jahre ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) (<u>http://www.who.int/</u>).

Der klinische Nachweis des Vorliegens einer HCV-Infektion erfolgt durch den Nachweis von HCV-RNA, sowie von Anti-HCV Antikörpern im Blut [9]. Das leberspezifische Enzym Alanin-Aminotransferase (ALT) wird bei einer Schädigung der Leber in erhöhtem Maß im Blut gemessen [10]. Die Beobachtung und Gegenüberstellung dieser Parameter dient der Diagnose und Therapiekontrolle. Die typischen Verläufe einer Infektion mit dem HCV zeigt Abb. 2.2 [11].



Abb. 2.2: Infektionsverläufe nach einer HCV-Infektion (a) Verlauf einer akuten, ausheilenden Infektion. Binnen 2 Wochen ist im Serum HCV-RNA (rote ●) nachweisbar, nach 2 bis 8 Wochen kommt es zu einem Anstieg von ALT (blaue ■) im Serum.Während der HCV-RNA-Spiegel sinkt und die Symptome nachlassen, normalisieren sich die ALT-Werte und HCV-Antikörper können nachgewiesen werden. (b) Verlauf einer akuten Infektion, die chronisch wird. Der HCV-RNA-Spiegel und die ALT-Werte fluktuieren während die Infektion fortbesteht. (Graphik aus [11])

Die Ausbildung einer Leberschädigung als Folge einer HCV-Infektion ist eher eine Konsequenz der zellulären Immunantwort als der direkten zytopathogenen Wirkung des HCV [12, 13].

Die gegenwärtige Standardtherapie chronischer Hepatitis C Patienten ist die Kombination von pegyliertem Interferon- α (IFN α) und Ribavirin [14, 15]. Durch IFN α

werden antivirale Schutzmechanismen der Zelle aktiviert, wie die Bildung der Proteinkinase R (PKR), welche z. B. den Translationsinitiationsfaktor eIF-2α inhibiert. Das Nukleosidanalogon Ribavirin verhindert die RNA-Replikation (Abb. 2.3) [16]. Die Effektivität der Therapie beträgt ca. 80% bei Patienten mit HCV-Genotyp 2 oder 3 und ca. 50% bei denen mit HCV-Genotyp 1 (s. 2.1.3.2). Circa 70%–80% der chronischen HCV-Infektionen in den USA und über 60% in Europa und Asien werden vom Genotyp 1 verursacht [17].



Abb. 2.3: Ribavirin, ein Nukleosidanalogon zur Kombinationstherapie der Hepatitis C

2.1.3 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus

2.1.3.1 Taxonomie und Struktur des Hepatitis C Virus

Zur Familie der *Flaviviridae* gehörend bildet das Hepatitis C Virus darin den eigenen Genus *Hepacivirus*. Andere Erreger aus dieser Familie verursachen z. B. das Gelbfieber, Dengue-Fieber, die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und das West-Nil-Fieber [18]. Die Virenpartikel sind im Durchmesser ca. 70 nm groß und haben einen geometrisch geformten, von einer Hülle umgebenen Kern, der eine plus-orientierte RNA umschließt [19].

2.1.3.2 Heterogenität des Hepatitis C Virus

Es sind mind. 6 unterschiedliche genetische Variationen (sog. Genotypen) bekannt, die sich untereinander in 30% bis 50% ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden. Innerhalb der Genotypen unterscheidet man weiter mehr als 50 Subtypen, die wiederum 10% bis 30% Sequenzverschiedenheiten haben. Zwischen 1% und 5% variiert die Nukleotidsequenz der sog. Quasispezies innerhalb der HCV-Partikel eines Patienten [12, 20-22].

2.1.3.3 Genomische Organisation des Hepatitis C Virus

Das plus-orientierte RNA-Genom (s. 2.1.3.1) des HCV hat eine Länge von ca. 9600 Nukleotiden. Es hat ein einziges, langes offenes Leseraster (open reading frame, ORF), das ein Polyprotein kodiert, welches proteolytisch in mind. 10 funktionelle Proteine gespalten wird (Abb. 2.4).



Abb. 2.4: HCV – Genom, Translation und Prozessierung; das virale Genom hat einen durchgehenden offenen Leseraster, der von nicht-translatierten Bereichen flankiert wird. Das nach der Translation gebildete, ca. 3000 Aminosäuren große Polyprotein wird anschließend durch wirtseigene, sowie virale Proteasen in mind. 10 funktionelle Proteine gespalten. (Quelle: <u>http://www.molecular-virology.uni-hd.de/</u>)

Die Translation des HCV ORF wird über die ca. 340 Nukleotide umfassende 5' nichttranslatierte Region (NTR), die als interne Ribosomen Eintrittsstelle (IRES) dient, eingeleitet. Sie ermöglicht so die direkte Bindung des Ribosoms in unmittelbarer Nähe des Start-Codons. Die ca. 40 Nukleotide am Anfang des RNA-Genoms werden zwar nicht für die Translation, aber basierend auf Analogien mit anderen plusorientierten RNA Viren wahrscheinlich für die Replikation benötigt. Die 3' NTR hat eine dreigeteilte Struktur, bestehend aus einer variablen Sequenz, die auf das Stop-Codon des ORF folgt, einem poly(U)-Abschnitt mit heterogener Länge und einer hoch-konservierten Sequenz von 98 Nukleotiden, die essentiell für die Replikation *in vivo* ist [19]. Das HCV-Polyprotein hat einen modularen Aufbau, bei dem die Strukturproteine im vorderen Drittel am Aminoterminus lokalisiert sind und die nicht-Strukturproteine, die für die Replikation unverzichtbar sind, den übrigen Bereich ausmachen (Abb. 2.4). Strukturproteine sind das basische Core Protein (~23 kDa), der Hauptbestandteil des Nukleocapsids, sowie die Hüllproteine E1 (~35 kDa) und E2 (~72 kDa). Dies sind stark glykosilierte Typ I Membranproteine, die Heterodimer-Komplexe bilden [19]. Durch eine Leserasterverschiebung (frame shift) im Bereich der Gensequenz für das Core Protein kann das sog. F-Protein gebildet werden, dessen Rolle bei der HCV-Amplifikation unklar ist. Die genaue Funktion des stark hydrophoben Proteins p7 (~7 kDa) ist bislang nicht geklärt. Es scheint sich dabei allerdings um ein Viroporin zu handeln, welches die Membranpermeabilität erhöhen könnte. Deshalb wird vermutet, daß es eine Funktion in der Phase der Virusassemblierung hat [23, 24].

Die meisten der nicht-strukturellen (NS) Proteine werden für die Replikation der viralen RNA benötigt. NS2 (~23 kDA) ist eine Metalloprotease, die zusammen mit der amino-terminalen Domäne von NS3 die NS2-3 Protease bildet, welche die Spaltung bei NS2/3 katalysiert. Das NS3 Protein (~70 kDa) ist bifunktional, der etwa 180 AS umfassende, amino-terminale Bereich fungiert als Protease, welche die Spaltung bei NS3/4A, NS4A/B, NS4B/5A und NS5A/B vornimmt. Der carboxy-terminale Bereich hat eine NTPase/Helikase-Funktion, die für die Translation und Replikation des HCV-Genoms essentiell ist. NS4A (~8 kDa) ist ein essentieller Co-Faktor der NS3 Protease, die Funktion des hydrophoben NS4B Proteins (~27 kDa) hingegen ist unbekannt. NS5A (~49 kDa), das von einer noch nicht identifizierten, zellulären Kinase hyperphosphoryliert wird, hat vermutlich eine Rolle bei der Regulation der RNA-Replikation. Desweiteren scheint es an der Ausbildung der Resistenz der infizierten Zelle gegenüber IFN beteiligt zu sein. NS5B (~68 kDa) ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA-dependant RNA-polymerase, RdRp) [19].

2.1.3.4 Der Lebenszyklus des Hepatitis C Virus

Die in den letzten Jahren verfügbar gewordenen Zellkultursysteme (s. 2.1.4) haben in hohem Maße dazu beigetragen, daß der Lebenszyklus des HCV eingehend erforscht werden konnte. Doch trotz der Entwicklung von gentechnisch manipulierten viralen Genomen, die selbstständig hohe Amplifikationsraten erzielen (Replikon System, s. 2.1.4) und der Etablierung eines Systems, welches rekombinante, infektiöse HCV-

Partikel erzeugt bleibt das Modell in Teilen unvollständig [25]. Eine Übersicht des derzeitigen Verständnisses des HCV-Lebenszyklus stellt Abb. 2.5 dar.



Abb. 2.5: Der Lebenszyklus des Hepatitis C Virus; das Virion bindet an spezifische Oberflächenrezeptoren der Zelle und wird endozytotisch internalisiert. Nach der Verschmelzung von Vesikelmembran und Virushülle erfolgt die Freisetzung des viralen Genoms. Nach Translation der Virenproteine kommt es zur Ausbildung eines Replikationskomplexes in Form des sog. membranösen Netzes an speziellen Membranstrukturen des ER. Die Assemblierung, Reifung und Freisetzung neuer Virionen erfolgt via Golgi-Apparat auf konstitutivem sekretorischen Weg. (Quelle: Tibotec Pharmaceuticals Ltd.; <u>http://www.tibotec.com/</u>)

Primäre Wirtszellen sind Hepatozyten, aber die Replikation von HCV ist auch schon für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), sowie für B- und T-Zelllinien beschrieben worden [26]. Die Bindung des Virenpartikels erfolgt durch Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die Virushülle besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, die sich von der Wirtszelle ableitet und in der die viralen Hüllproteine verankert sind. Die Hülle ist außerdem mit Low Density Lipoproteinen (LDL) assoziiert [27]. Für die frühe Phase der Bindung des Viruspartikels an die Zielzelle konnte eine Interaktion mit dem LDL-Rezeptor nachgewiesen werden [28]. Weitere Oberflächenrezeptoren sind CD81, ein Protein aus der Tetraspanin-Familie, das an Signalvermittlungsprozessen beteiligt ist und der Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I (SCARB1) [29]. Für das Tight Junction Protein Claudin-1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, daß es bei der Virusbindung eine essentielle Funktion hat [30]. Die endozytotische Internalisierung des Viruspartikels erfolgt Clathrin-abhängig [31]. Nach der Verschmelzung von Vesikelmembran und Virushülle wird aus dem Capsid das HCV-Genom freigesetzt. Die Synthese des Polyproteins wird durch das IRES-Element im 5'-NTR (s. 2.1.3.3) initiiert. Nach dessen proteolytischer Spaltung in die einzelnen Proteine kommt es zur Ausbildung spezifischer Membranstrukturen, dem sog. membranösen Netz bzw. den Lipid Rafts. In dieser Membranmikrodomäne bildet sich der Replikationskomplex aus, in dem vom (+)-Strang ein (-)-Strang kopiert wird, der dann als Matrize die Synthese neuer (+)-Strang-RNAs ermöglicht. Diese dienen entweder zur Erzeugung weiterer (-)-Stränge, zur Translation oder sie werden in neue Viruspartikel eingehüllt. Assemblierung, Reifung und Freisetzung neuer Virionen erfolgt wahrscheinlich über den konstitutiven Sekretionsweg [26].

Für die gut untersuchten Abschnitte des HCV-Lebenzyklus ist bereits bekannt, daß eine Reihe von Wirtszell-Faktoren mit der viralen RNA und den viralen Proteinen interagieren und auch für die Replikation erforderlich sind [32-34]. Die vorliegenden Informationen werden bereits genutzt um neue Pharmazeutika zu entwickeln, die in verschiedenen klinischen Studien erprobt werden [17].

2.1.4 Modellsysteme des HCV für die Zellkultur

Mit der Einführung des Replikon Systems [35] steht seit mehreren Jahren ein Modell zur Verfügung, mit dem in Zellkultur Untersuchungen zur Molekularbiologie des HCV möglich wurden. HCV-Replikons waren zunächst teilweise deletierte HCV-Genome, die zu autonomer Replikation befähigt waren. Die Struktur des bicistronischen, subgenomischen Replikons I₃₇₇/NS3-3' (NCBI Accession Nr. <u>AJ242652</u>) ist in Abb. 2.6 gezeigt [36]. Das Replikon I₃₇₇/NS3-3' ist vom Genotyp 1b abgeleitet und wurde in dieser Arbeit verwendet. Es beherbergt die minimale autonom replizierende HCV-RNA.

Bicistronic, subgenomic replicon I₃₇₇/NS3-3[^]



Abb. 2.6: Struktur des minimalen HCV-Replikons; das HCV-Genom ist teilweise deletiert, als Selektionsmarker ist das Neomycinresistenzgen eingefügt, dessen Expression unter Kontrolle der HCV IRES steht. Die Expression der Gene NS3 bis NS5B steht unter Kontrolle der EMCV IRES [36].

Beim Replikon I₃₇₇/NS3-3' sind nach der 5' nicht-translatierten Region (s. 2.1.3.3) die Strukturgene, sowie die Gene für die p7 und NS2 Proteine deletiert und als Selektionsmarker das Neomycinresistenzgen eingefügt worden. Die 5' NTR und die Nukleotide 342–377 des Core-Gens bilden die HCV IRES. Die IRES des Enzephalomyocarditis Virus (EMCV) schließt an das *neo*-Gen an und ermöglicht die Translation der nicht-Strukturproteine NS3–NS5B [37]. Nach Transfektion dieser synthetischen RNA in die humane Hepatom-Zelllinie Huh-7 [38] und G418-Selektion konnten Zelllinien generiert werden, in denen die HCV-RNA autonom repliziert [39]. Die Zelllinie, die aus der stabilen Transfektion von Huh-7 mit dem Replikon I₃₇₇/NS3-3' hervorgegangen ist, trägt nach dem selektierten Zellklon die Bezeichnung Huh9-13 [40].

Die Markierung in Abb. 2.6 zeigt die Position einer Mutation im NS5B-Gen. Die ursprünglich aus dem HCV-Genom generierten Replikons zeigten in Zellkultur nur niedrige Replikationsraten. Im Fall des Replikons I₃₇₇/NS3-3' ist die Mutation das Ergebnis eines evolutionären Prozesses der während der Etablierung des Zellklons 9-13 stattfand [36]. Durch die Mutationen des Wildtyp-Genoms erhöhen sich die Replikationsraten bis um das 500-fache. Diese sog. Zellkultur-adaptiven Mutationen, die in fast allen nicht-Struktur Proteinen auftreten, nicht aber in den 5'- und 3'-NTRs, werden z. T. auch künstlich erzeugt [37, 41, 42]. Inzwischen wurden auch Volllängen-Replikons erzeugt, die es erlauben, alle Abschnitte des HCV-Lebenszyklus zu erforschen [43-45].

2.2 Eisenstoffwechsel

2.2.1 Stoffwechsel nicht Häm-gebundenen Eisens

Etwa 4 g Eisen sind durchschnittlich im Körper eines gesunden Erwachsenen gespeichert. Davon sind ca. 70% in Häm-Verbindungen (Hämoglobin, Myoglobin), 20% in Form von Speichereisen (Ferritin, Hämosiderin) und 10% an andere, Eisenhaltige Proteine (meist Enzyme) gebunden.

Täglich wird mit 1 bis 2 mg so viel Eisen wieder absorbiert, wie auch ausgeschieden wird. Während Häm-gebundenes Eisen zweiwertig ist (Fe^{2+}) ist Nahrungseisen vor allem dreiwertig (Fe^{3+}) und muß zur Resorption in zweiwertiges Eisen überführt werden. Nach der Aufnahme kann Eisen zum einen in Ferritin, einem 12 nm großen, 450 kDa schweren Polyprotein, das ca. 4500 Eisenionen umschließen kann, gespeichert werden. Andernfalls wird es über Ferroportin (SLC40A1), den bislang einzigen bekannten Exporter für Eisen, in den Stoffwechselkreislauf eingeschleust. Wieder in die dreiwertige Transportform überführt liegt das Eisen nicht frei vor, sondern an Transferrin (Tf) gebunden. Jeweils zwei Fe^{3+} lonen gelangen so an Transferrin gebunden zu den Organen, in der Hauptsache dem Knochenmark und der Leber. Die Aufnahme erfolgt über den Transferrinrezeptor (TfR), wobei Leberzellen neben dem ubiquitären TfR1 auch spezifisch den TfR2 aufweisen [46-48]. Einen Überblick über den Stoffwechsel des nicht Häm-gebundenen Eisens gibt Abb. 2.7.

Zur Diagnostik einer evtl. vorliegenden Störung im Eisenstoffwechsel werden als Eisen-Laborparameter die Serumferritinspiegel, die Transferrinsättigung und die freie, sowie die totale Eisenbindungskapazität bestimmt [49]. Inwieweit die Eisenwerte im Blut direkt mit der Lebereisenkonzentration korrelieren ist noch Gegenstand von Untersuchungen [50-52].



Abb. 2.7: Eisenstoffwechsel im Körper; Darstellung des Stoffwechsels nicht Häm-gebundenen Nahrungseisens. Verändert nach [46]. Abkürzungen: Caeruloplasmin (Cp); "duodenal cytochrome b" (Dcytb); "divalent metal iron transporter 1" (DMT1); Eisen (Fe) (zweiwertig:●, dreiwertig:▲); Ferroportin (SLC40A1); Hephaestin (Hp); Genprodukt des Hämochromatose-Gens (HFE); "iron regulatory protein" (IRP); Nukleus (N); Transferrin (Tf); Transferrinrezeptor (TfR)

2.2.2 Erhalt und Störung der Eisenhomöostase

Etwa 40% des im Körper vorhandenen Eisens wird in der Leber gespeichert, hauptsächlich (98%) in den Parenchymzellen [53, 54]. Die Regulation der Genexpression von Proteinen des Eisenstoffwechsels erfolgt intrazellular auf Translationsebene durch sog. Eisen-regulatorische Proteine (iron regulatory proteins, IRP). Diese interagieren mit Zielsequenzen, den "iron responsive elements" (IRE) in 5'- bzw. 3'-Bereichen von mRNAs, wobei über die erstgenannten die Ribosomenbindung und somit die Initiation der Translation und über letztere die Stabilität und der Abbau der mRNA reguliert werden [55, 56].

Das 25 Aminosäuren große Peptid Hepcidin, ein antimikrobiell wirkendes Molekül, das von der Leber gebildet und sezerniert wird, ist der hauptsächliche Regulator der systemischen Eisenhomöostase. Via Hepcidin werden die Eisenkonzentrationen in Blut und Gewebe durch Inhibition der intestinalen Eisenaufnahme und der Eisenfreisetzung aus Makrophagen und den Speichern der Leber reguliert. Mechanistisch hemmt Hepcidin den Efflux von Eisen aus der Zelle, indem es an Ferroportin bindet und dessen Degradation induziert [57-60]. Hepcidin selber wird über Hämojuvelin reguliert, ein Protein, das mit dem Signalnetzwerk der "bone morphogenic proteins" (BMPs) interagiert und darüber als Modulator der Genexpression von Hepcidin wirkt [61].

Krankheitsbild der Hämochromatose beruht auf Das einer Störung der Eisenhomöostase mit genetischer Ursache. Das Genprodukt des Hämochromatose-Gens (HFE), ein Glykoprotein der MHC-Klasse I, ist mit β₂-Mikroglobulin und dem Transferrin-Rezeptor (TfR) assoziiert (Abb. 2.7). Durch eine Mutation kommt es zum Aminosäureaustausch Cys282Tyr wodurch offenbar die Bindung von β_2 -Mikroglobulin an das HFE-Genprodukt blockiert wird [62, 63]. Als Folge kommt es zu einer Fehlregulation der intestinalen Eisenabsorption, wodurch die tägliche Eisenaufnahme von ca. 1 bis 2 mg auf ca. 4 bis 5 mg inadäquat erhöht ist [64]. Ob ein Zusammenhang beim Vorliegen einer Eisenüberladung von HFE-Mutation und Hepatitis C besteht ist umstritten [65-67].

2.2.3 Zelluläres Eisen – Funktion und Toxizität

Eisen ist ein unverzichtbares Spurenelement mit wichtigen Funktionen bei einer Reihe biochemischer Prozesse [68]. Die biologische Funktion beruht auf den chemischen Eigenschaften, nämlich der Dynamik des Übergangs zwischen den Oxidationszuständen Fe²⁺ und Fe³⁺ und damit die Möglichkeit eine Reihe von Koordinationsverbindungen mit organischen Liganden einzugehen. In Metalloproteinen fungiert es in Form von Eisen-Schwefel-Clustern (Fe/S) als anorganischer Co-Faktor von Proteinen, die an Katalyseprozessen, Redox-Reaktionen und dem Elektronentransport beteiligt sind [69, 70]. Wenn bei steigender Eisenbeladung die Bindungskapazität der Eisenspeicherproteine überschritten wird kommt es zu Akkumulation freien Eisens in der Zelle. Freies Eisen wirkt bereits in geringen Mengen zellschädigend, da via Fenton-Haber-Weiss-Reaktion reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) wie das Hydroxylradikal (OH[•]) gebildet werden können. Die ROS z. B. mit ungesättigten Fettsäuren, reagieren was zur Störung von Membranstabilitäten führt, oder direkt mit DNA, wodurch DNA-Strangbrüche oder Nukleinsäuremodifikationen entstehen [46, 71, 72]. Wegen der hohen Stoffwechselrate in Hepatozyten sind dort die zytoprotektiven Mechanismen besonders ausgebildet. Im Vergleich zu anderen Gewebezellen finden sich dort bspw. die höchsten Enzymaktivitäten der Superoxid-Dismutase (SOD), der Katalase, sowie der Glutathionperoxidase und -reduktase, außerdem der höchste Gehalt an Antioxidantien, z. B. Glutathion [55].

2.2.4 Eisen und Hepatitis C

Klinisch wurde in unabhängigen Studien mehrfach eine stärkere Prävalenz von erhöhten Serum-Eisen-Indices bei Patienten mit chronischer viraler Hepatitis beschrieben [73, 74]. Eine Erhöhung der Transferrinsättigung findet sich bei 20% bis 40% der Patienten [75] und erhöhte Ferritinspiegel bei 30% bis 60% [76, 77]. Bei 10% bis 30% findet man ebenfalls erhöhte Eisenkonzentrationen in der Leber [67, 78-80]. Zugleich wurde festgestellt, daß beim Vorliegen erhöhter Eisen-Parameter solche Hepatitis C Patienten schlechter auf die Interferontherapie ansprechen [81-83]. Die Ursachen dieses klinischen Zusammenhangs sind bislang nicht bekannt. Aderlässe sind möglicherweise eine brauchbare Therapiemethode um die Wirksamkeit der Interferontherapie bei dem betroffenen Patientenkollektiv zu erhöhen [84-86].

Die molekularbiologischen Ursachen für die erhöhten Lebereisenkonzentrationen chronischer HCV-Patienten sind unklar. Das Genom des HCV weist in den 5'- und 3'-NTRs keine IRE-Zielsequenzen (s. 2.2.2) auf und das Vorkommen der spezifischen Nukleotidsequenz CAGUGN (N = beliebige Nukleobase außer Guanin) innerhalb des Leserasters entspricht der statistischen Erwartung. Allerdings ist beschrieben, daß es IRE-bindende Proteine gibt, die Eisen-abhängig auch mit der IRES des HCV interagieren [87]. Oxidativer Stress wird in der Zelle durch Struktur–

und nicht-Struktur-Proteine des HCV über unterschiedliche Mechanismen ausgelöst [88-90], wobei sowohl induzierende [91], wie auch hemmende [92] Effekte insbesondere auf die IFN-Signalvermittlung beschrieben sind.

2.3 Zellhydration und Zellfunktion

2.3.1 Dynamik der Zellvolumenhomöostase

Das Volumen einer Zelle ist nicht konstant. Zellvolumenänderungen zeigen sich binnen Minuten unter dem Einfluß von Anisoosmolarität, Hormonen, Nährstoffen und oxidativem Stress, wobei sog. Osmosensoren Zellhydrationsänderungen registrieren ("Osmosensing" und dadurch Signaltransduktionsprozesse auslösen und "Osmosignaling") [93, 94]. Dadurch stellen Zellvolumenänderungen ein unabhängiges Signal dar, welches zur Regulation des Zellmetabolismus und der Genexpression beiträgt [94, 95]. Eine Zellschwellung fördert anabole Effekte, wie die Inhibierung der Proteolyse, der Glykogenolyse und der Gluconeogenese bei gleichzeitiger Stimulation der Protein- und der Glykogen-Synthese [94]. Zudem wird die Zellzyklusprogression gefördert. Eine Zellschrumpfung fördert hingegen katabole Prozesse durch Stimulation der Proteolyse, der Glykogenolyse und Gluconeogenese [96].

Auf hypo- bzw. hyperosmotische Umgebungsosmolaritäten reagieren Hepatozyten Zellvolumenzunahme bzw. Zellvolumenabnahme. Zuge mit einer Im der Gegenregulation dieser Volumenänderungen kommt es zur Ausscheidung (regulatory volume decrease, RVD) bzw. Aufnahme (regulatory volume increase, RVI) gelöster Stoffe und Wasser [97]. RVI erfolgt initial durch ionische Mechanismen, wodurch sich allerdings die intrazelluläre lonenstärke erhöht, was die Funktion unterschiedlicher Proteine beeinträchtigen kann. Langfristig erfolgt eine Adaption durch isoosmotischen Austausch von Ionen gegen kompatible organischer Osmolyte. Solche Moleküle, z. B. Betain, myo-Inositol und Taurin stören auch in hohen Konzentrationen die Funktion von Proteinen nicht [98]. Die Mechanismen des RVD und RVI führen allerdings nicht zu einer vollständigen Wiederherstellung des initialen Leberzellvolumen, so daß die Hepatozyten eine leichte Schwellung bzw. Schrumpfung behalten. Diese Maßabweichung fungiert möglicherweise als Signal

Funktion. zur Modulation der zellulären In vitro können extrazelluläre Osmolaritätsveränderungen von etwa 100 mosmol/I Zellvolumenveränderungen zu erreichen, die den in vivo unter pathophysiologischen Bedingungen anzutreffenden vergleichbar sind [99]. Diese Prozesse sind in Abb. 2.8 schematisch zusammengefaßt.



Mechanistisch ist das Osmosensing in weiten Teilen geklärt. Dem Integrinsystem kommt eine zentrale Rolle bei der Registrierung einer Volumenzunahme in Hepatozyten zu [100]. Interessanterweise wird auch die durch Insulin induzierte Hepatozytenschwellung über das Integrinsystem registriert und in Signale übersetzt, deren Blockade in der Leber eine Insulinresistenz erzeugt [101]. Unter hyperosmotischen Bedingungen kommt es zu einer Clusterung und Aktivierung von Plasmamembranrezeptoren [102]. Weiterhin kann eine Einflußnahme durch oxidativen Stress angenommen werden, da schon gezeigt wurde, daß es durch Hyperosmolarität in Hepatozyten [103], aber auch durch Hypoosmolarität in Fibroblasten [104] und Astrozyten [105] rasch zur Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies kommt. Andererseits kommt es in Folge von oxidativem Stress zur

Schrumpfung von Hepatozyten [106, 107], so daß hier sich selbst verstärkende Amplifikationszyklen bei der Signalgenerierung anzunehmen sind.

2.3.2 Virale Replikation in Abhängigkeit der Zellhydration

Seit Mitte der 1960er Jahre wurden in Zell- bzw. Gewebekultursystemen Hydrationseffekte auf die virale Replikation von RNA-Viren (Polio-, Sindbis-, Retikuloendotheliose Virus) beobachtet [108-111]. Seit Mitte der 1970er Jahre sind Beobachtungen zu Dysfunktionen im Elektrolythaushalt bei Lebererkrankungen beschrieben [112-114], die Datenlage bzgl. solcher Untersuchungen bei viralen Hepatiden ist allerdings spärlich. Mit der Verbesserung der Analysemethoden und in Anbetracht der epidemiologischen Daten wurden Mitte der 1990er Jahre die Analysen der frühen Modelle wieder aufgegriffen und an die Untersuchung viraler Hepatiden angepaßt. Offensperger et al. zeigten 1994 an HBV-infizierten Hepatozyten von Enten, daß Anisoosmolarität die virale Replikation beeinflußt [115]. Dabei sinkt die Replikationsrate bei Zellschwellung (Hypoosmolarität) und steigt bei Zellschrumpfung (Hyperosmolarität). Auch Glebe et al. fanden 2001 beim Versuch die Zellkulturbedingungen für die HBV-infizierte Hepatomzelllinie HepG2.2.15 für eine stärkere virale Replikationsrate zu optimieren eine Steigerung in Folge von Hyperosmolarität [116]. Bei in vitro Studien mit der Makrophagen-ähnlichen U1 Zelllinie, die das HIV Genom expremiert, konnte ebenfalls gezeigt werden, daß unter hyperosmotischen Bedingungen die virale Replikation gesteigert ist. [117]. Daten zur Replikation von HCV aus Modellsystemen zur HCV-Infektion liegen bislang nicht vor.

2.4 Zielsetzung

Die Replikation des Hepatitis C Virus kann im Modellsystem des subgenomischen Replikons durch Noxen bzw. Stimuli beeinflußt werden. An der Replikation sind neben viralen Proteinen auch zelluläre Faktoren beteiligt. Zielsetzung dieser Arbeit war es die Beeinflussung der HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell beim Vorliegen einer Eisenüberladung, bzw. beim Vorliegen von Anisoosmolarität zu charakterisieren. In diesem Rahmen sollte eine Identifikation der bei Eisenüberladung bzw. bei Anisoosmolarität angesteuerten zellulären Faktoren stattfinden. Zu diesem Zweck sollten jeweils mittels DNA-Mikroarray-Analysen Veränderungen der Genexpression und mittels differentieller Proteinanalytik und Massenspektrometrie Veränderungen der Proteinexpression im Modellsystem an Huh9-13 Zellen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Tab. 3.1: Übersicht der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Firma
3111 Forma Scientific CO ₂ Water-jacketed Incubator	Thermo Scientific, Langenselbold
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
CURIX 60, Filmentwickler	AGFA, Köln
FLA-8000, Laserscanner	Fujifilm, Düsseldorf
GeneAmp 2400 (bzw. 9700) PCR System	PerkinElmer, Massachusetts, USA
GeneQuant II, Photometer	Pharmacia, Karlsruhe
HS400pro, Hybridisierstation	Tecan, Crailsheim
micrOTOF-Q, Massenspektrometer	Bruker Daltonics, Bremen
NuPAGE [®] XCell Sure Lock [™] Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] XCell II [™] Blot Module Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Osmomat 030, Gefrierpunktosmometer	Gonotec, Berlin
QArray2, Spotter	Genetix, Hampshire, England
Sonorex RK 103 H, Ultraschallbad	Bandelin Electronics, Berlin
Spectra, ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim
Typhoon [™] 9400 Variable Mode Imager	Amersham, Freiburg
Ultimate 3000 Nanoflow HPLC	Dionex, Idstein
Ultrospec Plus, Spektralphotometer	LKB Biochrom, Freiburg
UniVapo 150 H, Vakuumkonzentrator	UniEquip, München

3.1.2 Kits

Tab. 3.2: Überblick über die verwendeten Kits

Kit	Firma
Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad, München
CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit	Amersham, Freiburg
maxXbond, Regenerationssystem	AppliChem, Darmstadt
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder Homogenizer	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNA 6000 Pico LabChip Kit	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
SilverQuest [™] Silver Staining Kit	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
TOX2, in vitro Toxicology Assay Kit	Sigma/Aldrich, Seelze
Western Lightning [™]	PerkinElmer, Massachusetts, USA

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
BioMax XAR Filme	Kodak, Stuttgart
Cryo-Tubes [™] , Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
MicroAmp [™] Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
MicroAmp [™] Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Weiterstadt
NuPAGE [®] Novex 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Polaroid 667/10F Filme	Polaroid, Dreieich-Sprendlingen
PROTRAN [®] Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Super RX Filme	Fujifilm, Düsseldorf
Whatman 3MM CHR Blotting Sheets	Schleicher & Schuell, Dassel

3.1.4 Chemikalien und Medien

Sämtliche Chemikalien und Medien entsprachen der höchst zu erwerbenden Reinheit und wurden, wenn nicht in nachstehender Tabelle aufgelistet, von Sigma-Aldrich Laborchemikalien (Seelze), AppliChem (Darmstadt) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Produkt	Firma		
Acetonitril	Bio-Solve, Valkenswaard, Holland		
Ampholine	Amersham, Freiburg		
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad, München		
cOmplete Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim		
Cy2, Cy3 und Cy5 zur Proteinmarkierung	Amersham, Freiburg		
Cy3-dUTP	Amersham, Freiburg		
DMEM/F-12 (1:1) mit 900 mg/l Glukose, w/o NaCl	Invitrogen, Karlsruhe		
DMEM/F-12 (1:1) mit GlutaMAX I	Invitrogen, Karlsruhe		
DMEM/F-12 (1:1) mit L-Glutamin, ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe		
Dulbeccos PBS	Invitrogen, Karlsruhe		
Fötales Rinderserum	Biowest, Nuaillé, Frankreich		
Geneticin [®]	Invitrogen, Karlsruhe		
I-Block [™]	Tropix, Bedford, USA		
Multimark Multi-Colored Standard	Invitrogen, Karlsruhe		
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe		
PageRuler [™] Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot		
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe		
Pharmalyt	Amersham, Freiburg		
Ponceau-S Lösung	Serva, Heidelberg		
Random Primer p(dN) ₆	Roche, Mannheim		
Roferon [®] -A	Roche, Mannheim		

Tab. 3.4: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Medien

Produkt	Firma
Servalyt	Serva, Heidelberg
SimplyBlue [™] Safestain	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom AG, Berlin

3.1.5 Lösungen und Puffer

PBS	137	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	8,2	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8	mM	KH ₂ PO ₄
PBST	0,1	%	PBS (s. o.) Tween-20
Protein-Lysispuffer	30	mM	Tris Base, pH 8,5
	7	M	Harnstoff
	2	M	Thioharnstoff
	4	%	CHAPS (w/v)
4 x LDS Ladungspuffer	40 440 560 300 1,6 0,075 0,025	% mM mM mM % %	Glycerol Tris-HCl Tris Base LDS EDTA Serva Blau G250 Phenolrot
MES/SDS-Laufpuffer	50	mM	MES
	50	mM	Tris
	0,1	%	SDS
	0,8	mM	EDTA
Blottingpuffer	25	mM	Bicin
	25	mM	Bis-Tris, pH 8,3
	0,8	mM	EDTA
	20	%	Methanol
Blockierungslösung	0,2 4	% %	PBST (s. o.) I-Block [™] Milchpulver (Blotting-Grade Blocker)
Western-Stripping-Puffer	200	mM	Glycin, pH 2,6
	0,1	%	SDS
	0,1	%	Tween-20
Äquilibrierungspuffer	125	mM	Tris Base; pH 6,8
	40	%	Glycerin (v/v)
	3	%	SDS (w/v)
	65	mM	DTT

Trägerampholyt-Mischung	8 8 16 24 8	ml ml ml ml	Ampholine pH 3,5-10 Servalyt pH 2-11 Pharmalyt pH 5-8 Pharmalyt pH 4-6,5 Servalyt pH 6,5-9
Schutzlösung	30	%	Harnstoff
	5	%	Glycerin
	2	%	Servalyt pH 2-4
Separationsgel pH 2-11	3,5 0,3 4 9 5 0,06	% % M %	Acrylamid (w/v) Piperazindiacrylamid (w/v) Trägerampholyt-Mischung (v/v) (s. o.) Harnstoff Glycerin (w/v) TEMED (v/v)
Abschlussgel pH 2-11	12,3 0.13 4 9 5 0,06	% % M % %	Acrylamid (w/v) Piperazindiacrylamid (w/v) Trägerampholyt-Mischung (v/v) Harnstoff Glycerin (w/v) TEMED /v/v)
Anodenpuffer	742	mM	Phosphorsäure
	3	M	Harnstoff
Kathodenpuffer	5	%	Ethylendiamin (v/v)
	5	%	Glycerin (v/v)
	9	M	Harnstoff
Trenngel	750	mM	Tris; pH 8,8
	15	%	Acrylamid
	0,2	%	Bisacrylamid
	0,06	%	TEMED
	0,2	%	SDS
Laufpuffer	0,3	%	Tris Base
	1,44	%	Glycin
	0,1	%	SDS
Stopplösung	10	mМ	L-Lysin
Extraktionslösung	2,5	%	Ameisensäure
	50	%	Acetonitril
Trennmittellösung A	0,1	%	Ameisensäure
Trennmittellösung B	0,1	%	Ameisensäure
	84	%	Acetonitril
Einfriermedium	90	%	FBS
	10	%	DMSO
SSC	150	mM	NaCl
	15	mM	Natriumcitrat; pH 7,2
Vorhybridisierungspuffer	5	x	SSC; pH 8,0
	1	%	BSA (w/v)
	0,1	%	SDS

Hybridisierungspuffer	5	x	SSC; pH 8,0
	0,1	%	SDS
	50	%	Formamid
Array-Waschpuffer	2	x	SSC
	0,1	%	SDS

3.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide der nachstehenden Tabelle wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Tab. 3.5: Oligonukleoti	de für die DNA-Amplifikation

Bezeichnung	Sense Oligonukleotid	Antisense Oligonukleotid	
HCV-NS3 #1	AACGGACGCTCTAATGACGG	TTGCAGTCGATCACTGAGTCG	
HCV-NS3 #2	TCTTTACAGGCCTCACCCACA	TGCCTGCTTAGTCTGGGACAA	
hSDHA	CCTGGAGATAAAGTCCCTCCAA	ACAGATTCTTCCCCAGCGTTT	

3.1.7 Antikörper

Tab. 3.6: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Firma	
HCV NS3	Abcam, Cambridge, England	
HCV NS5B	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz	
GAPDH	Chemicon, Temecula, USA	
ECL Anti-Kanninchen IgG, Meerrettich- Peroxidase gekoppelt	Amersham, Freiburg	
ECL Anti-Maus IgG, Meerrettich- Peroxidase gekoppelt	Amersham, Freiburg	

3.1.8 Zelllinien

Tab. 3	3.7:	Übersicht	der	verwendeten	Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Anmerkung	
Huh-7	Humane Hepatomzellen	Nakabayashi <i>et al.</i> , 1982 [38]	
Huh9-13	Humane Hepatomzellen	Lohmann <i>et al.</i> , 1999 [35]	

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Huh-7 Zellklone 9-13 (kurz: Huh9-13) mit dem subgenomischen HCV-Replikon wurden in "Dulbecco's modified Eagle Medium" (DMEM) F-12 mit GlutaMAX I plus 10% fötalem Rinderserum, Streptomycin (100 μ g/ml), Penicillin (100 U/ml) und Geneticin (G418) (500 μ g/ml) kultiviert. Dies erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ in Luft und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Vor einem Versuch wurden die Zellen über Nacht gehungert. Dazu wurde Kultivierungsmedium ohne FBS Zusatz verwendet. Angestrebt wurde dadurch die Synchronisation der Zellen im Zellzyklusstadium (G0/G1). Die Versuchsdurchführung erfolgte anschließend stets in FBS-freiem Medium.

Für die Versuche zur Eisenüberladung wurden dem Medium entweder die Metallverbindungen FeSO₄, Fe(III)Citrat, CaCl₂ oder MgSO₄, oder die Chelatoren Bathophenanthrolindisulfonsäure (BPS) bzw. Deferoxamin (DFO) zugesetzt. Für die Experimente wurde die Stoffmengenkonzentration im Medium um 100 µmol/l, für Konzentrationsreihen um 10, 50, 100 und 500 µmol/l erhöht.

Die Herstellung der anisoosmotischen Medien geschah auf Basis des DMEM/F-12 (900 mg/l Glukose) w/o NaCl (s. 3.1.4). Um dieses Medium auf die Glukosekonzentration des DMEM/F-12 mit GlutaMAX I Mediums anzupassen, wurden 225 mg Glukose je 100 ml Medium zugesetzt.

Hypoosmotisches Medium (220 mosmol/I) wurde durch eine 2:3 Mischung dieses Mediums mit dem DMEM/F-12 mit GlutaMAX I Medium hergestellt.

Hyperosmotisches Medium wurde durch Zugabe von 1,66 g NaCl pro 100 ml DMEM/F-12 (900 mg/l Glukose) w/o NaCl hergestellt und steril filtriert. Durch Mischung mit DMEM/F-12 mit GlutaMAX I Medium im Verhältnis von 2:3 erhielt man ein hyperosmotisches Medium mit 420 mosmol/l.

Bei Kontrollversuchen wurde die Osmolarität der Medien mit dem alternativen, nicht-zellpermeablen Osmolyt Raffinose eingestellt. Ausgehend vom hypoosmotischen Medium (220 mosmol/l) wurde durch Zugabe von 100 mmol/l Raffinose normoosmotisches (320 mosmol/l) und durch Zugabe von weiteren 100 mmol/l Raffinose hyperosmotisches (420 mosmol/l) Medium erzeugt.

Der Zusatz der Antibiotika erfolgte bei den anisoosmotischen Medium so, wie auch beim Standardkultivierungsmedium.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen humaner Zellen

Die Zellen wurden mittels Trypsinbehandlung von den Kulturflaschen abgelöst (2 ml für 2 min mit Trypsin/EDTA Lösung), mit 8 ml Medium versetzt und in 15 ml Falconröhrchen überführt. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 350 x g wurde der Überstand verworfen, das Pellet zum Waschen in 10 ml Medium vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden rasch bei 37°C aufgetaut und in Zellkulturflaschen mit 12 ml Medium überführt. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt und die Konfluenz begutachtet.

3.2.3 Zytotoxizitätsassay

Das Ausmaß der Zellschädigung wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers mit dem TOX2 *in vitro* Toxicology Assay Kit bestimmt. Als Basis wurde das DMEM/F-12 (mit L-Glutamin, ohne Phenolrot) Medium verwendet. Der Zusatz der Antibiotika erfolgte so, wie auch beim Standardkultivierungsmedium (s. 3.2.1). Mit 5 ml des Basismediums ohne Phenolrot wurden 5 mg XTT einer Ampulle des TOX2 Kits gelöst. Gebrauchsfertiges XTT-Medium wurde durch fünffache Verdünnung dieser Stammlösung mit dem Basismedium ohne Phenolrot hergestellt. Gleiche Zellzahlen wurden in Deep Well Zellkulturschalen ausgesäht. Nach Ablauf des Versuchs wurde das jeweilige Medium abgezogen und die Zellen mit XTT-Medium überschichtet und für 4 h weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Extinktion der Überstände bei λ = 450 nm im Tecan Spectra Reader.

3.2.4 Proteinanalye

3.2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Zellen wurden in Protein-Lysispuffer im Ultraschallbad (mit Eis) für 45 min lysiert und bei 16.000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die Bestimmung der

Proteinkonzentration im Überstand erfolgte photometrisch nach Bradford [118] mit dem Bio-Rad Protein-Assay. In einer Einwegküvette wurden 5 µl Lysat, 795 µl dest. H_2O und 200 µl Bradfordreagenz gemischt und die Extinktion bei λ = 595 nm im LKB Biochrom Ultrospec Plus Photometer bestimmt. Zur Berechnung der Proteinkonzentration in µg/µl wurden die gemessenen Werte mit dem gerätespezifischen Eichfaktor von 3,8 multipliziert.

3.2.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Vom Zelllysat wurden, wenn nicht anders erwähnt, 50 µg Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proben wurden mit dem NuPAGE[®] LDS Sample Buffer und DTT (Endkonzentration 100 mM) für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in diskontinuierlichen NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis-Tris Gelen mittels NuPAGE[®] XCell Sure Lock[™] Mini-Cell System. Als Größenstandards wurden der Multimark Multi-Colored Standard oder die PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 200 V für ca. 45 min in MES-Laufpuffer durchgeführt.

3.2.4.3 Western-Blot Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mittels NuPAGE[®] XCell II[™] Blot Module Kit auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies erfolgte in Blottingpuffer für 2,5 h bei 24 V Spannung.

3.2.4.4 Immunodetektion

Nach erfolgtem Blot wurde der Transfer der Proteine auf die Membran mittels Ponceau-Färbung kontrolliert. Im Anschluß an die Entfärbung der Membran mit PBST wurden die freien Bindungsstellen blockiert. Dazu wurde sie bei RT für 1 h mit Blockierungslösung schüttelnd inkubiert. Dann wurde die Membran üN mit dem jeweiligen Erstantikörper in Blockierungslösung bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBST wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in Blockierungslösung bei RT für 1 h schüttelnd inkubiert. Nach erneutem, zweimaligen Waschen mit PBST wurde der Sekundärantikörper mit Hilfe des Western Lightning[™] ECL-Systems detektiert. Die Exposition erfolgte in einer Autoradiographiekassette auf BioMax XAR oder Super RX Filmen, die Filmentwicklung im CURIX 60.

Vor einer anschließenden Detektion mit einem anderen Erstantikörper wurden die gebundenen Antikörper zunächst abgelöst. Dazu wurde die Membran zweimal für 30 min bei RT in Western-Stripping-Puffer schüttelnd inkubiert, mit PBST gewaschen und erneut mit einer einstündigen Inkubation in Blockierungslösung begonnen.

3.2.5 Differentielle Proteinanalyse

Die Untersuchungen zur differentiellen Proteinanalyse mittels 2D-DIGE wurden in Kooperation mit dem Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

3.2.5.1 Präparation der Gesamtproteine und Proteinbestimmung

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und nach Ablösung aus der Zellkulturschale in PBS aufgenommen und 5 min. bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Protein-Lysispuffer für 10 s im Ultraschallbad (mit Eis) behandelt und anschließend 50 s im Eis gekühlt. Diese Prozedur wurde insgesamt sechs Mal wiederholt. Anschließend wurde bei 16.000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine im Überstand erfolgte photometrisch nach Bradford (s. 3.2.4.1).

3.2.5.2 Proteinmarkierung für die 2D-DIGE

Die Cy-Farbstoffe wurden in DMF auf eine Konzentration von 400 pmol/µl verdünnt. Je µg Gesamtproteinlysat wurden 8 pmol Farbstoff eingesetzt. Die Markierungsreaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und durch Zugabe von 1 µl Stopplösung je 400 pmol Farbstoff beendet. Der interne Standard enthielt äquivalente Mengen der vereinigten Proteine von allen Wiederholungen aller Versuchsbedingen einer jeweiligen Versuchsreihe.

3.2.5.3 2D-Gelektrophorese

Die 2D-PAGE wurde nach einer Methode von Klose & Kobalz [119] durchgeführt. Für die isoelektrische Fokussierung (erste Dimension) der Proteine wurden je nach Verwendungszweck Trägerampholyte in Rundgelen eingesetzt (20 cm lang mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm). Bei den analytischen Gelen wurden jeweils 50 μ g pro Zustand (insgesamt 150 μ g), bei den präparativen Gelen 400 μ g Gesamtprotein aufgetrennt. An der Auftragestelle wurde vor dem Probenauftrag ein Sephadexgemisch direkt auf das Separationsgel aufgebracht, welches in Abwandlung der beschriebenen Methode wie folgt modifiziert war: Zusatz von 331 mg einer Harnstoff/Thioharnstoff-Mischung (7 M / 2 M) + 25 μ I Ampholine-

Mischung / 270 mg Sephadex-Suspension + 25 μ I DTT (1,08 g / 5 ml). Nach dem blasenfreien Auftragen der Probe wurde sie mit der Schutzlösung überschichtet und dann nachstehendes Spannungsprogramm für die 20 cm IEF gestartet: 1 h bei 100 V; 1 h bei 200 V; 17,5 h bei 400 V; 1 h bei 650 V; 30 min bei 1000 V; 10 min bei 1500 V und 10 min bei 2000 V.

Nach dem Lauf wurden die IEF-Gele in Äquilibrierungspuffer inkubiert. Die anschließende SDS-PAGE (zweite Dimension) wurde in 15%-igen Acrylamidgelen durchgeführt. Die IEF-Gele wurden 2 x mit Laufpuffer gewaschen und anschließend auf das SDS-Gel appliziert und mit einer 1%-igen Agaroselösung (mit Bromphenolblau) fixiert. Das Einwandern der Proteine in das SDS-Gel erfolgte bei 75 mA, die elektrophoretische Trennung bei 100 mA bis eine Trennstrecke von 30 cm erreicht wurde. Die Gelkammern wurden konstant auf 15°C temperiert.

3.2.5.4 Bilderfassung und Bild-Analyse

Die SDS-Gele wurden mit einem Typhoon[™] 9400 Variable Mode Imager gescannt, wobei die Anregungs- und Emissionswellenlängen für jeden Cy-Farbstoff entsprechend der Empfehlung des Herstellers gewählt wurden. Die Aufbereitung der Bilder erfolgte zunächst mit der ImageQuant[™] Software (Amersham, Freiburg). Die intra-Gel Spot-Detektion, sowie der inter-Gel Abgleich erfolgten per "Differential Ingel Analysis" (DIA) Modul bzw. "Biological Variation Analysis" (BVA) Modul der DeCyder Software (Amersham, Freiburg). Die Fluoreszenzintensitäten der Spots wurden auf den internen Standard (s. 3.2.5.2) bezogen normalisiert.

3.2.6 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen zur Identifizierung differentiell exprimierter Proteine wurden in Kooperation mit dem Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

3.2.6.1 Probenvorbereitung und in-Gel Trypsinverdau

Differentiell exprimierte Proteinspots wurden, mit dem Ziel der Identifizierung, massenspektrometrisch weiter untersucht. Die Spots wurden aus dem jeweiligen präparativen Gel ausgestochen und zunächst abwechselnd 3 x 10 min. in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7,8) bzw. 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat und 50% Acentonitril gewaschen. Nach Trocknung der Gelstücke in der

Vakuumzentrifuge wurden sie zur proteolytischen Spaltung einem Trypsinverdau (0,03 µg/µl Trypsin in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat) unterzogen. Die Spaltung erfolgte üN bei 37°C. Im Anschluß an die tryptische Spaltung der Proteine wurden die Gelstücke mit 20 µl Extraktionslösung überschichtet und 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Extraktionsvorgang mit dem Gelstück wiederholt. Die vereinigten Überstände beider Extraktionsprozesse wurden auf 16 µl eingeengt und für die HPLC verwendet.

3.2.6.2 Identifikation mittels Massenspektrometrie

Die extrahierten Peptide wurden mittels LC-MS/MS in einem ESI-QTOF Massenspektrometer, dem eine Nanoflow HPLC vorgeschaltet war analysiert. Die Umkehrphasehauptsäule (Innendurchmesser 75 µm, 15 cm Länge, Acclaim C18 PepMap Säulenmaterial) wurde bei einer Durchflußrate von 300 nl/min durchströmt. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurden die Proben nach 10 min Vorkonzentration auf einer Vorsäule (Innendurchmesser 100 µm, 2 cm Länge, Acclaim C18 PepMap Säulenmaterial) in einem Gradienten von 5% bis 35% Trennmittellösung B über einen Zeitraum von 34 min appliziert. Anschließend wurde für 15 min mit 90% Trennmittellösung B gespült und danach die Säule über weitere 15 min wieder äquilibriert.

Die Massenspektren wurden im Bereich von 100 bis 2000 $\frac{m}{z}$ aufgenommen. Die Nanospraykapillare wurde mit 1300 bis 1500 V bei einem Stickstoffdurchfluß von 6 l/min bei 140°C betrieben. Auf jeden MS-Scan folgte eine MS/MS-Messung der drei lonen mit den höchsten Intensitäten bei variablen Kollisionsbedingungen von 800 bis 250 Vpp (Volts per pole) während der Fragmentierung. Die Analysezyklen lagen je nach Intensitäten der zuvor gemessenen Peptide zwischen 3,6 s und 5,4 s. Über die Data Analysis Software (Bruker Daltonics, Bremen) erfolgte der Export der Analysedaten. Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch Korrelation der Daten des Massenspektrometers mit dem humanen Internationalen Protein Index (Human IPI v3.41 Decoy Datenbank mit 72.155 Protein- und 72.155 Decoy-Einträgen) über die ProteinScape[™] Datenbank Plattform (v1.3, Bruker Daltonics, Bremen). Ein Protein wurde als signifikant identifiziert, wenn mind. 2 Peptide mit einem Mascot-Score von jeweils mind. 22,5 dem Protein zugeordnet werden konnten. Wenn
mehrere Proteine diese Kriterien erfüllt haben, wurde das Protein mit dem höchsten Gesamt-Mascot-Score als identifiziert erachtet.

3.2.7 RNA Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde nach den Angaben des Herstellers mittels RNeasy Kit aufgereinigt. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit erfolgte spektroskopisch bei den Wellenlängen 230, 260, 280 und 320 nm mit dem GeneQuant II Spektralphotometer.

3.2.8 RNA Qualitätsbestimmung

Durch Kapillarelektrophorese am Agilent 2100 Bioanalyzer wurde nach Herstellerprotokoll die Qualität der aufgereinigten Gesamt-RNA mit dem RNA 6000 Pico LabChip Kit kontrolliert. Dies wurde durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (BMFZ) durchgeführt. Als Ergebnis wurde ein Elektropherogramm ausgegeben aus dem Größen und Mengeverteilung der RNA ersichtlich wurden (Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Elektropherogramme von Gesamt-RNA links: Elektropherogramm von RNA guter Qualität. Den überwiegenden Anteil bilden rRNAs, wobei der kleinere Peak der 18S und der größere der 28S rRNA gut zu erkennen sind. Der Quotient aus 28S zu 18S rRNA beträgt etwa 2.

<u>rechts</u>: Elektropherogramm von teilweise degradierter RNA. Die Peaks der 18S und 28S rRNA sind undeutlich und im niedermolekularen Bereich wird RNA unterschiedlicher Fragmentgrößen detektiert.

3.2.9 Regeneration von Silikasäulen

Nukleinsäure-Bindesäulen auf Basis einer Silika-Matrix wurden nach dem Gebrauch zur Isolierung bzw. Aufreinigung von Nukleinsäuren (s. 3.2.7 u. 3.2.11.1) mit dem maxXbond Kit nach Herstellerangaben regeneriert und dann wiederverwendet.

3.2.10 Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR (RT-PCR)

Die Änderungen des Replikationsniveaus des subgenomischen HCV-RNA-Konstruktes in Huh9-13 Zellen wurden durch quantitative Real-Time PCR mit dem ABI 7500 Real Time PCR System ermittelt. Die Gesamt-RNA wurde dafür zunächst mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit in cDNA umgeschrieben. Das subgenomische HCV-Replikon hat im Gegensatz zur mRNA keinen poly(A)-Schwanz, so daß bei Verwendung von Oligo-d(T)-Primern das Replikon nicht zu cDNA umgeschrieben werden kann. Da der RT Primer Mix des QuantiTect Reverse Transcription Kit eine Mischung von Oligo-d(T)- und Random-Primern enthält, wurden, um eine gleichmäßige Transkription zu gewährleisten, anstatt des RT Primer Mix die Random Primer $p(dN)_6$ zur cDNA-Synthese für die Real-Time PCR verwendet.

Der PCR-Ansatz wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem SYBR[®] Green PCR Master Mix durchgeführt. Für die Standardisierung der relativen RNA-Spiegel wurde als endogene Kontrolle die Untereinheit A des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes (SDHA) verwendet. Sämtliche benutzten Oligonukleotide sind der Tabelle Tab. 3.5 unter 3.1.6 zu entnehmen.

Die PCR-Zyklen wurden wie folgt gewählt: 2 min 50°C, 10 min 95°C, danach 40 Zyklen mit 15 s bei 95°C und 1 min bei 60°C.

Im Anschluß an die PCR wurden die Amplifikate durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft.

3.2.11 DNA Mikroarray Hybridisierung

3.2.11.1 RNA Isolierung und Synthese von cDNA

Die RNA Isolierung erfolgte wie unter 3.2.7 beschrieben. Zur Herstellung von Fluoreszenz-markierter cDNA wurden 50 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Synthese erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll mit dem CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit unter Verwendung von Cy3-dUTPs. Die Aufreinigung der Cy3-markierten cDNA erfolgte anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit entsprechend der Angaben des Herstellers.

3.2.11.2 DNA Mikroarray Analyse

Die Mikroarray Analysen wurden in Kooperation mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (BMFZ) durchgeführt. Die Cy3-markierte cDNA wurde in 220 µl Hybridisierungspuffer gelöst, 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend in eine HS400pro Hybridisierstation injiziert. Der Programmablauf der HS400pro ist: Vorhybridisierung für 45 min bei 42°C in Vorhybridisierungspuffer, Hybridisierung für 1 h bei 60°C, anschließend für 16 h bei 42°C in Hybridisierungspuffer, zweimaliges Waschen für 2 min bei 23°C in Array-Waschpuffer, dreimalig für 1 min bei 23°C mit 0,1 x SSC, 1 x für 10 s bei 23°C mit 0,01 x SSC, Trocknung für 2 min bei 25°C.

Die Visualisierung der an die Gensonden hybridisierten cDNA erfolgte mit dem FLA-8000 Laserscanner mit diesen Parametern: Anregung 532 nm, Emissionsfilter 570 nm, Auflösung 10 µm, Scangeschwindigkeit 200 mm/s, Photomultiplierspannung 100%.

Die Analyse der gescannten Bilder erfolgte mit der AIDA Array Analysis Software (Raytest, Straubenhardt). Es wurden die Fluoreszenzintensitäten jedes Spots integriert und die Hintergrundintensität subtrahiert. Die erhaltenen Werte dienten zur Ermittlung der Normalisierungsannäherung. Dabei wurden Gene, bei denen das Verhältnis von Signal– zu Hintergrund–Intensität kleiner als 2,5 war, als nicht-detektierbar gewertet. Die Unterschiede in der Genexpression wurden als log₁₀ des Verhältnis der Mediane der normalisierten Intensitäten von Versuchs– zu Kontroll– Bedingungen berechnet. Die nach der Datenanalyse ermittelten Gene wurden in fünf Gruppen geordnet. Verhältnisse im Bereich von $\pm 0,18$ kennzeichneten unregulierte und im Bereich zwischen $\pm 0,18$ und $\pm 0,3$ mäßig regulierte Gene. Bei einem Verhältnis > 0,3 waren Gene hochreguliert bei < -0,3 herabreguliert.

Zur Interpretation der Genexpressionsdaten und Charakterisierung der identifizierten Gene wurden die GenMAPP Software (v2.1; <u>http://www.genmapp.org/</u>) [120], und die Internet-Plattformen "DAVID" (<u>http://david.abcc.ncifcrf.gov/</u>) [121] und "eGOn" (v2.0; <u>http://www.genetools.microarray.ntnu.no/</u>) [122] verwendet.

3.2.12 Berliner Blau Färbung zum Nachweis von Eisen

Huh9-13 Zellen wurden 24 h in Medium, dem 100 µmol/I FeSO₄ zugesetzt war, inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und 10 min bei RT in 4%-iger Paraformaldehydlösung fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min mit 0,1%-iger Triton X-100 Lösung permeabilisiert. Wieder wurde mit PBS gewaschen und mit Berliner Blau Lösung (1% HCl, 1% Kaliumhexacyanoferrat (II) [gelbes Blutlaugensalz]) gefärbt. Hierdurch wird eine schwer lösliche, blaue Eisenkomplexverbindung gebildet.

3.2.13 Statistik

Die Darstellung der Daten erfolgte in Form des Mittelwertes \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) von $n \ge 3$ unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse wurde der zweiseitige Studentsche t-Test durchgeführt. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluß einer Eisenüberladung auf die HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell

4.1.1 Untersuchungen zum Effekt steigender Konzentrationen von Eisen auf die HCV-Replikation

Bei Patienten mit chronischer viraler Hepatitis wurde in unabhängigen Studien das gehäufte Vorliegen einer Eisenüberladung beschrieben [73, 74, 78, 79], wobei ebenfalls festgestellt wurde, daß die Patienten schlechter auf die Interferontherapie ansprechen [81-83]. Als Näherung für die physiologische Eisenkonzentration in der Leber wurden die Angaben zu den Normwerten der Eisenkonzentration im Serum herangezogen. Diese unterliegen einem circadianen Rhythmus, weshalb das Referenzintervall von ~0,5 - 1,7 µg/ml, das entspricht ~10 - 30 µmol/l, recht groß ist [64, 123]. Kakizaki et al. haben beschrieben, daß bei Eisenüberladung in einem in vitro Modell der HCV-Infektion die virale Replikation deutlich gesteigert war [124]. Theurl et al. und Cho et al. fanden bei transienter Transfektion in Zellkultur eine Stimulation der HCV-IRES vermittelten Translation [87, 125]. Hingegen zeigten Fillebeen et al. und Yuasa et al., daß eine Eisenüberladung zu einer deutlichen Verminderung der HCV-Replikation führte [126, 127]. In Anbetracht der Datenlage wurde in Huh9-13 Zellen mit dem subgenomischen Replikon I₃₇₇/NS3-3' der Effekt einer Eisenüberladung auf die HCV-Replikation untersucht. Zur Simulation des Vorliegens einer Eisenüberladung wurde im Rahmen einer Konzentrationsreihe die Eisenkonzentration im Medium um 10, 50, 100 und 500 µmol/l durch zweiwertiges Eisen in Form von FeSO₄ erhöht. Nach 24-stündiger Inkubation wurden zum einen die Gesamt-RNA, zum anderen die Gesamtproteine wie beschrieben isoliert und per Real-Time PCR bzw. Western-Blot analysiert.

4.1.1.1 Messung der Änderung der HCV-Replikationsrate mittels Real-Time PCR

Zur Bestimmung der Änderung der HCV-Replikationsrate wurden für die Real-Time PCR Primerpaare im NS3-Gen verwendet (s. 3.1.6). Beide Primerpaare #1 und #2 konnten mit gleicher Effektivität eingesetzt werden, die gebildeten Amplifikate waren 57 bp bzw. 56 bp groß. Die gemessenen Absolutwerte wurden auf die mRNA-Spiegel der endogenen Kontrolle SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A; 50 bp Amplikon) normalisiert.



Abb. 4.1: Einfluß von Eisenüberladung für 24 h auf die HCV-Replikation Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit FeSO₄ bzw. IFNα wie angegeben inkubiert. (A) Die Konzentration von Fe²⁺ im Kultivierungsmedium wurde schrittweise erhöht. Die Replikationsrate des subgenomischen Replikons wurde mittels Real-Time PCR bestimmt. (Mittelwerte ± SEM; n=4; * signifikante (P < 0,01) Verminderung der Replikationsrate) (B) Fe²⁺ wurde in einer Konzentration von 100 µmol/l zur Simulation einer Eisenüberladung eingesetzt. Zum Vergleich wurde die Replikationsrate in Gegenwart von 1000 U/ml IFNα alleine und in Kombination mit 100 µM Fe²⁺ bestimmt. Die Messungen erfolgten mittels Real-Time PCR. (Mittelwerte ± SEM; n=11; * signifikante (P < 0,01) Verminderung der Replikationsrate)

Wie in Abb. 4.1 gezeigt sank bei Erhöhung der Eisenkonzentration die HCV-Replikationsrate um etwa ein Drittel. Dabei wurde keine weitere Verstärkung der Hemmung bei Erhöhung der Eisenkonzentration von 100 µmol/l auf 500 µmol/l gemessen. Gleichzeitig wurden bei 100 µmol/l Fe²⁺ keine, bei 500 µmol/l deutliche zytotoxische Effekte gezeigt (s. 4.1.1.5). Auf Grundlage dieser Befunde wurde in weiteren Versuchen eine Eisenüberladung durch Erhöhung der Eisenkonzentration um 100 µmol/l erzeugt. Im direkten Vergleich zur Inhibierung durch 1000 U/ml Interferon- α (IFN α) war dabei die Hemmung der Replikation etwa halb so groß. Bei gleichzeitiger Zugabe von 100 μ M Fe²⁺ und 1000 U/ml IFN α sank die Replikationsrate um noch etwa 5%.

4.1.1.2 Nachweis der Änderung der HCV-Replikationsrate mittels Western-Blot

Um die Daten der Real-Time PCR zur Änderung der Replikationsrate bei steigenden Eisenkonzentrationen zu überprüfen, wurde mittels Western-Blot die Proteinexpression des subgenomischen Replikons analysiert. Der Nachweis erfolgte durch spezifische Antikörper gegen die HCV-Proteine NS3 und NS5B, als unabhängiger, konstitutiver Proteinmarker wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3phosphat-Dehydrogenase) gewählt. Aufgrund der nur geringfügigen Hemmung durch 10 µmol/l Fe²⁺ wurde wegen der voraussichtlich schlechten Visualisierung im Western-Blot bei der Versuchsdurchführung zur späteren Proteinanalyse auf diese Konzentrationsstufe verzichtet. Wie in Abb. 4.2 dargestellt zeigte sich entsprechend der Real-Time PCR Analysen bei steigender Eisenkonzentration eine Verminderung der viralen Proteinexpression.



Abb. 4.2: Einfluß von Eisenüberladung für 24 h auf die HCV-Proteinexpression Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit zunehmenden Konzentrationen an FeSO₄ wie angegeben inkubiert. Je Spur wurden 50 µg Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist eine repräsentative Western-Blot Analyse (n=3).

Während im Western-Blot im Gegensatz zur Real-Time PCR eine Verstärkung der Hemmung viraler Proteinexpression bei Erhöhung der Eisenkonzentration von 100 µmol/l auf 500 µmol/l vorzuliegen schien, wurde in weiteren Analysen aufgrund der vorliegenden Zytotoxizität (s. 4.1.1.5) Fe²⁺ 100 µM eingesetzt. Wie Abb. 4.3 zeigt war die Hemmung durch 1000 U/ml IFNα erwartungsgemäß deutlich stärker, gleichzeitig war auch die Hemmung durch 100 µM Fe²⁺ in Kombination mit 1000 U/ml IFNα ausgeprägter als in den Real-Time PCR Versuchen.



Abb. 4.3: HCV-Proteinexpression nach 24 h Inkubation mit IFN α **und/oder Fe**²⁺ Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit FeSO₄ bzw. IFN α wie angegeben inkubiert. Je Spur wurden 50 µg Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist eine repräsentative Western-Blot Analyse (n=3).

*4.1.1.3 Kontrolle der Befunde durch Färbung, sowie Verwendung dreiwertigen Eisens, anderer zweiwertiger Metallionen und Fe*²⁺–Chelatoren

Die Aufnahme des Eisens im Medium durch die Zellen wurde mittels Berliner Blau Färbung gezeigt (Abb. 4.4). Die Eisendepots konnten zur Bestätigung des tatsächlichen Vorliegens einer Eisenüberladung in den Zellen deutlich sichtbar gemacht werden.



Abb. 4.4: Berliner Blau Färbung nach Eisenüberladung für 24 h in Huh9-13 Zellen Huh9-13 Zellen wurden für 24 h in Standard-Kultivierungsmedium (<u>links</u>) bzw. unter Zusatz von 100 μmol/l FeSO₄ (<u>rechts</u>) inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde mittels Berliner Blau Lösung die Eisenfärbung durchgeführt.

Zur Kontrolle wurde anschließend mittels Real-Time PCR untersucht, ob andere zweiwertige Metallionen, im speziellen Ca^{2+} (als $CaCl_2$) und Mg^{2+} (als $MgSO_4$), oder dreiwertiges Eisen Fe^{3+} (als Fe(III)Citrat), bei Verwendung in gleichen Konzentrationen wie zuvor Fe^{2+} , ebenfalls die HCV-Replikation beeinflussen. Außerdem wurde überprüft, ob durch die Verwendung der Eisen-Chelatoren Bathophenanthrolindisulfonsäure (BPS) bzw. Deferoxamin (DFO) alleine und in Kombination mit Fe^{2+} die Reduktion der Replikationsrate aufgehoben werden konnte.

Wie Abb. 4.5 zeigt ergab sich weder durch Eisenüberladung mit Fe³⁺, noch durch Überladung mit Ca²⁺ oder Mg²⁺ bei keiner der gewählten Konzentrationen eine signifikante Veränderung der Replikationsrate.



Abb. 4.5: Beeinflussung der HCV-Replikation durch andere Metallionen bzw. durch Eisen-Chelatoren Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit den angegeben Substanzen inkubiert. **(A)** Die Konzentration von Fe^{3+} , Mg^{2+} , oder Ca^{2+} im Kultivierungsmedium wurde schrittweise erhöht. Die Replikationsrate des subgenomischen Replikons wurde mittels Real-Time PCR bestimmt. (Mittelwerte \pm SEM; n=5 für Fe³⁺; n=3 für Me²⁺)

(B) Eisenchelatoren wurden in einer Konzentration von 100 µmol/l alleine, bzw. in Kombination mit 100 µM Fe²⁺ eingesetzt. Die Messungen erfolgten mittels Real-Time PCR.

(Mittelwerte \pm SEM; n=4; * signifikante (P < 0.01) Änderung der Replikationsrate; ** signifikante (P < 0.05) Änderung der Replikationsrate)

Desweiteren ist in Abb. 4.5 dargestellt, daß der zuvor beobachtete Effekt einer Hemmung der HCV-Replikation durch Fe²⁺ durch Verwendung von Eisen-Chelatoren umgekehrt werden konnte. Dabei zeigte sich bei Zugabe des jeweiligen Chelators alleine eine Steigerung der HCV-Replikation um bis zu 100%. Die gleichzeitige Zugabe eines Chelators und von Fe²⁺ in äguimolaren Konzentrationen führte im Fall von BPS zu einer ungefähren Wiederherstellung der Replikationsrate unter Kontrollbedingungen. BPS ist ein sensitiver Chelator für zweiwertiges Eisen, der in der analytischen Chemie zur Stöchiometrie eingesetzt wird [128]. Die Kombination von Deferoxamin mit Fe²⁺ in äquimolaren Konzentrationen resultierte nur in einer leichten, aber signifikanten Abnahme der Steigerung der HCV-Replikation, welche deutlich und signifikant erhöht bestehen blieb. Deferoxamin komplexiert sowohl Fe²⁺, als auch Fe³⁺, wobei der DFO-Fe(II)-Komplex nach einer Weile in den stabileren DFO-Fe(III)-Komplex umgewandelt wird [129, 130]. Deferoxamin wird in der Therapie von Patienten mit Eisenüberladung als Infusion oder subkutane Injektion zur Induktion einer verstärkten Eisenausscheidung eingesetzt [123, 131, 132].

Der Western-Blot zeigte entsprechend der Real-Time PCR Befunde die erwartete Veränderung der Expression viraler Proteine. Dies ist in Abb. 4.6 wieder mittels der HCV-Proteine NS3 und NS5B, sowie GAPDH als unabhängigem, konstitutiven Proteinmarker gezeigt. Während die virale Proteinexpression bei Zugabe von 100 μ M Fe²⁺ vermindert war, konnte eine deutliche Steigerung durch Zusatz von 100 μ M BPS oder DFO erreicht werden. Durch gleichzeitige Applikation von äquimolaren Konzentrationen Fe²⁺ und Chelator konnte diese Steigerung unterbunden (bei BPS), bzw. (bei DFO) verringert werden.



Abb. 4.6: HCV-Proteinexpression nach 24 h Inkubation mitChelatoren und/oder Fe²⁺ Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit FeSO₄, BPS, DFO bzw. Kombinationen von Chelator und Fe²⁺ wie angegeben inkubiert. Je Spur wurden 50 µg Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist eine repräsentative Western-Blot Analyse (n=3).

4.1.1.4 Bestimmung der RNA-Qualität unter den ausgewählten Versuchsbedingungen

Zur weiteren Überprüfung der bisher erhaltenen Real-Time PCR Daten wurden von Stichproben der Gesamt-RNA sämtlicher ausgewählter Versuchsbedingungen, die als Template für die cDNA-Synthese verwendet wurden, Elektropherogramme aufgenommen. Diese Stichproben sind in Abb. 4.7 (A) bis (H) dargestellt. Die bei den

Analysen ermittelten RNA-Profile zeigten, daß bei keiner Versuchsbedingung eine Schädigung oder Degradation der Gesamt-RNA vorlag. Die 18S (kleinerer Peak) und 28S rRNA (größerer Peak) bilden den überwiegenden Anteil der Gesamt-RNAs und im niedermolekularen Bereich wird kaum fragmentierte RNA detektiert.



Abb. 4.7: Elektropherogramme der Gesamt-RNA von den ausgewählten Versuchsbedingungen Huh9-13 Zellen wurden für 24 h jeweils unter Zugabe der von (A) bis (H) angegeben Substanzen inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde wie beschrieben isoliert und ein Aliquot wurde zur Qualitätsbestimmung im Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet. Dargestellt sind Stichproben der jeweiligen Präparationen.

4.1.1.5 Zytotoxitätstests

Zur Überprüfung inwiefern die bei den Versuchen verwendeten Substanzen und Konzentrationen möglicherweise die Viabilität der Huh9-13 Zellen beeinträchtigten wurde mittels XTT-Assay auf eventuelle Zytotoxizität geprüft. Das Reagenz XTT wird von den Zellen aufgenommen und durch mitochondriale Dehydrogenasen gespalten.

Das wasserlösliche Spaltprodukt Formazan ist orange und kann photometrisch bestimmt werden, dabei zeigt die Umsetzung die metabolische Kapazität der Zelle und dient als Maß zur Bestimmung auftretender Beeinträchtigungen der Viabilität.



Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von (**A**) FeSO₄, oder (**B**) BPS, DFO bzw. Kombinationen von Chelator und Fe²⁺ wie angegeben inkubiert. Die Zytotoxizität wurde wie beschrieben photometrisch mittels XTT-Assay gemessen. Die Zellviabilität unter Kontrollbedingungen wurde gleich 100% gesetzt und die anderen Meßwerte darauf normiert.

(Mittelwerte ± SEM; n=7; * signifikante (P < 0,001) Minderung der Zellviabilität)

Bei den zur Simulation einer bestehenden Eisenüberladung dem Zellkulturmedium zugesetzten Konzentrationen FeSO₄ zeigte sich nur bei der höchsten Konzentration von 500 μ mol/l ein zytotoxischer Effekt. Die signifikante Verminderung der Zellviabilität betrug dabei im Mittel 23 ± 4%. Wie in Abb. 4.8 dargestellt wurde bei keiner der sonst verwendeten Eisen– bzw. Chelator–Konzentrationen eine Beeinflussung der Zellviabilität festgestellt.

4.1.2 Einfluß von Eisenüberladung auf das Genexpressionsprofil der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie

Zur weiteren Analyse sollten Unterschiede in Genexpressionsprofilen ermittelt werden, die einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen viraler Replikation und Eisenüberladung geben. Es wurde ein innerhalb des Sonderforschungsbereich 575 "Experimentelle Hepatologie" (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) entwickelter Oligonukleotid Array eingesetzt. Auf diesem Array sind 1500 humane Sonden. Fillebeen et al. haben unlängst mittels Genexpressionsanalyse die Veränderungen der Eisenhomöostase untersucht, die durch eine Infektion mit HCV eintritt. Dazu wurden die Expressionsdaten ausgewählter Gene des Eisenstoffwechsels in Wildtyp Huh-7 Zellen und in davon abgeleiteten Zellen mit einem subgenomischen HCV-Replikon analysiert [133]. In der vorliegenden Arbeit wurden nach 24 h Inkubationsdauer Änderungen der Genexpression in Huh9-13 Zellen untersucht, die im Vergleich zu Kontrollbedingungen bei einer Eisenüberladung auftreten. Diese wurde durch Zusatz von 100 µmol/I FeSO₄ erzeugt. Desweiteren wurden die Genexpressionsänderungen bei Eisenüberladung in Gegenwart von 1000 U/ml IFNa untersucht, wobei hier die Expressionsdaten von Zellen, die bei Kontrollbedingungen, aber ebenfalls in Gegenwart von 1000 U/ml IFNa inkubiert worden waren als Referenz dienten.

Eine Übersicht der Anzahl der bei Eisenüberladung, sowie der bei Eisenüberladung in Gegenwart von IFNα regulierten Gene zeigt Tab. 4.1. Im ersten Fall lieferten von den 1500 Sonden 841 ein detektierbares Signal, davon 835 ein auswertbares, und 659 ein Signal mit zu schwacher Intensität. Im zweiten Fall lieferten von den 1500 Sonden 871 ein detektierbares Signal und 629 ein Signal mit zu schwacher Intensität.

(s. 3.2.11.2).					
	r	eprimiert	nicht reguliert	induziei	t
Log₁₀ x/y	< -0,3	-0,3 bis -0,18	± 0,18	+0,18 bis +0,3	> +0,3
Fe ²⁺ [100 µmol/l] vs. Kontrolle	44	71	678	31	11
Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml] vs. IFNα [1000 U/ml]	14	39	783	29	6

Tab. 4.1: Übersicht der Genexpressionsänderungen durch Eisenüberladung in Abwesenheit und in Gegenwart von IFNα Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit 100 μM Fe²⁺, oder 1000 U/ml IFNα bzw. der Kombination von 100 μM

Fe²⁺ und 1000 U/ml IFNα inkubiert. Von 50 μg Gesamt-RNA wurde fluoreszenz-markierte cDNA erzeugt. Mit dieser wurden Oligonukleotid-Arrays hybridisiert. Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisierter

zu den

Fluoreszenzwerten

der

Quotient der Fluorenszenzwerte der Effektorbedingungen

Wie in Tab. 4.1 dargestellt waren beim Vorliegen einer Eisenüberladung mit einer Gesamtzahl von 115 gegenüber 42 deutlich mehr mRNAs der auf dem Array vertretenen Gene reprimiert als induziert. In Gegenwart von IFNa waren 53 Gentranskripte bei Eisenüberladung reprimiert und 35 induziert. Bei der Gruppierung der regulierten Transkripte zeigt sich, daß eine Schnittmenge von 45 mRNAs allgemein bei Eisenüberladung reguliert wurde. Weitere 111 mRNAs waren in Abwesenheit und 43 mRNAs in Anwesenheit von IFNa reguliert. Eine vollständige Auflistung der regulierten Gentranskripte befindet sich im Anhang (s. Tab. AI–AII).

4.1.3 Differentielle Proteinexpression durch Eisenüberladung in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie

In Analogie zu den Untersuchungen zur Veränderung der mRNA-Expression sollten mittels differentieller Proteinexpressionsanalysen Proteine identifiziert werden, die einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen viraler Replikation und Eisenüberladung geben. Klinisch hat ein proteomisches Profiling bereits mehrfach bei Patientenkollektiven während der Progression einer HCV-induzierten Leberschädigung zum HCC stattgefunden um so Proteine zu identifizieren, die möglicherweise als Biomarker etabliert werden können [134-136]. Auch in Zellkulturmodellen wurden HCV-spezifische, differentielle Proteinanalysen durchgeführt, bislang jedoch keine zu den hier untersuchten Fragestellungen. Verglichen wurden Änderungen der Proteinexpression von Hepatomzellen mit HCV-Replikon bezogen auf die Huh-7 Wildtyp Zellen. Fang et al. haben Untersuchungen

an drei präparierten, subzellulären Fraktionen vorgenommen, Mannová et al. untersuchten die Lipid-Rafts als Ort der Replikation [33, 137]. Harris et al. identifizierten Wirtszellproteine, die mit der 3'-NTR der genomischen HCV-RNA In der vorliegenden Untersuchung wurden nach 24 h interagieren [32]. Versuchsdauer Änderungen der Proteinexpression in Huh9-13 Zellen untersucht, die im Vergleich zu Kontrollbedingungen bei einer Eisenüberladung auftreten. Diese wurde wieder durch Zugabe von 100 µmol/l FeSO₄ erzeugt. Weiterhin wurden die Proteinexpressionsänderungen bei Eisenüberladung in Gegenwart von 1000 U/ml IFNα untersucht, wobei hier die Expressionsdaten von Zellen, die bei Kontrollbedingungen, aber ebenfalls in Gegenwart von 1000 U/ml IFNa inkubiert worden waren als Referenz dienten.

Zur Bestimmung der Expressionsänderung in Huh9-13 Zellen bei Eisenüberladung mittels 2D-DIGE wurden vier unabhängige Experimente (n=4) analysiert. Hierfür war das Anfertigen von acht 2D-Gelen für die Auswertung nötig. Die Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy2, Cy3 und Cy5 erfolgt an der ε-Aminogruppe von Lysinresten, dabei war die Farbstoffkonzentration mit 8 pmol Farbstoff je µg Gesamtproteinlysat so gewählt, daß statistisch die Markierung von nur einem Lysin je Protein stattfand. Dies bedeutet, daß ca. 2% des Gesamtproteins markiert waren. In jedem Gel wurden jeweils zwei Versuchszustände zzgl. des internen Standards aufgetrennt. Dieser beinhaltet äquivalente Mengen der Proteine von allen Wiederholungen und war immer mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2 markiert. Um einen Einfluß des Farbstoffs auf den Gellauf der Proteine zu minimieren, wurde bei der Markierung der Gesamtproteine der einzelnen Versuchszustände der Farbstoff variiert. Pro Zustand wurden 50 µg Lysat eingesetzt, die Markierung der Proteine erfolgte gemäß der Auflistung in Tab. 4.2.

Tab. 4.2: Proteinmarkierung für die 2D-DIGE

Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit 100 μ M Fe²⁺, oder 1000 U/ml IFN α bzw. der Kombination von 100 μ M Fe²⁺ und 1000 U/ml IFN α inkubiert. Während der interne Standard immer mit dem Farbstoff Cy2 markiert war, wurden die Proteinlysate der Einzelversuche variabel markiert.

Versuchssatz (n)	Index	Versuchsbedingung	Markierung
	Col #1	Kontrolle	Cy3
1	Ger#1	Fe ²⁺ [100 µmol/l]	Cy5
		IFNα [1000 U/ml]	Cy3
	Gel #2	Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml]	Cy5
	Col #2	Kontrolle	Cy3
	Gel #3	Fe ²⁺ [100 µmol/l]	Cy5
2		IFNα [1000 U/ml]	Cy3
	Gel #4	Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml]	Cy5
	Col #5	Kontrolle	Cy5
	Gel #5	Fe ²⁺ [100 µmol/l]	Cy3
3	Gel #6	IFNα [1000 U/ml]	Cy5
		Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml]	Cy3
	Col #7	Kontrolle	Cy5
	56 #7	Fe ²⁺ [100 µmol/l]	Cy3
4		IFNα [1000 U/ml]	Cy5
	Gel #8	Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml]	СуЗ

Bei der Bildauswertung der Gele mittels DeCyder Software wurden bei der intra-Gel Spot-Detektion und dem inter-Gel Abgleich durchschnittlich 2600 Proteinspots analysiert. Abb. 4.9 zeigt ein repräsentatives Gel, in dem der Cy2-markierte interne Standard dargestellt ist.

Für sämtliche Versuchsbedingungen wurden durch univariate Varianzanalyse 43 Proteinspots (in Abb. 4.9 hervorgehoben) ermittelt, bei denen anhand der Fluoreszenzintensitätsmessungen Änderungen der Proteinmengen vorlagen. Als differentiell exprimiert wurden solche Proteinspots identifiziert, die bei Eisenüberladung bezogen auf die jeweilige Kontrollbedingung eine Änderung um das ± 1,5-fache zeigten und die im zweiseitigen Studentschen t-Test P-Werte unter 0,05 hatten. Nach dieser Auswertung waren bei Eisenüberladung in Abwesenheit, wie in Gegenwart von IFNa jeweils drei Proteinspots reprimiert und sechs Proteinspots induziert (Tab. 4.3).



Abb. 4.9: Repräsentatives 2D-Gel der Studie zur Eisenüberladung (Cy2-Farbkanal, int. Standard) Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit 100 μ M Fe²⁺, oder 1000 U/ml IFN α bzw. der Kombination von 100 μ M Fe²⁺ und 1000 U/ml IFN α inkubiert. Für die angegeben Spotnummern wurden unter den verschiedenen Versuchsbedingungen Veränderungen der Proteinmengen detektiert.

Tab. 4.3: Übersicht der Proteinexpressionsänderungen durch Eisenüberladung

Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit 100 μ M Fe²⁺, oder 1000 U/ml IFN α bzw. der Kombination von 100 μ M Fe²⁺ und 1000 U/ml IFN α inkubiert. Als differentiell expremiert wurden Proteinspots identifiziert, die bei Eisenüberladung bezogen auf die jeweilige Kontrollbedingung eine Änderung um das ± 1,5-fache zeigten und die im zweiseitigen Studentschen t-Test P-Werte unter 0,05 hatten.

	reprimiert	nicht reguliert	induziert
	Faktor ≤ -1,5 und P ≤ 0,05	-1,5 > Faktor < +1,5 oder P > 0,05	Faktor ≥ +1,5 und P ≤ 0,05
Fe ²⁺ [100 µmol/l] vs. Kontrolle	3	34	6
Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml] vs. IFNα [1000 U/ml]	3	34	6

Bei der anschließenden Identifizierung mittels gekoppelter LC-MS/MS wurde festgestellt, daß acht der neun jeweils regulierten Proteinspots bei Eisenüberladung

(Tab. 4.4), wie auch bei Eisenüberladung in Gegenwart von IFN α (Tab. 4.5) identisch waren. Im Ganzen wurden sechs nicht-redundante Proteine identifiziert.

Index	Spot- Nr.	Proteinname	NCBI Gensymbol	IPI Accession	Fe ²⁺ [100 μmol/l] vs. Kontrolle
1	584	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Isoform 3)	HNRNPK	IPI00807545.1	1,73
2	578	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Isoform 1)	HNRNPK	IPI00216049.1	1,72
3	574	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Isoform 1)	HNRNPK	IPI00216049.1	1,71
4	1305	nicht identifiziert			1,67
5	2286	Hematological and neurological expressed 1-like protein (Isoform 1)	HN1L	IPI00027397.3	1,64
6	1543	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	ACADS	IPI00027701.3	1,53
7	186	Elongation factor 2	EEF2	IPI00186290.6	-1,51
8	2460	nicht identifiziert			-1,77
9	1750	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	MDH2	IPI00291006.1	-1,78

Tab. 4.4: Durch Eisenüberladung regulierte Proteine

Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit 100 µM Fe²⁺ inkubiert. Unbehandelte Huh9-13 Zellen dienten als Refernez. Differentielle Proteinspots wurden nach Trypsin-Verdau mittels LC-MS/MS weiter analysiert und per Software-gestütztem Datenbankvergleich identifiziert.

Tab. 4.5: Durch Eisenüberladung in Gegenwart von IFNα regulierte Proteine

Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit 1000 U/ml IFN α bzw. mit 1000 U/ml IFN α und 100 µM Fe²⁺ inkubiert. Differentielle Proteinspots wurden nach Trypsin-Verdau mittels LC-MS/MS weiter analysiert und per Software-gestütztem Datenbankvergleich identifiziert.

Index	Spot- Nr.	Proteinname	NCBI Gensymbol	IPI Accession	Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml] vs. IFNα [1000 U/ml]
1	1305	nicht iden	tifiziert		1,97
2	584	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Isoform 3)	HNRNPK	IPI00807545.1	1,74
3	1543	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	ACADS	IPI00027701.3	1,7
4	2286	Hematological and neurological expressed 1-like protein (Isoform 1)	HN1L	IPI00027397.3	1,67
5	578	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Isoform 1)	HNRNPK	IPI00216049.1	1,58
6	574	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Isoform 1)	HNRNPK	IPI00216049.1	1,53
7	2217	FUS-interacting serine-arginine- rich protein 1 (Isoform 2)	FUSIP1	IPI00412643.1	-1,54
8	186	Elongation factor 2	EEF2	IPI00186290.6	-1,69
9	1750	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	MDH2	IPI00291006.1	-2,44

4.2 Einfluß von Anisoosmolarität auf die HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell

4.2.1 Effekt anisoosmotisch induzierter Zellvolumenänderung auf die HCV-Replikation

Offensperger *et al.* 1994 fanden in Versuchen an HBV-infizierten Entenhepatozyten, daß Anisoosmolarität die virale Replikation beeinflußt [115]. Eine Absenkung der Replikationsrate wurde bei Zellschwellung (Hypoosmolarität; 277 mosmol/l; 10 d) und ein Anstieg bei Zellschrumpfung (Hyperosmolarität; 421 mosmol/l; 10 d) beobachtet. Bei Versuchen zur Optimierung der Zellkulturbedingungen für die HBV-infizierte Hepatomzelllinie HepG2.2.15 zur Verstärkung der viralen Replikation fanden Glebe *et al.* 2001 eine Steigerung in Folge von Hyperosmolarität durch Zugabe von 1% DMSO (Osmolaritätserhöhung ≈ 140 mosmol/l) nach 7 d [116]. Da entsprechende Untersuchungen zur Replikation von HCV in Replikon-Modellsystemen zur HCV-Infektion bislang nicht durchgeführt wurden, sollte die Frage geklärt werden, ob in Huh9-13 Zellen Anisoosmolarität die Replikation des subgenomischen Replikons beeinflußt. Zu diesem Zweck wurden nach Inkubation unter anisoosmotischen Bedingungen zum einen die Gesamt-RNA, zum anderen die Gesamtproteine isoliert und per Real-Time PCR bzw. Western-Blot analysiert.

4.2.1.1 Messung der Änderung der HCV-Replikationsrate mittels Real-Time PCR

Zur Bestimmung der Änderung der HCV-Replikationsrate wurden für die Real-Time PCR die im NS3-Gen lokalisierten Primerpaare verwendet (s. 3.1.6). Die gemessenen Absolutwerte wurden auf die mRNA-Spiegel der endogenen Kontrolle Die SDHA normalisiert. relative Replikationsrate bei Normooasmolarität (320 mosmol/l) wurde als Bezugspunkt zur Festlegung der Veränderungen bei (220 mosmol/l) bzw. Hyperosmolarität (420 mosmol/l) gesetzt. Hypo-Die anisoosmotischen Medien wurden wie beschrieben (s. 3.2.1) durch Mischungen von Medien mit erhöhter Konzentration NaCl bzw. ohne NaCl hergestellt. Nach 24 h Inkubationsdauer ergaben sich nur geringe Veränderungen (Abb. 4.10).



Abb. 4.10: Einfluß von Anisoosmolarität für 24 h auf die HCV-Replikation Huh9-13 Zellen wurden für 24 h jeweils ohne (A) und mit Zusatz (B) von 1000 U/ml IFNα in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Die Replikationsrate des subgenomischen Replikons wurde mittels Real-Time PCR bestimmt.

(A) 24 h Inkubationsdauer (Mittelwerte \pm SEM; n=3; * signifikante (P < 0,01) Änderung der Replikationsrate) (B) 24 h Inkubationsdauer (Mittelwerte \pm SEM; n=3; * signifikante (P < 0,01) Änderung der Replikationsrate; ** signifikante (P < 0,05) Änderung der Replikationsrate)

** signifikante (P < 0,05) Änderung der Replikationsrate)

Wurde eine Zellschwellung induziert sank die Replikationsrate um $17 \pm 1\%$, bei stieg sie um $13,5 \pm 3,7\%$. Zur Überprüfung, Zellschrumpfung ob unter anisoosmotischen Bedingungen die antivirale Immunantwort beeinträchtigt war, wurde der Versuch auch in Gegenwart von 1000 U/ml IFNα durchgeführt. Das Profil der verminderten Replikation bei Zellschwellung und gesteigerter Replikation bei Zellschrumpfung blieb dabei erhalten. Die Steigerung der Replikationsrate unter dem Einfluß von Hyperosmolarität war der Hemmung durch IFNa entgegen gerichtet und führte zu einer Verminderung der beobachteten Signifikanz (P < 0,05) gegenüber Kontrollbedingungen (P < 0,01) (Abb. 4.10, (B)).

Die Versuchsdauer wurde auf 48 h verdoppelt, wodurch die Änderungen der Replikationsrate ausgeprägter waren (Abb. 4.11).



Abb. 4.11: Einfluß von Anisoosmolarität für 48 h auf die HCV-Replikation Huh9-13 Zellen wurden für 48 h jeweils **(A)** ohne und **(B)** mit Zusatz von 1000 U/ml IFNα in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Die Replikationsrate des subgenomischen Replikons wurde mittels Real-Time PCR bestimmt.

(A) 48 h Inkubationsdauer (Mittelwerte \pm SEM; n=4; * signifikante (P < 0,05) Änderung der Replikationsrate) (B) 48 h Inkubationsdauer (Mittelwerte \pm SEM; n=4; * signifikante (P < 0,01) Änderung der Replikationsrate; ** signifikante (P < 0,05) Änderung der Replikationsrate)

Unter hypoosmotischen Bedingungen sank die Replikationsrate um $36 \pm 6\%$ und stieg bei hyperosmotischen Bedingungen um $70 \pm 16\%$. Wieder blieb dieses Profil auch in Gegenwart von 1000 U/ml IFN α erhalten. Auffällig war dabei, daß die Replikationsrate bei Hyperosmolarität um das 4-fache gegenüber Normoosmolarität gesteigert war, und dies somit eine signifikante Aufhebung der Interferonhemmung durch Hyperosmolarität zeigte (Abb. 4.11).

Die Herstellung der Medien unterschiedlicher Osmolarität erfolgte durch Mischungen von Medien mit erhöhter Konzentration NaCl bzw. ohne NaCl (s. 3.2.1). Um zu klären, ob die bisher beobachteten Veränderungen Folge der Volumenänderung oder der Änderung der Ionenstärke sind, wurde an Stelle von NaCl der nicht-zellpermeable Osmolyt Raffinose verwendet (Abb. 4.12). Dabei wurde ausgehend vom

hypoosmotischen Medium (220 mosmol/l) durch Zugabe von 100 mmol/l Raffinose normoosmotisches (320 mosmol/l) und durch Zugabe von weiteren 100 mmol/l Raffinose hyperosmotisches (420 mosmol/l) Medium erzeugt.



Abb. 4.12: Änderung der HCV-Replikationsrate bei Verwendung von Raffinose statt NaCl Huh9-13 Zellen wurden für 24 h (A) bzw. 48 h (B) in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Bei Verwendung von NaCl wurde durch Mischungen von Medien mit erhöhter NaCl Konzentration bzw. ohne NaCl die Osmolarität hergestellt. Bei Verwendung von Raffinose (impermeabler Osmolyt) wurde ausgehend von hypoosmotischem Medium durch Zugabe von 100 mM Raffinose isoosmotisches und durch weitere, 100 mM Konzentrationserhöhung hyperosmotisches Medium hergestellt. Die Replikationsrate des subgenomischen Replikons wurde mittels Real-Time PCR bestimmt.

(A) 24 h Inkubationsdauer (Mittelwerte ± SEM; n≥3; * signifikante (P < 0,01) Änderung der Replikationsrate)
 (B) 48 h Inkubationsdauer (Mittelwerte ± SEM; n≥3; * signifikante (P < 0,05) Änderung der Replikationsrate)

Wie Abb. 4.12 zeigt ergaben sich bei Verwendung von Raffinose ähnliche Änderungen der HCV-Replikationsrate, wie bei Verwendung von NaCl. Die bisher beobachteten Veränderungen wurden also durch die Modifikation des Zellvolumens augelöst und nicht als Folge der Änderung der Ionenstärke.

4.2.1.2 Nachweis der Änderung der HCV-Replikationsrate mittels Western-Blot

Mittels Western-Blot sollte festgestellt werden, ob sich die Befunde der Real-Time PCR Analysen auf Proteinebene wiederspiegeln. Zum Nachweis wurden spezifische Antikörper gegen die HCV-Proteine NS3 und NS5B, sowie als unabhängiger, konstitutiver Proteinmarker GAPDH gewählt. Bei der Real-Time PCR wurden nach 24 h Inkubationsdauer nur geringe Änderungen der HCV-Replikation beobachtet. Im Western Blot konnten nach 24 h Änderungen der Expression viraler Proteine nicht visualisiert werden. Wie Abb. 4.13 zeigt führte die Interferonzugabe bei allen Osmolaritäten zu einer verminderten Proteinexpression, aber zwischen den verschiedenen osmotischen Bedingungen ließen sich keine Unterschiede ausmachen.



Abb. 4.13: HCV-Proteinexpression nach 24 h Inkubation bei versch. Osmolaritäten Huh9-13 Zellen wurden für 24 h in Abwesenheit bzw. Gegenwart von 1000 U/ml IFNα in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Je Spur wurden 50 μg Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist eine repräsentative Western-Blot Analyse (n=3).

Nach Verdopplung der Versuchsdauer auf 48 h wurde eine Osmosensitivität der viralen Proteinexpression deutlich (Abb. 4.14).



Abb. 4.14: HCV-Proteinexpression nach 48 h Inkubation bei versch. Osmolaritäten Huh9-13 Zellen wurden für 48 h ohne bzw. mit Zugabe von 1000 U/ml IFNα in hypoosmotischem (220 mosmol/I), normoosmotischem (320 mosmol/I) oder hyperosmotischem (420 mosmol/I) Medium inkubiert. Je Spur wurden 50 μg Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist eine repräsentative Western-Blot Analyse (n=3). Es zeigte sich bei Hypoosmolarität eine verminderte und bei Hyperosmolarität eine verstärkte Expression der HCV-Proteine NS3 und NS5B. Auch in Gegenwart von IFNα zeigte sich nach 48 h, daß die dadurch induzierte Hemmung unter hyperosmotischen Bedingungen abgeschwächt war (Abb. 4.14).

Mittels Western-Blot sollte noch der Befund der Real-Time PCR Analyse auf Proteinebene verifiziert werden, daß die Änderungen der viralen Proteinexpression durch die unterschiedlichen Osmolaritäten des Medium verursacht wurden. Dazu wurde wieder ausgehend vom hypoosmotischen Medium (220 mosmol/l) durch Zugabe des alternativen Osmolyt Raffinose normo– (320 mosmol/l) bzw. hyperosmotisches Medium (420 mosmol/l) hergestellt. Außerdem wurde bei Isoosmolarität der Ionophor Nystatin eingesetzt. Wie Kapus *et al.* 1999 zeigten kann dadurch selektiv die Membran für kleine, monovalente Ionen permeabilisiert werden, ohne gleichzeitig die Permeation großer, anorganischer Ionen zu ermöglichen. Dies resultiert in einer Zellschrumpfung unter normoosmotischen Bedingungen [138].



Abb. 4.15: Vergleich der HCV-Proteinexpression nach 48 h Inkubation bei versch. Osmolaritäten unter Verwendung versch. Osmolyte

Huh9-13 Zellen wurden für 48 h in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Bei Verwendung von NaCl wurde durch Mischungen von Medien mit erhöhter NaCl Konzentration bzw. ohne NaCl die Osmolarität hergestellt. Bei Verwendung von Raffinose wurde ausgehend von hypoosmotischem Medium durch Zugabe von 100 mM Raffinose isoosmotisches und durch weitere, 100 mM Konzentrationserhöhung hyperosmotischen Bedingungen hergestellt. Durch Zugabe des Ionophors Nystatin wurde unter isoosmotischen Bedingungen Hyperosmolarität (Zellschrumpfung) simuliert. Je Spur wurden 50 µg Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist eine repräsentative Western-Blot Analyse (n=3).

In Abb. 4.15 ist dargestellt, daß zum einen die Expression der viralen Proteine NS3 und NS5B bei Verwendung von NaCl oder Raffinose als Osmolyt jeweils bei Normobzw. Hyperosmolarität vergleichbar war. Zum anderen zeigte sich auch bei Verwendung von Nystatin bei isoosmotischen Bedingungen eine Steigerung der Proteinexpression ähnlich der Steigerung bei durch Hyperosmolarität verursachte Zellschrumpfung.

4.2.1.3 Bestimmung der RNA-Qualität unter den ausgewählten Versuchsbedingungen

Von Gesamt-RNA-Präparationen nach 48 h Versuchsdauer bei den verschiedenen Tonizitäten wurden Stichproben zur Aufnahme von Elektropherogrammen genommen. Mittels dieser Stichproben, die in Abb. 4.16 (A) bis (C) dargestellt sind, konnte zur weiteren Überprüfung der bisher erhaltenen Real-Time PCR Daten gezeigt werden, daß bei keiner Versuchsbedingung eine Schädigung oder Degradation der Gesamt-RNA vorlag. Deren überwiegenden Anteil bilden die 18S (kleinerer Peak) und 28S rRNA (größerer Peak) und im niedermolekularen Bereich wird kaum fragmentierte RNA detektiert.



Abb. 4.16: Elektropherogramme der Gesamt-RNA von den ausgewählten Versuchsbedingungen Huh9-13 Zellen wurden für 48 h bei den jeweils unter **(A)** bis **(C)** angegeben Tonizitäten inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde wie beschrieben isoliert und ein Aliquot wurde zur Qualitätsbestimmung im Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet. Dargestellt sind Stichproben der jeweiligen Präparationen.

4.2.1.4 Zytotoxitätstests

Inwiefern die verschiedenen Osmolaritäten möglicherweise die Viabilität der Huh9-13 Zellen nach 24 h bzw. 48 h Versuchsdauer beeinträchtigten wurde photometrisch mittels XTT–Zytotoxizitäts–Assay geprüft. Die Umsetzung der Tetrazoliumverbindung XTT zum Formazan durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase System zeigt die metabolische Kapazität der Zelle und dient als Maß zur Bestimmung auftretender Beeinträchtigungen der Viabilität. Wie in Abb. 4.17 dargestellt wurde bei keiner Versuchsbedingung eine Beeinflussung der Zellviabilität festgestellt.



Abb. 4.17: Zellviabilität nach 24 h bzw. 48 h Inkubation bei versch. Osmolaritäten
Huh9-13 Zellen wurden für 24 h bzw. 48 h in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Die Zytotoxizität wurde wie beschrieben photometrisch mittels XTT-Assay gemessen. Die Zellviabilität bei Normoosmolarität wurde gleich 100% gesetzt und die anderen Meßwerte darauf normiert.
(A) 24 h Inkubationsdauer (Mittelwerte ± SEM; n=5)
(B) 48 h Inkubationsdauer (Mittelwerte ± SEM; n=4)

4.2.2 Einfluß von Anisoosmolarität auf das Genexpressionsprofil der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie

Zur weiteren Analyse sollten Unterschiede im Genexpressionsprofil von Huh9-13 Zellen ermittelt werden, die 48 h anisoosmotischen Bedingungen ausgesetzt waren, um einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen viraler Replikation und Zellvolumenänderung zu erhalten. Es wurde der im Sonderforschungsbereich 575 "Experimentelle Hepatologie" (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) entwickelte Oligonukleotid Array mit 1500 humanen Sonden eingesetzt. Huh9-13 Zellen wurden 48 h unter hypoosmotischen (220 mosmol/l), normoosmotischen (320 mosmol/l) und hyperosmotischen Bedingungen (420 mosmol/l) inkubiert. Die Expression unter normoosmotischen Bedingungen diente als Referenz um die Änderungen der Genexpression in Huh9-13 Zellen bei Anisoosmolarität zu untersuchen.

Eine Übersicht der Anzahl der unter anisoosmotischen Bedingungen regulierten Gene zeigt Tab. 4.6. Bei Hypoosmolarität lieferten von den 1500 Sonden 933 ein detektierbares und 567 ein Signal mit zu schwacher Intensität. Bei Hyperosmolarität lieferten von den 1500 Sonden 959 ein detektierbares Signal und 541 ein Signal mit zu schwacher Intensität.

Tab. 4.6: Ubersicht der Genexpressionsänderungen durch Anisoosmolarität
Huh9-13 Zellen wurden für 48 h in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l)
oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Von 50 µg Gesamt-RNA wurde fluoreszenz-
markierte cDNA erzeugt. Mit dieser wurden Oligonukleotid-Arrays hybridisiert. Genexpressionsänderungen
wurden als logarithmisierter Quotient der Fluorenszenzwerte bei jeweiliger Anisoosmolarität zu den
Fluoreszenzwerten bei Isoosmolarität dargestellt. Die Gruppierung der Genexpressionsänderungen erfolgte
wie beschrieben (s. 3.2.11.2).

...

_	reprimiert		nicht reguliert	induzie	rt
Log₁₀ x/y	< -0,3	-0,3 bis -0,18	± 0,18	+0,18 bis +0,3	> +0,3
220 mosmol/l vs. 320 mosmol/l	18	49	805	39	22
420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l	49	65	674	89	82

Wie in Tab. 4.6 dargestellt waren unter hypoosmotischen Bedingungen mit einer Gesamtzahl von 67 gegenüber 61 ähnlich viele Gentranskripte reprimiert wie induziert. Unter hyperosmotischen Bedingungen waren insgesamt deutlich mehr Transkripte reguliert, wobei 114 mRNAs reprimiert und mit 171 deutlich mehr induziert waren. Bei der Gruppierung der regulierten mRNAs zeigt sich, daß eine Schnittmenge von 64 mRNAs sowohl unter hypo- als auch unter hyperosmotischen Bedingungen reguliert wurde. Davon waren 18 mRNAs gleichsinnig und 46 mRNAs gegensinnig reguliert. Weitere 62 mRNAs waren lediglich unter hypoosmotischen Bedingungen und 218 mRNAs lediglich unter hyperosmotischen Bedingungen (s. Tab. AIII–AIV).

4.2.3 Differentielle Proteinexpression unter dem Einfluß von Anisoosmolarität in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie

Analog zu den Untersuchungen zur Modifikation der mRNA-Expression sollten mittels differentieller Proteinexpressionsanalysen Proteine identifiziert werden, deren Expression unter der Einwirkung von Zellvolumenveränderungen verändert ist und die dadurch möglicherweise Einfluß auf die virale Replikation haben. Dazu wurden nach 48 h Versuchsdauer Änderungen der Proteinexpression in Huh9-13 Zellen untersucht, die bei Anisoosmolarität auftreten. Hierfür wurden die Zellen in (220 mosmol/l), hypoosmotischem normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Die Bestimmung der Expressionsänderung nach Zellschwellung (bei Hypoosmolarität) bzw. Zellschrumpfung (bei Hyperosmolarität) erfolgte durch die Analyse von vier unabhängigen Experimenten (n=4) mittels 2D-DIGE (vgl. 4.1.3). Hierfür wurden sechs 2D-Gele zur Auswertung angefertigt. In jedem Gel wurden jeweils zwei Versuchszustände zzgl. internem Standard aufgetrennt. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy2 wurde zur Markierung des internen Standards eingesetzt, die Markierung mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 wurde variiert, um einen Einfluß des Farbstoffs auf den Gellauf der Proteine zu minimieren (Tab. 4.7).

Tab.	4.7:	Proteinmarkierung	für	die	2D-DIGE	
rab.	- ./.	i i oteniniai kierung	iui	uie	ZD-DIOL	

Huh9-13 Zellen wurden für 48 h in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Während der interne Standard immer mit dem Farbstoff Cy2 markiert war, wurden die Proteinlysate der Einzelversuche variabel markiert.

Versuchssatz (n)	Index	Osmolarität [mosmol/l]	Markierung
	റപ #1	220	Cy3
1	Ger#1	320	Cy5
	Col #2	420	Cy5
	Gel #2	320	Cy3
2	Gel #3	220	Cy3
		420	Cy5
	Col #4	220	Cy5
3	Gel #4	320	Cy3
	Col #5	420	Cy3
	Gel #5	320	Cy5
4	Col #6	220	Cy5
	Gel #0	420	Cy3

Bei der Bildauswertung mit der DeCyder Software wurden per intra-Gel Spot-Detektion und inter-Gel Abgleich durchschnittlich 2600 Proteinspots analysiert. In dem repräsentativen Gel, bei dem der Cy2-markierte interne Standard erfaßt wurde, sind die 64 Proteinspots hervorgehoben, bei denen nach univariater Varianzanalyse der drei Versuchszustände entsprechend der Fluoreszenzintensitätsmessungen Änderungen der Proteinmengen vorlagen (Abb. 4.18).

162 452 1095 906 A 110 1056 1483 1569 M 1735 1745 2567

Abb. 4.18: Repräsentatives 2D-Gel der Studie zur Osmoregulation (Cy2-Farbkanal, int. Standard) Huh9-13 Zellen wurden für 48 h in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Für die angegeben Spotnummern wurden unter den verschiedenen Versuchsbedingungen Veränderungen der Proteinmengen detektiert.

Gemäß der Kriterien zur Analyse differentieller Expression (Änderung um das \pm 1,5-fache; P < 0,05 im zweiseitigen Studentschen t-Test) wurden bei Hypoosmolarität ein Proteinspot als reprimiert und drei Proteinspots als induziert ermittelt. Bei Hyperosmolarität waren 20 Proteinspots reprimiert und 21 Proteinspots induziert (Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Übersicht der Proteinexpressionsänderungen durch Anisoosmolarität

Huh9-13 Zellen wurden für 48 h in hypoosmotischem (220 mosmol/l), normoosmotischem (320 mosmol/l) oder hyperosmotischem (420 mosmol/l) Medium inkubiert. Als differentiell expremiert wurden Proteinspots identifiziert, die bei hypoosmotischen bzw. hyperosmotischen Bedingungen jeweils bezogen auf Isoosmolarität eine Änderung um das ± 1,5-fache zeigten und die im zweiseitigen Studentschen t-Test P-Werte unter 0,05 hatten.

	reprimiert	nicht reguliert	induziert
	Faktor ≤ -1,5 und P ≤ 0,05	-1,5 > Faktor < +1,5 oder P > 0,05	Faktor ≥ +1,5 und P ≤ 0,05
220 mosmol/l vs. 320 mosmol/l	1	60	3
420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l	20	23	21

Von den insgesamt 45 regulierten Proteinspots wurden anschließend 33 mittels gekoppelter LC-MS/MS identifiziert, dabei vier bei Hypoosmolarität (Tab. 4.9) und 29 bei Hyperosmolarität (Tab. 4.10). Im Ganzen konnten 19 nicht redundante Proteine identifiziert werden.

Tab. 4.9: Durch Hypoosmolarität regulierte Proteine

Huh9-13 Zellen wurden für 48 h in hypoosmotischem (220 mosmol/l) bzw. normoosmotischem (320 mosmol/l) Medium inkubiert. Differentielle Proteinspots wurden nach Trypsin-Verdau mittels LC-MS/MS weiter analysiert und per Software-gestütztem Datenbankvergleich identifiziert.

Index	Spot- Nr.	Proteinname	NCBI Gensymbol	IPI Accession	220 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
1	555	Fibrinogen alpha chain precursor (Isoform 2)	FGA	IPI00029717.1	3,3
2	1108	Putative uncharacterized protein DKFZp779N0926	FGG	IPI00411626.4	3,03
3	841	UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH	IPI00031420.3	1,53
4	1585	Aldo-keto reductase family 1 member C1	AKR1C1	IPI00029733.1	-1,57

Tab. 4.10: Durch Hyperosmolarität regulierte Proteine

Huh9-13 Zellen wurden für 48 h in hyperosmotischem (420 mosmol/l) bzw. normoosmotischem (320 mosmol/l) Medium inkubiert. Differentielle Proteinspots wurden nach Trypsin-Verdau mittels LC-MS/MS weiter analysiert und per Software-gestütztem Datenbankvergleich identifiziert.

Index	Spot- Nr.	Proteinname	NCBI Gensymbol	IPI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
1	381	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	DDX3Y	IPI00293616.3	2,37
2	510	Lamin-A/C (Isoform A)	LMNA	IPI00021405.3	2,35
3	506	Lamin-A/C (Isoform A)	LMNA	IPI00021405.3	2,16
4	785	Lamin-A/C (Isoform C)	LMNA	IPI00216952.1	2,1
5	782	Lamin-A/C (Isoform C)	LMNA	IPI00216952.1	2,06
6	2260	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	IPI00219446.5	1,95
7	456	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 (Isoform 2)	DDX17	IPI00651677.1	1,9

Index	Spot-	Proteinname	NCBI	IPI Accession	420 mosmol/l
macx	Nr.	Troteinnane	Gensymbol	II TABESSION	320 mosmol/l
8	783	Lamin-A/C (Isoform A)	LMNA	IPI00216952.1	1,9
9	503	nicht identi	1,8		
10	776	Lamin-A/C (Isoform C)	LMNA	IPI00216952.1	1,8
11	740	nicht identi	fiziert		1,76
12	162	nicht identi	fiziert		1,75
13	459	Caldesmon (Isoform 5)	CALD1	IPI00333771.1	1,75
14	2292	nicht identi	fiziert		1,73
15	1020	Keratin, Type I Cytoskeletal 8	KRT8	IPI00554648.3	1,71
16	2275	nicht identi	fiziert		1,71
17	1318	nicht identi	fiziert		1,66
18	1049	nicht identi	fiziert		1,64
19	1224	Keratin, Type I Cytoskeletal 18	KRT18	IPI00554788.5	1,56
20	1109	nicht identi	fiziert		1,52
21	716	Beta-1-syntrophin (Isoform 2)	SNTB1	IPI00216858.3	-1,5
22	1483	Hepatoma-derived growth factor	HDGF	IPI00020956.1	-1,53
23	420	Caldesmon (Isoform 5)	CALD1	IPI00333771.1	-1,56
24	2567	nicht identi	-1,56		
25	1293	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	IPI00027223.2	-1,57
26	2115	nicht identi	-1,57		
27	933	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	IPI00218914.5	-1,59
28	2523	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	ATP5A1	IPI00440493.2	-1,6
29	1957	ATP synthase subunit alpha, ATP5A1 IPI00440493.2 mitochondrial precursor		-1,64	
30	2424	nicht identi	-1,66		
31	414	Caldesmon (Isoform 5)	CALD1	IPI00333771.1	-1,67
32	1735	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	ATP5A1	IPI00440493.2	-1,82
33	1108	Putative uncharacterized protein DKFZp779N0926	FGG	IPI00411626.2	-1,89
34	1569	nicht identi	-2		
35	926	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	ATP5A1	IPI00440493.2	-2,03
36	2412	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	ATP5A1	IPI00440493.2	-2,08
37	1745	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein ASGTAIPI00013949.1		-2,26	
38	555	Fibrinogen alpha chain precursor FGA IPI00029717.1 (Isoform 2)		-2,37	
39	950	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	IPI00218914.5	-2,65
40	940	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	HMGCS1	IPI00008475.1	-3,01
41	948	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	HMGCS1	IPI00008475.1	-3,77

5 Diskussion

Es ist seit mehreren Jahren bekannt und intensiv erforscht, daß eine Reihe von Wirtszell-Faktoren mit der genomischen RNA und den viralen Proteinen des HCV interagieren und auch für die Replikation des Hepatitis C Virus erforderlich sind [32-34]. Vor allem für die HCV-Proteine NS5A und NS5B sind Interaktionen mit zahlreichen zellulären Proteinen identifiziert worden. Insgesamt sind bisher sehr unterschiedliche Proteine bekannt. Beispiele dafür sind Nucleolin. ein Phosphoprotein, das an der Synthese und Reifung der Ribosomen beteiligt ist [139, 140], die RNA-Helikase DDX5 [141], das geranylgeranylierte F-box Protein FBXL2, das an Ubiguitinierungsreaktionen beteiligt ist [142], die vesikulären Proteine VAPA und VAPB [143, 144] und die Chaperone Cyclophilin B (PPIB) [145] und FKBP8 [146].

Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit Mechanismen des angeborenen Immunsystems, und dabei insbesondere das Interferon–Signalnetzwerk, bei HCV-Infektion beeinflußt sind. Durch Forschungsarbeiten am Replikon–System konnten zum einen molekulare Mechanismen der Wirkung von endogenem und exogenem Interferon analysiert werden [147-152]. Außerdem konnte gezeigt werden, daß durch HCV-Proteine wiederum das Interferon–Signalnetzwerk blockiert werden kann [153-155].

Desweiteren wurden in Tierversuchen und bei Patientenstudien Genexpressionsund Proteinexpressionsänderungen untersucht, die durch eine HCV-Infektion ausgelöst werden, bzw. sich im Rahmen der Progression der HCV-induzierten Leberschädigung ausbilden [156-159].

In einer Studie zur Regulation von Faktoren der Eisenhomöostase wurden in vitro mittels Genexpressionsanalyse Veränderungen von ausgewählten Genen des Eisenstoffwechsels analysiert. Dabei wurden Expressionsdaten in Wildtyp Huh-7 Zellen und in davon abgeleiteten Zellen mit einem subgenomischen HCV-Replikon erhoben [133]. Verschiedene Untersuchungen zum Effekt von Eisen auf die HCV-Replikation zeigten widersprüchliche Ergebnisse (Tab. 5.1). Der Einfluß der Zellhydration auf die virale Replikation wurde bisher erst in wenigen in vitro Studien analysiert [108-111], und Daten zu viralen Hepatiden lagen bislang nur für HBV Modelle Fragestellung Effekt vor [115, 116]. Die nach dem von

Hydrationsänderungen bei bestehender HCV-Infektion ist bislang nicht bearbeitet worden. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der Einfluß von Eisenüberladung, als auch von Anisoosmolarität, mit dem Ziel untersucht, auftretende Veränderungen der Gen– und Proteinexpression im Zellkulturmodell zu ermitteln.

Zur Interpretation der Ergebnisse aus den Genexpressionsstudien bedarf es vorab zweier Hinweise. Im Regelfall wird nur ein geringer Prozentsatz der Gene, die auf einem beliebigen cDNA-Array vertreten sind, als differentiell reguliert identifiziert [160]. Durch Verwendung des innerhalb des Sonderforschungsbereich 575 "Experimentelle Hepatologie" (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) entwickelten, vorselektionierten Oligonukleotid Arrays, der die gleichzeitige Betrachtung von über 1500 humanen Gentranskripten der Leber ermöglicht, findet man aufgrund dieser Vorauswahl letztendlich einen höheren Prozentsatz regulierter Gene. Bei der Studie zur Eisenüberladung wurde für 13% der über den Array untersuchten Gene, bei der Studie zur Anisoosmolarität für 11,5% der untersuchten Gene eine Regulation beobachtet. Andererseits ermöglichen Arrays, die das komplette Genom abbilden, die Untersuchung von der 25-fachen bis zur deutlich über 60-fachen Anzahl an Gentranskripten gegenüber der hier verwendeten Technologie. Die Interpretation der Daten hinsichtlich der beeinflußten, biologischen Prozesse (Stoffwechselwege, Signalvermittlungsnetzwerke, Wachstums-/Differenzierungsvorgänge) kann dadurch erleichtert sein. Aufgrund der hier vorgenommenen Vorselektionierung sind Aussagen zur funktionellen Regulation biologischer Prozesse nur in dem Maß möglich, welches dem Vorliegen der Gene in der Grundgesamtheit des Arrays entspricht.

5.1 Hemmung der HCV-Replikation bei Eisenüberladung im subgenomischen Replikon-Modell

Von Patienten mit chronischer viraler Hepatitis ist seit Anfang der 1990er Jahre bekannt, daß die im Rahmen der klinischen Diagnostik als Laborparameter bestimmten Serum-Eisen-Indices (Serumferritinspiegel; Transferrinsättigung; freie und totale Eisenbindungskapazität) [49] häufig erhöht sind [73-77]. Bei mehreren Studien wurden bei HCV-Patienten auch erhöhte Eisenspiegel in der Leber gemessen [67, 78-80]. Ein schlechteres Ansprechen auf die Interferontherapie ist bei

den Patienten mit erhöhten Eisenindices bekannt [81-83, 86], die Ursachen dieses klinischen Zusammenhangs sind aber bislang nicht aufgeklärt.

Die Ergebnisse etlicher Forschungsarbeiten an Zellkulturmodellen wurden kontrovers diskutiert [161, 162], nachdem sowohl Induktion, als auch Inhibierung der HCV-Replikation bei Eisenüberladung beobachtet wurde (Tab. 5.1).

Autor	Journal	Jahr	<i>in vitro</i> Zell- System	HCV Konstrukt	Eisen	Resultat	Erklärung
Kakizaki	Liver	2000	PH5CH8	HCV Genotyp 1b aus Patientenserum	FeSO ₄	gesteigerte Replikation	Schwächung zellulärer Abwehr von Viren durch oxidativen Stress
Theurl	J Infect Dis	2004	HepG2	bicistronisches, duales Luciferase Reporter Plasmid	FeCl₃	gesteigerte HCV-IRES- abhängige Translation	verstärkte Expression von eIF3
Fillebeen	J Biol Chem	2005	Huh-7	subgenomisches Replikon	Hämin; Fe-SIH	verringerte Replikation	Inaktivierung der NS5B
Yuasa	Liver Int.	2006	PH5CH8	subgenomisches u. Volllängen-Replikon	FeSO ₄ , FeCl ₃	verringerte Replikation	Inaktivierung der NS5B
Cho	Virus Genes	2008	Cos-7, HeLa	bicistronische, duale Luciferase Reporter Plasmide	NH₄- Fe(III)- Citrat	gesteigerte HCV-IRES- abhängige Translation	2 uncharakterisierte Proteine binden an HCV IRES und auch hu IRE

 Tab. 5.1: Übersicht von Veröffentlichungen zu in vitro Analysen der HCV-Replikation bei Eisenüberladung (Hämin: Eisen(III)-Protoporphyrin-IX-chlorid; Fe-SIH: Eisen(III)-Salicylaldehydisonicotinoylhydrazon)

Im Fall der Induktion profitiert das HCV von der Schwächung zellulärer Abwehrmechanismen in Folge des erhöhten oxidativen Streß [124], von der induzierten Expression des Translationsinitiationsfaktors elF3 [125] oder der modulierten Bindungsaffinität zellulärer Faktoren zur HCV IRES bei der Translationsinitiation [87]. Im Fall der Reduktion hemmt Eisen direkt die virale RNA-Polymerase NS5B, indem der benötigte Co-Faktor Mg²⁺ aus der Bindestelle im Enzym verdrängt wird [126, 127]. Es muß eingeräumt werden, daß die unterschiedlichen Beobachtungen der verschiedenen Arbeitsgruppen in den abweichenden experimentellen Bedingungen, wie z.B. den jeweils verwendeten Zelllinien, den genetischen Konstrukten unterschiedlicher HCV-Genotypen und der Art der Expression (z.B. transient oder stabil) begründet sein können (Tab. 5.1).

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurde die Replikon-Zelllinie Huh9-13 [35] verwendet, die auf dem Hintergrund der Huh-7 Zellen [38] generiert wurde. Diese Replikon-Zellen enthalten die sich selbst replizierende

subgenomische HCV-RNA I₃₇₇/NS3-3', die für die Nicht-Strukturproteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B codiert [37].

Im untersuchten Modell der Eisenüberladung zeigte sich, daß bei Verwendung zweiwertigen Eisens (Fe²⁺), nicht aber bei Verwendung dreiwertigen Eisens (Fe³⁺) die HCV-Replikation beeinflußt war (s. 4.1.1.1 u. 4.1.1.3). Die Replikationsrate sank nach 24 h um durchschnittlich $33 \pm 6\%$ (P < 0,01) wenn die Eisenkonzentration im Medium um 100 µmol/l erhöht wurde (s. Abb. 4.1). Die Ergebnisse zur Expressionsstärke viraler Proteine (s. Abb. 4.2 u. Abb. 4.3) spiegeln die Resultate der Real-Time PCR Analysen wieder.

Der eigene Befund einer Inhibierung der HCV-Replikation durch Eisen ist im Einklang mit vorliegenden Daten, die ebenfalls am Modell des subgenomischen Replikons erhoben wurden. Während Fillebeen *et al.* ebenfalls eine durch Transfektion von Huh-7 Zellen hergestellte Replikon-Zelllinie verwendeten, wurde die Chloroeisen(III)-Porphyrin-Koordinationskomplexverbindung Hämin, also dreiwertiges Eisen (Fe³⁺), in den Versuchen eingesetzt [126]. Yuasa *et al.* führten die Versuche mit zweiwertigem Eisen in Form des auch hier eingesetzten FeSO₄ an HCV-infizierten, humanen Hepatomzellen des Typs PH5CH8 durch [127]. Interessanterweise damit an Zellen des selben Typs und bei Verwendung der selben Eisenverbindung, für die von der gleichen Arbeitsgruppe zuvor, allerdings in einem veränderten HCV-Infektionsmodell, das gegenteilige Ergebnis einer Verstärkung der HCV-Replikation publiziert worden war [124].

Der eigene Befund zeigt allerdings auch eine Diskrepanz zwischen dem *in vitro* Modell und dem klinischen Befund. Angesichts der Beobachtung, daß chronische HCV-Patienten mit erhöhten Eisenwerten eine schlechtere Therapieprognose haben, wäre eine gesteigerte virale Replikation eine naheliegende Vermutung. Die Hemmung der HCV-Replikation *in vitro* war durch die Kombination von 1000 U/ml IFN α und 100 μ M Fe²⁺ ähnlich, wie die nur durch IFN α erzeugte (Abb. 4.1). Die Konzentration *in vitro* war so gewählt, um etwa 75% Inhibition der Replikation zu erreichen. Allerdings beträgt bei der Interferontherapie HCV-infizierter Patienten der Serumspiegel max. 10 – 15 U/ml [163], so daß sich allein daraus Unterschiede bei der IFN-Wirkung herleiten lassen.

5.1.1 Genexpressionsänderungen bei Eisenüberladung in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie

Mittels Analyse der Veränderungen von Expressionsprofilen sollten Gene ermittelt werden, deren Expressionsregulation Hinweise auf den Zusammenhang zwischen viraler Replikation und Eisenüberladung geben. Es wurde bei der Unterteilung der in Tab. 4.1 gelisteten Gruppen regulierter Gentranskripte festgestellt, daß 45 mRNAs allgemein bei Eisenüberladung reguliert waren, 14 davon wurden induziert und 31 reprimiert. Weitere 111 mRNAs (28 induziert; 83 reprimiert) waren exklusiv in Abwesenheit von IFNα und 43 mRNAs nur in Anwesenheit von IFNα (21 induziert; 22 reprimiert) bei Eisenüberladung reguliert (s. Tab. AI–AII).

Die Daten zeigen, daß durch Erhöhung der Eisenkonzentration mehr Gentranskripte reprimiert als induziert sind, bei oberflächlicher Gruppierung z. B. mit insgesamt 50 runterregulierten gegenüber 27 hochregulierten solche Gene, deren Produkte an unterschiedlichen Prozessen biologischer Regulation beteiligt sind. Außerdem sind mRNAs verschiedener Enzyme reguliert, die Redoxprozesse katalysieren, darunter sind hauptsächlich solche reprimiert, die an katabolen Prozessen (Kohlenhydrat–; Fettsäure–; Aminosäurestoffwechsel) beteiligt sind. Vornehmlich induziert sind solche, die in Elektronentransportvorgänge involviert sind (z. B. Cytochrom-Oxidasen, ATPasen).

Freies Eisen führt in der Zelle *via* Fenton-Haber-Weiss-Reaktion zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) [71, 72]. Wie gezeigt wurde, ergaben sich bei der eingesetzten Stoffmengenkonzentration von 100 µmol/l Fe²⁺ keine zytotoxischen Effekte (Abb. 4.8), nicht zuletzt, da in Hepatozyten die zytoprotektiven Mechanismen besonders ausgebildet sind [55]. Gleichwohl finden sich unter den bei Eisenüberladung regulierten Genen zahlreiche, deren Produkte in Prozesse der Stressantwort und Stresskontrolle involviert sind. Transkripte der Gene beispielsweise für Thioredoxin (TXN), die Thioredoxin-Reduktase 1 (TXNRD1), von Peroxiredoxin 5 (PRDX5) und Interleukin 8 (IL8) waren hochreguliert. Erwartungsgemäß ebenso mRNAs für Ferritin, als maßgebliches Eisenspeicherprotein der Zelle. Unter den regulierten Transkripten finden sich etliche für Chaperone, z. B. aus der Familie der "heat shock proteins" (HSP) und den HSP40 homologen Chaperonen der DNAJ-Familie. Auffällig sind dabei sowohl schwach
induzierte Transkripte (HSPD1; HSPA1A; DNAJA3; DNAJB9), neben deutlich stärker reprimierten (HSPA8; HSP90B1; DNAJC7). Zu letzteren gehören auch zwei Prolylisomerasen (PPIB; FKBP1A), mit welchen Wechselwirkungen zu HCV-Proteinen bereits beschrieben sind. Cyclophilin B (PPIB) stimuliert die Affinität und Aktivität der NS5B RNA-Polymerase [145] und FKBP8, das wie das hier gefundene FKBP1A zur Chaperon-Familie der FK506 bindenden Proteine gehört, interagiert zusammen mit HSP90, hier gefunden in Form von HSP90B1, mit dem HCV-Protein NS5A [146], dem eine Rolle bei der Regulation der Replikation zugeschrieben wird [164]. Daß die mRNAs der Chaperone Cyclophilin B, FKBP1A und HSP90B1 bei Eisenüberladung reprimiert sind, stellt somit einen möglichen direkten Zusammenhang zur bei Eisenüberladung verminderten HCV-Replikation her.

Weiterhin werden auffällige Genexpressionsregulationen in zwei Netzwerken des Interferon-vermittelten Signalings gefunden. Für den JAK/STAT-Signalweg und das Signalnetzwerk der "mitogen activated protein kinases" (MAPK) fällt auf, daß bei mehreren beteiligten Faktoren eine Regulation des Expressionsniveaus auf Transkriptebene ermittelt JAK/STAT-Signalweg wurde. Beim werden rezeptorvermittelt die so genannten Janus-Kinasen (JAK) aktiviert, welche ihrerseits STAT-Transkriptionsfaktoren (signal transducer and activator of transcription) phosphorylieren, die daraufhin dimerisieren, in den Zellkern translozieren und die Transkription IFN-stimulierter Gene initieren [165]. Es wurde schon beschrieben, daß HCV-Proteine per se die JAK/STAT-Signalvermittlung über die Induzierung der SOCS Signal-Inhibitoren (suppressor of cytokine signaling) blockieren können [166]. Allerdings findet diese Inhibierung wohl in Abhängigkeit des HCV-Core Proteins statt [167], welches im I₃₇₇/NS3-3'-Replikon deletiert ist.

Bei Eisenüberladung waren sowohl die für die Janus-Kinase JAK1 kodierende mRNA, als auch die für die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 kodierenden mRNAs runterreguliert. Darüber kann ein direkter Zusammenhang zum schlechteren Ansprechen von HCV-Patienten mit erhöhten Eisen-Indices auf die Interferonbehandlung hergestellt werden.

Bei der Signalweiterleitung via MAP-Kinasen werden mehrere sequenzielle Kinasen per Phosphorylierungskaskade aktiviert, wodurch letztendlich, wie auch beim JAK/STAT-Signalweg, über Transkriptionsfaktoren die Transkription von zahlreichen Zielgenen aktiviert wird. Das MAPK-Signaling beeinflußt z. B. Zellproliferation,

Zelldifferenzierung, aber auch Apoptose [168, 169]. In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, daß auch via Signaltransduktion über MAP-Kinasen sowohl die von IFNα [170], als auch die von IFNγ [171] vermittelte antivirale Aktivität gegen das Hepatitis C Virus beeinflußt wird.

In Folge der induzierten Eisenüberladung zeigte sich, daß mRNAs zentraler MAP-Kinasen (MAPK3; MAPK9; MAPK14), sowie des direkt mit diesen interagierenden Transkriptionsfaktors JUN runterreguliert waren. Die mRNAs der MAPK-Inhibitoren "dual specifity phosphatase 1" (DUSP1) und der Magnesium-abhängigen Protein-Phosphatase 1A (PPM1A) waren im Gegenzug hochreguliert. Dieser Befund liefert zwar ein weiteres Indiz für das schlechtere Ansprechen auf die IFN-Therapie bei Eisenüberladung, steht aber im scheinbaren Widerspruch zur bei Eisenüberladung *in vitro* verminderten HCV-Replikation.

Die bereits besprochene reprimierte Transkription von Chaperonen, die essentielle Interaktionspartner der HCV-Proteine NS5A und NS5B sind, in Kombination mit der Beeinflussung IFN-vermittelter Signalwege stellt ein Konzept dar, welches Grundlage für weiterführende Untersuchungen sein kann.

5.1.2 Proteinexpressionsänderungen bei Eisenüberladung in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie

Im Rahmen der Analysen zur differentiellen Proteinexpression gelang es, sechs nicht-redundante Proteine zu identifizieren, von denen fünf bei Eisenüberladung sowohl in Abwesenheit, wie in Anwesenheit von IFNα identisch waren (Tab. 4.4 u. Tab. 4.5).

Über das hochregulierte "hematological and neurological expressed 1-like" Protein (HN1L) ist bislang nur wenig Information verfügbar. Es wird in der Leber exprimiert und ist sowohl im Zellkern, wie im Zytosol lokalisiert. HN1L und andere Gene der HN1-Familie haben möglicherweise eine Funktion bei der Embryonalentwicklung [172].

Die induzierte Acyl-Coenzym A Dehydrogenase (ACADS) ist ebenso, wie die reprimierte Malatdehydrogenase (MDH2), eine Oxidoreduktase, für die schon die Genexpressionsdaten gezeigt haben, daß sie unterschiedlicher Regulation bei

Eisenüberladung unterliegen. *Via* Array Technologie war auch auf Transkriptebene die mRNA der MDH2 als reprimiert identifiziert worden.

Drei identifizierte Proteine haben Funktionen bei der Prozessierung von mRNA und der Translation. Runterreguliert sind sowohl das "FUS interacting protein 1" (FUSIP1), dem eine Rolle beim RNA-Splicing zukommt [173], und der eukaryotische Translations-Elongations-Faktor 2 (EEF2), der essentieller Bestandteil des Translationskomplexes am Ribosom ist [174]. Die mRNA-Expression eines weiteren Translations-Elongations-Faktor (EEF1A1) wurde bei den Genexpressionsanalysen ebenfalls als runterreguliert identifiziert. Eine bei Eisenüberladung verminderte Translation in Folge der Beeinflussung der Co-Faktoren könnte somit zur Erklärung der verminderten HCV-Replikation beitragen.

Das hochregulierte "heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K" (hnRNPK), für das sowohl die Möglichkeit zur Interaktion mit dem HCV Core Protein [175], als auch mit der 3'-NTR des HCV nachgewiesen wurde [32], ist ein Transkriptionsfaktor für den Transkriptionsfaktor c-myc [176], dessen mRNA-Expression wiederum bei der Array-Auswertung als hochreguliert gefunden wurde. Neben der Funktion bei der Regulation von Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose fällt c-myc auch eine Rolle bei der Regulation in Folge von oxidativem Stress zu, der, wie bereits beschrieben, auch durch freies Eisen hervorgerufen wird [177].

5.2 Einfluß von Anisoosmolarität auf die HCV-Replikation im subgenomischen Replikon-Modell

Zu Beginn der 1990er Jahre konnte das Konzept etabliert werden, daß Änderungen der zellulären Hydration, die unter verschiedenen Einflüssen auftreten, eigenständig zur Kontrolle des zellulären Metabolismus und der Genexpression beitragen [93, 178]. Modellsysteme, Zellen und Gewebe anisotonischen bei denen Milieubedingungen ausgesetzt wurden, führten zur Identifizierung von Mechanismen des Osmosensings und von Prozessen des Osmosignalings und erweiterten somit Verständnis Zellvolumenfluktuationen, das der Zusammenhänge zwischen Änderungen des Metabolismus und der Modulation der Toxizität von Noxen [96, 179-181]. Während eine Hydrationszunahme (Zellschwellung) die Stimulation anaboler Stoffwechselprozesse und der Zellzyklusprogression bewirkt [94], fördert eine Hydrationsabnahme (Zellschrumpfung) katabole Stoffwechselprozesse und begünstigt die Anfälligkeit der Zelle gegenüber pro-apoptotisch wirkenden Streßfaktoren [96, 103, 182].

Bislang existieren nur wenig Daten zum Einfluß von Zellvolumenänderungen auf die virale Replikation. Während in den 1960er und 70er Jahren der Effekt der Zellhydrationszunahme (Zellschwellung) auf die Replikation von RNA-Viren (Polio–, Sindbis–, Retikuloendotheliose Virus) untersucht wurde [108-111], liegen seit mehreren Jahren auch Daten aus Modellsystemen der viralen Hepatitis vor, die sich aber auf Vorgänge zur HBV-Infektion beschränken [115, 116]. Gezeigt wurde bisher in allen Studien, daß Anisoosmolarität die virale Replikation beeinflußt. Dabei ist die Replikation in Folge von Zellschwellung (Hypoosmolarität) vermindert [108-111, 115] und in Folge von Zellschrumpfung (Hyperosmolarität) gesteigert [115, 116]. Auch in Studien zur HIV-Replikation wurde gezeigt, daß unter hyperosmotischen Bedingungen die virale Replikation gesteigert ist [117].

Die eigenen Untersuchungen wurden an Huh9-13 Zellen mit dem subgenomischen I₃₇₇/NS3-3' Replikon [35] durchgeführt. Nach 24 h, und deutlich verstärkt nach 48 h Inkubationsdauer, zeigten sich unter hypo- und hyperosmotischen Bedingungen entgegengesetzt gerichtete Effekte auf die HCV-Replikation (s. Abb. 4.11). Die Replikation war nach 48 h bei induzierter Zellschwellung (Hypoosmolarität) um $36 \pm 6\%$ verringert (P < 0,01) und bei induzierter Zellschrumpfung (Hyperosmolarität) um 70 \pm 16% gesteigert (P < 0,01) (Abb. 4.11). Vergleichbare Veränderungen wurden auch nach Austausch von NaCl gegen die nicht-zellpermeable Raffinose gemessen (Abb. 4.12), woraus sich als Schlußfolgerung ableitet, daß die Beeinträchtigung der viralen Replikationsrate durch die Modifikation des Zellvolumens ausgelöst wurde und keine Folge der Änderung der Ionenstärke war. Nach 24 h, ebenso wie nach 48 h Inkubation der Zellen unter anisoosmotischen Bedingungen, konnte keine Beeinträchtigung der Zellviabilität festgestellt werden (Abb. 4.16). In einer Studie zur Hitzetoleranz von Rattenhepatomzellen wurde, ebenfalls durch Verwendung der Methode des XTT-Assays, bereits gezeigt, daß es nach 24 h Inkubation in hypoosmotischem Medium zu keinem Viabilitätsverlust und in hyperosmotischem Medium nur zu einem geringen Viabilitätsverlust kam [183].

Die Ergebnisse zur Expressionsstärke viraler Proteine (Abb. 4.14 u. Abb. 4.15) spiegeln die Resultate der Real-Time PCR Analysen wieder. Bemerkenswert ist die

Beobachtung, daß die Erhöhung der HCV-Replikationsrate nach 48 h Inkubation in hyperosmotischem Medium bei gleichzeitiger Administration von IFN α so stark ausfällt, daß sie um ein signifikantes Maß (P < 0,05) die hemmende IFN-Wirkung abschwächt (Abb. 4.10 u. Abb. 4.13).

5.2.1 Genexpressionsänderungen unter dem Einfluß von Anisotonizität in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie

Als Folge der Modifikation des Hydrationszustands der Zelle sollten resultierende Veränderungen in der Expressionsregulation von Genen untersucht werden, um Hinweise auf den Zusammenhang zwischen viraler Replikation und Zellvolumendynamik zu erhalten. Es wurde bei der Unterteilung der in Tab. 4.6 gelisteten Gruppen regulierter Gentranskripte festgestellt, daß 62 mRNAs (29 induziert; 33 reprimiert) nur unter hypoosmotischen und 218 mRNAs (134 induziert; 84 reprimiert) nur bei hyperosmotischen Bedingungen reguliert waren. 64 mRNAs waren allgemein bei Anisoosmolarität reguliert. Gleichsinnig bei Hypo- und Hyperosmolarität waren davon 10 induziert und 8 reprimiert. Gegensätzlich reguliert wurden insgesamt 46 mRNAs. Bei Zellschwellung induziert und bei Zellschrumpfung reprimiert waren 21 mRNAs und 25 entsprechend bei Zellschrumpfung induziert und bei Zellschwellung reprimiert (s. Tab. AIII–AIV).

In der vorliegenden Studie fällt auf, daß bei einer Hydrationsabnahme ein größerer Einfluß auf die Zellen ausgeübt wird, als bei einer Hydrationszunahme, da von den insgesamt 408 (davon 344 nicht-redundante) regulierten Gentranskripten, bei 70% in Folge einer Zellschrumpfung und bei 30% nach Zellschwellung eine Regulation beobachtet wurde. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß unter hypoosmotischen Bedingungen etwa gleich viele mRNAs reprimiert wie induziert waren, während ein Ungleichgewicht unter hyperosmotischen Bedingungen vorlag, nämlich ca. 40% der mRNAs reprimiert und ca. 60% induziert waren.

Der generelle Effekt von Zellvolumenänderungen auf die Genexpression ist bereits in unterschiedlichen Studien für diverse Zelltypen untersucht worden [95, 184, 185].

Bei Zellschwellung fand man neben der bereits erwähnten Stimulation anaboler Stoffwechselprozesse und erwartungsgemäß einer Beeinflussung von zytoskelettalen Strukturen [186, 187] eine Aktivierung zentraler Kinasen der Mitogen-

aktivierten Signaltransduktion und aktivierender Transkriptionsfaktoren von Proliferations– und Differenzierungsvorgängen [188, 189].

Bei den eigenen Untersuchungen im subgenomischen HCV-Replikon Modell fand sich zwar eine Regulation von Transkripten proliferativer Zellprozesse bei einer Hydrationszunahme, allerdings läßt sich kein gerichteter Einfluß ableiten. Es waren sowohl mRNAs von positiven Regulatoren (Transkriptionsfaktor MYC, Nucleosiddiphosphatkinase NME2, Chemokin Ligand CXCL10, Interleukin 18), als auch von negativen Regulatoren (anti-proliferatives Translokationsgen BTG1, Tumor Suppressor PTEN, Membranrezeptor TM4SF4, Proteinphosphatase 1G), sowohl runterreguliert (MYC, NME2, TM4SF4, PPM1G), als auch hochreguliert (CXCL10, IL18, BTG1, PTEN).

Eine verstärkte Regulation metabolischer Prozesse wurde beobachtet, dabei waren z. B. Transkripte von Genprodukten kataboler Prozesse (Glycolyse, Proteolyse) runterreguliert. Angesichts der Osmolaritätsänderung des Milieus fand sich auch eine Regulation bei Genen für unterschiedliche zelluläre Transporter. Darunter waren ABC-Transporter und verschiedene Transporter aus der über 45 Familien umfassenden Gruppe der "solute carrier" (SLC) [190], z. B. waren Transkripte von Genen für Aminosäuretransporter hochreguliert (SLC1A5, SLC38A3). Angesichts der Tatsache, daß unter hypoosmotischen Bedingungen anabole Prozesse stimuliert werden, läßt sich über die Induktion der mRNAs besagter Transporter die entsprechende Erhöhung der Substratzufuhr ableiten.

Es ist bekannt, daß durch Hypoosmolarität oxidativer Stress ausgelöst wird [104, 105], und es fand sich in Folge hypoosmotischer Inkubation die Aktivierung Stress-induzierter Gene. Bzgl. der Mitogen-aktivierten Signaltransduktion kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, da Transkripte sowohl von als Aktivator fungierenden Kinasen (MAPK3, IRAK1), als auch solche für die Kinaseinhibitoren der "dual specifity phosphatases" (DUSP5, DUSP6), als runterreguliert gefunden wurden. Ebenso wurden Transkriptionsfaktoren, welche die Endpunkte der Signalvermittlung bilden, z. T. als induziert (ATF4) und z. T. als reprimiert (MYC) ermittelt.

Wie beschrieben durch die hervorgerufene Zellschrumpfung waren in hyperosmotischem Milieu insgesamt deutlich mehr Transkripte als bei hypoosmotischer Zellschwellung reguliert. Hyperosmolarität fördert den katabolen

Stoffwechsel [96], erzeugt oxidativen Stress, begünstigt die Suszeptibilität der Zelle gegenüber Stressoren und die Initiation apoptotischer Abläufe [103, 182]. Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen waren entsprechend Transkripte von positiv auf die Zellzyklusprogression einwirkenden Faktoren reprimiert (Survinin, Cyclin A2, NEK6). Weiterhin fand sich bei Hydrationsabnahme die Induktion verschiedener zellulärer Transporter unterschiedlicher Spezifitäten, z. B. ABC-Transporter (ABCB4, ABCC2, ABCC5) und div. SLC-Transporter (Aminosäuretransporter (SLC3A2, SLC38A1), Kation/Chlorid-Cotransporter (SLC12A2), Bicarbonat-Transporter (SLC4A2), Na/Glukose-Cotransporter (SLC5A3)). Bei einer Studie zur mRNA-Expression in Keratinozyten konnte bereits gezeigt werden, daß unter dem Einfluß von Dehydration (Zellschrumpfung) Osmolyttransporter hochreguliert werden [208].

Die Zellen zeigten zwar nach 48 h Behandlung in hyperosmotischem Milieu keinen Viabilitätsverlust (Abb. 4.16), dennoch wurde bei der Genexpressionsstudie die Regulation von mit Stressantworten und Apoptose assoziierten Transkripten beobachtet, z. B. die Induktion von anti-apoptotischen Genen (BCL2L1 (s. u.), NFKB1 (s. u.), Beclin, Clusterin).

In Anbetracht der Beobachtung, daß bei Hydrationsabnahme nach 48 h die hemmende Wirkung von IFNa abgeschwächt, und die HCV-Replikationsrate signifikant gegenüber isotonischen Bedingungen erhöht war (Abb. 4.10 u. Abb. 4.13), wurden JAK/STAT-Signalweg und MAPK-Signalnetzwerk intensiver betrachtet. Auffällig ist das gleichzeitige Vorliegen einer Induzierung der Expression von Aktivatoren (STAT3, STAT6) und Inhibitoren (PIAS1, SOCS5) des Signalwegs, insbesondere, weil der "suppressor of cytokine signaling 5" möglicherweise ein negativer Regulator des Transkriptionsfaktors STAT6 ("signal transducer and activator of transcription 6") ist [191]. Über diesen erfolgt allerdings die Expression der Transkriptionsfaktoren des anti-apoptotischen BCL-2/-XL Systems [192] und von NF-kB [193], deren mRNA-Expression ebenfalls induziert war. Der "protein inhibitor of activated STAT 1" PIAS1 inhibiert spezifisch den Transkriptionsfaktor STAT1 [194], der insbesondere in Folge des Signalings durch IFNa und IFNy aktiviert wird. STAT3 wird ebenfalls durch IFN-vermittelte Signale aktiviert. Allerdings kann es, durch das HCV-NS5A Protein vermittelt, zu oxidativem Stress kommen, in dessen Folge eine konstitutive Aktivierung von STAT3 und auch von NF-kB erfolgen kann [89, 91].

Analog zur hyperosmotischen Aktivierung des HOG1-Signalweges bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde für Säugerzellen eine Aktivierung des MAPK-Signalnetzwerks beschrieben [185]. Während durch Hypoosmolarität die Aktivierung der MAP-Kinasen-Expression schnell, aber, zumindest *in vitro*, nur bei Verfügbarkeit des Cofaktors Vanadat eintritt, und binnen weniger Stunden wieder auf ein basales Niveau reduziert wird, tritt bei Hyperosmolarität die Aktivierung verzögert ein und bleibt länger erhalten, bevor die Expression auf eine basales Niveau zurückkehrt [195]. Angesichts der Versuchsdauer von 48 h besteht die Möglichkeit, daß bestimmte Expressionsänderungen nicht erfasst wurden, wenn nach anfänglicher Regulation wieder nahezu der Normalzustand der Expression vorlag. Beobachtet wurde wie beim JAK/STAT–Signalweg auch für das MAPK-Signalnetzwerk das gleichzeitige Vorliegen einer Induzierung der Expression von Aktivatoren (GADD45A, GADD45B, MAP4K3) und Inhibitoren (DUSP1, DUSP3, DUSP5, DUSP6, DUSP10).

In Folge der hyperosmotischen Exposition der Zellen wurde die Induzierung zahlreicher Transkripte von Nukleinsäure-bindenden Genprodukten festgestellt, z. B. verschiedene Transkriptionsfaktoren (FOXA3, NF-kB, NR0B2, NR1H2, NR1H4, NR4A1, SREBF2) und u. a. solche die mit Nukleinsäurestrukturen mittels Helikase-Aktivität (CHD4, DDX26, DDX46) wechselwirken. Für verschiedene RNA-Helikasen (DDX3, DDX5, DDX15, DDX17, DHX9) wurde schon gezeigt, daß sie mit dem RNA-HCV interagieren [32]. Genom des Hochreguliert waren auch die 2',5'-Oligoadenylatsynthetase und a-Aktinin und damit zwei Faktoren, von denen bekannt ist, daß sie mit NS5A [196] respektive mit NS5B [197] interagieren und die zur gesteigerten HCV-Replikation bei Hydrationsabnahme beitragen könnten.

5.2.2 Proteinexpressionsänderungen unter dem Einfluß von Anisotonizität in der humanen Huh9-13 Hepatomzelllinie

Bei den Untersuchungen zur Proteinexpression wurden von den insgesamt 45 differentiell regulierten Proteinspots schließlich 33 mittels gekoppelter LC-MS/MS identifiziert, dabei vier bei Hypoosmolarität (Tab. 4.9) und 29 bei Hyperosmolarität (Tab. 4.10), wodurch dann 19 nicht-redundante Proteine ermittelt werden konnten.

Auffällig ist zunächst die offensichtliche Regulation von Fibrinogen. Das Glycoprotein Fibrinogen besitzt drei jeweils paarweise vorhandene alpha-, beta-, und gamma-

Ketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind und jeweils von einem eigenständigen Gen codiert werden [198]. Aufgrund der denaturierenden Elektrophoresemethode, bei der Disulfidbindungen getrennt werden, wurden alphaund gamma-Kette separat identifiziert. Bei den Genexpressionsanalysen wurde zusätzlich noch das Transkript für die beta-Kette gefunden. Sowohl Protein- als auch Genexpressionsdaten zeigen, daß die Fibrinogenkomponenten ieweils bei Zellschwellung stark hochreguliert und bei Zellschrumpfung stark runterreguliert waren. Fibrinogen ist ein wichtiger Faktor der Blutgerinnung, hat aber eine Reihe weiterer biologischer Funktionen. So ist es an Zytokin- und Wachstumsfaktorvermittelten Proliferationsprozessen beteiligt [199], welche durch Zellschwellung begünstigt und durch Zellschrumpfung unterbunden werden. Die Fibrinogen gamma-Kette kann außerdem mit dem NS4B-Protein des HCV interagieren [200].

Bei der Hydrationszunahme war auch die UDP-Glucosedehydrogenase induziert. Diese ist an der Biosynthese von Glykosaminoglykanen beteiligt, welche als Komponente der extrazellulären Matrix Wasser binden können und somit der Zellschwellung entgegenwirken [201]. Die Expressionsregulation des Gens erfolgt über den "transforming growth factor beta 1" (TGFB1) [202].

Das einzige unter hypoosmotischen Bedingungen identifizierte, reprimierte Protein war das C1-Protein der Aldo-Keto-Reduktase Familie 1. Analog dazu waren in der Genexpressionsstudie die Transkripte der Aldo-Keto-Reduktasen C2 und C4 bei Hypoosmolarität ebenfalls reprimiert. Die Enzyme dieser Familie reduzieren Aldehyde und Ketone zu den jeweiligen Alkoholen und sind z. T. an Transportprozessen beteiligt [203].

Unter den bei Hyperosmolarität regulierten Proteinen, finden sich mehrere induzierte, zytoskelettale Proteine (Caldesmon, Lamin, Keratin, Syntrophin), für die vermutet werden kann, daß die Regulation in Folge der Zellschrumpfung durch Hydrationsabnahme auftritt.

Das ebenfalls hochregulierte Phosphatidylethanolamin-bindende Protein 1 (PEBP1) ist ein Raf-1 Kinase Inhibitor und damit ein negativer Regulator innerhalb des Mitogen-aktivierten Signalnetzwerks [204, 205]. Der Wachstumsfaktor HDGF ("hepatoma-derived growth factor"), ein möglicher Aktivator der Mitogen-vermittelten

Signalübertragung bei der Zellproliferation und Differenzierung [206], war in dem Zusammenhang reprimiert.

Wie bereits beschrieben interagieren verschiedene zelluläre RNA-Helikasen mit der 3'-NTR des HCV [32]. Analog zu den Genexpressionsdaten wurden auch unter den bei Hyperosmolarität hochregulierten Proteinen zwei Helikasen identifiziert. Dabei zählen DDX3 und DDX17 zu den als wechselwirkend bekannten Faktoren und sie könnten somit zur gesteigerten HCV-Replikation bei Hydrationsabnahme beitragen.

Vier an metabolischen Prozessen beteiligte Proteine waren runterreguliert, nämlich die cytosolische 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A Synthase 1 (HMGCS1) und drei im Mitochondrium lokalisierte Oxidoreduktasen (Aldehyd-Dehydrogenase A1, F1-Komplex der ATP-Synthase, Isocitratdehydrogenase). Ebenfalls reprimiert war das "small glutamine-rich TPR-containing protein" (SGTA), das ein möglicher proapoptotischer Faktor ist [207] und sich somit ein möglicher Zusammenhang zur Beobachtung der Induzierung anti-apoptotischer Gentranskripte bei der Genexpressionsanalyse ergibt.

Die Befunde, daß in Folge von Zellvolumenänderungen erstens bei unterschiedlichen zellulären Interaktionspartnern des HCV (Transkriptionsfaktoren, Helikasen, Zytoskelettkomponenten) zweitens innerhalb verschiedener und anti-viraler Signalvermittlungswege eine Regulation erfolgt, können dazu beitragen im Rahmen weiterführender Untersuchungen das Verständnis der Osmo-Regulation der HCV-Replikation zu erweitern.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 1989;244(4902):359-362.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM: Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. World J Gastroenterol 2007;13(17):2461-2466.
- 3. Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T: Viral hepatitis B. Lancet 2003;362(9401):2089-2094.
- 4. Lee WM: Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 1997;337(24):1733-1745.
- 5. Lauer GM, Walker BD: Hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2001;345(1):41-52.
- 6. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL: Viral hepatitis C. Lancet 2003;362(9401):2095-2100.
- 7. Di Bisceglie AM: Hepatitis C. Lancet 1998;351(9099):351-355.
- 8. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut WW, Schirren CA, Waechtler M, Backmund M, Pape GR: Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. Gastroenterology 2003;125(1):80-88.
- 9. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. NIH Consens State Sci Statements 2002;19(3):1-46.
- 10. Fontana RJ, Lok AS: Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. Hepatology 2002;36(5 Suppl 1):S57-S64.
- 11. Racanelli V, Rehermann B: Hepatitis C virus infection: when silence is deception. Trends Immunol 2003;24(8):456-464.
- 12. Hoofnagle JH: Course and outcome of hepatitis C. Hepatology 2002;36(5 Suppl 1):S21-S29.
- 13. Eisen-Vandervelde AL, Yao ZQ, Hahn YS: The molecular basis of HCVmediated immune dysregulation. Clin Immunol 2004;111(1):16-21.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2002;347(13):975-982.

- Toniutto P, Fabris C, Fumo E, Apollonio L, Caldato M, Avellini C, Minisini R, Pirisi M: Pegylated versus standard interferon-alpha in antiviral regimens for post-transplant recurrent hepatitis C: Comparison of tolerability and efficacy. J Gastroenterol Hepatol 2005;20(4):577-582.
- 16. Tan SL, Katze MG: How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. Virology 2001;284(1):1-12.
- 17. Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG: The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. Gastroenterology 2007;132(5):1979-1998.
- 18. Bukh J, Miller RH, Purcell RH: Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. Princess Takamatsu Symp 1995;25:75-91.
- 19. Bartenschlager R, Lohmann V: Replication of hepatitis C virus. J Gen Virol 2000;81(Pt 7):1631-1648.
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J: Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. J Virol 1992;66(5):3225-3229.
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS: Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. J Gen Virol 1993;74 (Pt 11):2391-2399.
- 22. Bukh J, Miller RH, Purcell RH: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. Semin Liver Dis 1995;15(1):41-63.
- Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J: Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. J Virol 2002;76(8):3720-3730.
- Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N: The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(10):6104-6108.
- 25. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T: Molecular biology of hepatitis C virus. J Gastroenterol 2007;42(6):411-423.
- 26. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T: Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. Adv Virus Res 2004;63:71-180.
- 27. Moradpour D, Penin F, Rice CM: Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Microbiol 2007;5(6):453-463.
- Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(22):12766-12771.

- 29. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A: The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. EMBO J 2002;21(19):5017-5025.
- Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatziioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM: Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nature 2007;446(7137):801-805.
- Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y: Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. J Virol 2006;80(14):6964-6972.
- 32. Harris D, Zhang Z, Chaubey B, Pandey VN: Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. Mol Cell Proteomics 2006;5(6):1006-1018.
- Mannova P, Fang R, Wang H, Deng B, McIntosh MW, Hanash SM, Beretta L: Modification of host lipid raft proteome upon hepatitis C virus replication. Mol Cell Proteomics 2006;5(12):2319-2325.
- 34. Ng TI, Mo H, Pilot-Matias T, He Y, Koev G, Krishnan P, Mondal R, Pithawalla R, He W, Dekhtyar T, Packer J, Schurdak M, Molla A: Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology. Hepatology 2007;45(6):1413-1421.
- Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 1999;285(5424):110-113.
- Frese M, Barth K, Kaul A, Lohmann V, Schwarzle V, Bartenschlager R: Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor-alpha. J Gen Virol 2003;84(Pt 5):1253-1259.
- 37. Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R: Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. J Virol 2001;75(3):1437-1449.
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J: Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res 1982;42(9):3858-3863.
- 39. Bartenschlager R: The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application. J Hepatol 2005;43(2):210-216.
- 40. Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. J Virol 2008;82(6):2631-2641.
- 41. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM: Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. Science 2000;290(5498):1972-1974.

- 42. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R: Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. J Virol 2001;75(10):4614-4624.
- 43. Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R: Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. J Virol 2002;76(8):4008-4021.
- 44. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R: Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. J Virol 2006;80(11):5308-5320.
- 45. Date T, Miyamoto M, Kato T, Morikawa K, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Mizokami M, Wakita T: An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. Hepatol Res 2007;37(6):433-443.
- 46. Erhardt A, Hauck K, Haussinger D: Iron as comorbid factor in chronic hepatitis C. Med Klin (Munich) 2003;98(12):685-691.
- 47. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science 2004;306(5704):2090-2093.
- 48. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC: The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. Cell Metab 2005;1(3):191-200.
- 49. Thomas L, Thomas C, Heimpel H: Neue Parameter zur Diagnostik von Eisenmangelzuständen: Retikulozytenhämoglobin und löslicher Transferrinrezeptor. Dtsch Arztebl 2005;102(9):580-586.
- Fabris C, Toniutto P, Scott CA, Falleti E, Avellini C, Del Forno M, Mattiuzzo M, Branca B, Pirisi M: Serum iron indices as a measure of iron deposits in chronic hepatitis C. Clin Chim Acta 2001;304(1-2):49-55.
- Metwally MA, Zein CO, Zein NN: Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. Am J Gastroenterol 2004;99(2):286-291.
- 52. Olthof AW, Sijens PE, Kreeftenberg HG, Kappert P, Irwan R, van der Jagt EJ, Oudkerk M: Correlation between serum ferritin levels and liver iron concentration determined by MR imaging: impact of hematologic disease and inflammation. Magn Reson Imaging 2007;25(2):228-231.
- 53. Bacon BR, Tavill AS: Role of the liver in normal iron metabolism. Semin Liver Dis 1984;4(3):181-192.
- 54. Bonkovsky HL: Iron and the liver. Am J Med Sci 1991;301(1):32-43.

- 55. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ: Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. J Inorg Biochem 2002;91(1):9-18.
- 56. Arredondo M, Nunez MT: Iron and copper metabolism. Mol Aspects Med 2005;26(4-5):313-327.
- 57. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem 2001;276(11):7806-7810.
- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. J Clin Invest 2002;110(7):1037-1044.
- 59. Ganz T: The role of hepcidin in iron sequestration during infections and in the pathogenesis of anemia of chronic disease. Isr Med Assoc J 2002;4(11):1043-1045.
- 60. Ganz T: Hepcidin--a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism; Antimicrobial Peptides and Human Disease. Springer Berlin Heidelberg, 2006, 306, pp 183-198.
- Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY: Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. Nat Genet 2006;38(5):531-539.
- 62. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Jr., Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nat Genet 1996;13(4):399-408.
- Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Starnes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, Schatzman RC: The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. J Biol Chem 1997;272(22):14025-14028.
- 64. Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R, Dresow B, Gabbe EE: Neue Möglichkeiten in der Diagnose der hereditären Hämochromatose. Dtsch Arztebl 1998;95(46):2912-2921.
- 65. Hezode C, Cazeneuve C, Coue O, Roudot-Thoraval F, Lonjon I, Bastie A, Duvoux C, Pawlotsky JM, Zafrani ES, Amselem S, Dhumeaux D: Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. J Hepatol 1999;31(6):979-984.

- Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T, Kaserer K, Hackl F, Polli C, Steindl PE, Penner E, Ferenci P: The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology 1999;116(1):127-134.
- 67. Tung BY, Emond MJ, Bronner MP, Raaka SD, Cotler SJ, Kowdley KV: Hepatitis C, iron status, and disease severity: relationship with HFE mutations. Gastroenterology 2003;124(2):318-326.
- 68. Papanikolaou G, Pantopoulos K: Iron metabolism and toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 2005;202(2):199-211.
- 69. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M: Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. Int J Biochem Cell Biol 2001;33(10):940-959.
- 70. Lill R, Muhlenhoff U: Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. Annu Rev Cell Dev Biol 2006;22:457-86.:457-486.
- 71. Sies H: Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med 1991;91(3C):31S-38S.
- 72. Sies H: Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem 1993;215(2):213-219.
- Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR: Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. Gastroenterology 1992;102(6):2108-2113.
- Arber N, Konikoff F, Moshkowitz M, Hallak A, Halpern Z, Gilat T: Chronic hepatitis C virus infection is associated with increased serum iron, iron saturation and iron absorption, but no increased liver iron accumulation. Gastroenterology 1993;104(A872).
- 75. Bonkovsky HL, Banner BF, Rothman AL: Iron and chronic viral hepatitis. Hepatology 1997;25(3):759-768.
- Arber N, Konikoff FM, Moshkowitz M, Baratz M, Hallak A, Santo M, Halpern Z, Weiss H, Gilat T: Increased serum iron and iron saturation without liver iron accumulation distinguish chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. Dig Dis Sci 1994;39(12):2656-2659.
- Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della LG, Marafin C, Lecis E, Burra P, Floreani A, Cecchetto A, Naccarato R: Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. J Hepatol 1995;22(4):449-456.
- Piperno A, D'Alba R, Fargion S, Roffi L, Sampietro M, Parma S, Arosio V, Fare M, Fiorelli G: Liver iron concentration in chronic viral hepatitis: a study of 98 patients. Eur J Gastroenterol Hepatol 1995;7(12):1203-1208.
- 79. Ludwig J, Hashimoto E, Porayko MK, Moyer TP, Baldus WP: Hemosiderosis in cirrhosis: a study of 447 native livers. Gastroenterology 1997;112(3):882-888.

- 80. Cotler SJ, Bronner MP, Press RD, Carlson TH, Perkins JD, Emond MJ, Kowdley KV: End-stage liver disease without hemochromatosis associated with elevated hepatic iron index. J Hepatol 1998;29(2):257-262.
- Van Thiel DH, Friedlander L, Fagiuoli S, Wright HI, Irish W, Gavaler JS: Response to interferon alpha therapy is influenced by the iron content of the liver. J Hepatol 1994;20(3):410-415.
- Olynyk JK, Reddy KR, Di Bisceglie AM, Jeffers LJ, Parker TI, Radick JL, Schiff ER, Bacon BR: Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. Gastroenterology 1995;108(4):1104-1109.
- Barton AL, Banner BF, Cable EE, Bonkovsky HL: Distribution of iron in the liver predicts the response of chronic hepatitis C infection to interferon therapy. Am J Clin Pathol 1995;103(4):419-424.
- 84. Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Chopra S, Flamm S, Reddy RK, Grace N, Killenberg P, Hunt C, Tamburro C, Tavill AS, Ferguson R, Krawitt E, Banner B, Bacon BR: Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C who have previously not responded to interferon: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial. Hepatology 2000;32(1):135-138.
- Fontana RJ, Israel J, LeClair P, Banner BF, Tortorelli K, Grace N, Levine RA, Fiarman G, Thiim M, Tavill AS, Bonkovsky HL: Iron reduction before and during interferon therapy of chronic hepatitis C: results of a multicenter, randomized, controlled trial. Hepatology 2000;31(3):730-736.
- Desai TK, Jamil LH, Balasubramaniam M, Koff R, Bonkovsky HL: Phlebotomy improves therapeutic response to interferon in patients with chronic hepatitis C: a meta-analysis of six prospective randomized controlled trials. Dig Dis Sci 2008;53(3):815-822.
- 87. Cho H, Lee HC, Jang SK, Kim YK: Iron increases translation initiation directed by internal ribosome entry site of hepatitis C virus. Virus Genes 2008;37(2):154-160.
- Fujita N, Horiike S, Sugimoto R, Tanaka H, Iwasa M, Kobayashi Y, Hasegawa K, Ma N, Kawanishi S, Adachi Y, Kaito M: Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. Free Radic Biol Med 2007;42(3):353-362.
- Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A: Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(17):9599-9604.
- 90. Miura K, Taura K, Kodama Y, Schnabl B, Brenner DA: Hepatitis C virusinduced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. Hepatology 2008; [Epub ahead of print]

- 91. Waris G, Turkson J, Hassanein T, Siddiqui A: Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: role of STAT-3 in HCV replication. J Virol 2005;79(3):1569-1580.
- 92. Di Bona D, Cippitelli M, Fionda C, Camma C, Licata A, Santoni A, Craxi A: Oxidative stress inhibits IFN-alpha-induced antiviral gene expression by blocking the JAK-STAT pathway. J Hepatol 2006;45(2):271-279.
- Haussinger D, Lang F: Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control. Biochim Biophys Acta 1991;1071(4):331-350.
- Haussinger D, Schliess F: Osmotic induction of signaling cascades: role in regulation of cell function. Biochem Biophys Res Commun 1999;255(3):551-555.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D: Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiol Rev 1998;78(1):247-306.
- 96. Schliess F, Haussinger D: The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. Biol Chem 2002;383(3-4):577-583.
- 97. Graf J, Haussinger D: Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism. J Hepatol 1996;24 Suppl 1:53-77.
- 98. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN: Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science 1982;217(4566):1214-1222.
- 99. Haussinger D: The role of cellular hydration in the regulation of cell function. Biochem J 1996;313(Pt 3):697-710.
- vom Dahl S, Schliess F, Reissmann R, Gorg B, Weiergraber O, Kocalkova M, Dombrowski F, Haussinger D: Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. J Biol Chem 2003;278(29):27088-27095.
- Schliess F, Reissmann R, Reinehr R, vom Dahl S, Haussinger D: Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. J Biol Chem 2004;279(20):21294-21301.
- 102. Rosette C, Karin M: Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. Science 1996;274(5290):1194-1197.
- Reinehr R, Schliess F, Haussinger D: Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J 2003;17(6):731-733.

- 104. Lambert IH: Reactive oxygen species regulate swelling-induced taurine efflux in NIH3T3 mouse fibroblasts. J Membr Biol 2003;192(1):19-32.
- 105. Schliess F, Foster N, Gorg B, Reinehr R, Haussinger D: Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. Glia 2004;47(1):21-29.
- 106. Hallbrucker C, Ritter M, Lang F, Gerok W, Haussinger D: Hydroperoxide metabolism in rat liver. K+ channel activation, cell volume changes and eicosanoid formation. Eur J Biochem 1993;211(3):449-458.
- 107. Saha N, Schreiber R, vom Dahl S, Lang F, Gerok W, Haussinger D: Endogenous hydroperoxide formation, cell volume and cellular K+ balance in perfused rat liver. Biochem J 1993;296 (Pt 3):701-707.
- 108. Tolskaya EA, Agol VI, Voroshilova MK, Lipskaya GY: The osmotic pressure of the maintenance medium and reproduction of poliovirus. Virology 1966;29(4):613-621.
- 109. Waite MR, Pfefferkorn ER: Effect of altered osmotic pressure on the growth of Sindbis virus. J Virol 1968;2(7):759-760.
- 110. Agol VI, Lipskaya GY, Tolskaya EA, Voroshilova MK, Romanova LI: Defect in poliovirus maturation under hypotonic conditions. Virology 1970;41(3):533-540.
- 111. Bishop JM, Maldonado RL, Garry RF, Allen PT, Bose HR, Waite MR: Effect of medium of lowered NaCl concentration on virus release and protein synthesis in cells infected with reticuloendotheliosis virus. J Virol 1976;17(2):446-452.
- 112. Papper S: Fluid and electrolyte disturbances in cirrhosis. Am J Med Sci 1976;272(1):53-56.
- 113. Satta A, Faedda R, Chiandussi L, Bartoli E: Fluid and electrolytes in liver disease. Postgrad Med J 1983;59(Suppl 4):64-72.
- 114. Levy M, Wexler MJ: Salt and water balance in liver disease. Hosp Pract (Off Ed) 1984;19(7):57-71.
- 115. Offensperger WB, Offensperger S, Stoll B, Gerok W, Haussinger D: Effects of anisotonic exposure on duck hepatitis B virus replication. Hepatology 1994;20(1 Pt 1):1-7.
- 116. Glebe D, Berting A, Broehl S, Naumann H, Schuster R, Fiedler N, Tolle TK, Nitsche S, Seifer M, Gerlich WH, Schaefer S: Optimised conditions for the production of hepatitis B virus from cell culture. Intervirology 2001;44(6):370-378.
- 117. Shapiro L, Heidenreich KA, Meintzer MK, Dinarello CA: Role of p38 mitogenactivated protein kinase in HIV type 1 production in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(13):7422-7426.

- 118. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
- 119. Klose J, Kobalz U: Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis 1995;16(6):1034-1059.
- 120. Salomonis N, Hanspers K, Zambon AC, Vranizan K, Lawlor SC, Dahlquist KD, Doniger SW, Stuart J, Conklin BR, Pico AR: GenMAPP 2: new features and resources for pathway analysis. BMC Bioinformatics 2007;8:217.
- 121. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA: DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol 2003;4(5):3.
- 122. Beisvag V, Junge FK, Bergum H, Jolsum L, Lydersen S, Gunther CC, Ramampiaro H, Langaas M, Sandvik AK, Laegreid A: GeneTools--application for functional annotation and statistical hypothesis testing. BMC Bioinformatics 2006;7:470.
- 123. Erhardt A, Haussinger D: Hämochromatosen Hämosiderosen. D-28211 Bremen, UNI-MED, 2006.
- 124. Kakizaki S, Takagi H, Horiguchi N, Toyoda M, Takayama H, Nagamine T, Mori M, Kato N: Iron enhances hepatitis C virus replication in cultured human hepatocytes. Liver 2000;20(2):125-128.
- 125. Theurl I, Zoller H, Obrist P, Datz C, Bachmann F, Elliott RM, Weiss G: Iron regulates hepatitis C virus translation via stimulation of expression of translation initiation factor 3. J Infect Dis 2004;190(4):819-825.
- 126. Fillebeen C, Rivas-Estilla AM, Bisaillon M, Ponka P, Muckenthaler M, Hentze MW, Koromilas AE, Pantopoulos K: Iron inactivates the RNA polymerase NS5B and suppresses subgenomic replication of hepatitis C Virus. J Biol Chem 2005;280(10):9049-9057.
- 127. Yuasa K, Naganuma A, Sato K, Ikeda M, Kato N, Takagi H, Mori M: Zinc is a negative regulator of hepatitis C virus RNA replication. Liver Int 2006;26(9):1111-1118.
- 128. Bouda J: Determination of iron with bathophenanthroline without deproteinisation. Clin Chim Acta 1968;21(1):159-160.
- 129. Hallaway PE, Eaton JW, Panter SS, Hedlund BE: Modulation of deferoxamine toxicity and clearance by covalent attachment to biocompatible polymers. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86(24):10108-10112.
- Meyer-Ingold W, Eichner W, Ettner N, Schink M, inventors. Beiersdorf AG (DE), assignee. Wound dressing for removal of interference factors from wound exudate. patent EP0945144. 1999 Sep 1999.

- 131. Tabor E, Kim CM: Inhibition of human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines by deferoxamine. J Med Virol 1991;34(1):45-50.
- 132. Britton RS, Leicester KL, Bacon BR: Iron toxicity and chelation therapy. Int J Hematol 2002;76(3):219-228.
- 133. Fillebeen C, Muckenthaler M, Andriopoulos B, Bisaillon M, Mounir Z, Hentze MW, Koromilas AE, Pantopoulos K: Expression of the subgenomic hepatitis C virus replicon alters iron homeostasis in Huh7 cells. J Hepatol 2007;47(1):12-22.
- 134. Seow TK, Liang RC, Leow CK, Chung MC: Hepatocellular carcinoma: from bedside to proteomics. Proteomics 2001;1(10):1249-63.
- 135. Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K: Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. Proteomics 2004;4(7):2111-2116.
- 136. Blanc JF, Lalanne C, Plomion C, Schmitter JM, Bathany K, Gion JM, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Bonneu M, Rosenbaum J: Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatocellular carcinoma developed in patients with chronic viral hepatitis C. Proteomics 2005;5(14):3778-3789.
- 137. Fang C, Yi Z, Liu F, Lan S, Wang J, Lu H, Yang P, Yuan Z: Proteome analysis of human liver carcinoma Huh7 cells harboring hepatitis C virus subgenomic replicon. Proteomics 2006;6(2):519-527.
- Kapus A, Szaszi K, Sun J, Rizoli S, Rotstein OD: Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of Na+/H+ exchangers. J Biol Chem 1999;274(12):8093-8102.
- 139. Hirano M, Kaneko S, Yamashita T, Luo H, Qin W, Shirota Y, Nomura T, Kobayashi K, Murakami S: Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. J Biol Chem 2003;278(7):5109-5115.
- 140. Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S: Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. J Virol 2006;80(7):3332-3340.
- 141. Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, Hong W: Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. J Virol 2004;78(10):5288-5298.
- 142. Wang C, Gale M, Jr., Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J: Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. Mol Cell 2005;18(4):425-434.

- 143. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM: Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. J Virol 2004;78(7):3480-3488.
- 144. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y: Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. J Virol 2005;79(21):13473-13482.
- 145. Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K: Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. Mol Cell 2005;19(1):111-122.
- 146. Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. EMBO J 2006;25(20):5015-5025.
- 147. Frese M, Pietschmann T, Moradpour D, Haller O, Bartenschlager R: Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. J Gen Virol 2001;82(Pt 4):723-733.
- 148. Guo JT, Bichko VV, Seeger C: Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. J Virol 2001;75(18):8516-8523.
- 149. Lanford RE, Guerra B, Lee H, Averett DR, Pfeiffer B, Chavez D, Notvall L, Bigger C: Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. J Virol 2003;77(2):1092-1104.
- 150. Yan W, Lee H, Yi EC, Reiss D, Shannon P, Kwieciszewski BK, Coito C, Li XJ, Keller A, Eng J, Galitski T, Goodlett DR, Aebersold R, Katze MG: Systembased proteomic analysis of the interferon response in human liver cells. Genome Biol 2004;5(8):R54.
- 151. Pai M, Prabhu R, Panebra A, Nangle S, Haque S, Bastian F, Garry R, Agrawal K, Goodbourn S, Dash S: Activation of interferon-stimulated response element in huh-7 cells replicating hepatitis C virus subgenomic RNA. Intervirology 2005;48(5):301-311.
- 152. Itsui Y, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Koyama T, Takeda Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Sekine Y, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M: Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. J Viral Hepat 2006;13(10):690-700.
- 153. Zhang T, Lin RT, Li Y, Douglas SD, Maxcey C, Ho C, Lai JP, Wang YJ, Wan Q, Ho WZ: Hepatitis C virus inhibits intracellular interferon alpha expression in human hepatic cell lines. Hepatology 2005;42(4):819-827.
- 154. Hiscott J, Lacoste J, Lin R: Recruitment of an interferon molecular signaling complex to the mitochondrial membrane: Disruption by hepatitis C virus NS3-4A protease. Biochem Pharmacol 2006;72(11):1477-1484.

- 155. Kaukinen P, Sillanpaa M, Kotenko S, Lin R, Hiscott J, Melen K, Julkunen I: Hepatitis C virus NS2 and NS3/4A proteins are potent inhibitors of host cell cytokine/chemokine gene expression. Virol J 2006;3:66.:66.
- 156. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV: Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(24):15669-15674.
- 157. Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C, Heathcote J, Edwards AM, McGilvray ID: Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. Gastroenterology 2005;128(5):1437-1444.
- 158. Bieche I, Asselah T, Laurendeau I, Vidaud D, Degot C, Paradis V, Bedossa P, Valla DC, Marcellin P, Vidaud M: Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. Virology 2005;332(1):130-144.
- 159. Asselah T, Bieche I, Laurendeau I, Paradis V, Vidaud D, Degott C, Martinot M, Bedossa P, Valla D, Vidaud M, Marcellin P: Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology 2005;129(6):2064-2075.
- 160. Mutch DM, Berger A, Mansourian R, Rytz A, Roberts MA: Microarray data analysis: a practical approach for selecting differentially expressed genes. Genome Biol 2001;2(12):Preprint0009.
- 161. Mueller S, Afdhal NH, Schuppan D: Iron, HCV, and liver cancer: hard metal setting the pace? Gastroenterology 2006;130(7):2229-2234.
- 162. Valenti L, Pulixi EA, Arosio P, Cremonesi L, Biasiotto G, Dongiovanni P, Maggioni M, Fargion S, Fracanzani AL: Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis. Haematologica 2007;92(8):1037-1042.
- 163. Erhardt A, Heintges T, Haussinger D: Neue Interferone und Therapieansätze in Erprobung; In: Haussinger D, Niederau C (eds): Hepatitis C. Berlin, Wien, Blackwell Wiss.-Verl., 2001, pp 285-305.
- 164. Ishida H, Li K, Yi M, Lemon SM: p21-activated kinase 1 is activated through the mammalian target of rapamycin/p70 S6 kinase pathway and regulates the replication of hepatitis C virus in human hepatoma cells. J Biol Chem 2007; 282(16):11836-11848.
- 165. Weber F, Thimme R: Viral anti-interferon strategies: mechanisms and clinical impact. Dtsch Med Wochenschr 2003;128(7):323-325.
- 166. Heim MH, Moradpour D, Blum HE: Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. J Virol 1999;73(10):8469-8475.

- 167. Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Haussinger D: IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. FASEB J 2003;17(3):488-490.
- 168. Seger R, Krebs EG: The MAPK signaling cascade. FASEB J 1995;9(9):726-735.
- 169. Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev 2001;22(2):153-183.
- 170. Ishida H, Ohkawa K, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Ueda K, Takehara T, Hayashi N: Involvement of p38 signaling pathway in interferon-alpha-mediated antiviral activity toward hepatitis C virus. Biochem Biophys Res Commun 2004;321(3):722-727.
- 171. Huang Y, Chen XC, Konduri M, Fomina N, Lu J, Jin L, Kolykhalov A, Tan SL: Mechanistic link between the anti-HCV effect of interferon gamma and control of viral replication by a Ras-MAPK signaling cascade. Hepatology 2006;43(1):81-90.
- 172. Zhou G, Wang J, Zhang Y, Zhong C, Ni J, Wang L, Guo J, Zhang K, Yu L, Zhao S: Cloning, expression and subcellular localization of HN1 and HN1L genes, as well as characterization of their orthologs, defining an evolutionarily conserved gene family. Gene 2004;331:115-123.
- 173. Cowper AE, Caceres JF, Mayeda A, Screaton GR: Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alternative splicing. J Biol Chem 2001;276(52):48908-48914.
- 174. Nygard O, Nilsson L: Kinetic determination of the effects of ADP-ribosylation on the interaction of eukaryotic elongation factor 2 with ribosomes. J Biol Chem 1990;265(11):6030-6034.
- 175. Hsieh TY, Matsumoto M, Chou HC, Schneider R, Hwang SB, Lee AS, Lai MM: Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. J Biol Chem 1998;273(28):17651-17659.
- 176. Baber JL, Libutti D, Levens D, Tjandra N: High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a c-myc transcription factor. J Mol Biol 1999;289(4):949-962.
- 177. Benassi B, Fanciulli M, Fiorentino F, Porrello A, Chiorino G, Loda M, Zupi G, Biroccio A: c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. Mol Cell 2006;21(4):509-519.
- 178. Haussinger D, Lang F: The mutual interaction between cell volume and cell function: a new principle of metabolic regulation. Biochem Cell Biol 1991;69(1):1-4.

- 179. Schliess F, Richter L, vom Dahl S, Haussinger D: Cell hydration and mTORdependent signalling. Acta Physiol (Oxf) 2006;187(1-2):223-229.
- 180. Schliess F, Haussinger D: Osmosensing and signaling in the regulation of liver function. Contrib Nephrol 2006;152:198-209.:198-209.
- 181. Schliess F, Reinehr R, Haussinger D: Osmosensing and signaling in the regulation of mammalian cell function. FEBS J 2007;274(22):5799-5803.
- 182. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Haussinger D: Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. Hepatology 2002;36(3):602-614.
- 183. Schliess F, Wiese S, Haussinger D: Osmotic regulation of the heat shock response in H4IIE rat hepatoma cells. FASEB J 1999;13(12):1557-1564.
- 184. Haussinger D, Lang F, Gerok W: Regulation of cell function by the cellular hydration state. Am J Physiol 1994;267(3 Pt 1):E343-E355.
- Burg MB, Kwon ED, Kultz D: Osmotic regulation of gene expression. FASEB J 1996;10(14):1598-1606.
- 186. Theodoropoulos PA, Stournaras C, Stoll B, Markogiannakis E, Lang F, Gravanis A, Haussinger D: Hepatocyte swelling leads to rapid decrease of the G-/total actin ratio and increases actin mRNA levels. FEBS Lett 1992;311(3):241-245.
- Haussinger D, Stoll B, vom Dahl S, Theodoropoulos PA, Markogiannakis E, Gravanis A, Lang F, Stournaras C: Effect of hepatocyte swelling on microtubule stability and tubulin mRNA levels. Biochem Cell Biol 1994;72(1-2):12-19.
- 188. Finkenzeller G, Newsome W, Lang F, Haussinger D: Increase of c-jun mRNA upon hypo-osmotic cell swelling of rat hepatoma cells. FEBS Lett 1994;340(3):163-166.
- 189. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S: Tyrosine kinase activation is an immediate and essential step in hypotonic cell swelling-induced ERK activation and c-fos gene expression in cardiac myocytes. EMBO J 1996;15(20):5535-5546.
- 190. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA: The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. Pflugers Arch 2004;447(5):465-468.
- 191. Seki Y, Hayashi K, Matsumoto A, Seki N, Tsukada J, Ransom J, Naka T, Kishimoto T, Yoshimura A, Kubo M: Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(20):13003-13008.

- 192. Wurster AL, Rodgers VL, White MF, Rothstein TL, Grusby MJ: Interleukin-4mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6dependent up-regulation of Bcl-xL. J Biol Chem 2002;277(30):27169-27175.
- 193. Shen CH, Stavnezer J: Interaction of stat6 and NF-kappaB: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. Mol Cell Biol 1998;18(6):3395-3404.
- 194. Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K: Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(18):10626-10631.
- 195. Wiese S, Schliess F, Haussinger D: Osmotic regulation of MAP-kinase activities and gene expression in H4IIE rat hepatoma cells. Biol Chem 1998;379(6):667-671.
- 196. Taguchi T, Nagano-Fujii M, Akutsu M, Kadoya H, Ohgimoto S, Ishido S, Hotta H: Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. J Gen Virol 2004;85(Pt 4):959-969.
- 197. Lan S, Wang H, Jiang H, Mao H, Liu X, Zhang X, Hu Y, Xiang L, Yuan Z: Direct interaction between alpha-actinin and hepatitis C virus NS5B. FEBS Lett 2003;554(3):289-294.
- 198. Weisel JW: Fibrinogen and fibrin. Adv Protein Chem 2005;70:247-299.
- 199. Mosesson MW: Fibrinogen and fibrin structure and functions. J Thromb Haemost 2005;3(8):1894-1904.
- 200. Liu Y, Cheng J, Bai GQ, Yan FM, Wu SH, Wang L, Zhang LX: Screening and cloning of hepatitis C virus non-structural protein 4B interacting protein gene in hepatocytes. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 2005;19(3):248-251.
- 201. Lu Y, Parker KH, Wang W: Effects of osmotic pressure in the extracellular matrix on tissue deformation. Philos Transact A Math Phys Eng Sci 2006;364(1843):1407-1422.
- 202. Bontemps Y, Vuillermoz B, Antonicelli F, Perreau C, Danan JL, Maquart FX, Wegrowski Y: Specific protein-1 is a universal regulator of UDP-glucose dehydrogenase expression: its positive involvement in transforming growth factor-beta signaling and inhibition in hypoxia. J Biol Chem 2003;278(24):21566-21575.
- Stolz A, Hammond L, Lou H, Takikawa H, Ronk M, Shively JE: cDNA cloning and expression of the human hepatic bile acid-binding protein. A member of the monomeric reductase gene family. J Biol Chem 1993;268(14):10448-10457.

- 204. Park S, Rath O, Beach S, Xiang X, Kelly SM, Luo Z, Kolch W, Yeung KC: Regulation of RKIP binding to the N-region of the Raf-1 kinase. FEBS Lett 2006;580(27):6405-6412.
- 205. Schuierer MM, Bataille F, Weiss TS, Hellerbrand C, Bosserhoff AK: Raf kinase inhibitor protein is downregulated in hepatocellular carcinoma. Oncol Rep 2006;16(3):451-456.
- 206. Kishima Y, Yamamoto H, Izumoto Y, Yoshida K, Enomoto H, Yamamoto M, Kuroda T, Ito H, Yoshizaki K, Nakamura H: Hepatoma-derived growth factor stimulates cell growth after translocation to the nucleus by nuclear localization signals. J Biol Chem 2002;277(12):10315-10322.
- 207. Wang H, Shen H, Wang Y, Li Z, Yin H, Zong H, Jiang J, Gu J: Overexpression of small glutamine-rich TPR-containing protein promotes apoptosis in 7721 cells. FEBS Lett 2005;579(5):1279-1284.
- 208. Warskulat U, Brookmann S, Reinen A, Haussinger D: Ultraviolet B radiation induces cell shrinkage and increases osmolyte transporter mRNA expression and osmolyte uptake in HaCaT keratinocytes. Biol Chem 2007;388(12):1345-1352.

7 Abkürzungsverzeichnis

7.1 Allgemeines

°C	Grad Celsius	deion.	deionisiert
β-ΜΕ	2-Mercaptoethanol	DEPC	Diethylpyrocarbonat
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)	dest.	destilliert
ul	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)		N'-[5-(acetyl-hydroxy-
н. н.М	Mikromolar (10^{-6} M)		aminopentyl-hydroxy-
חג חג חו		DFO	carbamoyl)propanoylamino]-
10, 20, 30	Absorption: Adopin: Amporo		pentylj-N-hydroxybutandiamid, Deferoxamin Desferal [®]
A Abb	Abbildung		Fluorescence 2D Difference
	Adenosindinhosphat	2D-DIGE	Gel Electrophoresis,
	Alanin-Aminotransferase		Fluoreszenz 2D Differenz Gelektrophorese
ALT (GPT)	(alt: Glutamat-Pyruvat-	DMF	Dimethylformamid
	Transaminase)	DMSO	Dimethylsulfoxid
AIP	Adenosintriphosphat	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AS	Aminosaure(n) Aspartat Aminotransferase	DNALC	Dolan DNA Learning Center
AST (GOT)	(alt: Glutamat-Oxalacetat-	Dnase	Desoxyribonuklease
, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	Transaminase)	dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
(bi)dest.	(zweifach) destilliert	ds	doppelsträngig
Bicin	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)glycin	DTT	1,4-Dithiothreitol
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-amino- tris-(hydroxymethyl)-methan	dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DIAST	Basic Local Alignment Search	E	Extinktion
	Tool	EBI	European Bioinformatics
рр	Basenpaare	FCI	institute
BPB	sulfonphthalein.	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	Bromphenolblau	eGOn	explore Gene Ontology
	4,7-Diphenyl-1,10-	FOTA	Ethylene-bis-
BPS	Bathophenanthrolindisulfon-	EGIA	(oxyethylennitrilo)-tetraacetat
	säure	EMBL	European Molecular Biology
BSA	Rinderserumalbumin	ER	Endoplasmatisches Retikulum
bzw.	beziehungsweise	ESI	Elektrospray-Ionisation
С	Cytosin; Kohlenstoff	et al.	<i>et aliteri</i> , und andere
cDNA	komplementäre DNA		3,8-Diamino-5-ethyl- 6-phenyl-
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-	EtBr	phenantridinium-bromid,
	propansulfonat		Ethiolumpromio Expert Protein Analysis
cm	Zentimeter (10 ⁻² m)	ExPASy	System
Су	Cyanin-Floureszenzfarbstoff	Fa.	Firma
Da	Dalton	FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , fötales
	Database for Annotation,	FD	Ferredoxin
DAVID	Visualization and Integrated		Gammadlutamyltransferase
	DISCOVELY	γ-01 (001)	Sammayiulamyillansielase

g	Gramm oder Erdbe-	ms	Millisekunde (10 ⁻³ s)
G	Schleunigung (g = 9,81 m/s) Guanin	mt	mitochondrial
СЛОПН	Glycerinaldehyd-3-phosphat-	mV	Millivolt (10 ⁻³ V)
6AI DH	Dehydrogenase	MW	Molekulargewicht
	Stunde	n	Anzahl Einzelmessungen
поv НСV	Hepatitis C Virus	Ν	ein beliebiges Nukleotid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-2-	NADH	Nicotinamid-Adenin- Dinukleotid (reduzierte Form)
HEFES	ethansulfonsäure High Performance Liquid	NADPH	Nicotinamid-Adenin- Dinukleotid-Phosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschro	nb	(reduzierte Form) nicht bestimmt
	matographie Hypoxanthin-Guanin-	NCBI	National Center for
	Phosphoribosyl-Transferase 1	na	Biotechnology and information Nanogramm $(10^{-9} \mathrm{g})$
nu	numan		
IEF		NI-N I A	Nickei-Nitriioessigsaure
IgG IDI	Infimungiobulin G	nm	Nanometer (10°m)
	international Protein Index	n.s.	nicht signifikant
IRES	internal ribosome entry site,	NS3	HCV Nicht-Strukturprotein 3, Protease/Helikase
ISC	<i>iron-sulfur cluster</i> , Eisen- Schwefel Zentrum	NS5B	RNA-abhängige RNA- Polymerase
kb	Kilobasen (10 ³ bp)	nt	Nukleotide
kDa	Kilodalton (10^3 Da)	NTR	nicht-translatierte Region
λ		OD	optische Dichte
I	Liter	ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserasterrahmen
log ₁₀	dekadischer Logarithmus	ох	oxidiert
LDS	Lithiumdodecylsulfat	Р	Wahrscheinlichkeit
m	Meter oder Masse	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
M	Molar	DBS	phosphate buffered saline,
mA	Milliampere (10°A)		Phospat-gepufferte Salzlösung
MALDI	Desorption Ionisation	PBST	PBS mit Tween20
Mb	Megabasen (10 ⁶ bp)	PCR	Polymearsekettenreaktion
MES	2-(N-Morpholino)- ethansulfonsäure	PEG	Polyethylenglykol
mg	Milligramm (10⁻³ g)	pН	Logarithmus der
min	Minute		Protonenkonzentration
mind.	mindestens	pl	isoelektrischer Punkt
ml	Milliliter (10 ⁻³ I)	Pi	Phosphat
mМ	Millimolar (10 ⁻³ M)	pmol	Pikomol (10 ⁻¹² mol)
mol	6,3 x 10 ²³ Teilchen	PVP	Polyvinylpyrrolidon
MOPS	3-Morpholinopropan-	rea	reauzien
	sulfonsäure	Ribavirin [®]	triazol-3-carboxamid
MRNA	messenger RNA	RNA	Ribonukleinsäure
MS	wassenspektrometer	Rnase	Ribonuklease

Roferon [®] -A	Interferon alpha-2a, Fa. Hoffmann-La Roche	TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris- gepufferte Salzlösung
ROS	reactive oxygen species,	TBST	TBS mit Tween20
	reaktive Sauerstoffspezies	TE	Tris-EDTA-Puffer
rpm	Umdrehungen pro Minute	TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethyl-
rRNA	ribosomale RNA		ethylendiamin
RT	Raumtemperatur	TIGR	Research
RT-PCR	<i>Real-Time</i> PCR	Τ _m	Schmelztemperatur
S	Sekunde	TOF	Time of flight
S.	siehe	Trie	Tris(hydroxymethyl)-
SD	standard deviation,	THS	aminomethan
	Standardabweichung	tRNA	transfer RNA
SDHA	Komplex, Untereinheit A	U	Uracil; <i>unit</i> (Einheit der
SDS	Natriumdodecylsulfat	ΰN	über Nacht
SELDI	Surface-Enhanced Laser	UTR	untranslatierte Region
	Desorption Ionization standard error of mean	UV	Ultraviolettes Licht
SEM	Standard error of mean, Standardabweichung des	V	Volt
	Mittelwertes	Vol	Volumen
siRNA	small interfering RNA	,	Volumeneinheit pro
S.O.	siehe oben	V/V	Volumeneinheit
sog.	sogenannt	w/v	Masseneinheit pro
SS	single stranded, einzelsträngig	\A/t	Wildtyp
SSC	Standard Saline Citrate,	X	eine beliebige Aminosäure
S 11	siehe unten	X	2.3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-
т	Thymin: Temperatur	XTT	sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-
Tab	Tabelle		carboxanilid
	Tris_Acetat_EDTA_Puffer	Z	Ladung
		z.B.	zum Beispiel
IDE	IIIS-DUIAL-EDTA-PUILEI		

7.2 Aminosäuren

Alanin	Ala	А	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	Κ
Asparagin	Asn	Ν	Methionin	Met	Μ
Aspartat	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	С	Prolin	Pro	Ρ
Glutamat	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	Т
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	Н	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	lle	I	Valin	Val	V

8 Curriculum Vitae

"Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht."

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Erhardt für die Überlassung der interessanten Thematik, die engangierte wissenschaftliche Unterstützung mit dem steten Interesse am Fortgang der Arbeit und die mir gewährte Selbstständigkeit.

Herrn Prof. Dr. Dieter Häussinger danke ich für die Möglichkeit meine Promotion an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. William Martin danke ich neben der Mitbetreuung vor allem für die Übernahme des Korreferats, wodurch die fakultätsübergreifende Betreuung erst möglich wurde.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Karlheinz Esser und Herrn Prof. Dr. Thomas Lisowsky von der multiBIND biotec GmbH, die seit vielen Jahren meinen wissenschaftlichen Werdegang mannigfaltig beeinflußt und bereichert haben.

Herrn Dr. Thorsten Gehrmann vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität danke ich für die ausgiebige Unterstützung bei der Durchführung und Analyse der Mikrochip-Array Untersuchungen.

Bei den Mitarbeitern der Nachwuchsgruppe Neuroproteomics vom Medizinischen Proteom Center der Ruhr-Universität Bochum, Dr. Barbara Sitek, Dr. Kai Stühler, Birgit Korte und Sebastian Link möchte ich mich für die umfassende Unterstützung und nachhaltige Betreuung bei der differentiellen Proteinanalytik bedanken, sowie bei Dr. Michael Hamacher für die Vermittlung beim Zustandekommen der Kooperation.

Allen Kolleginnen aus dem Forschungslabor, insbesondere Dr. Jessica Lüsebrink und Dr. Lisa Richter, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die vielen Hilfestellungen in fachlichen Fragen und darüber hinaus danke ich Dr. Peter Schröder und Thomas Dehmel. Danke auch meinen Kommilitonen und Freunden, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich herzlichen Dank meinen Eltern, die mir in vielerlei Hinsicht meine akademische Ausbildung ermöglicht haben.

10 Anhang

Tab. Al: Durch Eisenüberladung regulierte Gene Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit 100 μ M Fe²⁺ inkubiert. Unbehandelte Huh9-13 Zellen dienten als Referenz. Von 50 μ g Gesamt-RNA wurde fluoreszenz-markierte cDNA erzeugt. Mit dieser wurden Oligonukleotid-Arrays hybridisiert. Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisierter Quotient der Fluorenszenzwerte der Effektorbedingungen zu den Fluoreszenzwerten der Kontrollbedingungen dargestellt. Der angegebene Wert ist der Median von n=5 Einzelversuchen. Die Gruppierung der Genexpressionsänderungen erfolgte wie beschrieben (s. 3.2.11.2).

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 µmol/l] vs. Kontrolle
1	growth differentiation factor 15; macrophage inhibitory cytokine-1	GDF15	NM_004864	0,61
2	growth arrest and DNA-damage- inducible, beta	GADD45B	NM_015675	0,44
3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	DHRS2	NM_005794, NM_182908	0,36
4	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	SERPINA3	NM_001085	0,36
5	titin	TTN	NM_133379	0,35
6	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III) transcript variant 2	AKR1C2	NM_001354, NM_205845	0,35
7	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	MYC	NM_002467	0,34
8	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2; differentially expressed in chondrocytes 1	BHLHB2	NM_003670	0,34
9	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B7	UGT2B7 (UGT2B28, UGT2B11, UGT2B4,)	NM_001074,	0,32
10	serum amyloid P component	APCS	NM_001639	0,31
11	ferritin, light polypeptide	FTL	NM_000146	0,30
12	plasminogen	PLG	NM_000301	0,28
13	Thioredoxin reductase 1	TXNRD1	NM_003330, NM_182729, NM_182742, NM_182743	0,28
14	Complement factor H	CFH	NM_000186	0,27
15	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 50	DDX50	NM_024045	0,27
16	heme oxygenase 1	Hmox1	NM_002133	0,26
17	Asparagine synthetase transcript variant 2	ASNS	NM_001673, NM_133436, NM_183356	0,25
18	Glutathione S-transferase A1	GSTA1	NM_145740	0,24
19	Serine protease inhibitor, Kazal type 1	SPINK1	NM_003122	0,24
20	Heat shock 70kD protein 1A	HSPA1A	NM_005345	0,23

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 µmol/l] vs. Kontrolle
21	Peroxiredoxin 5	PRDX5	NM_012094, NM_181651, NM_181652	0,23
22	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3	DNAJA3	NM_005147	0,22
23	dual specificity phosphatase 1; MAP kinase phosphatase 1	DUSP1	NM_004417	0,22
24	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	GNPDA1	NM_005471	0,22
25	c-Myc promoter-binding protein	MYCPBP	NM_005848	0,22
26	chloride intracellular channel 1	CLIC1	NM_001288	0,21
27	actinin, alpha 1	ACTN1	NM_001102	0,21
28	RAP1B, member of RAS oncogene family	RAP1B	NM_015646	0,21
29	Enolase 1, (alpha)	ENO1	NM_001428	0,21
30	Succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)	SDHB	NM_003000	0,20
31	Protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform	PPM1A	NM_021003, NM_177952	0,20
32	beta-2-microglobulin	B2M	NM_004048	0,20
33	Transaldolase 1	TALDO1	NM_006755	0,20
34	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2; canalicular multispecific organic anion transporter	Abcc2	NM_000392	0,20
35	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	DNAJB9	NM_012328	0,20
36	Apolipoprotein C-I	APOC1	NM_001645	0,19
37	interleukin 8	IL8	NM_000584	0,19
38	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)- associated factor, 32kDa transcript variant 1	TAF9	NM_016283, NM_001015891	0,18
39	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) transcript variant 1	HSPD1	NM_002156, NM_199440	0,18
40	growth arrest and DNA-damage- inducible, alpha	GADD45A	NM_001924	0,18
41	actin, gamma 1	ACTG1	NM_001614	0,18
42	Phosphogluconate dehydrogenase	PGD	NM_002631	0,18
43	N-myristoyltransferase 1	NMT1	NM_021079	-0,18
44	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	PTPRA	NM_002836, NM_080840, NM_080841	-0,18
45	selenoprotein M	SelM	NM_080430	-0,18
46	Histone acetyltransferase 1	HAT1	NM_003642	-0,18
47	ubiquitin-conjugating enzyme E2I transcript variant 1	UBE2I	NM_003345, NM_194259, NM_194260, NM_194261	-0,18
48	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	ALDH1A1	NM_000689	-0,18

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 µmol/l] vs. Kontrolle
49	mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	NM_001315, NM_139012, NM_139013, NM_139014	-0,18
50	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	ATP2A2	NM_001681, NM_170665	-0,18
51	protein S (alpha)	PROS1	NM_000313	-0,19
52	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1	ALDH18A1	NM_001017423 NM_002860	-0,19
53	transmembrane 4 superfamily member 4	TM4SF4	NM_004617	-0,19
54	glycogen phosphorylase liver type	Pygl	NM_002863	-0,19
55	emopamil binding protein (sterol isomerase)	EBP	NM_006579	-0,19
56	Paraoxonase 2	PON2	NM_000305	-0,19
57	3'-phosphoadenosine 5'- phosphosulfate synthase 1	PAPSS1	NM_005443	-0,19
58	Mitogen-activated protein kinase 9	МАРК9	NM_002752, NM_139068, NM_139069, NM_139070	-0,19
59	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	SMPDL3A	NM_006714	-0,20
60	apolipoprotein A-I	APOA1	NM_000039	-0,20
61	Cyclin C	CCNC	NM_005190	-0,20
62	Na,K-ATPase alpha-1 subunit	Atp1a1	NM_000701	-0,20
63	Calnexin	CANX	NM_001746	-0,20
64	I hymidylate synthetase	IYMS	NM_001071	-0,20
65	ribonucleoprotein U-like 1	HNRPUL1	NM_007040, NM_144732, NM_144734	-0,20
66	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	MDH1	NM_005917	-0,20
67	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop- helix protein	ID1	NM_181353, NM_002165	-0,20
68	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	ASAH1	NM_004315, NM_177924	-0,21
69	Chromodomain helicase DNA binding protein 4	CHD4	NM_001273	-0,21
70	TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)- associated factor, 28 kD	TAF11	NM_005643	-0,21
71	15kDa selenoprotein, variant 1, 2	Sel15	NM_203341 NM_004261	-0,21
72	protein inhibitor of activated STAT, 2	PIAS2	NM_004671, NM_173206	-0,22
73	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	DNAJC7	NM_003315	-0,22
74	interleukin 7 receptor	IL7R	NM_002185	-0,22
75	proliferating cell nuclear antigen; DNA polymerase delta auxiliary protein	PCNA	NM_002592, NM_182649	-0,22

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 µmol/l] vs. Kontrolle
76	Guanidinoacetate N- methyltransferase	GAMT	NM_000156	-0,22
77	Janus kinase 1	Jak1	NM 002227	-0,22
78	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	HADHSC	NM_005327	-0,22
79	solute carrier family 37 (glycerol- 6-phosphate transporter), member 4	SLC37A4	NM_001467	-0,23
80	Metallothionein 1E	MT1E	NM_175617	-0,23
81	Mevalonate (diphospho) decarboxylase	MVD	NM_002461	-0,23
82	Cyclin B2	CCNB2	NM_004701	-0,23
83	Minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 7	MCM7	NM_005916, NM_182776	-0,23
84	forkhead box A1; hepatocyte nuclear factor 3 alpha	FOXA1	NM_004496	-0,23
85	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit	DPM1	NM_003859	-0,23
86	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (yeast)	SUMO3	NM_006936	-0,24
87	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	SLCO2A1	NM_005630	-0,24
88	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 transcript variant 1; 11S regulator complex alpha subunit; 29-kD MCP activator subunit; activator of multicatalytic protease subunit 1; interferon gamma up-regulated I-5111 protein; interferon-gamma IEF SSP 5111; interferon- gamma-inducible protein 5111	PSME1	NM_006263, NM_176783	-0,24
89	CD9 antigen (p24)	Cd9	NM_001769	-0,24
90	Sterol-C4-methyl oxidase-like	SC4MOL	NM_006745	-0,25
91 92	Endothelial cell growth factor 1	ECGF1	NM_004924 NM_001953	-0,25
03	(platelet-delived)	FECH	NM 000140	_0.25
94	Cyclin A2	CCNA2	NM 001237	-0,25
95	Connective tissue growth factor	CTGF	NM_001901	-0.26
96	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20	NM_001255	-0,26
97	cathepsin H	Ctsh	NM_004390, NM_148979	-0,26
98	Cold shock domain protein A	CSDA	NM_003651	-0,26
99	RAB5B, member RAS oncogene family	RAB5B	NM_002868	-0,27
100	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	JUN	NM_002228	-0,27
101	filamin Ă, alpha	FLNA	NM_001456	-0,27
102	Inhibitor of DNA binding 2	ID2	NM_002166	-0,27
103	signal transducer and activator of transcription 1 transcript variant alpha	Stat1	NM_007315	-0,28
Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 µmol/l] vs. Kontrolle
-------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------	---------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------
104	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9 transcript variant 1	DHX9	NM_001357	-0,28
105	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	ltgb1	NM_002211, NM_033666, NM_033667, NM_033668, NM_033669, NM_133376	-0,28
106	signal transducer and activator of transcription 1	Stat1	NM_007315, NM_139266	-0,28
107	Protein kinase C substrate 80K-H	PRKCSH	NM_002743	-0,28
108	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	CALM3	NM_005184	-0,28
109	Glutathione peroxidase 3 (plasma)	GPX3	NM_002084	-0,28
110	Protein-kinase, interferon- inducible double stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repr	PRKRIR	NM_004705	-0,28
111	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2	NM_001979	-0,28
112	solute carrier family 38, member 3; amino acid transporter system N1; SN1	Slc38a3	NM_006841	-0,29
113	Cyclin B1	CCNB1	NM_031966	-0,29
114	high-mobility group nucleosomal binding domain 2	HMGN2	NM_005517	-0,30
115	thymidine kinase 1, soluble	Tk1	NM_003258	-0,30
116	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	ITGAV	NM_002210	-0,30
117	metallothionein 1H	MT1H	NM_005951 und andere	-0,30
118	Sterol O-acyltransferase 2	SOAT2	NM_003578	-0,30
119	heat shock 70kDa protein 8 transcript variant 1	HSPA8	NM_006597, NM_153201	-0,30
120	dual specificity phosphatase 9	DUSP9	NM_001395	-0,30
121	signal recognition particle 9kDa	SRP9	NM_003133	-0,31
122	Ubiquitin B	UBB	NM_018955	-0,32
123	Replication protein A1 (70kD)	RPA1	NM_002945	-0,32
124	release factor		NM_012232	-0,32
125	Carnitine palmitoyitransferase II		NM_000098	-0,33
120	Keratin 8		NW_002273	-0,33
121	paternally expressed 10		NM 000612	-0,33
128	(somatomedin A)			-0,34
129	member 13	11145113	NIVI_014399	-0,34
130	Polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	POLE3	NM_017443	-0,34
131	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	NM_002356	-0,35
132	Exportin 1 (CRM1, yeast, homolog)	XPO1	NM_003400	-0,35

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 µmol/l] vs. Kontrolle
133	dystroglycan 1 (dystrophin- associated glycoprotein 1)	DAG1	NM_004393	-0,36
134	phosphorylase, glycogen	PYGB	NM_002862	-0,36
135	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	GNAI2	NM_002070	-0,37
136	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	PPP1CC	NM_002710	-0,38
137	FK506 binding protein 1A (12 kD) transcript variant 12A	FKBP1A	NM_000801, NM_054014	-0,38
138	chromosome condensation- related SMC-associated protein 1	CNAP1	NM_014865	-0,38
139	solute carrier family 40 (iron- regulated transporter), member 1	SLC40A1	NM_014585	-0,38
140	scavenger receptor class B, member 1	SCARB1	NM_005505	-0,41
141	inhibitor of DNA binding 2B, dominant negative helix-loop- helix protein	ID2B	M96843	-0,43
142	Malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	MDH2	NM_005918	-0,45
143	diaphorase (NADH) (cytochrome b-5 reductase) transcript variant M	Dia1	NM_000398, NM_007326	-0,45
144	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	SDHA	NM_004168	-0,45
145	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	IDH1	NM_005896	-0,47
146	Retinoid X receptor beta	RXRB	NM_021976	-0,48
147	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	PRKDC	NM_006904	-0,49
148	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5; canalicular multispecific organic anion transporter C	Abcc5	NM_005688	-0,50
149	solute carrier family 4, anion exchanger, member 2	SLC4A2	NM_003040	-0,52
150	Splicing factor 1 transcript variant 1	SF1	NM_004630, NM_201995	-0,53
151	monoamine oxidase B	Maob	NM_000898	-0,56
152	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2	GNB2	NM_005273	-0,58
153	TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1	TIAF1	NM_004740	-0,65
154	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	HSP90B1	NM_003299	-0,66
155	carboxylesterase 2 (intestine, liver) transcript variant 1	CES2	NM_003869, NM_198061	-0,79
156	serum/glucocorticoid regulated kinase	Sgk	NM_005627	-0,87
157	pre-B-cell colony enhancing factor 1 (PBEF1), transcript variant 2	PBEF	NM_005746, NM_182790	-1,23

Tab. All: Durch Eisenüberladung in Gegenwart von IFNα regulierte Gene

Huh9-13 Zellen wurden für 24 h mit 1000 U/ml IFN α bzw. mit 1000 U/ml IFN α und 100 μ M Fe²⁺ inkubiert. Von 50 μ g Gesamt-RNA wurde fluoreszenz-markierte cDNA erzeugt. Mit dieser wurden Oligonukleotid-Arrays hybridisiert. Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisierter Quotient der Fluorenszenzwerte der Effektorbedingungen zu den Fluoreszenzwerten der Kontrollbedingungen dargestellt. Der angegebene Wert ist der Median von n=3 Einzelversuchen. Die Gruppierung der Genexpressionsänderungen erfolgte wie beschrieben (s. 3.2.11.2).

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml] vs. IFNα [1000 U/ml]
1	growth differentiation factor 15; macrophage inhibitory cytokine-1	GDF15	NM_004864	0,60
2	GADD153; growth arrest and DNA-damage-inducible protein; DNA-damage-inducible transcript 3	Ddit3	NM_004083	0,34
3	Ras homolog gene family, member E	ARHE	NM_005168	0,34
4	tryptophan 2,3-dioxygenase	TDO2	NM_005651	0,32
5	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III) transcript variant 2	AKR1C2	NM_001354, NM_205845	0,31
6	heme oxygenase 1	Hmox1	NM_002133	0,30
7	ferritin, light polypeptide	FTL	NM_000146	0,29
8	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	SERPINA3	NM_001085	0,29
9	Thioredoxin reductase 1	TXNRD1	NM_003330, NM_182729, NM_182742, NM_182743	0,28
10	titin	TTN	NM_003319, NM_133379, NM_133432, NM_133437	0,26
11	cathepsin L	Ctsl	NM_001912, NM_145918	0,25
12	chloride intracellular channel 1	CLIC1	NM_001288	0,25
13	Transketolase (Wernicke- Korsakoff syndrome)	ТКТ	NM_001064	0,25
14	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	GNPDA1	NM_005471	0,24
15	methionine sulfoxide reductaseB	SelX1	NM_016332	0,24
16	Cytochrome c oxidase subunit Vb	COX5B	NM_001862	0,23
17	ribosomal protein s17	RPS17	NM_001021	0,22
18	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)- associated factor, 32kDa transcript variant 1	TAF9	NM_003187, NM_001015892	0,22
19	Glutathione S-transferase A1	GSTA1	NM_145740	0,21
20	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12	GNG12	NM_018841	0,21
21	Cytochrome c oxidase subunit VIIb	COX7B	NM_001866	0,21

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml] VS.
		Concymber	/1000001011	IFNα [1000 U/ml]
22	Ribosomal Protein S3a	RPS3A	NM_182777	0,21
23	Ribosomal protein L6	RPL6	NM_000970, NM_001024662	0,20
24	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	MYC	NM_002467	0,20
25	Thioredoxin	TXN	NM_003329	0,20
26	signal recognition particle 14kDa (homologous Alu RNA binding protein)	SRP14	NM_003134	0,20
27	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	Ptp4a1	NM_003463	0,20
28	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B4	UGT2B4	NM_021139	0,19
29	Apolipoprotein C-I	APOC1	NM_001645	0,19
30	carboxylesterase 1	CES1	NM_001266	0,19
31	dual specificity phosphatase 1; MAP kinase phosphatase 1	DUSP1	NM_004417	0,19
32	ATG3 autophagy related 3 homolog	ATG3	NM_022488	0,18
33	fatty acid binding protein 1	Fabp1	NM_001443	0,18
34	aminolevulinate, delta-, synthase	Alas1	NM_000688,	0.18
0.	1 transcript variant 2		NM_199166	0,10
35	Ferritin heavy chain	FIH1	NM_002032	0,18
36			NM_005190	-0,18
37	homolog 6	SMAD6	NIM_005585	-0,18
38	Tropomyosin 1 (alpha)	TPM1	NM_001018020, NM_001018006, NM_000366	-0,18
39	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N- acetylglucosamine:polypeptide-N- acetylglucosaminyl transferase)	OGT	NM_003605, NM_181672, NM_181673	-0,18
40	metallothionein 2A	MT2A	NM_005953	-0,19
41	dystroglycan 1 (dystrophin- associated glycoprotein 1)	DAG1	NM_004393	-0,19
42	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2	NM_001979	-0,19
43	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20	NM_001255	-0,19
44	selenoprotein S, variant 1, 2	SelS	NM_203472 NM_018445	-0,19
45	Peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	PPIB	NM_000942	-0,19
46	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	CASP6	NM_001226, NM_032992	-0,19
47	metallothionein 1H	MT1H	NM_005951	-0,20
48	15kDa selenoprotein, variant 1	Sel15	NM_004261	-0,20
49	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	PTPRA	NM_002836, NM_080840, NM_080841	-0,20
50	emopamil binding protein (sterol isomerase)	EBP	NM_006579	-0,21
51	signal recognition particle 9kDa	SRP9	NM_003133	-0,21
52	pre-B-cell colony enhancing factor 1 (PBEF1), transcript variant 2	PBEF	NM_005746, NM_182790	-0,22

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml] vs. IFNα [1000 U/ml]
53	complement component 3	C3	NM_000064	-0,22
54	actinin, alpha 4	ACTN4	NM_004924	-0,22
55	mitogen-activated protein kinase 3	MAPK3	NM_002746	-0,22
56	3-hydroxy-3-methylglutaryl- Coenzyme A synthase 1 (soluble)	HMGCS1	NM_002130	-0,22
57	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1	ALDH18A1	NM_001017423 NM_002860	-0,23
58	Janus kinase 1	Jak1	NM_002227	-0,23
59	signal transducer and activator of transcription 3	Stat3	NM_003150, NM_139276, NM_213662	-0,23
60	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID1	NM_181353, NM_002165	-0,23
61	UDP-glucose dehydrogenase	UGDH	NM_003359	-0,23
62	Death-associated protein	DAP	NM_004394	-0,23
63	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	ATP2B1	NM_001001323, NM_001682	-0,23
64	TAF7 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)- associated factor, 55 kD	TAF7	NM_005642	-0,23
65	Na,K-ATPase alpha-1 subunit	Atp1a1	NM_000701	-0,24
66	chemokine (C-X-C motif) ligand	CXCL10	NM_001565	-0,25
67	inhibitor of DNA binding 2B, dominant negative helix-loop-helix protein	ID2B	M96843	-0,25
68	paternally expressed 10	PEG10	XM_496907	-0,26
69	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2	GNB2	NM_005273	-0,26
70	Metallothionein 1E	MT1E	NM_175617	-0,27
71	dual specificity phosphatase 9	DUSP9	NM_001395	-0,27
72	3'-phosphoadenosine 5'- phosphosulfate synthase 1	PAPSS1	NM_005443	-0,29
73	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	PPP1CC	NM_002710	-0,29
74	transmembrane 4 superfamily member 13	TM4SF13	NM_014399	-0,29
75	TRAF family member-associated NFKB activator	TANK	NM_004180, NM_133484	-0,30
76	signal transducer and activator of transcription 1	Stat1	NM_007315, NM_139266	-0,31
77	ubiquitin D	UBD	NM_006398	-0,31
78	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	ITGAV	NM_002210	-0,31
79	histone deacetylase 3	HDAC3	NM_003883	-0,32
80	APG12 autophagy 12-like (S. cerevisiae)	APG12L	NM_004707	-0,35
81	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	IDH1	NM_005896	-0,38
82	Minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 7	MCM7	NM_005916, NM_182776	-0,39

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	Fe ²⁺ [100 μmol/l], IFNα [1000 U/ml] vs. IFNα [1000 U/ml]
83	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	NM_001402	-0,40
84	keratin 8	KRT8	NM_002273	-0,43
85	methionine-tRNA synthetase	MARS	NM_004990	-0,50
86	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	HSP90B1	NM_003299	-0,50
87	heat shock 70kDa protein 8 transcript variant 1	HSPA8	NM_006597, NM_153201	-0,51
88	serum/glucocorticoid regulated kinase	Sgk	NM_005627	-0,53

Tab. Alll: Durch Hypoosmolarität regulierte GeneHuh9-13ZellenWurdenfür48 hinhypoosmotischem(220 mosmol/l)bzw.normoosmotischem (320 mosmol/l) Medium inkubiert. Von 50 µg Gesamt-RNA wurde fluoreszenz-markierte cDNA erzeugt. Mit dieser wurden Oligonukleotid-Arrays hybridisiert. Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisierter Quotient der Fluorenszenzwerte der hypoosmotischen Bedingungen zu den Fluoreszenzwerten der normoosmotischen Bedingungen dargestellt. Der angegebene Wert ist der Median von n=6 Einzelversuchen. Die Gruppierung der Genexpressionsänderungen erfolgte wie beschrieben (s. 3.2.11.2).

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	220 mosmol/l vs. 220 mosmol/l
1	Williams Beuren syndrome chromosome region 14, ChREBP	WBSCR14	NM_032951, NM_032952, NM_032953, NM_032954, NM_032904	0,71
2	metallothionein 2A	MT2A	NM_005953	0,62
3	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	Slc22a7	NM_006672, NM_153320	0,61
4	metallothionein 1H	MT1H	NM_005951	0,59
5	Aldo-keto reductase family 1	AKR1D1	NM_005989	0,58
6	Glutathione S-transferase A1	GSTA1	NM_145740	0,56
7	Metallothionein 1E	MT1E	NM_175617	0,55
8	glutathione S-transferase A2	GSTA2	NM_000846	0,54
9	fibrinogen, gamma polypeptide transcript variant gamma-A	FGG	NM_000509, NM_021870	0,46
10	Ornithine decarboxylase 1	ODC1	NM_002539	0,44
11	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	Slc30a1	NM_021194	0,40
12	fibrinogen, A alpha polypeptide	FGA	NM_000508, NM_021871	0,38
13	cysteine sulfinic acid decarboxylase	CSAD	NM_015989	0,38
14	solute carrier family 38, member 3; amino acid transporter system N1; SN1	Slc38a3	NM_006841	0,37
15	complement component 4B, centromeric	C4B	NM_001002029	0,33
16	glycine dehydrogenase (decarboxylating; glycine decarboxylase, glycine cleavage system protein P)	GLDC	NM_000170	0,33

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	220 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
17	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	SERPINC1	NM_000488	0,32
18	ubiquitin D	UBD	NM_006398	0,31
19	haptoglobin	HP	NM_005143	0,31
20	ATP-binding cassette, sub-family	ABCA5	NM_018672	0 31
	A (ABC1), member 5		NM_172232	0,01
21	fibrinogen, B beta polypeptide	FGB	NM_005141	0,30
22	gap junction protein, beta 1, 32kDa (connexin 32, Charcot- Marie-Tooth neuropathy, X- linked)	Gjb1	NM_000166	0,30
23	Interleukin 18 (interferon-gamma- inducing factor)	IL18	NM_001562	0,29
24	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	Cps1	NM_001875	0,29
25	fibrinogen, A alpha polypeptide	FGA	NM_000508	0,28
26	stearoyl-CoA desaturase (delta- 9-desaturase)	SCD	NM_005063	0,28
27	haptoglobin-related protein	HPR	NM_020995 (NM_005143)	0,27
28	growth arrest and DNA-damage- inducible, beta	GADD45B	NM_015675	0,27
29	paternally expressed 10	PEG10	XM_496907	0,26
30	apolipoprotein A-I	APOA1	NM_000039	0,26
31	high-mobility group nucleosomal binding domain 2	HMGN2	NM_005517	0,26
32	solute carrier family 35 (UDP- glucuronic acid/UDP-N- acetylgalactosamine dual transporter), member D1	SLC35D1	NM_015139	0,25
33	Cytochrome b-5	CYB5	NM_001914, NM_148923	0,25
34	Asparagine synthetase transcript variant 2	ASNS	NM_001673, NM_133436, NM_183356	0,24
35	Acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain	ACOX2	NM_003500	0,24
36	Alcohol dehydrogenase 6 (class V)	ADH6	NM_000672	0,23
37	leptin receptor (fatty)	Lepr	NM_001003679	0,23
38	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	SLC1A5	NM_005628	0,23
39	organic solute transporter beta	OSTbeta	NM_178859	0,23
40	solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 3; oct3	Slc22a3	NM_021977	0,22
41	chemokine (C-X-C motif) ligand	CXCL10	NM_001565	0,22
42	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	SERPINA3	NM_001085	0,22
43	family, member A1	ALDH6A1	INIM_005589	0,22

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	220 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
44	calpain 2, (m/II) large subunit	CAPN2	NM 001748	0,22
45	High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 2	HMGB2	NM_002129	0,21
46	Polymerase I and transcript release factor	PTRF	NM_012232	0,20
47	Ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)	OAT	NM_000274	0,19
48	Peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase	PECI	NM_006117, NM_206836	0,19
49	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1	CYP27A1	NM_000784	0,19
50	Midkine (neurite growth- promoting factor 2)	MDK	NM_002391	0,19
51	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	ATF4	NM_182810 NM_001675	0,19
52	protein tyrosine phosphatase and tensin homolog/mutated in multiple advanced cancers protein (PTEN/MMAC1)	Pten	NM_000314	0,19
53	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	EPHX1	NM_000120	0,19
54	vimentin	VIM	NM_003380	0,18
55	Glutamate dehydrogenase 1	GLUD1	NM_005271	0,18
56	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2	NM_001979	0,18
57	Complement component C5	C5	NM_001735	0,18
58	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	NNT	NM_012343, NM_182977	0,18
59	B-cell translocation gene 1, anti- proliferative	BTG1	NM_001731	0,18
60	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	CDC42	NM_001791	0,18
61	Rhesus blood group, B glycoprotein	RHBG	NM_020407	0,18
62	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	GFPT1	NM_002056	-0,18
63	Spectrin, beta, non-erythrocytic 1	SPTBN1	NM_003128	-0,18
64	Histone acetyltransferase 1	HAT1	NM_003642	-0,18
65	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B7	UGT2B7 (UGT2B28, UGT2B11, UGT2B4,)	NM_001074,	-0,18
66	Protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium- dependent, gamma isoform	PPM1G	NM_002707, NM_177983	-0,18
67	dipeptidyl peptidase IV (DPPIV ; DPP4); bile canaliculus domain- specific membrane glycoprotein; gp110 glycoprotein	Dpp4	NM_001935	-0,18
68	Protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	PPP4C	NM_002720	-0,18
69	solute carrier family 5 (sodium- dependent vitamin transporter), member 6	Slc5a6	NM_021095	-0,18
70	Transketolase (Wernicke- Korsakoff syndrome)	ТКТ	NM_001064	-0,18

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	220 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
71	Cryptochrome 1 (photolyase-like)	CRY1	NM 004075	-0,18
72	serum/glucocorticoid regulated kinase	Sgk	NM_005627	-0,18
73	Minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 3	MCM3	NM_002388	-0,18
74	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1	IMPDH1	NM_000883, NM_183243	-0,19
75	BCL2-like 1	BCL2L1	NM_001191, NM_138578	-0,19
76	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5; canalicular multispecific organic anion transporter C	Abcc5	NM_005688	-0,19
77	Na,K-ATPase alpha-1 subunit	Atp1a1	NM 000701	-0,19
78	TRAF family member-associated NFKB activator	TÄNK	NM_004180, NM_133484	-0,19
79	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in	NME2	NM_002512	-0,19
80	Dihydrolipoamide S- acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	DLAT	NM_001931	-0,19
81	H2A histone family, member Z	H2AFZ	NM_002106	-0,20
82	Serine- Hydroxymethyltransferase2 (mitochondrial)	SHMT2	NM_005412	-0,20
83	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1	MAN1A1	NM_005907	-0,20
84	Farnesyl diphosphate synthase (farnesyl pyrophosphate synthetase, dimethylallyltranstransferase, ger	FDPS	NM_002004	-0,20
85	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B4	UGT2B4	NM_021139	-0,20
86	Homogentisate 1,2-dioxygenase (homogentisate oxidase)	HGD	NM_000187	-0,20
87	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	ITGA5	NM_002205	-0,21
88	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	IRAK1	NM_001569, NM_001025242, NM_001025243	-0,21
89	Minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 7	MCM7	NM_005916, NM_182776	-0,21
90	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	Abcb6	NM_005689	-0,21
91	Glutathione peroxidase 3 (plasma)	GPX3	NM_002084	-0,22
92	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8	DHRS8	NM_016245	-0,23
93	3-hydroxy-3-methylglutaryl- Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial); HMG-CoA synthase	Hmgcs2	NM_005518	-0,23
94	mitogen-activated protein kinase	MAPK3	NM_002746	-0,23

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	220 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
95	CAP, adenylate cyclase- associated protein 1	CAP1	NM_006367	-0,23
96	Paraoxonase 1	PON1	NM 000446	-0,23
97	heat shock 27kDa protein 1	Hspb1	NM 001540	-0,23
98	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	LTBR	NM_002342	-0,24
99	fibrinogen-like 1; variant 1, 2, 3, 4	FGL1	NM_201553 NM_201552 NM_147203 NM_004467	-0,24
100	dual specificity phosphatase 6	DUSP6	NM_001946, NM_022652	-0,24
101	CD9 antigen (p24)	Cd9	NM_001769	-0,25
102	transferrin receptor 2	TFR2	NM_003227	-0,25
103	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	HPGD	NM_000860	-0,25
104	forkhead box M1	FOXM1	NM_021953, NM_202002, NM_202003	-0,25
105	neuronal PAS domain protein 2	NPAS2	NM_002518	-0,26
106	Aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase	AKR1C4	NM_001818	-0,26
107	transmembrane 4 superfamily member 4	TM4SF4	NM_004617	-0,28
108	Quinolinate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating))	QPRT	NM_014298	-0,28
109	Pyruvate kinase, muscle transcript variant 2	PKM2	NM_002654, NM_182470, NM_182471	-0,29
110	Alpha-2-macroglobulin	A2M	NM_000014	-0,29
111	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2; nkcc1	Slc12a2	NM_001046	-0,32
112	Glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)	GOT1	NM_002079	-0,32
113	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop- helix protein	ID1	NM_181353, NM_002165	-0,33
114	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	UCHL1	NM_004181	-0,33
115	Arylacetamide deacetylase (esterase)	AADAC	NM_001086	-0,35
116	solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1	Sīc3a1	NM_000341	-0,36
117	connexin 43; Gap junction protein, alpha 1, 43 kD; Gja1	Gja1	NM_000165	-0,37

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	220 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
118	solute carrier family 38, member 2; system A (ATA2)	Slc38a2	NM_018976	-0,37
119	group-specific component (vitamin D binding protein)	GC	NM_000583	-0,41
120	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	MYC	NM_002467	-0,44
121	transmembrane 4 superfamily member 3	TM4SF3	NM_004616	-0,44
122	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	AKR1C2	NM_001354, NM_205845, NM_001353	-0,50
123	arginase	Arg1	NM_000045	-0,51
124	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III) transcript variant 2	AKR1C2	NM_001354, NM_205845	-0,53
125	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (Nr0b2), small heterodimer partner homolog; Shp	Nr0b2	NM_021969	-0,54
126	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)	S100A4	NM_002961, NM_019554	-0,67
127	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	GPX2	NM_002083	-0,83
128	dual specificity phosphatase 5; MAP-kinase phosphatase cpg21	DUSP5	NM_004419	-0,88

Tab. AIV: Durch Hyperosmolarität regulierte Gene

Huh9-13 Zellen wurden für 48 h in hyperosmotischem (420 mosmol/l) bzw. normoosmotischem (320 mosmol/l) Medium inkubiert. Von 50 µg Gesamt-RNA wurde fluoreszenz-markierte cDNA erzeugt. Mit dieser wurden Oligonukleotid-Arrays hybridisiert. Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisierter Quotient der Fluorenszenzwerte der hyperosmotischen Bedingungen zu den Fluoreszenzwerten der normoosmotischen Bedingungen dargestellt. Der angegebene Wert ist der Median von n=6 Einzelversuchen. Die Gruppierung der Genexpressionsänderungen erfolgte wie beschrieben (s. 3.2.11.2).

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
1	Aldo keto Reductase, family 1 member B1(Aldose Reductase)	AKR1B1	NM_001628	1,63
2	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12	SLC6A12	NM_003044	1,54
3	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	GPX2	NM_002083	1,41
4	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)	S100A4	NM_002961, NM_019554	1,18

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
5	endothelin receptor type B	EDNRB	NM_000115, NM_003991	1,08
6	RAB17, member RAS oncogene family	RAB17	NM_022449	1,08
7	serum amyloid P component	APCS	NM_001639	1,02
8	Retinoic acid receptor, beta	Rarb	NM_000965, NM_016152	0,76
9	Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 7	CYP3A7	NM_000765	0,71
10	Cytochrome P450, subfamily IIIA (niphedipine oxidase), polypeptide 4	CYP3A4	NM_017460	0,69
11	calpain 2, (m/II) large subunit	CAPN2	NM_001748	0,65
12	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3; SMIT	Slc5a3	NM_006933	0,62
13	Alpha-2-macroglobulin	A2M	NM_000014	0,61
14	arginase, type II	ARG2	NM_001172	0,59
15	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1	ALDH18A1	NM_001017423 NM_002860	0,59
16	lipopolysaccharide-induced TNF factor	LITAF	NM_004862	0,58
17	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (Nr0b2), small heterodimer partner homolog Shp	Nr0b2	NM_021969	0,58
18	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2; nkcc1	Slc12a2	NM_001046	0,57
19	aquaporin 3	Aqp3	NM_004925	0,57
20	transforming growth factor, beta 1	TGFB1	NM_000660	0,57
21	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NR4A1	NM_002135, NM_173157	0,56
22	Aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase	AKR1C4	NM_001818	0,56
23	neuronal PAS domain protein 2	NPAS2	NM_002518	0,55
24	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III) transcript variant 2	AKR1C2	NM_001354, NM_205845	0,55
25	retinoblastoma 1	RB1	NM_000321	0,53
26	growth differentiation factor 15; macrophage inhibitory cytokine-1	GDF15	NM_004864	0,52
27	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	ITGA3	NM_002204, NM_005501	0,52
28	N-myc downstream regulated gene 2	NDRG2	NM_016250, NM_201535, NM_201536, NM_201537, NM_201538, NM_201539, NM_201540, NM_201541	0,52

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
29	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	MALAT1	AF001540	0,52
30	glutaminase	GLS	NM_014905	0,51
31	growth arrest and DNA-damage- inducible, beta	GADD45B	NM_015675	0,51
32	group-specific component (vitamin D binding protein)	GC	NM_000583	0,50
33	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	AKR1C2	NM_001354, NM_205845, NM_001353	0,49
34	Cystathionine-gamma Lyase	СТН	NM_001902, NM_153742	0,48
35	B-factor, properdin	BF	NM_001710	0,48
36	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	HPGD	NM_000860	0,45
37	cysteine sulfinic acid decarboxylase	CSAD	NM_015989	0,45
38	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N- acetylglucosamine:polypeptide-N- acetylglucosaminyl transferase)	OGT	NM_003605, NM_181672, NM_181673	0,45
39	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4; farnesoid X activated receptor (FXR)	Nr1h4	NM_005123	0,43
40	solute carrier family 38, member 2; system A (ATA2)	Slc38a2	NM_018976	0,42
41	Serine protease inhibitor, Kazal type 1	SPINK1	NM_003122	0,42
42	dual specificity phosphatase 10; MKP-5	DUSP10	NM_007207, NM_144728, NM_144729	0,42
43	Polymerase I and transcript release factor	PTRF	NM_012232	0,42
44	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	ATP1B1	NM_001001787, NM_001677	0,41
45	solute carrier family 38, member 5; amino acid transporter system N2, SN2	SLC38A5	NM_033518	0,40
46	Jun B proto-oncogen	JUNB	NM_002229	0,40
47	phosphorylase, glycogen	PYGB	NM_002862	0,39
48	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	HSD17B7	NM_016371	0,39
49	solute carrier family 31 (copper transporters), member 2	SLC31A2	NM_001860	0,39
50	Glutaredoxin (thioltransferase)	GLRX	NM_002064	0,38
51	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1;	SERPINE1	NM_000602	0,38
52	insulin receptor substrate 2	IRS2	NM_003749	0,38

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
53	dipeptidyl peptidase IV (DPPIV ; DPP4); bile canaliculus domain- specific membrane glycoprotein; gp110 glycoprotein	Dpp4	NM_001935	0,38
54	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2; differentially expressed in chondrocytes 1	BHLHB2	NM_003670	0,38
55	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	Timp1	NM_003254	0,38
56	ephrin-A1; immediate early response protein B61 transcript variant 1	EFNA1	NM_004428, NM_182685	0,37
57	period homolog 1	PER1	NM_002616	0,36
58	Cytochrome P450, subfamily IIB (phenobarbital-inducible), polypeptide 6	CYP2B6	NM_000767	0,36
59	platelet derived growth factor C	PDGFC	NM_016205	0,36
60	Na,K-ATPase alpha-1 subunit	Atp1a1	NM_000701	0,35
61	complement component 4B, centromeric	C4B	NM_001002029	0,35
62	Benzodiazepin receptor (peripheral)	Bzrp	NM_000714, NM_007311	0,35
63	major histocompatibility complex, class I, C	HLA-C	NM_002117	0,35
64	serum/glucocorticoid regulated kinase	Sgk	NM_005627	0,34
65	selenoprotein N1, variant 1, 2	SelN1	NM_020451 NM_206926	0,34
66	B-cell translocation gene 1, antiproliferative	BTG1	NM_001731	0,34
67	membrane-associated RING-CH protein VI	MARCH-VI	NM_005885	0,33
68	actinin, alpha 4	ACTN4	NM_004924	0,33
69	insulin-like growth factor 2 receptor	lgf2r	NM_000876	0,32
70	solute carrier family 38, member 1	SLC38A1	NM_030674	0,32
71	BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3-like	BNIP3L	NM_004331	0,31
72	Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2	TNKS2	NM_025235	0,31
73	solute carrier family 11 (proton- coupled divalent metal ion transporters), member 2	Slc11a2	NM_000617	0,31
74	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 anti- proteinase, antitrypsin) member 3	SERPINA3	NM_001085	0,31
75	3'-phosphoadenosine 5'- phosphosulfate synthase 1	PAPSS1	NM_005443	0,31

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
76	Williams Beuren syndrome chromosome region 14, ChREBP	WBSCR14	NM_032951, NM_032952, NM_032953, NM_032954, NM_032994	0,31
77	Insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	NM_001552	0,31
78	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5	ABCA5	NM_018672 NM_172232	0,31
79	BCL2-like 1	BCL2L1	NM_001191, NM_138578	0,30
80	complement component 2	C2	NM_000063	0,30
81	endothelin receptor type A	EDNRA	NM_001957	0,30
82	dual specificity phosphatase 6	DUSP6	NM_001946, NM_022652	0,30
83	phospholipase A2 gamma intracellular membrane- associated calcium-independent	IPLA2	NM_015723	0,29
84	Dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1- related)	DUSP3	NM_004090	0,28
85	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	PTPRK	NM_002844	0,28
86	Histone H1(0)	H1F0	NM_005318	0,28
87	transferrin receptor 2	TFR2	NM_003227	0,27
88	signal transducer and activator of transcription 3	Stat3	NM_003150, NM_139276 (NM_213662)	0,27
89	solute carrier family 4, anion exchanger, member 2	SLC4A2	NM_003040	0,27
90	collagen, type V, alpha 1	COL5A1	NM_000093	0,27
91	Tropomyosin 2 (beta) transcript variant 1	TPM2	NM_003289	0,27
92	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor, alpha	NFKBIA	NM_020529	0,27
93	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	GNPDA1	NM_005471	0,26
94	hemopexin	HPX	NM_000613	0,26
95	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa transcript variant E16	OAS1	NM_016816	0,26
96	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	CNP	NM_033133	0,26
97	solute carrier family 13 (sodium- dependent citrate transporter), member 5	SLC13A5	NM_177550	0,26
98	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	MAP4K3	NM_003618	0,26
99	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26	DDX26	NM_012141	0,26
100	pre-B-cell colony enhancing factor 1 (PBEF1), transcript variant 2	PBEF	NM_005746, NM_182790	0,26
101	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	ATP2A2	NM_001681, NM_170665	0,25

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
102	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5; canalicular multispecific organic anion transporter C	Abcc5	NM_005688	0,25
103	protein inhibitor of activated STAT, 1	PIAS1	NM_016166	0,25
104	RAB7, member RAS oncogene family	RAB7	NM_004637	0,25
105	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	LTBR	NM_002342	0,25
106	ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d isoform 1	ATP6V0D1	NM_004691	0,25
107	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	EPHX1	NM_000120	0,24
108	Heat shock 70kD protein 1A	HSPA1A	NM_005345	0,24
109	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	TRPM7	NM_017672	0,24
110	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	ITGAV	NM_002210	0,24
111	Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	SULT1A1	NM_001055, NM_177529, NM_177530, NM_177534, NM_177536	0,24
112	Ras homolog gene family, member E	ARHE	NM_005168	0,24
113	lysosomal-associated membrane protein 2 Transcript variant LAMP2A	LAMP2	NM_002294, NM_013995	0,24
114	Pyruvate kinase, muscle transcript variant 2	PKM2	NM_002654, NM_182470, NM_182471	0,24
115	programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)	Pdcd8	NM_004208, NM_145812, NM_145813	0,24
116	forkhead box A3	FOXA3	NM 004497	0,23
117	Quinolinate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating))	QPRT	NM_014298	0,23
118	Death-associated protein	DAP	NM 004394	0,23
119	Serum/glucocorticoid regulated kinase-like	SGKL	NM_013257, NM_170709	0,23
120	ras homolog gene family, member G (rho G)	RHOG	NM_001665	0,23
121	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	PTPN12	NM_002835	0,22
122	Catechol-O-methyltransferase transcript variant S-COMT	COMT	NM_007310	0,22
123	c-Myc promoter-binding protein	MYCPBP	NM_005848	0,22
124	GrpE-like 1, mitochondrial; stress- inducible chaperone mt-GrpE#1	Grpel1	NM_025196	0,22
125	carboxypeptidase A2 (pancreatic)	CPA2	NM_001869	0,22

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
126	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4 transcript variant A; multiple drug resistance 3; P glycoprotein 3/multiple drug resistance 3	Abcb4	NM_000443, NM_018849, NM_018850	0,22
127	glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1	NM_015917	0,22
128	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	SERPINA1	NM_000295, NM_001002235, NM_001002236	0,22
129	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells 1 (p105)	NFKB1	NM_003998	0,22
130	deleted in liver cancer 1	DLC1	NM_006094, NM_024767, NM_182643	0,22
131	transmembrane 4 superfamily member 3	TM4SF3	NM_004616	0,22
132	Glutamine synthase	GLUL	NM_002065	0,22
133	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	DDX46	NM_014829	0,21
134	BCL2-associated transcription factor 1	BCLAF1	NM_014739	0,21
135	suppressor of cytokine signaling 5 transcript variant 2	SOCS5	NM_014011, NM_144949	0,21
136	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	HNRPUL1	NM_007040, NM_144732, NM_144734	0,21
137	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2; Nr1h2; OR-1; oxysterol receptors LXRbeta	Nr1h2	NM_007121	0,21
138	sterol regulatory element binding transcription factor 2	SREBF2	NM_004599	0,21
139	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	Stat6	NM_003153	0,21
140	emopamil binding protein (sterol isomerase)	EBP	NM_006579	0,20
141	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	DNAJB9	NM_012328	0,20
142	histone deacetylase 3	HDAC3	NM_003883	0,20
143	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	ATP2B1	NM_001001323, NM_001682	0,20
144	Cryptochrome 1 (photolyase-like)	CRY1	NM_004075	0,20
145	Beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein)	BECN1	NM_003766	0,20
146	glial fibrillary acidic protein	GFAP	NM_002055	0,20
147	interleukin 10 receptor, beta	IL10RB	NM_000628	0,20
148	Protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	PPP4C	NM_002720	0,20
149	Choline Kinase beta		NM_005198	0,20
150	E2D 1	UBE2D1	NM_003338	0,20
151	Chromodomain helicase DNA binding protein 4	CHD4	NM_001273	0,20

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
152	dual specificity phosphatase 5; MAP-kinase phosphatase cpg21	DUSP5	NM_004419	0,20
153	signal recognition particle 14kDa (homologous Alu RNA binding protein)	SRP14	NM_003134	0,20
154	Tropomyosin 2 (beta) transcript variant 2	TPM2	NM_213674	0,20
155	selenoprotein W1	SelW1	NM_003009	0,19
156	growth arrest and DNA-damage- inducible, alpha	GADD45A	NM_001924	0,19
157	cathepsin C	Ctsc	NM_001814, NM_148170	0,19
158	beta-2-microglobulin	B2M	NM_004048	0,19
159	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25	SLC25A25	NM_001006643, NM_001006641, NM_052901, NM_001006642	0,19
160	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2; canalicular multispecific organic anion transporter	Abcc2	NM_000392	0,19
161	Cyclin G1	CCNG1	NM_004060, NM_199246	0,19
162	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	Slc3a2	NM_002394	0,18
163	ATP citrate lyase (Acly)	Acly	NM_001096	0,18
164	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	SDHA	NM_004168	0,18
165	Arylsulfatase A	ARSA	NM_000487	0,18
166	histone deacetylase 1	HDAC1	NM_004964	0,18
167	Excision repair cross- complementing rodent repair deficiency, complementation group 5 (xeroderma pig	ERCC5	NM_000123	0,18
168	dual specificity phosphatase 1; MAP kinase phosphatase 1	DUSP1	NM_004417	0,18
169	tuberous sclerosis 2	TSC2	NM_000548, NM_021055, NM_021056	0,18
170	tissue inhibitor of metalloproteinase 2; Timp2	Timp2	NM_003255	0,18
171	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone- repressed prostate message 2, apolipoprotein J) transcript variant 2	CLU	NM_001831, NM_203339	0,18
172	karyopherin (importin) alpha 2 (kpna2)	Kpna2	NM_002266	-0,18
173	Gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase)	GGH	NM_003878	-0,18
174	alpha-fetoprotein	AFP	NM_001134	-0,18

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
	inhibitor of DNA binding 1	ID1	NM 181353	520 11031101/1
175	dominant negative helix-loop-helix protein		NM_002165	-0,18
176	signal recognition particle 9kDa	SRP9	NM_003133	-0,18
177	Serine- Hydroxymethyltransferase2 (mitochondrial)	SHMT2	NM_005412	-0,18
178	Protein disulfide isomerase related protein (calcium-binding protein, intestinal-related)	ERP70	NM_004911	-0,18
179	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2	NM_001979	-0,18
180	Flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	NM_004111	-0,18
181	argininosuccinate synthetase	ASS	NM_000050, NM_054012	-0,19
182	geminin, DNA replication inhibitor	GMNN	NM_015895	-0,19
183	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	ALDH3A2	NM_000382	-0,19
184	syndecan 1 transcript variant 1	SDC1	NM_001006946, NM_002997	-0,19
185	Polo-like kinase (Drosophila)	PLK	NM_005030	-0,20
186	Glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)	GOT2	NM_002080	-0,20
187	Alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	ADH5	NM_000671	-0,20
188	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRPA1	NM_002136, NM_031157	-0,20
189	Protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	NM_003981, NM_199413, NM_199414	-0,20
190	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase,	MTHFD1	NM_005956	-0,20
191	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1	SERPIND1	NM_000185	-0,21
192	3-hydroxyisobutyryl-Coenzyme A hydrolase	HIBCH	NM_014362, NM_198047	-0,21
193	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	HIBADH	NM_152740	-0,21
194	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	MYBL2	NM_002466	-0,21
195	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	CDC45L	NM_003504	-0,21
196	Apolipoprotein C-III	APOC3	NM_000040	-0,21
197	Ligase I, DNA, ATP-dependent	LIG1	NM_000234	-0,22
198	Asparagine synthetase transcript variant 2	ASNS	NM_001673, NM_133436, NM_183356	-0,22
199	Peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	PPIF	NM_005729	-0,22
200	RAN, member RAS oncogene family	RAN	NM_006325	-0,22
201	peroxiredoxin 6	Prdx6	NM_004905	-0,22

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
202	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 6	NEK6	NM_014397	-0,22
203	transmembrane 4 superfamily member 4	TM4SF4	NM_004617	-0,22
204	ribosomal protein L18a	RPL18A	NM_000980	-0,22
205	tubulin, beta polypeptide	TUBB	NM_178014	-0,22
206	tubulin, alpha, ubiquitous	TUBA1B	NM_006082	-0,22
207	coproporphyrinogen oxidase	CPO	NM_000097	-0,22
208	serine/threonine kinase 6 transcript variant 2	STK6	NM_003600, NM_198433, NM_198434, NM_198435, NM_198436, NM_198437	-0,23
209	Aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	ALDH7A1	NM_001182	-0,23
210	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	CALM3	NM_005184	-0,23
211	forkhead box M1	FOXM1	NM_021953, NM_202002, NM_202003	-0,23
212	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) transcript variant 1	HSPD1	NM_002156, NM_199440	-0,24
213	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	NM_002356	-0,25
214	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, type II	HADH2	NM_004493	-0,25
215	minichromosome maintenance deficient 2, mitotin	MCM2	NM_004526	-0,25
216	Pituitary tumor-transforming 1	PTTG1	NM_004219	-0,25
217	Glypican 3	GPC3	NM_004484	-0,25
218	Polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit (50kD)	POLD2	NM_006230	-0,25
219	Laminin receptor 1 (67 kD, ribosomal protein SA)	LAMR1	NM_002295	-0,26
220	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in; 'A' isoform of nucleoside diphosphate kinase transcript variant 2	NME1	NM_000269, NM_198175	-0,26
221	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	ANG	NM_001145	-0,26
222	MutS homolog 6 (E. coli)	MSH6	NM_000179	-0,26
223	programmed cell death 5	PDCD5	NM_004708	-0,26
224	Microsomal glutathione S- transferase 3	MGST3	NM_004528	-0,27
225	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	HADHSC	NM_005327	-0,27
226	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	HSD17B2	NM_002153	-0,27
227	fatty acid binding protein 5	FABP5	NM_001444	-0,27
228	High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 2	HMGB2	NM_002129	-0,27
229	fumarate hydratase	FH	NM_000143	-0,27
230	proliferating cell nuclear antigen; DNA polymerase delta auxiliary protein	PCNA	NM_002592, NM_182649	-0,28

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
231	glucosidase, beta, acid 3 (cytosolic)	GBA3	NM_020973	-0,28
232	Guanidinoacetate N- methyltransferase	GAMT	NM_000156	-0,28
233	Sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA) -preferring, member 1	SULT2A1	NM_003167	-0,28
234	Sterol O-acyltransferase 2	SOAT2	NM_003578	-0,29
235	glycine amidinotransferase (L- arginine:glycine amidinotransferase)	GATM	NM_001482	-0,29
236	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	IMPDH2	NM_000884	-0,29
237	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin); apoptosis inhibitor 4	BIRC5	NM_001168	-0,30
238	heat shock 70kDa protein 8 transcript variant 1	HSPA8	NM_006597, NM_153201	-0,30
239	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	IDH1	NM_005896	-0,30
240	hyaluronan binding protein 2	HABP2	NM_004132	-0,30
241	Cyclin B1	CCNB1	NM_031966	-0,30
242	Arylacetamide deacetylase (esterase)	AADAC	NM_001086	-0,31
243	Peroxisomal trans 2-enoyl CoA reductase; putative short chain alcohol dehydrogenase	PECR	NM_018441	-0,31
244	asialoglycoprotein receptor; hepatic lectin H1	Asgr1	NM_001671	-0,31
245	Thymidylate synthetase	TYMS	NM_001071	-0,32
246	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	ITIH2	NM_002216	-0,32
247	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20	NM_001255	-0,33
248	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	PCK2	NM_004563	-0,33
249	Ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)	OAT	NM_000274	-0,34
250	paternally expressed 10	PEG10	XM_496907	-0,34
251	annexin A4	ANXA4	NM_001153	-0,35
252	Glutamate dehydrogenase 1	GLUD1	NM_005271	-0,35
253	dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1	SIC3a1	NM_000341	-0,35
254	Phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	NM_006623	-0,36
255	3-hydroxy-3-methylglutaryl- Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial); HMG-CoA synthase	Hmgcs2	NM_005518	-0,36
256	Inhibitor of DNA binding 2	ID2	NM_002166	-0,36
257	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae)	MCM5	NM_006739	-0,37

Index	Name	NCBI Gensymbol	NCBI Accession	420 mosmol/l vs. 320 mosmol/l
258	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	ACADSB	NM_001609	-0,37
259	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	HSP90B1	NM_003299	-0,38
260	Cyclin B2	CCNB2	NM_004701	-0,39
261	metallothionein 1H	MT1H	NM_005951 und andere	-0,40
262	connexin 43; Gap junction protein, alpha 1, 43 kD; Gja1	Gja1	NM_000165	-0,40
263	Metallothionein 1E	MT1E	NM_175617	-0,40
264	Cyclin A2	CCNA2	NM_001237	-0,43
265	metallothionein 2A	MT2A	NM_005953	-0,44
266	orosomucoid 1; alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1	NM_000607	-0,45
267	orosomucoid 2; alpha-1-acid glycoprotein, type 2	ORM2	NM_000608	-0,45
268	solute carrier family 38, member 3; amino acid transporter system N1; SN1	Slc38a3	NM_006841	-0,46
269	inhibitor of DNA binding 2B, dominant negative helix-loop-helix protein	ID2B	M96843	-0,46
270	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	Cps1	NM_001875	-0,47
271	Creatine kinase	CKB	NM_001823	-0,47
272	fibrinogen, A alpha polypeptide	FGA	NM_000508	-0,52
273	haptoglobin-related protein	HPR	NM_020995 (NM_005143)	-0,55
274	Ornithine decarboxylase 1	ODC1	NM_002539	-0,55
275	fatty acid binding protein 1	Fabp1	NM_001443	-0,56
276	high-mobility group nucleosomal binding domain 2	HMGN2	NM_005517	-0,56
277	kininogen 1	KNG1	NM_000893	-0,57
278	Complement component C5	C5	NM_001735	-0,57
279	haptoglobin	HP	NM_005143	-0,62
280	fibrinogen, gamma polypeptide transcript variant gamma-A	FGG	NM_000509, NM_021870	-0,70
281	fibrinogen, B beta polypeptide	FGB	NM_005141	-0,70
282	fibrinogen, A alpha polypeptide	FGA	NM_000508, NM_021871	-0,75
283	alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	NM_001622	-0,85
284	Glutathione S-transferase A1	GSTA1	NM_145740	-0,86
285	glutathione S-transferase A2	GSTA2	NM 000846	-0,92

11 Abschlußerklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch keiner Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Ort, Datum

Unterschrift