

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med D. Häussinger

**Einfluss des Hepatitis C-Virus auf die CREB  
Genexpression und die funktionelle Relevanz**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
**Michaela Rohr**

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes G. Bode

Zweitgutachterin: Priv.-Doz. Dr. med. Julia Reifenberger

Meinen Eltern, meinen Großeltern,  
meiner Schwester und meinem Verlobten  
zum Dank gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Das Hepatitis C-Virus</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Allgemein.....	1
1.1.2 Hepatitis C-Virus .....	2
1.1.3 Virale Replikation und Infektion .....	4
1.1.4 Hepatitis C-Zellkulturmodell .....	7
1.1.5 Apoptose - Bedeutung und Regulation .....	8
1.1.5.1 Der extrinsische Signalweg .....	10
1.1.5.2 Der intrinsische Signalweg.....	11
1.1.6 Hepatitis C - Einfluss auf die Apoptose.....	13
1.1.6.1 HCV <i>Core</i> Protein .....	14
1.1.6.2 HCV Hüllproteine E1 und E2.....	15
1.1.6.3 HCV nichtstrukturelle Proteine .....	15
1.1.7 Pro- und anti-apoptotische Proteine .....	16
1.1.7.1 p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) .....	19
1.1.8 <i>Activating transcription factor 2</i> (ATF-2) und seine Transkriptionsfamilie .....	20
1.1.9 <i>Peroxisome-proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i> (PPAR $\gamma$ ) .....	22
1.1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	25
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Material, Substanzen und Lösungen</b> .....	<b>26</b>
2.1.1 Materialien für die Zellkultur.....	26
2.1.2 Zellkulturmedien.....	26
2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien .....	26
2.1.4 Kits .....	28
2.1.5 <i>Realtime</i> - PCR.....	28
2.1.6 Primärantikörper und Sekundärantikörper.....	28
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	30
2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	32
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	34
<b>2.3 Analyse der Daten &amp; statistische Auswertung</b> .....	<b>37</b>
<b>2.4 Humane Leberproben</b> .....	<b>38</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 HCV induziert die mRNA Expression von CREB5 und ATF-2</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2 ATF-2 hemmt die virale Replikation</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3 Actinomycin D/ TNF<math>\alpha</math>-vermittelte Apoptose</b> .....	<b>43</b>
<b>3.4 ATF-2 hemmt die HCV-induzierte Expression pro-apoptotischer Gene</b> .....	<b>45</b>
<b>3.5 Die mRNA-Expression von ATF-2 und PPAR<math>\gamma</math> in humanen HCV-infizierten Leberzellen</b> .....	<b>48</b>
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>50</b>

<b>4.1 Subgenomisches HCV Replikon (Genotyp 1b) - Einfluss auf die CREB/ATF- Transkriptionsfamilie .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Modifikation der Apoptosesensibilität gegenüber pro-apoptischen Stimuli durch HCV .....</b>	<b>53</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>58</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>

## Abbildungsverzeichnis

### 1. Einleitung

Abbildung 1:	Prozessierung des HCV Polyproteins	3
Abbildung 2:	Viruseintritt und Replikationszyklus von HCV	7
Abbildung 3:	Extrinsischer Apoptoseweg	11
Abbildung 4:	Intrinsischer Apoptoseweg	13
Abbildung 5:	Pro- und anti-apoptische Proteine	18

### 3. Ergebnisse

Abbildung 6:	HCV beeinflusst die Expression der verschiedenen CREB-Isoformen	40
Abbildung 7:	Die nukleäre Translokation von ATF-2 sowie die ATF-2 Aktivierung sind in Gegenwart des subgenomischen HCV Replikons verstärkt	41
Abbildung 8:	ATF-2 <i>Knockdown</i> hat einen Einfluss auf die virale Replikation	42
Abbildung 9:	Die ATF-2 Aktivierung durch das HCV moduliert die Apoptosesensitivität der Zellen	44
Abbildung 10:	HCV reduziert die mRNA Expression der pro-apoptischen Faktoren PUMA und PPAR $\gamma$ über die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors ATF-2	46
Abbildung 11:	ATF-2 <i>Knockdown</i> in HCV-Replikonzellen führt zu einer verstärkten Proteinexpression von PPAR $\gamma$	47
Abbildung 12:	HCV verändert die mRNA Expression von ATF-2 und PPAR $\gamma$	49

## Tabellenverzeichnis

### 2. Material und Methoden

Tabelle 1:	Verwendete Zelllinien	29
Tabelle 2:	Oligonukleotide für die RT-PCR	34

### 3. Ergebnisse

Tabelle 3:	Patientendaten zu den in Abb. 12 eingesetzten humanen Leberproben.	48
------------	--	----

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A1/Bfl-1	<i>Bcl2-related Protein</i>
Akt	Proteinkinase B
AP-1	Aktivator Protein 1
ATF	<i>cyclic AMP-dependent transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BBC3	<i>Bcl-2-binding component 3</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
Bcl-xl	<i>B-cell lymphoma- extra large</i>
Bcl-w	<i>Bcl-2 like protein 2</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>Bcl2-interacting killer</i>
Bim	<i>Bcl2-interacting mediator</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARD	<i>caspase recruiting domain</i>
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIDE-B	<i>Cell death-inducing DFF45-like effector b</i>
CLDN	<i>Claudin-1</i>
CRE	<i>cAMP-responsive element</i>

CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DEDs	<i>death effector domains</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fos	<i>growth factor-stimulated serine/threonine protein kinase</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HBV	Hepatitis B
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
Huh	Humane Hepatomazellen
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
JNK	<i>c-JUN N-terminal protein kinase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
Maf	macrophage-activating factor
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mcl-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NS	nicht strukturell
NTP	Nukleosidtriphosphat

OCN	Occludin
ORF	<i>Open reading frame</i>
p38 <sup>MAPK</sup>	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PARP	<i>Poly-(ADP-ribose)-polymerase</i>
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3- kinase</i>
PKA	Proteinkinase A
PPAR	<i>Peroxisome-proliferator-activated receptor</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>Realtime PCR</i>
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SP	<i>Specificity protein</i>
SPP	Signalpeptidpeptidasen
SR-BI	<i>Scavenger Receptor B1</i>
TLP	Triton-Lyse-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand-Rezeptor</i>
Tris	Trishydroxy-Aminomethan
UTR	<i>untranslated region</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
w/o	<i>without</i>

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Hepatitis C-Virus

### 1.1.1 Allgemein

Bis 1988 wurden mehr als die Hälfte der viral bedingten Leberentzündungen auf das Hepatitis A-Virus und das Hepatitis B-Virus zurückgeführt. Erst 1989 wurde das Hepatitis C-Virus als Erreger von einem Großteil der Hepatitiden identifiziert, die unter dem Begriff Non A- Non B-Hepatitis zusammengefasst wurden. Dieser ist heutzutage weltweit eine der führenden Ursachen für chronische Lebererkrankungen [1].

Mittels molekularbiologischer Methoden gelang es Choo et al. 1989 aus dem Serum eines mit Non A- Non B- Hepatitis Virus infizierten Schimpansen ein Genomfragment durch Klonierung und Charakterisierung als neuen Erreger zu demaskieren. Dieser Erreger wurde daraufhin als Hepatitis C-Virus (HCV) bezeichnet [2].

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit 150 Millionen Menschen mit HCV infiziert [1]. Jährlich treten weltweit 3 bis 4 Millionen Neuinfektionen auf. Bei 70% aller Infizierten kommt es zu einem chronischen Verlauf der Erkrankung. Die Krankheit kann sich sowohl als sehr milde Form mit spontaner Ausheilung nach wenigen Wochen äußern, kann aber auch erst sehr spät zur Entwicklung einer Leberzirrhose und Folgeerkrankungen wie dem hepatozellulären Karzinom führen. Es entwickeln 5-20% der Hepatitis C Infizierten eine Leberzirrhose, 25% aller hepatozellulären Karzinome werden mit einer Hepatitis C-Infektion in Verbindung gebracht. An den Folgen einer Leberzirrhose oder eines hepatozellulären Karzinoms sterben 1-5% aller HCV Patienten [1].

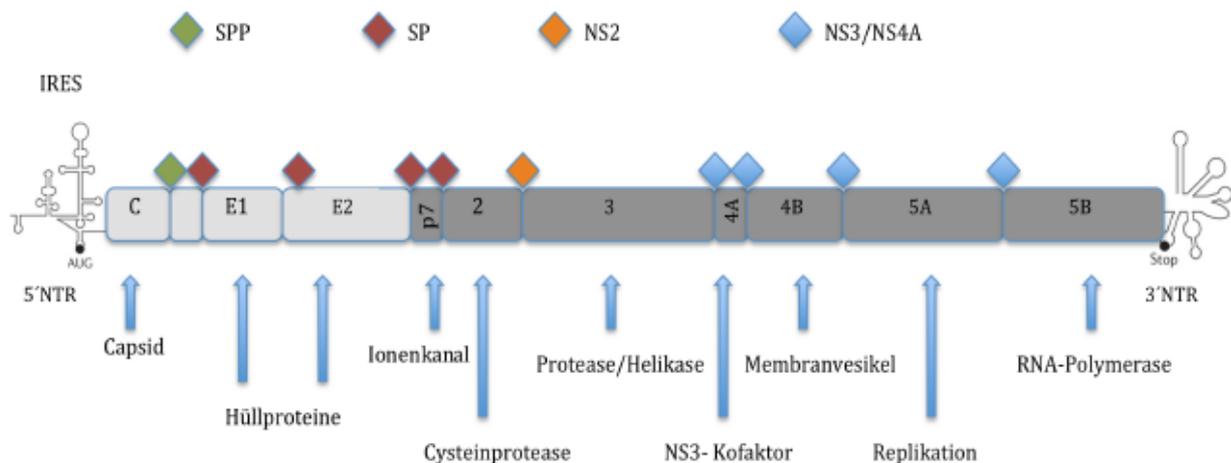
### 1.1.2 Hepatitis C-Virus

Das Hepatitis C-Virus ist ein hepatotroper, humaner Krankheitserreger, der unter anderem vor allem die Hepatozyten infiziert. Es gehört zur Gattung *Hepacivirus* und zur Familie *Flaviviridae*. Der Name *Flaviviridae* leitet sich vom lateinischen 'flavus' (= 'gelb') ab. Damit ist das Gelbfiebervirus ursprünglich für die Namensgebung dieser Familie verantwortlich. Nicht nur das Hepatitis C-Virus, sondern auch Pestiviren wie der klassischen Schweinepest und andere Flaviviren wie Frühsommer-Meningoenzephalitis und das Gelbfiebervirus gehören der Familie *Flaviviridae* an.

Es existieren 7 verschiedene Genotypen des Hepatitis C-Virus, die weiter in 67 Subtypen unterteilt werden können [3]. Die Genotypen des Hepatitis C-Virus unterscheiden sich in ihrer Nukleotidsequenz und sind geographisch unterschiedlich verteilt. So ist zum Beispiel in Deutschland der Genotyp 1 führend, während in Italien vor allem der Genotyp 2 detektiert werden kann [4].

Das 9,6kb große, einzelsträngige RNA Genom positiver Polarität besteht aus einem 3' und 5' untranslatierten Bereich (UTR) und codiert in einem einzelnen offenen Leserahmen ein Polyprotein.

Die 5' nicht kodierende Region beinhaltet eine interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosome entry site* = IRES). Die IRES ist dafür verantwortlich, dass die mRNA an die Ribosomen bindet und damit die Translation initiiert wird. Dabei wird ein vorläufiges Polyprotein aus etwa 3000 Aminosäuren gebildet. Dieses Protein wird schließlich von virus- und wirtsspezifischen Proteasen ko- und posttranslationell in die Struktur- und Nicht-Strukturproteine prozessiert.



**Abb. 1: Prozessierung des HCV Polyproteins.** Das einzelsträngige RNA Genom des Hepatitis C-Virus hat eine Größe von 9,6kb und Plusstrangorientierung. Das virale Genom kodiert in einem offenen Leserahmen ein Polyprotein. Die IRES-Sequenz (*internal ribosome entry site*) im 5'NTR vermittelt die Bindung der mRNA an die Ribosomen. Daraufhin erfolgt die Translation des 3000 Aminosäure großen Polyproteins. Die ko- und posttranslationelle Prozessierung des Polyproteins erfolgt mit Hilfe von Enzymen. Core, E1, E2 und p7 werden durch Signalpeptidpeptidasen (SPP) und Signalpeptidasen (SP) geschnitten. Die Spaltung zwischen NS2 und NS3 erfolgt durch die Cysteinprotease NS2, die weiteren nichtstrukturellen Proteine werden durch die NS3/4A-Serinprotease prozessiert. Abkürzungen: NTR: nontranslated region (modifiziert nach *Bartenschlager, 2006*)

Zu den Strukturproteinen des Hepatitis C-Virus zählen das Core Protein, sowie die Proteine E1 und E2. Das Core Protein bildet das virale Nukleokapsid und die Proteine E1 und E2 sind Glykoproteine der Hüllmembran. Der Ionenkanal p7, die NS2 Protease, der NS3/4A Komplex sowie NS4B, NS5A und die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B werden als die nichtstrukturellen Proteine des Hepatitis C-Virus zusammengefasst [5]. Das Viroporin p7 ist ein kleines, integrales Membranprotein, ein Kationenkanal, und an der Freisetzung der Viruspartikel beteiligt [6]. Das Nicht-Struktur-Protein NS3 beinhaltet eine N-terminale Serinprotease und eine C-terminale RNA Helikase. Die N-terminale Protease ist einerseits für die Spaltung des Polyproteins verantwortlich, andererseits inaktiviert sie zelluläre Proteine, die für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort erforderlich sind. NS3 und NS4A liegen als Komplex vor. Dabei ist NS4A der Kofaktor von NS3. Durch einen Membrananker lokalisiert NS4A NS3 an das Endoplasmatische Retikulum und moduliert zusätzlich dessen

Enzymaktivität. Am Endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Prozessierung der Nicht-Strukturproteine NS4A bis NS5B [7].

NS4B ist ein hydrophobes integrales Membranprotein. Die Ausbildung der netzartigen Membranstrukturen um das Endoplasmatische Retikulum wird durch dieses Protein induziert. Im Weiteren kann NS4B mit anderen Proteinen interagieren, bindet virale RNA und hat NTPase Aktivität. Das Protein NS4B spielt eine Rolle bei der RNA Replikation, dem Zusammenbau des Virus und bei dessen Freisetzung [8].

Ein weiteres Protein, das sowohl mit der Wirtszelle interagiert als auch einen Einfluss bei der Replikation hat, ist das nichtstrukturelle Phosphoprotein NS5A. Dieses Protein kann sowohl in hypophosphorylierter (p56), als auch in hyperphosphorylierter (p58) Form vorliegen. Die Phosphorylierung erfolgt dabei hauptsächlich an Serin-, aber auch an Threoninresten. Liegt das Protein in der hypophosphorylierten Form vor, so spielt es eine Rolle in der Replikation; liegt es in der hyperphosphorylierten Form vor, nimmt es eine Funktion beim viralen Zusammenbau ein [8, 9].

Die mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziierte RNA-abhängige Polymerase NS5B ist ein Enzym, das eine wichtige Rolle bei der viralen Replikation spielt. Es initiiert die Synthese der komplementären (-)RNA und schließlich wird von der (-)RNA wieder (+)RNA gebildet. Letztere dient wiederum als *template* für die Replikation, aber auch für die Translation des Polyproteins und den Zusammenbau neuer Viren [8].

### 1.1.3 Virale Replikation und Infektion

Ziel jedes Virus ist das eigene Überleben. Damit die Virusreplikation gesichert wird, muss sich das Hepatitis C-Virus den Wirtsstoffwechsel zu Nutze machen. Dies kann das Virus erst, wenn es in die Zelle aufgenommen wurde. Der Viruseintritt in die Hepatozyten findet in einem dreistufigen Prozess statt:

1. Zelloberflächenbindung
2. Invasion
3. Freisetzung des viralen Nukleokapsids ins Zytosol

Im Blut zirkuliert das Hepatitis C-Virus als ein lipoviraler Partikel (*LVPs*), assoziiert an LDL (*low-density lipoprotein*), VLDL (*very low-density lipoprotein*) und Immunglobuline [10, 11].

Der Viruseintritt in den Hepatozyten erfolgt in mehreren Schritten. Zuerst bindet das verpackte (+)RNA-Virus über Glykosaminoglykane oder den LDL-Rezeptor (*low-density lipoprotein-receptor*) an die Oberfläche der Hepatozyten. Die Oberflächenmoleküle CD81 (*Cluster of Differentiation 81*) und SR-BI (*Scavenger Rezeptor-BI*) sowie die *tight junction* Proteine *Claudin-1* (CLDN) und *Occludin* (OCLN) sind an dem endozytotischen Prozess beteiligt [12, 13]. Eine ATP-getriebene Protonenpumpe transportiert nun Protonen in den Innenraum des entstandenen Endosoms. Durch den daraufhin sinkenden pH-Wert erfolgt die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran und damit die zytoplasmatische Freisetzung des viralen Nukleokapsids [14, 15].

Bei den bekannten Kofaktoren für den viralen Eintritt sind der EGF-Rezeptor sowie der Ephrin-Rezeptor A2 zu nennen. Diese regulieren mit ihrer Tyrosinkinaseaktivität sowohl den intrazellulären als auch den transmembranären Transport von CD81 und CLDN1. Befinden sich somit vermehrt CD81 und CLDN1 an der Zellmembranaußenseite, erleichtert dies die glykoproteinabhängige Membranfusion von HCV und führt zu einer Erhöhung des Viruseintritts. Zusammengefasst bewirkt somit eine Aktivierung des EGF-Rezeptors eine kofaktorielle Steigerung des Viruseintritts [16, 17].

Die initiale Anhaftung des Virus an die Wirtszelle erfolgt über die viruseigenen Glykoproteine E1 und E2. Hochsulfatiertes Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG), das auf der Oberfläche humaner Zellen exprimiert wird, spielt dabei eine entscheidende Rolle [18, 19]. Da die Heparansulfate je nach Gewebe und Zelltyp strukturelle Unterschiede zeigen, kommt es zu einem Zelltropismus – das Hepatitis C-Virus befällt fast ausschließlich Hepatozyten [20].

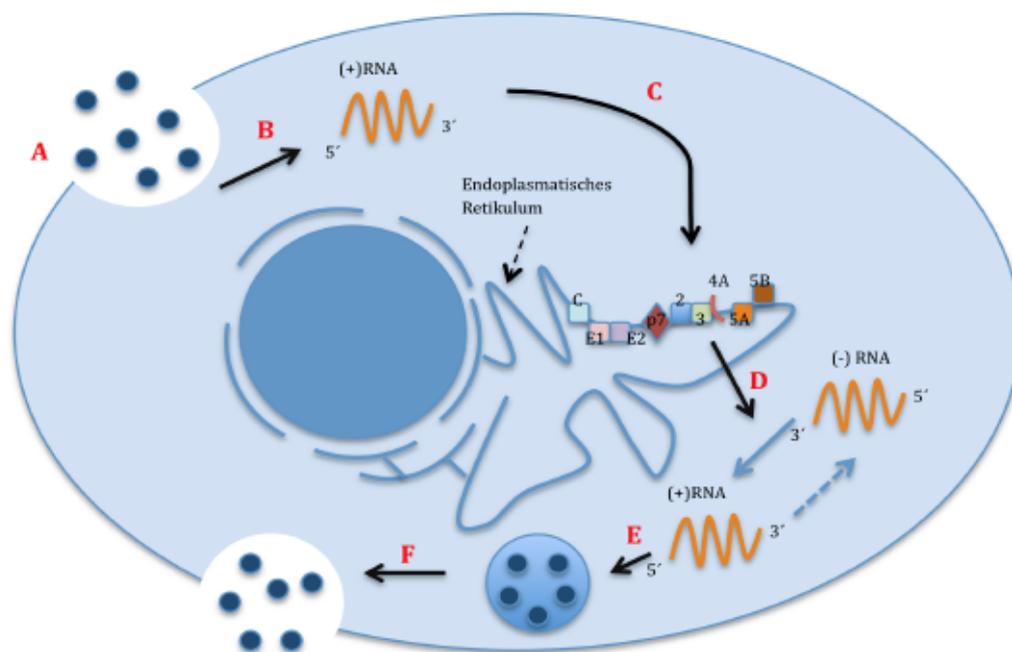
Das Oberflächenmolekül CD81 hat auch eine wichtige Funktion beim Eintritt des Hepatitis C-Virus in die Hepatozyten. CD81 ist ein transmembranäres Protein, das unter anderem auf der Oberfläche von Hepatozyten, B- und T-Lymphozyten zu finden ist. Es gehört zur Familie der Tetraspanine und geht eine Bindung mit dem viralen Glykoprotein E2 ein [21]. Nachdem bereits der erste Kontakt des Hepatitis C-Virus mit

der Wirtszelle stattgefunden hat, dient folglich CD81 als Post-Bindungsfaktor [22]. Es kommt zu einer Komplexbildung zwischen CD81 und *tight junction* Protein CLDN1 [23, 24].

Um das Hepatitis C-Virus zu vervielfältigen, wird die virale RNA am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert. Die IRES-abhängige Translation beginnt an der 5'-NTR (nicht-translatierten Region) der viralen RNA. Das entstehende Polyprotein wird durch zelluläre Signalpeptidasen und virale Proteasen prozessiert. Die virale Replikation findet in einem durch das HCV Protein NS4B gebildeten membranösen Netzwerk statt, der Replikationskomplex ist so vor Abbau geschützt. Dieses membranöse Netzwerk besteht aus Vesikeln, dem endoplasmatischen Retikulum und *lipid droplets*. Bei der viralen Replikation wird zuerst eine negativsträngige RNA hergestellt, woraus dann durch die virale RNA-abhängige Polymerase NS5B wieder eine Positivstrang-RNA gebildet wird [25, 26]. Das entstandene (+)RNA Genom kann auf dreierlei Art genutzt werden:

1. Bildung neuer HCV Proteine
2. Matrizenstrang für die Herstellung weiterer HCV Genome
3. Einbau in Nukleokapside

Lagert sich das RNA-Genom an die Membran des endoplasmatischen Retikulums, kommt es zur Einstülpung der Membran in das Lumen des ER. Dabei erfolgt eine Umhüllung des Hepatitis C-Virus („*budding*“). Im Golgi-Apparat erfolgt anschließend die Glykosylierung der viralen Glykoproteine E1 und E2. Die Golgi-Vesikel fusionieren letztlich mit der Zytoplasmamembran, um daraufhin die Virone ins Zytoplasma freizusetzen [27].



**Abb. 2: Viruseintritt und Replikationszyklus von HCV.** A) rezeptorvermittelte Endozytose; B) zytosolische Freisetzung des Nucleokapsids; C) IRES-vermittelte Translation und Prozessierung der Polyproteins; D) RNA-Replikation; E) *viral assembly*; F) Freisetzung der Virone (modifiziert nach Moradpour *et al.*, 2007)

#### 1.1.4 Hepatitis C-Zellkulturmodell

Zur Erforschung des Hepatitis C-Virus werden zahlreiche Modellsysteme verwendet. Dabei spielen insbesondere *in vitro*-Modelle eine entscheidende Rolle. Da HCV nur den Menschen und den Schimpansen infiziert, standen *in vivo*-Modelle zur Untersuchung des viralen Lebenszyklus *in vivo* nur sehr begrenzt zur Verfügung. Um hier Abhilfe zu schaffen, wurden Mausmodelle entwickelt, in denen einzelne oder mehrere HCV-Proteine transgen exprimiert werden. Zudem wurden *in vivo* Infektionsmodelle entwickelt, bei denen immundefiziente Mäuse nach Depletion der murinen Hepatozyten mit humanen Hepatozyten repopularisiert wurden [28].

Lohmann *et al.* entwickelte 1999 das erste Zellkulturmodell, indem aus einer viralen RNA -isoliert aus einer infizierten humanen Leber- ein übereinstimmendes Genom in voller Länge kloniert wurde. Dieses Genom wurde dazu genutzt, ein subgenomisches Replikonsystem zu entwickeln [29]. Die Entwicklung dieses Replikonsystems, das sich

vom Genotyp 1b (HCV Isolat Con1) abgeleitet, ermöglichte es erstmals die virale Replikationsmaschinerie in der Zellkultur genauestens zu untersuchen. Beim subgenomischen Replikonsystem vom Genotyp 1b wurden die Regionen des Gens Core bis p7 durch Gene, die Encephalomyokarditis-Virus(EMCV)-IRES und Neomycinphosphotransferase (neo) kodieren, ersetzt. Durch diese Veränderung konnten die positiven Klone nach Transfektion von humanen Hepatomazelllinien 7 mit Hilfe von Geneticin (G418) selektiert werden, da durch das Gen, das die Neomycinphosphotransferase (npt) kodiert, eine Geneticin-Resistenz entstand. Durch adaptive Mutationen im Replikonsystem vor allem im Bereich der nicht-strukturellen Proteine konnten positive Klone besser überleben und replizieren [30]. Weitere sub- bzw. vollgenomische Replikon-Zelllinien folgten. Um den Eintritt des HC-Virus in die Zelle detailliert zu untersuchen, wurden HCV-Pseudopartikel entwickelt. Die Herstellung dieser Partikel erfolgt durch Kotransfektion von speziell konstruierten Klonierungsvektoren, den Expressionsvektoren der HCV Glykoproteine E1 und E2 und den gag-pol Proteinen des murinen Leukämievirus (MLV) sowie einem retroviralen Genom in 293 T-Zellen [31].

Erst die Isolation viraler RNA aus dem Blut eines japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis C brachte den Erfolg zur Entwicklung eines Infektionsmodells in der Zellkultur. Das sogenannte HCV-Isolat JFH-1 (Genotyp 2a) ermöglichte die Produktion infektiöser HCV-Partikel, die wiederum zur Infektion naiver Zellen befähigt waren. Dieses System ermöglicht, den viralen Lebenszyklus und die Entwicklung antiviraler Strategien genauestens zu untersuchen [32].

### 1.1.5 Apoptose - Bedeutung und Regulation

Die Apoptose ist ein Prozess, der aktiv gesteuert wird und zu einer Selbstzerstörung der Zellen führt. Es handelt sich hierbei um einen gesteuerten, „programmierten“ Zelltod, zu dessen morphologischen Veränderungen u.a. Zellschrumpfung, erhöhte Endonukleaseaktivität, Chromatinkondensierung, Zytoplasmakondensation, Kernfragmentierung und DNA-Zerfall gehören [33].

Die entstandenen Apoptosekörperchen werden anschließend von phagozytierenden Zellen verdaut und beseitigt; eine Entzündungsreaktion tritt nicht auf.

Der Weg der Apoptose verläuft über die Aktivierung von spezifischen Proteasen, den Caspasen (*Cytosolic Aspartat- Specific Cysteine Protease*), die ihre Substrate hinter einem Aspartatrest spalten und damit das apoptotische Programm initiieren [34]. Im Jahre 1992 wurde die Caspase-1 alias *Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme* (ICE) als erstes Mitglied der Proteasefamilie beschrieben. Caspase-1 spaltet Pro-Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in seine biologisch aktive Form, Interleukin-1 [35].

Ein homologes Protein zu Interleukin-1 namens *Ced-3 (cell death abnormal mutations in C. elegans)* wurde 1993 identifiziert [36]. *Ced-3* ist eine funktionelle Caspase und die einzige in Fadenwürmern *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) vorkommende. Diese Caspase ist während der Entwicklung von *C. elegans* für die Apoptose somatischer Zellen verantwortlich [37].

Caspasen sind aus einer kleinen ( $\sim$  p10) und einer großen ( $\sim$  p20) Untereinheit sowie einer Prodomäne, deren Größe zwischen den einzelnen Caspasenmitgliedern variiert, zusammengesetzt. Sie werden als Proenzyme, den sogenannten Zymogenen, synthetisiert und müssen durch Spaltung der Untereinheiten und Entfernung der Prodomäne während der Apoptose kaskadenartig aktiviert werden.

Es werden zwei Gruppen von Caspasen unterschieden, die Inflammations-Caspasen und die Apoptose-Caspasen. Letztere werden weiter in Initiator- (Caspase-2,-8,-9,-10) und Effektor-Caspasen (Caspase-3,-6,-7) unterteilt.

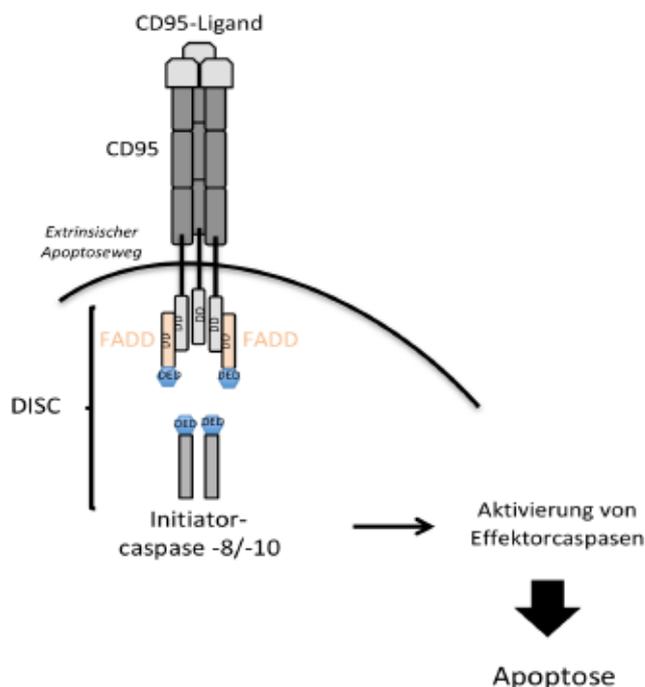
Effektor-Caspasen zeichnen sich durch eine kurze Prodomäne aus. Sie werden im Laufe der Apoptose durch Initiator- und andere Effektor-Caspasen aktiviert und können so zur Spaltung definierter Zielproteine führen. Initiator-Caspasen hingegen tragen eine längere Prodomäne. Diese besitzt funktionelle Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Die Prodomänen der Caspase-8 und-10 setzen sich aus zwei *death effector domains* (DEDs) zusammen, die Prodomänen der Caspasen-2 und -9 hingegen tragen jeweils eine *caspase recruiting domain* (CARD). Bei einer Aktivierung der Initiator-Caspasen durch bestimmte Apoptose-induzierende Stimuli extrinsischer oder intrinsischer Natur, kommt es zu einer Bildung von hochmolekularen Aktivierungskomplexen. Diese Komplexe können sich durch gegenseitige Proteolyse weiter aktivieren - es kommt zur Initiierung der Caspasen-Kaskade.

Zwei Apoptosewege sind bekannt, die in einen extrinsischen (rezeptorvermittelten) und einen intrinsischen (mitochondrialen) unterteilt werden und zu einer Aktivierung intrazellulärer Proteasen und Endonukleasen führen [38].

#### 1.1.5.1 Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Apoptoseweg wird von Todesrezeptoren, die der Superfamilie der TNF-Rezeptoren angehören, ausgelöst. Zu den leberspezifischen Rezeptoren gehören vor allem der *TNF-related apoptosis-inducing ligand*-Rezeptor 1/2 (TRAIL), der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) und CD95 (syn. Fas-Rezeptor). Extrazellulär tragen die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie Cystein-reiche Domänen, an die die Liganden binden [39]. Spezifische Todesliganden wie  $\text{TNF}\alpha$ , TRAIL und CD95 binden an ihre Transmembran-Rezeptoren, aktivieren diese und lösen damit den apoptotischen Signalweg aus. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und damit zu einer Veränderung der zytoplasmatischen Todesdomäne (*death domain* = DD). Anschließend folgt eine Rekrutierung von Adapterproteinen wie z.B. *Fas-associated death domain protein* (FADD) und Proenzyme (Procaspase-8 und -10) an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors und es bildet sich ein Signalkomplex, der *death-inducing signaling complex* (DISC) [40]. In diesem pro-apoptotischen Multiprotein-Komplex werden die Initiator-Caspasen-8 und -10 aktiviert [41] und durch proteolytische Prozessierungen kommt es zu einer kaskadenartigen Aktivierung weiterer als Proenzyme vorliegender Caspasen in aktive Proteasen [42]. Aktivierte Effektorcaspasen führen folglich zur Spaltung von Todessubstraten wie *Inhibitor of Caspase Activated DNase* (ICAD) oder *Poly-(ADP-ribose)-polymerase* (PARP). Es kommt schließlich zur Fragmentierung der DNA.

*Poly-(ADP-ribose)-polymerase* (PARP) ist ein Protein, das im Nukleus lokalisiert ist. Das körpereigene Enzym spielt eine entscheidende Rolle im DNA-Reparatursystem und kann über die Effektorcaspase-3 gespalten und inaktiviert werden [43, 44].



**Abb. 3: Extrinsischer Apoptoseweg.** Ein apoptotisches Signal führt zur Bindung eines spezifischen Liganden (CD95-Ligand) an seinen Todesrezeptor (CD95). Es kommt zur Konformationsänderung des Rezeptors und damit zur Veränderung der zytosolischen Todesdomäne (*death domain* = DD). Viele Adapterproteine werden an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors rekrutiert und es bildet sich ein Signalkomplex, der *death-inducing signaling complex* (DISC). Folglich kommt es zur konsekutiven Aktivierung von Caspasen.

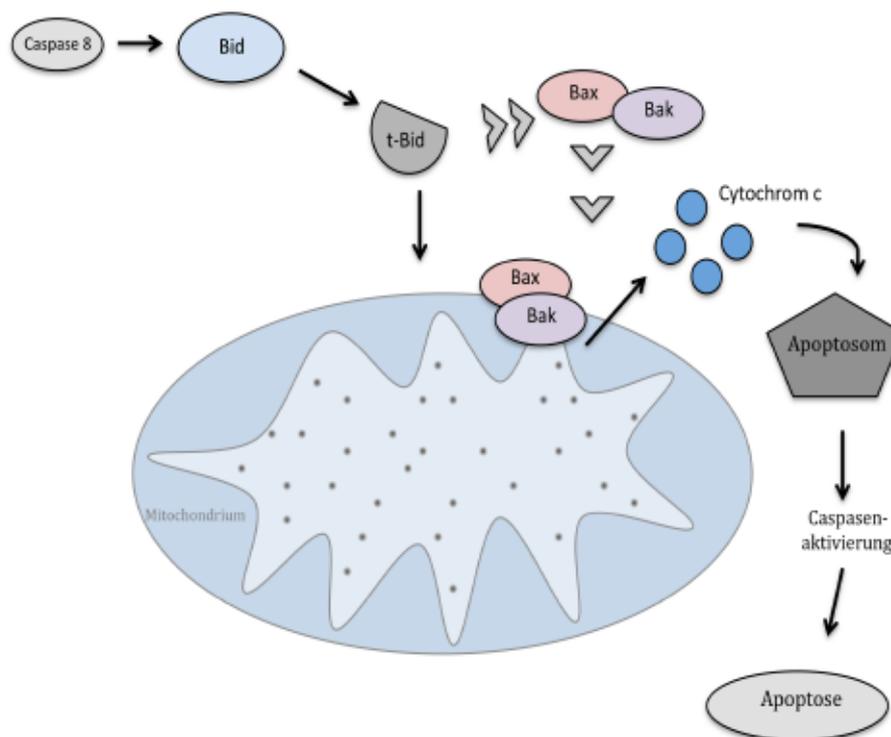
#### 1.1.5.2 Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Apoptoseweg wird auch als mitochondriale Signaltransduktion der Apoptose bezeichnet, in der apoptotische Signale mit Hilfe der Bcl-2-Proteinfamilie übermittelt werden [45]. Die Mitochondrien spielen zwar einerseits eine bedeutende Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle, andererseits nehmen sie jedoch eine wichtige Funktion innerhalb der Apoptose ein [46].

Wichtige Vertreter der mitochondrialen Apoptose sind die Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)-Proteine, die diese regulieren.

Die an dem pro-apoptotischen Multiprotein-Komplex aktivierte Initiatorcaspase-8

prozessiert im Zytosol die inaktive Form des Proteins *BH3 interacting domain death agonist* (Bid), das daraufhin zum Mitochondrium transloziert [47]. Gemeinsam mit den Proteinen *Bcl-2-associated X protein* (BAX) und *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (BAK), die der Bcl-2-Familie angehören, ruft das trunkierte Protein (t-Bid) eine Änderung des Membranpotentials und der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran hervor [48-50]. Es kommt zu einer Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren wie Cytochrom c, *second mitochondria-derived activator of caspase* (Smac) / *direct inhibitor of apoptosis protein-binding protein with low pI* (DIABLO), *HtrA serin peptidase 2* (HTR A2), *apoptosis-inducing factor* (AIF) und *Inhibitor of apoptosis Protein* (IAP) vom Mitochondrium ins Zytosol [51]. Das freigesetzte Cytochrom c bildet daraufhin einen Komplex mit dem monomeren Faktor *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) und der Initiatorcaspase-9. Es kommt zur Bildung eines Apoptosoms, das proteolytisch die Caspase-9 aktiviert. Caspase-9 kann nun die Effektorcaspasen-3,-6 und -7 spalten und aktivieren [52, 53]. Anti-apoptotische Mitglieder wie *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) und *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xl) hingegen verhindern die Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen [46].



**Abb. 4: Intrinsischer Apoptoseweg.** Bei diesem Weg der Apoptose kommt es zu einer Mitochondrienschädigung. Die im pro-apoptischen Multiprotein-Komplex aktivierte Initiatorcaspase-8 prozessiert im Zytosol die inaktive Form des Proteins *BH3 interacting domain death agonist* (Bid), das daraufhin zum Mitochondrium transloziert. Gemeinsam mit den Proteinen *Bcl-2-associated X protein* (BAX) und *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (BAK) ruft das trunkierte Protein (t-Bid) eine Änderung des Membranpotentials und der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran hervor. Es kommt zu einer Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren wie Cytochrom c. Durch die Bildung des Apoptosoms werden weitere Caspasen aktiviert.

### 1.1.6 Hepatitis C - Einfluss auf die Apoptose

Das Hepatitis C-Virus hat im Laufe der (Ko-)Evolution Mechanismen entwickelt, die es ihm ermöglichen, die Immunantwort des Wirts zu umgehen, Entzündungsreaktionen zu manipulieren und die Infrastruktur der Wirtszelle für seinen Lebenszyklus zu nutzen, ohne die Zelle dabei massiv in ihrer Viabilität zu beeinflussen.

Die Induktion von Apoptose stellt auch einen antiviralen Effektmechanismus dar, über den die virusinfizierte Zelle sich selbst eliminiert. Es stellt sich damit die Frage, über

welchen Mechanismus HCV die Induktion der Apoptose verhindert und hierdurch das Überleben, der von ihm infizierten Wirtszelle gewährleistet.

Bezüglich der einzelnen Virus-kodierten Proteine gibt es kontroverse Beobachtungen, die einerseits apoptotische, andererseits anti-apoptotische Effekte der verschiedenen HCV Proteine beschreiben, wobei hier jeweils das experimentelle System mit diskutiert werden muss. Da zum Beispiel die häufig verwendeten Transfektionssysteme mit einer hohen Proteinbelastung für die transfizierte Zelle einhergehen, können alleine dadurch auch pro-apoptotische Effekte induziert werden.

#### 1.1.6.1 HCV Core Protein

Untersuchungen ergaben, dass *Core* zu einer Unterdrückung der Apoptose in Hepatomazellen führt. Das *Core* Protein besitzt die Fähigkeit, den TNF $\alpha$ - [54] und den CD95-Ligand-induzierten Apoptoseweg [55] zu inhibieren. Die Ergebnisse von *Machida et al.* bestätigen nochmals, dass die Expression von HCV Proteinen zu einer Unterdrückung der CD95-Ligand-induzierten Apoptose führt. Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien wird zurückgehalten und damit auch die Aktivierung der Caspasen-9, -3 und -7 [56]. Desweiteren kommt es zu einer direkten Interaktion von *Core* mit den Todesdomänen *Fas-Associated protein with Death Domain* (FADD) und *Cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein* (cFLIP). Dies belegt abermals den anti-apoptotischen Effekt von *Core* [57].

Andere Forschungsgruppen konnten den anti-apoptotischen Effekt nicht bestätigen und beschrieben den gegenteiligen Effekt. Das *Core* Protein kann als positiver Regulator für die Induktion der Apoptose dienen und zu einer Sensibilisierung von Fas oder TNF $\alpha$  führen [58]. Desweiteren kann *Core* selbst über eine Interaktion mit der zytosmatischen Domäne des TNF-Rezeptor 1 zu einer Aktivierung der Apoptose führen [59]. Auch in transfizierten Jurkat T-, COS-7- und HepG2-Zellen, die das *Core* Protein oder *full-length*-HCV Polyprotein exprimieren, kommt es zu einer Apoptoseinduktion [60-62]. Beispielsweise aktiviert das HCV *Core* Protein, das im Zytoplasma lokalisiert sein muss, in Jurkat Zellen den CD95-Liganden-induzierten Apoptoseweg [62].

Andere Studien ergaben, dass die Bindung von *Core* an p53 einerseits zu einer Aktivierung, andererseits zu einer Inhibierung von p53 führt, was letztendlich mit anti- oder auch pro-apoptischen Effekten einhergeht [63, 64].

#### 1.1.6.2 HCV Hüllproteine E1 und E2

Auch die Untersuchungen der HCV Hüllproteine E1 und E2 in Bezug auf Apoptose erbrachten kontroverse Beobachtungen. So konnte unter anderem beschrieben werden, dass die TRAIL-induzierte Apoptose in Zellen, die HCV E2 exprimieren, unterdrückt wird. Cytochrom c wird nicht aus den Mitochondrien freigesetzt und die Aktivierung der Apoptose wird verhindert [65]. Ein apoptotischer Effekt konnte in diesem System für HCV E1 nicht festgestellt werden. Desweiteren konnte auch im transgenen Mausmodell bestätigt werden, dass es durch die HCV Hüllproteine E1 und E2 zu keiner CD95-induzierten Apoptose kommt. Es kommt nicht zur Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien und damit auch zu keiner Aktivierung der Caspasen-9, -3 und -7. Die Caspase-8 wird nicht inhibiert [56]. Im Gegensatz zur Apoptoseinhibierung belegten weitere Untersuchungen, dass die Expression von HCV E2 Protein die Apoptose in kultivierten Säugetierzellen aktivieren kann [66]. Diese Beobachtung wurde in einer weiteren Studie untersucht. In dieser wurde die Menge der Expression von Apoptose-induzierenden Molekülen in einer HCV E2 exprimierenden Huh7-Zelllinie untersucht. Dabei wurde ein pro-apoptischer Effekt von HCV E2 bestätigt [67].

#### 1.1.6.3 HCV nichtstrukturelle Proteine

Eine Untersuchung im Zellkulturmodell an Hepatozyten und dendritischen Zellen konnte nachweisen, dass es durch die Expression von HCV NS3 Protein zu einer verstärkten Apoptose- und Caspaseaktivierung kommt [68]. In NIH3T3 Zellen führt eine Interaktion von dem Tumorsuppressorprotein p53 mit dem Protein NS3 zu einer Unterdrückung der Actinomycin D-induzierten Apoptose [69].

Ferner interagiert HCV NS5A mit p53 und verhindert die p53-vermittelte Apoptose [70]. Außerdem soll das Protein NS5A die Hepatozyten vor dem TNF-induzierten Zelltod schützen, in dem es die Aktivierung der Caspase-3 verhindert [71]. Dieser Befund wurde im Jahre 2003 im Zellkulturmodell an Huh7-NS5A Zellen nochmals bestätigt. Hierbei ergaben die Untersuchungen, dass das NS5A Protein die TNF-induzierte Apoptose in Huh7-Zellen inhibiert. Desweiteren legen einige Daten dar, dass es durch die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs durch NS5A zu einem anti-apoptotischen Effekt kommt [72].

Für das HCV Protein NS2 legen Befunde nahe, dass NS2 die pro-apoptotische Funktion des Proteins *cell death-inducing DFF45-like effector b* (CIDE-B) inhibiert. CIDE-B ist ein Mitglied der Familie von Apoptose-induzierenden Faktoren. Durch einen Caspase-aktivierenden Weg kommt es zur Ausschüttung von Cytochrom c und dadurch zur Apoptoseaktivierung [73].

Das HCV Protein NS4A agiert als ein Kofaktor und ist an NS3 assoziiert. In den Untersuchungen am Zellkulturmodell in Huh7 Zellen wurde bestätigt, dass NS4A nicht ausschließlich am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, sondern auch alleine oder im Komplex mit NS3 an Mitochondrien nachgewiesen werden konnte. Die erhöhte Expression von NS4A führt letztendlich zu einem erhöhten mitochondrialen Transmembranpotential und dadurch zu einer Ausschüttung von Cytochrom c in das Zytoplasma. Die Aktivierung der Caspase-3 führt schließlich zu einer Caspase-8-unabhängigen, mitochondrial-vermittelten Apoptose [74].

### 1.1.7 Pro- und anti-apoptotische Proteine

Es gibt viele pro- und anti-apoptotische Proteine, die zu den Mitgliedern der *b-cell lymphoma 2* (Bcl-2)- Familie gehören. Im Jahre 1984 wurde Bcl-2 als ein Mitglied einer Apoptose-regulierenden Genfamilie identifiziert [75, 76]. Später konnten aufgrund von Wechselwirkungen mit Bcl-2 und Sequenzhomologien weitere Mitglieder der Bcl-2-Familie charakterisiert werden [77]. Die Zahl der Bcl-2 Familienmitglieder steigt heute immer noch stetig.

Zu der Bcl-2- Familie zählen Proteine, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Dazu gehören einerseits die pro-apoptotischen, andererseits die anti-apoptotischen

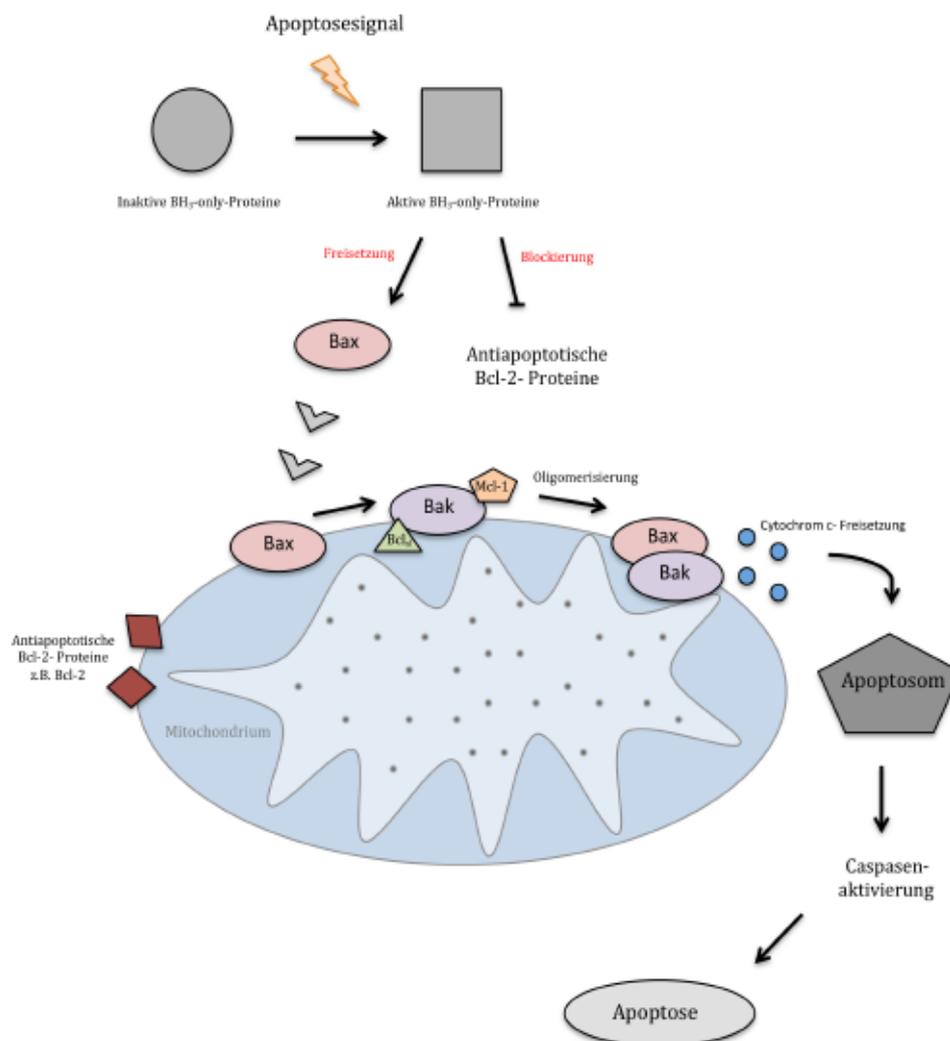
Proteine. Derzeit sind ca. 30 Mitglieder der Bcl-2- Familie in Säugerzellen identifiziert, von denen alle eine entscheidende Rolle bei der mitochondrial-vermittelten Apoptose spielen. Eine ihrer markantesten Gemeinsamkeiten ist die Fähigkeit, Homo- und Heterodimere zu bilden [78]. Kommt es zur Bildung von Heterodimeren zwischen anti- und pro-apoptotischen Mitgliedern dieser Familie, wird die biologische Aktivität des Partners inhibiert. So wird die pro-apoptotische Wirkung einiger Mitglieder der Bcl-2- Familie durch kompetitive Dimerisierung mit anti-apoptotischen Proteinen erreicht [78, 79].

Man klassifiziert die Mitglieder der Bcl-2- Familie in drei Gruppen, die sich anhand ihrer Funktion und Homologie differenzieren lassen:

1. Vier konservierte Bcl-2-homologe-Domänen (BHD) BH1-BH4: **anti-apoptotische Proteine** wie Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, A1/Bfl-1, Mcl-1
2. BH1- und BH2- und/oder die aminoterminal gelegene BH4-Domäne fehlen, nur die BH3-Domäne ist bei allen sogenannten **BH3-only Proteinen** vorhanden: **pro-apoptotische Proteine** wie Bik, Bid, PUMA/Bbc3, Noxa, Bim
3. Drei konservierte Bcl-2-homologe-Domänen BH1-BH3: **pro-apoptotische Proteine** wie Bax und Bak [80]

Die direkten Gegenspieler der anti-apoptotischen Proteine sind die *BH3-only* Proteine, die an der Apoptosekontrolle beteiligt sind. Kommt es zu einem apoptotischen Signal und zur *BH3-only* Proteinaktivierung, binden diese an die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine. Durch diese Bindung wird die Aktivität der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine neutralisiert und die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak werden freigesetzt [81]. Diese Bindung zwischen den pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen kommt dadurch zustande, dass die BH3-Domäne der anti-apoptotischen Proteine, die eine amphipathische  $\alpha$ -Helix besitzen, an die hydrophobe Tasche der anti-apoptotischen Proteine bindet [82, 83]. Die anti-apoptotischen Bcl-2-Mitglieder besitzen vier konservierte Bcl-2-homologe-Domänen. Die Domänen BH1-BH3 der anti-apoptotischen Bcl-2- Familie bilden durch Faltung eine kugelförmige Domäne mit einer hydrophoben Tasche („Bcl-2-Kern“) [84], während BH4 lediglich zur Stabilisierung der Domänen dient [85].

Alle pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie haben einen Einfluss auf die mitochondrial-vermittelte Caspasenaktivierung. Lokalisiert sind die Bcl-2-Proteine im Bereich der äußeren Mitochondrienmembran. Die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie stabilisieren diese, während die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine (Bax, Bak) zu einer Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran führen. Dies geschieht einerseits durch die Homodimerisierung und Oligomerisierung der Proteine Bax und Bak und andererseits durch allosterische Konformationsänderung. Durch die Interaktion kommt es zu einer Zerstörung des Membranpotentials [86]. Kontrolliert wird die Oligomerisierung von Bax und Bak durch die Interaktion mit den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, A1/Bfl-1 und Mcl-1 [80].



**Abb. 5: Pro- und anti-apoptische Proteine.** Durch ein Apoptosignal kommt es zur Aktivierung der BH<sub>3</sub>-only Proteine. Diese blockieren die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine und führen zusätzlich zur Freisetzung der Bcl-2-associated X proteins (BAX). Daraufhin kommt es zur Oligomerisierung von Bax

und *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (BAK) und zur Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran. Kontrolliert wird die Oligomerisierung von Bax und Bak durch die Interaktion mit den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, A1/Bfl-1 und Mcl-1. Weiterhin kommt es zu einer Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren wie Cytochrom c. Durch die Bildung des Apoptosoms werden weitere Caspasen aktiviert und die Apoptose in Gang gesetzt. (modifiziert nach Laura D. Osellame, et. al., Dez. 2012)

#### 1.1.7.1 *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA)

Eines der pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie, das in Zusammenhang dieser Doktorarbeit genauer betrachtet werden sollte, ist *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA). Dieses mitochondrial gelegene Protein, auch bekannt als *Bcl-2-binding component 3* (BBC3), gehört zu den *BH3-only*-Proteinen. Das PUMA Gen kodiert vier Proteine eines Transkripts, die durch alternatives *Splicing* entstehen. Dazu gehören PUMA  $\alpha/\beta/\gamma$  und  $\delta$ . PUMA $\alpha$  und PUMA $\beta$  besitzen eine BH3-Domäne, während PUMA $\gamma/\delta$  diese Domäne fehlt. Die BH3-Domäne ist verantwortlich für die Bindung von PUMA an die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xl [87].

Die Transkription von PUMA wird durch das nukleäre p53 beeinflusst [87, 88]. Dieser Transkriptionsfaktor (p53), ein Tumorsuppressorprotein, wird durch verschiedene zelluläre Signale wie onkogenen Stress oder DNA-Schäden induziert. p53 bindet dann als Tetramer an eine für ihn spezifische DNA-Sequenz und es kommt zur Transkription von Genen wie PUMA, Noxa und Bax, die einen Einfluss auf die Apoptose haben [88, 89].

Sowohl PUMA $\alpha$  als auch PUMA $\beta$  besitzen beide eine ähnliche Aktivität. Sie binden anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder, die dadurch ihren anti-apoptotischen Effekt verlieren [87]. Untersuchungen ergaben, dass der hydrophobe Teil der amphipathischen  $\alpha$ -Helix der *BH3-only*-Proteine an den hydrophoben Teil, gebildet von den BH1-3-Domänen des anti-apoptotischen Proteins, bindet [83, 90]. Die Aktivität der anti-apoptotischen Proteine wird neutralisiert. Sie können keine Interaktion mit Bax und Bak eingehen und können dadurch die Porenbildung an der äußeren Membran der Mitochondrien nicht verhindern.

Befunde legen dar, dass PUMA die Größe und Vielzahl von Lebertumoren beeinflusst. Dabei wurde die Rolle von PUMA bei der Diethylnitrosamine (DEN)-induzierten Leberkarzinogenese im Mausmodell untersucht. Desweiteren stellte man fest, dass durch die Inhibition von c-Jun N-terminale Kinase 1 (JNK1) die PUMA-induzierte Apoptose in Hepatozyten verhindert und die Proliferation und damit die chemische Leberkarzinogenese verstärkt wird [91].

PUMA wurde bereits mehrfach in Zusammenhang mit der Leber beschrieben, allerdings ist der Einfluss von Hepatitis C auf PUMA in Hepatozyten bisher nicht untersucht worden.

#### 1.1.8 *Activating transcription factor 2 (ATF-2) und seine Transkriptionsfamilie*

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an der Aktivierung oder Inhibierung der Transkription von Genen beteiligt sind. Dabei binden sie an die Promotorregion der Gene und vermitteln so den Start oder die Hemmung der Transkription der Zielgene.

*Activating transcription factor 2 (ATF-2)* ist einer von vielen Transkriptionsfaktoren, auch bekannt als *cAMP responsive element binding protein (CREB 2)*. Er gehört zur Familie der ATF/CREB Transkriptionsfaktoren. Im Jahre 1987 bekam der Transkriptionsfaktor ATF von *Lee et al.* seinen Namen. Damals ging man davon aus, dass dieses Protein an die *adenovirus early promoters E2, E3 und E4*, deren Sequenz als 'CGTCA' beschrieben wurden, bindet [92]. Im selben Jahr wurde auch das *cAMP responsive element binding protein (CREB)* benannt. *Montminy und Bilezikjian* stellten fest, dass dieses Protein an das *cAMP responsive element (CRE)* des Somatostatin-Promoters bindet [93]. Ein Jahr später wurde beschrieben, dass es sich bei der Bindungsstelle für ATF um die Sequenz 'TGACGT(C/A)(G/A)' handelt [94]. Es wurde deutlich, dass sowohl ATF als auch CREB die identische Sequenz 'TGACGTCA' erkennen und binden [95, 96]. Damit gehören sie gemeinsam zur Familie der ATF/CREB Transkriptionsfaktoren.

Die Zyklisierung von Adenosinmonophosphat (AMP) zu zyklischem AMP (cAMP) wird durch die membranständige Adenylatzyklase katalysiert. Viele hormonelle Regulationen des Stoffwechsels werden intrazellulär über den *second messenger* cAMP

vermittelt [97]. Wird nun in der Zelle der intrazelluläre cAMP Spiegel z.B. durch Sympatomimetika erhöht, kommt es zu einer vermehrten Aktivierung der Proteinkinase A. Vier Moleküle von cAMP binden an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A. Dadurch lösen sich die katalytischen von den regulatorischen Untereinheiten. Die katalytischen Untereinheiten können nun in aktivierter Form sowohl im Zytosol als auch im Zellkern ihrer Aufgabe nachgehen. Sie phosphorylieren Transkriptionsfaktoren und aktivieren sie damit. *cAMP response element binding protein* (CREB) wird am Serinrest 133 phosphoryliert [98]. Dieser Transkriptionsfaktor und die weiteren Mitglieder der Familie zeigten die stärkste Aktivierung bei einem erhöhten cAMP Spiegel [99].

Um nun aktivierenden oder auch inhibierenden Einfluss auf die Transkription von Zielgenen zu haben, bindet das phosphorylierte CREB mit Koaktivatoren an eine für ihn bestimmte Promotorregion, dem *cAMP-responsive element* (CRE). Diese Region wird allerdings auch von anderen Mitgliedern der *CRE-binding transcription* Familie erkannt und besetzt. Dazu gehört unter anderem die *activating transcription factor* (ATF)-Familie [100].

ATF-2 kann durch Phosphorylierung oder durch Assoziation mit viralen Proteinen, erstmals beschrieben an adenoviralem Protein E1A [101], aktiviert oder inhibiert werden. Die Phosphorylierung erfolgt unter anderem durch *stress-activated protein kinases* (SAPKs) wie *c-Jun N-terminal protein kinase* (JNK) und die p38-mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38<sup>MAPK</sup>).

Am C-terminalen Ende besitzt ATF-2 eine *basic leucine zipper*-Domäne (bZIP). Diese Region dient zur Proteindimerisierung und kann an vielen eukaryotischen DNA-Bindeproteinen gefunden werden. ATF-2 bildet Homodimere ebenso wie Heterodimere mit Mitgliedern der Jun-, Fos- und Maf-Transkriptionsfaktorfamilie und reguliert diverse zelluläre Funktionen. Im Kern kann es an eine DNA-Binderegion wie zum Beispiel das *cAMP responsive binding element* (CRE) binden und so die Transkription von Zielgenen beeinflussen.

### 1.1.9 Peroxisome-proliferator-activated receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )

Der intrazelluläre Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Expression von Zielgenen beteiligt ist und sich in die Isotypen PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 2 differenzieren lässt [102]. Er ist hauptsächlich im Kern lokalisiert und kann durch pharmakologische und physiologische Liganden aktiviert werden [103]. Als Heterodimer bindet PPAR $\gamma$  zusammen mit dem 9-cis-Retinoid x Rezeptor (RXR) [104] an die vorgesehene Regulatordomäne, dem *PPAR-response-element* (PPRE) und kontrolliert so die Expression verschiedener Gene, die an der Adipogenese, dem Lipidmetabolismus, der Immunantwort, der Insulinsensitivität, dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Erhaltung der Stoffwechsellhomöostase beteiligt sind [105, 106].

Die PPA-Rezeptoren spielen eine große Rolle bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten. Dazu zählt u.a. das metabolische Syndrom, das die Insulinresistenz, Glucoseintoleranz, Obesitas, Dyslipidämie, Hypertension, Arteriosklerose und Microalbuminurie beinhaltet [107, 108]. Desweiteren wird diskutiert, dass der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor an der Entstehung der Steatosis hepatis und des hepatozellulären Karzinoms beteiligt ist [109].

Mittlerweile sind in Säugetieren drei verschiedene PPAR-Isotypen identifiziert worden. Dazu zählen PPAR $\alpha$  (alias NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (alias NR1C2) und PPAR $\gamma$  (alias NR1C3). Während PPAR $\alpha$  überwiegend in der Leber, im Herzen, in der Niere und im braunen Fettgewebe vorkommt, kann PPAR  $\beta/\delta$  in allen Geweben des Körpers gefunden werden. PPAR $\gamma$  hingegen ist vorwiegend im Fettgewebe zu finden, wird jedoch auch in geringen Mengen im Herzen, in der Niere, der Leber und in Makrophagen exprimiert [103, 110].

PPAR $\gamma$  reguliert die Adipogenese und ist verantwortlich für den Lipidmetabolismus des Körpers sowie der Insulinsensitivität. Außerdem besitzt PPAR $\gamma$  eine antiinflammatorische Wirkung [111]. Im Jahre 2003 wurde beschrieben, dass PPAR $\gamma$  sowohl beim Zellwachstum als auch bei der Differenzierung, dem Zellzyklus und der Apoptose eine wichtige Rolle spielt [112].

Untersuchungen legen dar, dass bei einem hepatozellulären Karzinom die Expression von PPAR $\gamma$  variiert. Dabei ergab sich, dass die Expression von PPAR $\gamma$  sowohl erhöht [113], erniedrigt [9], als auch gleichbleibend [114] sein kann.

In diesem Zusammenhang machten zahlreiche *in vitro* Versuche zu PPAR $\gamma$  deutlich, dass eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  die Karzinogenese verschiedener Krebsarten, u.a. des hepatozellulären Karzinoms, hemmt [112, 115-119]. Eine Expression von PPAR $\gamma$  soll Metastasierungen und das invasive Tumorwachstum inhibieren [120].

In der Leber ergaben Untersuchungen, dass PPAR $\gamma$  als ein Tumorsuppressorgen agiert und die Apoptose induziert. Eine Überexpression von PPAR $\gamma$  führt zu einem Anstieg der Rezeptor- und mitochondrial-vermittelten Apoptose [115].

Die Transkription von PPAR $\gamma$  wird unter anderem über ATF-2 reguliert. Dabei kommt es über die p38<sup>MAPK</sup> zu einer Phosphorylierung von ATF-2, das daraufhin die Transkription von PPAR $\gamma$  beeinflusst. Desweiteren wird ATF-2 als ein wichtiger Regulator der Adipozytendifferenzierung beschrieben [121].

HCV Core Protein induziert eine Lipidakkumulation in der Leber über die Aktivierung von PPAR $\gamma$ . Dabei erhöht HCV Core Protein die transkriptionelle Aktivität von PPAR $\gamma$ , hat jedoch keinen Effekt auf dessen Genexpression [122]. Dieser Effekt konnte auch durch die HCV Proteine NS2 und NS5A bestätigt werden [123]. PPAR $\gamma$  führt daraufhin zur Transkription von Zielgenen, die an der Fettsäuresynthese der Leber beteiligt sind. In der Leber ist PPAR $\gamma$  für die Regulation der Lipidsynthese, des Lipidtransportes und der -speicherung innerhalb der Hepatozyten verantwortlich und begünstigt die Entwicklung einer hepatischen Steatose. So legen Befunde dar, dass eine verminderte mRNA Expression von PPAR $\gamma$  assoziiert ist mit einer Steatose bei HCV-infizierten Patienten. Dabei wurde auch die Rolle von PPAR $\gamma$  auf die Triglycerid-Akkumulation in Huh7 Zellen, transfiziert mit Genotyp 1b und 3a *Core* Protein, untersucht. Eine erhöhte Expression von HCV Core Protein (Genotyp 3a) verglichen mit HCV *Core* Protein (Genotyp 1b), führt zur einer vermehrten Triglycerid-Akkumulation und einer reduzierten mRNA Expression von PPAR $\gamma$  [124].

Desweiteren kann eine chronische HCV-Infektion zu einer Insulinresistenz führen. Das HCV *Core* Protein beeinflusst über Genotyp-spezifische Mechanismen den

intrazellulären Insulin-Signalweg. Es kommt dabei zu einer erniedrigten Proteinexpression des Insulin Rezeptor-1 (IRS-1) in Huh7 Zellen, die das *Core* Protein der Genotypen 3a und 1b exprimieren. Es wurde deutlich, dass das *Core* Protein (Genotyp 3a) durch die Herabregulation von PPAR $\gamma$  und des *Suppressor of Cytokine Signaling 7* (SOCS-7) die IRS-1 Degradierung und damit die folgende Insulinresistenz fördert [125].

### 1.1.10 Zielsetzung der Arbeit

Hepatitis C ist eine Viruserkrankung, die sich unter anhaltender Virusreplikation in einer chronischen Infektion mit über Jahrzehnte andauerndem Krankheitsverlauf äußert. Häufig kommt es erst sehr spät zur Entwicklung einer Leberzirrhose und Folgeerkrankungen wie dem hepatozellulären Karzinom. Das Virus muss daher im Laufe der Koevolution Mechanismen entwickelt haben, die Immunantwort des Wirts zu umgehen, Entzündungsreaktionen zu manipulieren und die Infrastruktur der Wirtszelle für seinen Lebenszyklus zu nutzen, ohne die Zelle dabei massiv in ihrer Viabilität zu beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, welchen Einfluss HCV auf die CREB/ATF Genexpression ausübt und welche funktionelle Relevanz sich daraus ergibt. Vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Dissertation von Sabine Eisenbürger) legen nahe, dass CREB-Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit eines subgenomischen HCV Replikons auf mRNA-Ebene unterschiedlich exprimiert werden. Desweiteren ergaben Untersuchungen (Dissertation von Erwin Brenndörfer), dass es zu einer konstitutiven Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 und einer vermehrten nukleären Präsenz von ATF-2 in Gegenwart eines subgenomischen HCV Replikons (Genotyp 1b) in nukleären Extrakten kommt.

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Befunde noch einmal zu bestätigen und herauszufinden, warum das Hepatitis C-Virus den Transkriptionsfaktor ATF-2 hochreguliert und welche funktionelle Relevanz sich daraus ergibt.

Es stellte sich die Frage, welchen Einfluss die HCV-vermittelte ATF-2 Aktivierung auf die Apoptosesensitivität ausübt. Desweiteren wurde untersucht, welchen Einfluss HCV über die Aktivierung von ATF-2 auf die Expression pro-apoptotischer Gene wie PPAR $\gamma$  und PUMA hat.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material, Substanzen und Lösungen

#### 2.1.1 Materialien für die Zellkultur

75 cm <sup>2</sup> Gewebekulturflaschen	Greiner; Solingen, Deutschland
6 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
10 cm Gewebekulturschalen	Falcon; Heidelberg, Deutschland
6-well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
96-well-Gewebekulturplatten	Nunc; Wiesbaden, Deutschland
Minisart Plus Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius; Göttingen, Deutschland

#### 2.1.2 Zellkulturmedien

DMEM/Nutrient Mix F-12	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma; München, Deutschland
FCS	Perbio; Bonn, Deutschland
G418 (Geneticin)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
PBS (w/o Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Cytogen; Sinn-Fleisbach, Deutschland

#### 2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien

Aprotinin	Sigma; München, Deutschland
Benzamidin	Sigma; München, Deutschland
Bradford Protein-Assay	BioRad; Hercules, USA

BSA	PAA-Laboratories; Linz, Österreich
Dharmafect 4	Dharmacon; Colorado, USA
DNase	Qiagen; Hilden, Deutschland
DTT	Sigma; München, Deutschland
EDTA	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Forskolin	Sigma; München, Deutschland
$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma; München, Deutschland
Leupeptin	Sigma; München, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Na-Pyrophosphat	Sigma; München, Deutschland
Perfabloc	Fluka; St. Gallen, Schweiz
Re-Blot Plus Strong	Chemicon; Temecula, USA
TNF $\alpha$ , human	Roche; Mannheim, Deutschland
Triton X-100	Merck; Darmstadt, Deutschland
Western Lightning Plus ECL	Perkin Elmer; Waltham, USA
Whatman-Paper	Schleicher-Schuell; Dassel, Deutschland
HiPerFect™ Transfection Reagent	Qiagen; Hilden, Deutschland
siGenome Non-Targeting siRNA Mix	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human ATF2 siRNA	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human CREB5 siRNA	Dharmacon; Colorado, USA
siGenome SMARTpool Human PPAR $\gamma$ siRNA	Dharmacon; Colorado, USA

### 2.1.4 Kits

QIAshredder Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland

### 2.1.5 Realtime- PCR

SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems; Foster City, USA
---------------------------	--------------------------------------

### 2.1.6 Primärantikörper und Sekundärantikörper

#### Primärantikörper

$\beta$ -Aktin	Abcam; Cambridge, UK
ATF-2	Cell Signaling; Danvers, USA
ATF-2 pThr71	Cell Signaling; Danvers, USA
GAPDH	Biodesign; Saco, USA
HCV NS3 [806]	Abcam; Cambridge, UK
HCV NS5A [H26]	Abcam; Cambridge, UK
PUMA $\alpha/\beta$ [H136]	Santa Cruz; Santa Cruz, USA
Lamin A/C	Cell Signaling; Danvers, USA
PARP	Cell Signaling; Danvers, USA
PPAR $\gamma$ [C26H12]	Cell Signaling; Danvers, USA

### Sekundärantikörper

HRP-anti-Maus DAKO; Hercules, USA

---

HRP-anti-Kaninchen DAKO; Hercules, USA

### Inhibitoren

Actinomycin D Sigma; München, Deutschland

Chemikalien zur Herstellung von Pufferlösungen, die hier nicht aufgeführt wurden, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Taufkirchen, Deutschland) oder Fluka (St. Gallen, Schweiz) mit den Substanz-Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen.

## 2.2 Methoden

**Tabelle 1 : Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Erläuterung	Kulturmedium	Zusätze
Huh7	Humane Hepatomazelllinie	DMEM/Nutrient Mix F-12	10% FCS
Huh9-13*	Humane Hepatomazelllinie Huh7, welche das subgenomische HCV (NS3-NS5B) Genom des Genotyps 1b enthält	DMEM/Nutrient Mix F-12	10% FCS 1mg/ml Geneticin

\* zur Verfügung gestellt von Ralf Bartenschlager, Heidelberg, Deutschland

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die humane Hepatomazelllinie Huh7 wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre in DMEM/Nutrient Mix F-12 + 10% komplement-inaktiviertem FCS kultiviert.

Auch die Kultivierung der humanen Hepatomazelllinie Huh 9-13, die das HCV-Replikon expremiert, erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer wassergesättigten Atmosphäre. DMEM/Nutrient Mix F-12 wurde allerdings bei Huh 9-13 mit 10% FCS und Geneticin (G418) 1mg/ml supplementiert.

Zur Vermeidung einer Besiedlung mit Mykoplasmen wurden die Zelllinien regelmäßigen PCR-basierten Screeningmethoden (VenorGeM, Minerva) unterzogen.

Die Zellen wurden zur Konservierung mit Einfriermedium (DMEM/Nutrient Mix F-12, 20% FCS, 10% DMSO) versetzt und in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Die Konfluenz der Zellen lag zum Zeitpunkt des Einfrierens bei 40-60% .

Die eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und in frisches Medium gegeben. Nach 4h erfolgte ein erneuter Mediumwechsel, um DMSO-Rückstände zu beseitigen.

#### **Transfektion von siRNA**

Bei der Transfektion werden kleine synthetische Moleküle, die sogenannte siRNA, in die Zelle eingeschleust. Diese Moleküle binden dann an komplementäre Sequenzen und können so eine post-transkriptionelle Herabregulation der Expression von Zielgenen bewirken.

Am Vortag wurden die benötigten Zellen auf 6-well-Platten ausgesät, um eine für die Transfektion ausreichende Konfluenz zu erhalten.

Die eigentliche Transfektion erfolgte daraufhin nach Vorschrift des Herstellers (*Dharmacon, Colorado, USA*).

Benötigt wurde ein 1x siRNA Puffer, den man durch Verdünnung eines 5x siRNA Puffer mit RNase freiem Wasser erhielt.

Der 1x siRNA Puffer wurde dazu verwendet, die spezifischen siRNA von 20 $\mu$ M auf 5 $\mu$ M zu verdünnen. Die Endkonzentration der siRNA lag bei 50nM.

Anschließend folgte die Herstellung der Transfektionsreagenzien. Eine Dharmafect Kontrolle, eine Kontrolle mit control siRNA und die gewünschte siRNA Probe wurden bereitgestellt und mit antibiotikafreiem OptiMEM gemischt. Desweiteren wurde das Transfektionsreagenz Dharmafect 4 in antibiotikafreiem OptiMEM aufgenommen.

- A1: 200 $\mu$ l antibiotikafreies OptiMEM/*well*  $\rightarrow$  Dharmafect Kontrolle
- A2: 20 $\mu$ l siRNA/*well* + 180 $\mu$ l antibiotikafreies OptiMEM/*well*  $\rightarrow$  spezifische siRNA
- A3: 20 $\mu$ l control siRNA/*well* + 180 $\mu$ l antibiotikafreies OptiMEM/*well*  $\rightarrow$  control siRNA
- B: 5 $\mu$ l Dharmafect/*well* + 195 $\mu$ l antibiotikafreies OptiMEM/*well*

Nach sorgfältiger Vermengung der Ansätze wurden diese anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 $\mu$ l B/*well* zu den Transfektionsreagenzien A1/A2/A3. Die Ansätze wurden wieder gut miteinander vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

1600 $\mu$ l antibiotikafreies Huh7 Medium/*well* wurde zu den Transfektionsansätzen gegeben und anschließend wurden diese nach Schema 2ml/*well* zu den vorbereiteten *wells* hinzugefügt.

Nach 6-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C, wurde das Medium durch neues antibiotikafreies Huh7 Medium ausgetauscht und die Zellkultur 72 Stunden weiter kultiviert. Mediumwechsel mit antibiotikafreiem Huh7 Medium erfolgte im 24-stündigem Rhythmus. Nach 48-72h konnten die Versuche durchgeführt werden.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### **Isolierung von mRNA**

Die Zellen, auf 6-well-Platten oder auch 6cm-Gewebekulturschalen kultiviert, wurden in 350µl RLT Puffer, 1:100 versetzt mit  $\beta$ -Mercaptoethanol, lysiert und anschließend mit einem Polyethylen-Zellschaber geerntet.

Das QIAshredder Kit der Firma Qiagen wurde im Weiteren dazu genutzt, die hergestellten Lysate zu homogenisieren. Im Anschluss wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben die RNA isoliert. Mit einer anschließenden spektralphotometrischen Methode (Extinktion von 260nm / 280nm) mittels NanoDrop 1000 der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration.

### **cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels QuantiTect Reverse Transcription Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Dabei wurden 1µg mRNA für die Herstellung der cDNA eingesetzt.

Eine Probe wurde ohne Zugabe von Reverser Transkriptase als Kontrollprobe verwendet. Zum Schluss erfolgte eine Verdünnung der cDNA mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:6.

### **Realtime PCR**

Die *Realtime* PCR ist eine Methode, die darauf beruht, die Expression der spezifischen Zielgene quantitativ zu bestimmen. Das Verfahren der *Realtime* PCR basiert auf der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion. Dabei wird die Menge der amplifizierten DNA gemessen.

Indem der DNA-Farbstoff SYBR Green I an die doppelsträngige DNA bindet, kann die Vervielfältigung der PCR-Produkte ermittelt werden. Hierbei ist die Fluoreszenz proportional zur Zunahme der PCR-Produkte.

Die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wird verwendet, um die Quantifizierung der DNA-Moleküle zu bestimmen. Dabei werden  $\text{CT}$ -Werte ermittelt, die den Beginn des exponentiellen Anstiegs einer Kurve beschreiben. Der Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz des DNA-Farbstoffkomplexes zum ersten mal exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt, wird als  $\text{C}_\text{T}$ -Wert (*cycle threshold*) beschrieben. Hier ist der Zustand der optimalsten Reaktionsbedingung anzunehmen.

1,2  $\mu\text{l}$  cDNA, je 1  $\mu\text{l}$  (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) Forward- und Reverse-Primer, sowie 12,5  $\mu\text{l}$  SYBR Green wurden in jedes *well* einer 96-*well* Platte pipettiert.

Die Realtime PCR erfolgte dann mittels des ViiA7 Real-Time PCR Systems der Firma Applied Biosystem nach Herstellerangabe.

Die Schmelzkurven-Analyse diente anschließend dazu, unspezifische PCR-Produkte oder auch entstandene Primer-Dimere von spezifischen PCR-Produkten zu unterscheiden.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels des  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Verfahrens. Dabei wurde die humane SDHA (Succinatdehydrogenase) als Referenzwert verwendet. Die Berechnung erfolgte, indem der  $\text{CT}$ -Wert des Referenzgens hSDHA (*Housekeeping-Gen*) vom  $\text{C}_\text{T}$ -Wert des vervielfältigten DNA Fragmentes subtrahiert wurde.

Tabelle 2 Oligonukleotide für die RT-PCR

Primer-Name		Sequenz von 5' → 3'
ATF-2	for	ccaacgaggatcatttggtg
ATF-2	rev	tctgttggtgttgggtctg
Creb5	for	gcagaagaactcaccagaca
Creb5	rev	tggctgttattgggcagtct
hSDHA	for	agatgtggtgtctcggtcgat
hSDHA	rev	cgatgatctttctcaggcca
NS3	for	aggtggctctgtccagcact
NS3	rev	gggatggccttgccataaaa
NS5A	for	aattattctagggcgctgtgg
NS5A	rev	gagctgtgaccaaccaggt
NS5B	for	tggccctttacgatgtggtc
NS5B	rev	attcaccaggaactcgacct
PUMA	for	gacgacctcaacgcacagta
PUMA	rev	ggtaagggcaggagtcccat
PPAR $\gamma$	for	gggcgatcttgacaggaaag
PPAR $\gamma$	rev	ggggatgatgtttgaacttgat
Bcl-XL	for	tgcgtggaaagcgtagacaa
Bcl-XL	rev	tccaaggctctaggtggtca
CREB1	for	tccacaagtccaacagttcag
CREB1	rev	tcccttcgcttttgggaatca
CREB3	for	gtagaaaagaggggaccaga
CREB3	rev	aataagcccctccttctcaa
CREBBP	for	ggtttccccgcaaatgactg
CREBBP	rev	gcttgactaaagggctgtcca

### 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### Herstellung von Kernextrakten

Für die Ernte von Kernextrakten wurden die kultivierten Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS w  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , versetzt mit 100  $\mu\text{M}$  Natrium-Orthovanadat, gewaschen. Mit einem Polyethylen-Zellschaber wurden die Zellen geerntet und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5ml) überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 2min bei 14.000rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das zurückgebliebene Pellet mit 400  $\mu\text{l}$  hypoosmolarem Puffer A (10 mM HEPES-KOH pH 7,9; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) resuspendiert. Eine Inkubation von 10min folgte.

Nach dieser Zeit wurde wieder eine 2-minütige Zentrifugation bei 14.000rpm und 4°C durchgeführt. Auch danach wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet mit 100µl des Puffers C (20 mM HEPES-KOH pH 7,9; 420 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA pH 8,0; 25 % Glycerin; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) resuspendiert. Eine Inkubationszeit von 30 Minuten mit dem Hochsalzpuffer C diente dazu, die Proteine aus dem Zellkern zu extrahieren.

Alle aufgeführten Schritte erfolgten auf Eis. Im Anschluss wurden mittels Protein-Assay von Bio-Rad die Proteinkonzentrationen nach Bradford bestimmt.

### Zellyse

Die Proteinernte erfolgte, indem die kultivierten Zellen zuerst mittels eiskaltem PBS w Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, das mit Natrium-Orthovanadat (0,1mM) versetzt wurde, einmal gewaschen wurden. Dann wurde ein modifizierter Triton-Lyse-Puffer (1% Triton X-100, 20mM Tris/HCl pH 7,4, 5µg/ml Aprotinin, 4mM Benzamidin, 2mM EDTA, 10% Glycerol, 50mM β-Glycerolphosphat, 5µg/ml Leupeptin, 136mM NaCl, 20mM Natrium-Pyrophosphat, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,2mM Pefabloc, 0,2% SDS) auf die Zellen gegeben, um die anschließende Lyse zu gewährleisten. Die Konfluenz der Zellen und damit auch die Größe der Gewebekulturschalen bestimmten dabei die Menge des Lyse-Puffer zwischen 80µl und 150µl.

Mit einem Polyethylen-Zellschaber wurden die Zellen geerntet und in ein vorgesehenes Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5ml) überführt. Alle Schritte erfolgten auf Eis.

Die Proteinproben wurden anschließend gevortext und 10 Minuten zur vollständigen Lyse der Zellen auf Eis inkubiert.

Eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000rpm und 4°C schloss sich an und die Überstände wurden dann in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5ml) gegeben. Die Lysate wurden auf ihre Proteinkonzentration mittels Protein-Assay von Bio-Rad nach Bradford überprüft und für die SDS-Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese) verwendet.

### **Proteinbestimmung nach Bradford**

Mittels des Protein-Assays von Bio-Rad wurde die Proteinkonzentration nach Bradford nach Herstellerangaben bestimmt. Das Absorptionsmaximum des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 verschiebt sich von 465nm auf 595nm, sobald der Farbstoff mit Proteinen in saurem Milieu in Berührung kommt. Bei diesem Verfahren wurden die Proteinmengen mittels Ultrospec Photometer (2100pro) der Firma Amersham photometrisch quantifiziert.

### **SDS-Page und Western Blot**

Zur Analyse der Proteine wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-Page) verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass sich die Proteine proportional zu ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld auftrennen. Zu Beginn wurden die Proteinlysate in 4xLäemli-Puffer (250mM Tris/HCl pH 6,8, 40% Glycerol, 5% SDS, 0,002% Bromphenolblau, 8%  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und damit denaturiert. Jede Spur erhielt die gleiche Proteinmenge.

SDS-Polyacrylamidgele dienen dazu, die Auftrennung der Proteine im Gelelektrophoresesystem der Firma Biometra zu ermöglichen. Je nach zu detektierender Proteingröße besaßen die Trenngele PAA-Konzentrationen zwischen 8 % und 12 %.

Im Sammelgel wurde eine Spannung von 100 Volt und im Trenngel eine Spannung von 160 Volt angelegt. Als Proteinmarker wurde Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standard der Firma BioRad ausgewählt.

Das Semidry-Blotting-Prinzip diente dazu, die Gele nach der Auftrennung der Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran der Firma Amersham in einer Elektroblotting-Apparatur (Biometra) zu überführen.

Das Whatman-Papier (Schleicher & Schuell) wurde in Anoden- und Kathodenpuffer getränkt, um den Stromfluss zwischen den Elektroden zu gewährleisten.

- (1) Anodenpuffer I: 0,3M Tris, 20% Methanol
- (2) Anodenpuffer II: 0,025 M Tris, 20% Methanol
- (3) Kathodenpuffer: 0,04 M 6-Amino-capronsäure, 20% Methanol

Nach dem Transfer ist die PVDF Membran 10 Minuten in TBS-T gewaschen und die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen mit 5% BSA/TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt worden. Anschließend folgte der Primärantikörper in geeigneter Verdünnung, der bei 4°C über Nacht auf die Membran gegeben wurde. Unter ständiger Bewegung auf einem Rollschüttler konnte die Membran vollständig mit dem Primärantikörper benetzt werden, um so den Antikörper gezielt an das gewünschte Protein binden zu lassen. Es folgten drei Waschschrte in TBS-T, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Der spezifische Sekundärantikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben und anschließend erfolgten wieder drei Waschschrte in TBS-T.

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Lightning Chemoluminescence Reagent Plus (PerkinElmer). ECL-Filme (GE Healthcare) wurden genutzt, um die Lichtemission der Chemolumineszenz zu fixieren. Ausgangsstoff der Chemolumineszenz ist Luminol (3-Amino-Phthalsäurehydrazid). Zur Filmentwicklung wurde die Entwicklmaschine der Firma Kodak verwendet.

Um weitere Immundetektion zu ermöglichen, wurden die Membranen mit ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Millipore) gestrippt und erneut mit einem Primärantikörper inkubiert.

### 2.3 Analyse der Daten & statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mittels der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Ergebnisse relativ zur unstimulierten Kontrolle wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des ANOVA Tests berechnet ( $p < 0,05$ ).

## 2.4 Humane Leberproben

Das humane Lebergewebe wurde aufgrund von Tumorresektionen im Rahmen einer Hemihepatektomie/Lobektomie gewonnen. Dabei wurde nur der tumorfreie Präparatbereich verwendet.

Alle verwendeten Proben wurden nach den Richtlinien der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie der Deklaration von Helsinki gewonnen. Zu jeder Probe liegt eine vor Probenentnahme unterzeichnete Einwilligung der Patienten vor. Die im Rahmen humanchirurgischer Eingriffe entnommenen Proben, wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Schulte am Esch zur Verfügung gestellt. Die Entnahme von Lebergewebe wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf am 02.02.2007 unter der Studiennummer 2852 und dem Amendment vom 08.10.2009 genehmigt.

Die mRNA und cDNA-Synthese erfolgte wie in 2.2.2 beschrieben. Die cDNA der humanen Leberproben wurde mir von Herrn Dr. Christian Ehlting zur Verfügung gestellt.

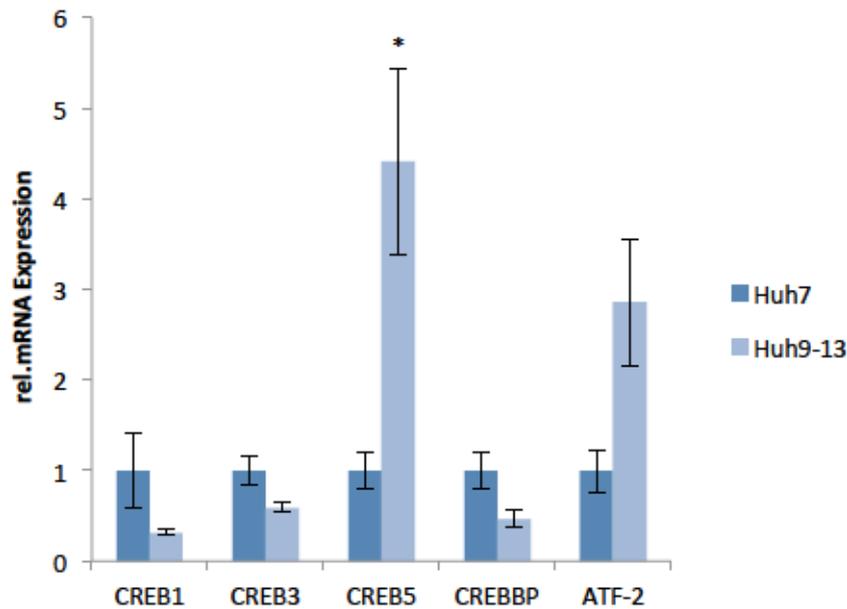
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 HCV induziert die mRNA Expression von CREB5 und ATF-2

Vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Dissertation von Frau Dr. Sabine Eisenbürger & Herrn Dr. Erwin Brenndörfer) legen nahe, dass die Expression von CREB-Transkriptionsfaktoren durch die Anwesenheit eines subgenomischen HCV Replikons (Genotyp 1b) auf mRNA-Ebene beeinflusst wird. In eigenen Untersuchungen konnte ebenfalls eine gesteigerte Expression von ATF-2 in Anwesenheit eines subgenomischen HCV Replikons (Genotyp 1b) belegt werden.

Für den Versuch wurden die humane Hepatomazelllinie Huh7 (Kontrollzellen) und die humane Hepatomazelllinie Huh9-13, die das subgenomische HCV Genom des Genotyps 1b exprimieren, verwendet. Durch die Isolierung der mRNA aus Gesamtzelllysat und die anschließende Synthese der cDNA (Kapitel 2.2.2) konnte die mRNA Expression von CREB1, CREB3, CREB5, CREBP und ATF-2 mittels *Realtime* PCR analysiert werden. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode angewandt.

Die in der Abbildung 6 wiedergegebenen Ergebnisse machen deutlich, dass ATF-2 und CREB5 in Anwesenheit des subgenomischen HCV Replikons deutlich verstärkt exprimiert werden. CREB1 und CREB3 sowie CREBBP hingegen werden schwächer exprimiert.



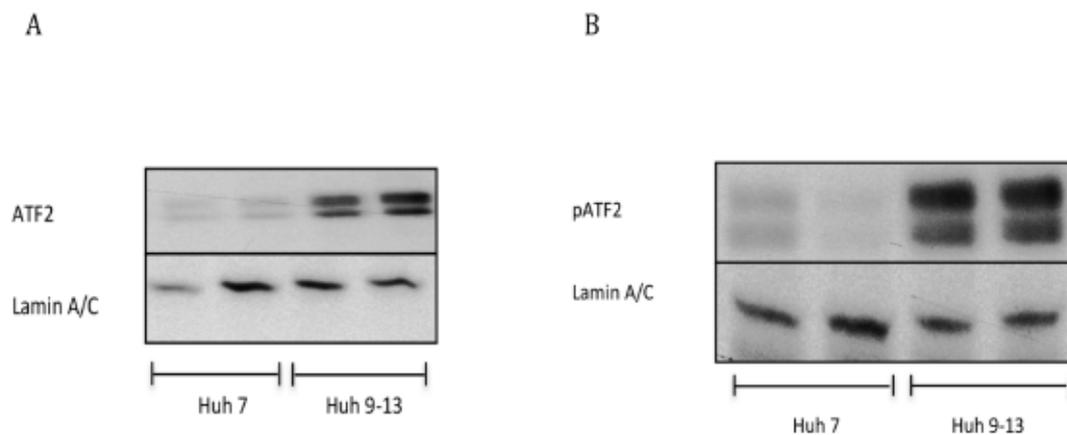
**Abb. 6: HCV beeinflusst die Expression der verschiedenen CREB-Isoformen.** In den Säulendiagrammen werden Huh7 Kontrollzellen als dunkelblaue Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als hellblaue Säulen dargestellt. Analyse der aus Gesamtzelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von CREB1, CREB3, CREB5, CREBBP (CREB Binding Protein) und ATF-2 mittels RT-PCR. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mittels der  $\Delta\Delta CT$ -Methode. Wiedergeben sind die Ergebnisse relativ zur unstimulierten Kontrolle. Diese wurde auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Die Signifikanz (\*) wurde mit Hilfe des ANOVA Tests berechnet ( $p < 0,05$ ). Die hier dargestellten Daten zum Einfluss des HCV Replikons auf die Expression von CREB1, CREB3, CREB5 und CREBP wurden freundlicher Weise von Frau Dr. Sabine Eisenbürger zur Verfügung gestellt.

Daraufhin stellte sich die Frage, welche funktionellen Relevanzen sich durch die HCV verstärkte mRNA Expression von CREB und ATF-2 ergeben.

Basierend auf dem Vorbefund wurden weitere Untersuchungen zur Expression von ATF-2 mittels Western Blot auf Proteinebene durchgeführt. Um hier die nukleär translozierten Fraktionen elektiv zu erfassen, wurden Kernextrakte von unstimulierten, humanen Kontrollzellen Huh7 und unstimulierten, humanen Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon Genotyp 1b enthalten, hergestellt (Kapitel 2.2.3). Wie in Abb. 7 dargestellt, kommt es im Vergleich zu Kontrollzellen auch auf Proteinebene zu einer verstärkten nukleären Präsenz von ATF-2 in Zellen, die das HCV Replikon

beherbergen. Dies geht mit einem Anstieg der Verfügbarkeit von phosphoryliertem ATF-2 einher (Abbildung 7B).

In Gegenwart des subgenomischen HCV Replikons kommt es zu einer vermehrten Proteinexpression und verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2.



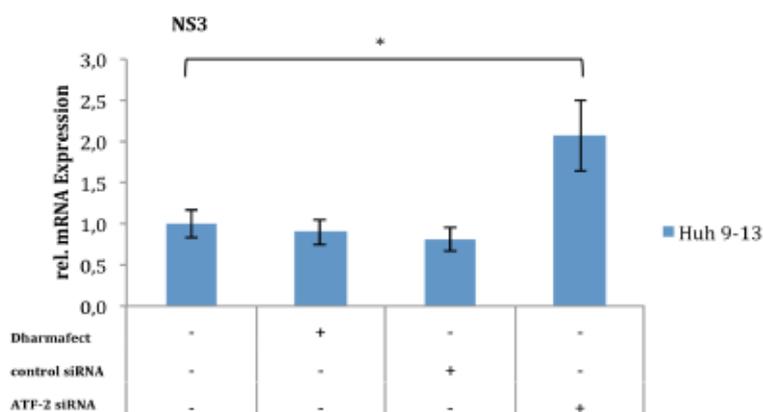
**Abb. 7:** Die nukleäre Translokation von ATF-2 sowie die ATF-2-Aktivierung sind in Gegenwart des subgenomischen HCV Replikons verstärkt. Zellkernextrakte wurden aus Huh7 Kontrollzellen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon (Genotyp1b) enthalten, isoliert und durch Auftragung von 20µg Protein mittels Western Blot auf A die Gesamt-Proteinexpression von ATF-2 und B die Aktivierung von ATF-2 analysiert. Lamin A/C diente als Ladekontrolle. Die Membran wurde zwischen den Detektionen mit *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution* für 15 Minuten gestriipt.

### 3.2 ATF-2 hemmt die virale Replikation

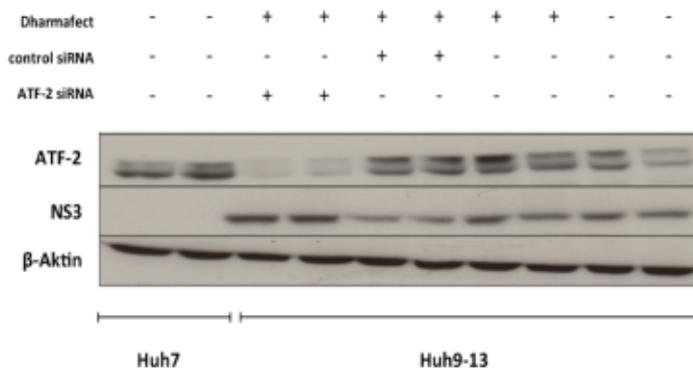
In den folgenden Untersuchungen sollte die Bedeutung der verstärkten Aktivierung von ATF-2 für die virale Replikation untersucht werden. Hierzu wurde eine posttranskriptionelle Hemmung der Expression des Transkriptionsfaktors ATF-2 mittels spezifischer siRNA (*Knockdown*) herbeigeführt. Nach Isolierung der mRNA und anschließender cDNA-Synthese, wurde die mRNA-Expression des HCV-Replikons mittels RT-PCR untersucht. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode angewandt. Für die Untersuchung auf Proteinebene erfolgte ebenfalls eine Hemmung der Expression von ATF-2 mittels spezifischer siRNA (*Knockdown*).

Anschließend wurde die Proteinexpression von HCV NS3 im Western Blot exemplarisch ausgewertet. Übereinstimmend mit der Heraufregulation der HCV mRNA (Abbildung 8A) kommt es nach *Knockdown* von ATF-2 zu einer verstärkten Expression von NS 3 (Abbildung 8B). Diese Experimente legen nahe, dass die Aktivierung von ATF-2 inhibitorisch auf die virale Replikation wirkt.

A



B



**Abb. 8: ATF-2 Knockdown hat einen Einfluss auf die virale Replikation.** Transfektion von Huh9-13 Zellen mit Kontroll-siRNA (50nM) bzw. ATF-2-siRNA (50nM) für 72h. A Analyse der aus Gesamtzelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von HCV NS3 mittels RT-PCR. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mittels der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Wiedergeben sind die Ergebnisse relativ zur unstimulierten Kontrolle. Diese wurde auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Die Signifikanz (\*) wurde mit Hilfe des ANOVA Tests berechnet ( $p < 0,05$ ) B Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot auf die Expression der viralen Nicht-Strukturproteine NS3 analysiert. Die Bestimmung von  $\beta$ -Aktin erfolgte zur

Beladungskontrolle. Die Membran wurde zwischen den Detektionen mit ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution für 15 Minuten gestrippt.

### 3.3 Actinomycin D/ TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose

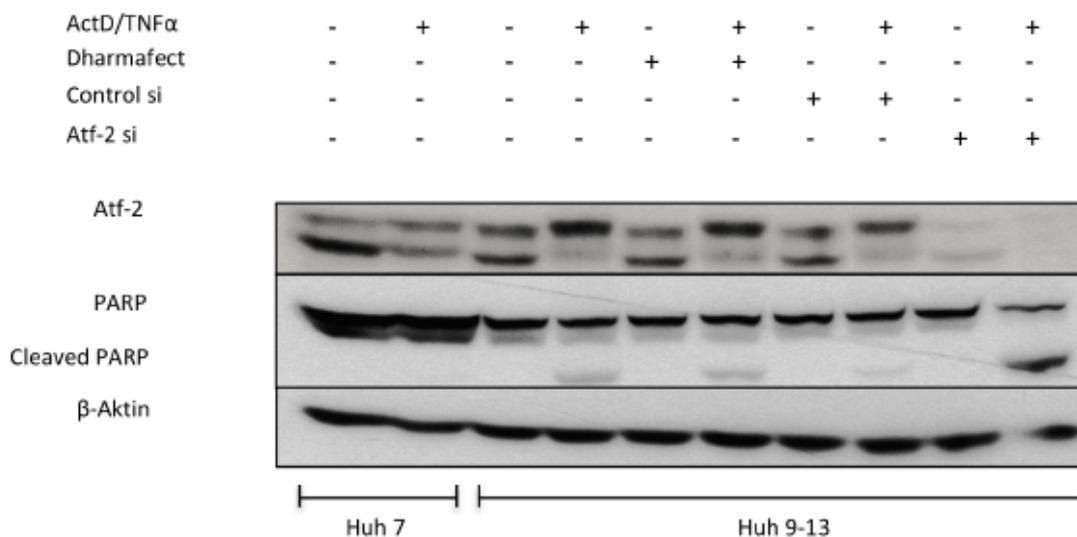
Die oben ausgeführten Daten legen nahe, dass ATF-2 kein für die virale Replikation essentieller Wirtsfaktor ist. Die Daten lassen vielmehr annehmen, dass die verstärkte Aktivierung von ATF-2 durch HCV einen inhibitorischen Einfluss auf die virale Replikation hat. Um zu klären, ob HCV über die Regulation der ATF-2 Expression das zelluläre Überleben beeinflusst, wurde in weiteren Schritten untersucht, ob ATF-2 die Sensibilität der Zelle gegen pro-apoptische Stimuli beeinflusst. Hierzu wurde der Transkriptionsinhibitor Actinomycin D in Verbindung mit TNF $\alpha$  eingesetzt. TNF $\alpha$  ist ein Zytokin, welches unter anderem von Makrophagen ausgeschüttet wird und an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt ist. TNF $\alpha$  kann unter anderem sowohl die Apoptose, als auch die Zellproliferation anregen und wurde bei dem folgenden Versuch in Kombination mit einem Transkriptionsinhibitor zur Induktion der Apoptose eingesetzt.

Die Daten vorausgegangener Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Dissertation Frau Dr. Patricia Cebula) machten deutlich, dass bei den hier verwendeten Zelllinien TNF $\alpha$  alleine nicht in der Lage ist, die Apoptose zu induzieren, sondern nur in Kombination mit dem Translationsinhibitor Actinomycin D zu einer Apoptoseinduktion führt.

Huh9-13 Zellen, die für 72 Stunden mit spezifischer siRNA gegen ATF-2 behandelt wurden oder untransfiziert blieben, sowie Huh7 Kontrollzellen, wurden mit Actinomycin D- (100 ng/ml) und TNF $\alpha$  (10ng/ml) für 8 Stunden inkubiert. Die Analyse der Protein-expression erfolgte mittels Western Blot. Der ATF-2 *Knockdown* führt verglichen mit kontroll-transfizierten Replikonzellen zu einer verstärkten Actinomycin D/TNF $\alpha$ -induzierten Spaltung von Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP). In Huh7 Kontrollzellen hingegen führt die Behandlung mit Actinomycin D/TNF $\alpha$  zu keiner Spaltung von PARP und damit nicht zur Induktion einer Apoptose.

PARP ist ein Protein, das im Nukleus lokalisiert ist. Kommt es zu einzelsträngigen DNA Brüchen, hat PARP die Aufgabe, diese aufzufinden, zu stabilisieren und an das enzymatische Reparatursystem weiterzugeben. Damit spielt PARP eine große Rolle im DNA-Reparatursystem, kann jedoch über die Effektorcaspase-3 gespalten und inaktiviert werden.

Diese Befunde legen nahe, dass die Präsenz des HCV-Replikons zu einer Sensibilisierung der betroffenen Zellpopulation gegenüber pro-apoptischen Stimuli führt. Dieser Effekt wird zumindest partiell durch die verstärkte, HCV-induzierte Aktivierung von ATF-2 kompensiert.



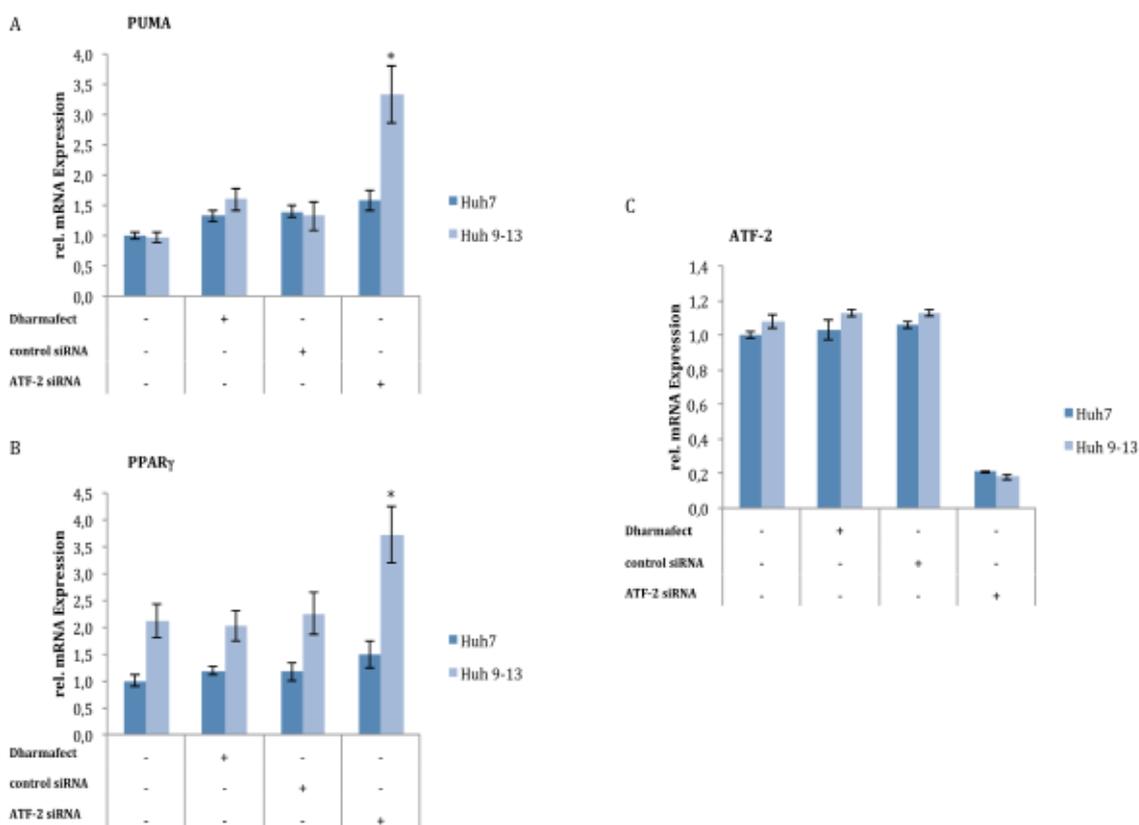
**Abb. 9:** Die ATF-2 Aktivierung durch das Hepatitis C-Virus moduliert die Apoptosesensitivität der Zellen. Transfektion von Huh9-13 Zellen mit Kontroll-siRNA (50nM) bzw. ATF-2-siRNA (50nM) für 72 Stunden und anschließend 8-stündige Behandlung der Zellen mit Actinomycin D (100ng/ml)/ TNF $\alpha$  (10ng/ml). Gesamtproteinextrakte wurden aus Zellen isoliert und mittels Western Blot analysiert. Die Bestimmung von  $\beta$ -Aktin erfolgte zur Beladungskontrolle. Die Membran wurde zwischen den Detektionen mit ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution für 15 Minuten gestriipt.

### 3.4 ATF-2 hemmt die HCV-induzierte Expression pro-apoptischer Gene

Die vorangehenden Daten legen nahe, dass die Aktivierung von ATF-2 durch HCV die Wirtszelle vor einer HCV-bedingten Sensibilisierung gegenüber pro-apoptischen Stimuli schützt. Es lag daher nahe, die Regulation von ATF-2-abhängigen Zielgenen zu untersuchen, die bekanntermaßen die Apoptosesensibilität der Zelle beeinflussen. Hierzu wurde zunächst die Hypothese geprüft, ob ATF-2 die Expression pro-apoptischer Gene wie PUMA und PPAR $\gamma$  unterdrückt und hierdurch anti-apoptische Effekte vermittelt.

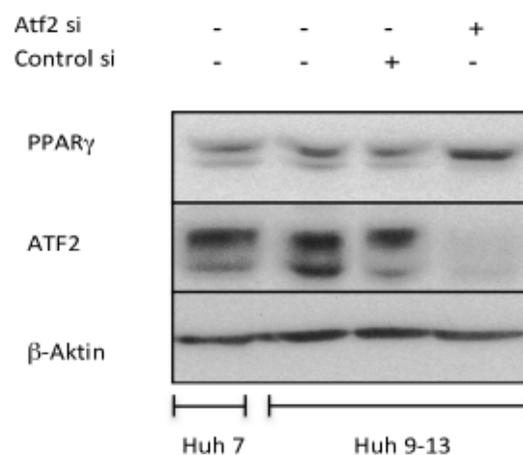
Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Expression des Transkriptionsfaktors ATF-2 in Huh9-13 Replikonzellen mittels spezifischer siRNA herabreguliert. Nach Isolierung der mRNA und anschließender cDNA-Synthese, wurde die mRNA-Expression von PUMA und PPAR $\gamma$  mittels RT-PCR untersucht. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode angewandt. Dabei stellte sich heraus, dass die verminderte ATF-2 Expression einen Anstieg der Expression dieser Gene zufolge hat.

Die Expression von PPAR $\gamma$  wird auf Transkriptionsebene durch HCV geringfügig hochreguliert. Dieser Effekt wird durch den *Knockdown* von ATF-2 deutlich verstärkt. Die vorliegenden Daten machen deutlich, dass HCV selbst die Expression pro-apoptischer Gene wie PUMA oder PPAR $\gamma$  heraufreguliert, diesen Effekt jedoch zumindest partiell über die verstärkte nukleäre Translokation und Aktivierung von ATF-2 gegenreguliert.



**Abb. 10: HCV reduziert die mRNA Expression der pro-apoptischen Faktoren PUMA und PPAR $\gamma$  über die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors ATF-2.** In dem Säulendiagramm werden Huh7 Kontrollzellen als dunkelblaue Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als hellblaue Säulen dargestellt. Für A, B und C wurden Huh9-13 Zellen mit Kontroll-siRNA (50nM) bzw. ATF-2-siRNA (50nM) für 72 Stunden transfiziert. Die Analyse der aus Gesamt-Zelllysaten isolierten mRNA auf die Expression von PUMA und PPAR $\gamma$  und ATF-2 erfolgte mittels RT-PCR. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mittels der  $\Delta\Delta CT$ -Methode. Wiedergeben sind die Ergebnisse relativ zur unstimulierten Kontrolle. Diese wurde auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Die Signifikanz (\*) wurde mit Hilfe des ANOVA Tests berechnet ( $p < 0,05$ ).

Übereinstimmend mit den Befunden aus der Analyse der Transkriptexpression konnte die verstärkte Expression von PPAR $\gamma$  nach Suppression der Expression von ATF-2 auch auf Proteinebene bestätigt werden. Für die Untersuchung auf Proteinebene erfolgte ebenfalls eine posttranskriptionelle Hemmung der Expression des Transkriptionsfaktors ATF-2 mittels spezifischer siRNA (*Knockdown*). Anschließend wurde die Proteinexpression von PPAR $\gamma$  im Western Blot ausgewertet.



**Abb. 11: ATF-2 *Knockdown* in HCV-Replikonzellen führt zu einer verstärkten Proteinexpression von PPAR $\gamma$ .** In den Säulendiagrammen wurden Huh7 Kontrollzellen als dunkelblaue Säulen und Huh9-13 Zellen, die das subgenomische HCV Replikon enthalten, als hellblaue Säulen dargestellt. Es wurden Huh9-13 Zellen mit Kontroll-siRNA (50nM) bzw. ATF-2-siRNA (50nM) für 72 Stunden transfiziert. Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot auf die Expression von PPAR $\gamma$  analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Membran wurde zwischen den Detektionen mit ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution für 15 Minuten gestriipt. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei vergleichbare Experimente.

### 3.5 Die mRNA- Expression von ATF-2 und PPAR $\gamma$ in humanen HCV-infizierten Leberzellen

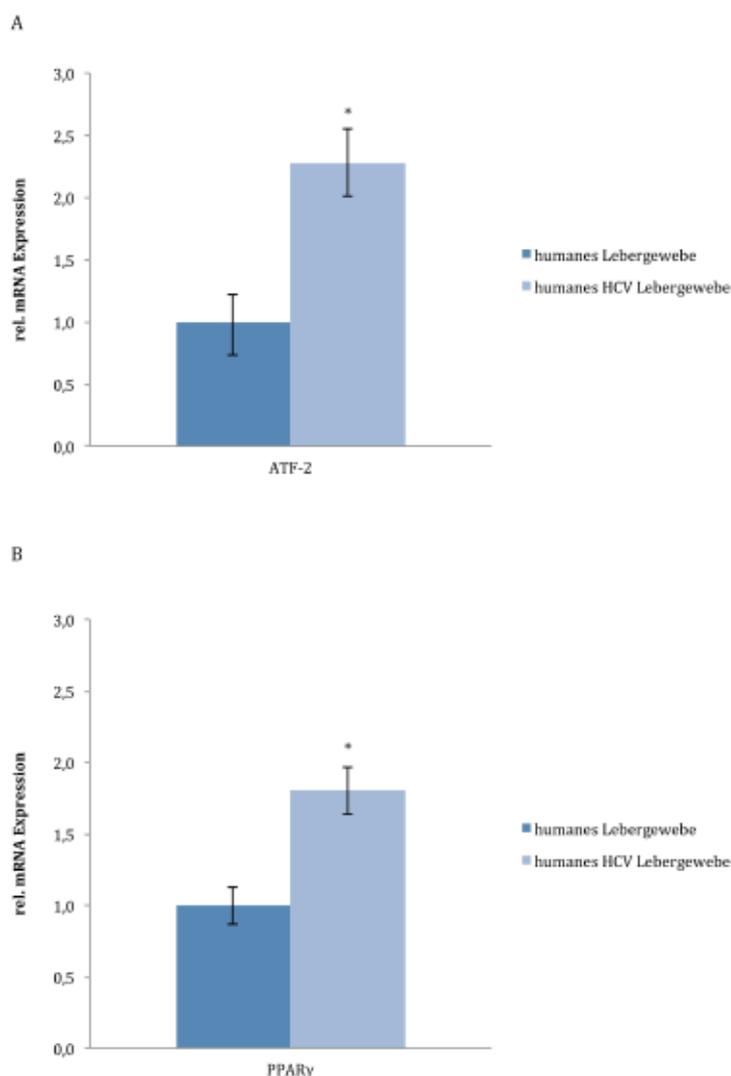
Um das grundlegende Ergebnis der erhöhten Expression von ATF-2 im HCV Replikonmodell zu untermauern, wurde an cDNA-Proben, die aus humanen, nicht infizierten und HCV-infizierten Leberproben isoliert wurden, die Expression von ATF-2 und PPAR $\gamma$  untersucht. Die Proben wurden mittels *Realtime* PCR analysiert und die Ergebnisse anschließend mit Hilfe der  $\Delta\Delta$ CT-Methode ausgewertet.

Die im Rahmen tumor-chirurgischer Eingriffe an chronisch HCV-infizierten oder nicht infizierten Patienten mit Tumoren der Leber entnommenen Proben, wurden durch Herrn Prof. Schulte am Esch im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Die Entnahme von Lebergewebe wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf am 02.02.2007 unter der Studiennummer 2852 und dem Amendment vom 08.10.2009 genehmigt.

Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose	Histologie	ALT	Bilirubin	Quick
1	männlich	61	Leberzirrhose CHILDB,HCC(G1)	feinkörnige Leberzirrhose	28	0,77	geronnen
2	männlich	35	HCV	keine Fibrose, Steatosis Hepatis	34	0,86	106
3	männlich	72	HCV (1b) HBV,HAV, HCC	ohne Leberzirrhose	25	0,33	90
4	weiblich	69	HCC	Leberzirrhose	86	0,9	84
5	Männlich	36	HCV	mäßige periduktale Fibrose	60	0,77	106
6	weiblich	53	HCC, Pankreas CA	keine Zirrhose, Steatosis Hepatis	20	0,27	85
7	weiblich	79	Intrahepatisches Gallengangskarzinom	normales Leberparenchym, keine Fibrose	75	0,46	104
8	weiblich	46	Fokale noduläre Leberhyperplasie	keine Leberzirrhose			
9	männlich	74	Gallenblasenkarzinom	keine Leberzirrhose	203	0,68	39
10	männlich	87	Lebermetastase	normales Lebergewebe	24	0,64	75

**Tabelle 3: Patientendaten zu den in Abb. 12 eingesetzten humanen Leberproben.** Abkürzungen: HAV: Heaptitis A Virus; HBV: Hepatitis B Virus; HCV: Hepatitis C-Virus; HCC: Hepatozelluläres Karzinom; ALT: Alanin-Aminotransferase. Die Normwerte lauten: Bilirubin < 1.1 mg/dl, ALT < 23 U/l und Quick 70% - 110%.

Die Befunde dieser Untersuchungen legen nahe, dass in Übereinstimmung mit den *in vitro* Befunden, sowohl die Expression von ATF-2, als auch von PPAR $\gamma$  im Lebergewebe von Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen verstärkt ist.



**Abb. 12: HCV verändert die mRNA Expression von ATF-2 und PPAR $\gamma$ .** In den Säulendiagrammen werden humane Leberproben als dunkelblaue Säulen und humane HCV-infizierte Leberproben als hellblaue Säulen dargestellt. Es wurde die mRNA Expression von ATF-2 und PPAR $\gamma$  mittels RT-PCR bestimmt. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mittels der  $\Delta\Delta CT$ -Methode. Wiedergegeben sind die Ergebnisse relativ zur unstimulierten Kontrolle. Diese wurde auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Die Signifikanz (\*) wurde mit Hilfe des ANOVA Tests berechnet ( $p < 0,05$ ).

## 4. Diskussion

Das Hepatitis C-Virus ist ein humaner, hepatotroper Krankheitserreger, der vorrangig die Hepatozyten infiziert. Er ist eine der führenden Ursachen für chronische Lebererkrankungen. Weltweit sind nach Angaben der WHO etwa 150 Millionen Menschen infiziert; bei mehr als 70% aller Infizierten bildet sich unter anhaltender Virusreplikation eine chronische Infektion mit einem über Jahrzehnte andauernden Krankheitsverlauf. Trotz anhaltend aktiver Virusreplikation ist der Verlauf einer Hepatitis C Infektion schleichend, häufig treten über Jahrzehnte keinerlei oder nur unspezifische Symptome auf, so dass die Betroffenen erst bei bereits massiven Schädigungen von ihrer Erkrankung erfahren. Dies legt nahe, dass das Virus im Laufe der Koevolution Mechanismen entwickelt hat, die Immunantwort des Wirts zu umgehen, Entzündungsreaktionen zu manipulieren und die Infrastruktur der Wirtszelle für seinen Lebenszyklus zu nutzen, ohne die Zelle dabei massiv in ihrer Viabilität zu beeinflussen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, welchen Einfluss das Hepatitis C-Virus auf die CREB Genexpression ausübt und welche funktionellen Relevanzen sich daraus ergeben. Ausgehend von der Beobachtung, dass es in humanen Hepatomazellen, die das subgenomische HCV Replikon (Genotyp 1b) exprimieren, zu einer verstärkten Expression von CREB5 kommt (Dissertation Sabine Eisenbürger), sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit die Expression weiterer Mitglieder der Familie von CREB-Transkriptionsfaktoren in Gegenwart von HCV sowie die funktionelle Bedeutung der Deregulation untersucht werden.

Die gewonnenen Daten legen nahe, dass HCV über die verstärkte Aktivierung von ATF-2 Mechanismen induziert, die durch die Virusinfektion bedingte Sensibilisierung der Wirtszelle gegenüber pro-apoptischen Stimuli weitestgehend neutralisiert.

#### 4.1 Subgenomisches HCV Replikon (Genotyp 1b) - Einfluss auf die CREB/ATF-Transkriptionsfamilie

Vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Dissertation Frau Dr. Sabine Eisenbürger und Herrn Dr. Erwin Brenndörfer) legen nahe, dass CREB-Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit eines subgenomischen HCV Replikons auf mRNA-Ebene unterschiedlich exprimiert werden. In eigenen Untersuchungen konnte ebenfalls eine gesteigerte nukleäre Translokation und Aktivierung von ATF-2 in Anwesenheit des subgenomischen HCV-Replikons belegt werden.

Übereinstimmend mit diesen Befunden konnte in Untersuchungen anderer belegt werden, dass bereits die alleinige Expression von NS3 zu einer Heraufregulation der Expression von ATF-2 und AP-1 führt [126]. Diese Daten lassen annehmen, dass NS3 möglicherweise für die hier berichteten Effekte des HCV Replikons verantwortlich ist.

Dass HCV die Aktivierung von Mitgliedern der CREB Familie beeinflusst, wurde ferner durch Untersuchungen zum Einfluss von HCV auf die Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) deutlich. Letztere wird durch das HCV-kodierte nichtstrukturelle Protein NS5A über einen cAMP abhängigen Mechanismus und die Aktivierung von CREB, CREBBP und *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 $\alpha$ ) verstärkt. In diesem Zusammenhang scheint ein cAMP responsives Element in der Promoterregion des PEPCK Gens für die verstärkte transkriptionelle Aktivierung der Genexpression verantwortlich zu sein [127].

Derselbe Einfluss auf die Transkription der PEPCK wurde für ATF-2 beschrieben [128]. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung ist daher denkbar, dass die Beeinflussung der Aktivierung von ATF-2 durch HCV ebenso wie die NS5A-vermittelte Aktivierung von CREB und die hierdurch bedingte Heraufregulation eines Schlüsselenzyms der Glukoneogenese mitverantwortlich für die Tatsache sind, dass HCV die Entstehung eines Diabetes Mellitus begünstigt.

Hiervon abgesehen ist die Tatsache interessant, dass in vielen Krebszelllinien und humanen Tumoren eine Überexpression des Transkriptionsfaktors ATF-2 beschrieben wurde [129]. Dieser Punkt muss in der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, da die für das HCV Replikon verwendete und permissive Wirtszelle von einem

hepatozellulären Karzinom abstammt, so dass hier möglicherweise eine höhere Bereitschaft für die Beeinflussung der ATF-2 Expression per se besteht. Das HCV jedoch in diesen Zellen einen Einfluss auf die Expression von ATF-2 hat, wird durch die Untersuchung entsprechender Kontrollzellen belegt. Darüber hinaus legt die Tatsache, dass im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen, eine Heraufregulation der ATF-2 Expression auch im Lebergewebe von Patienten mit chronischer HCV Infektion zu beobachten ist, nahe, dass es sich hierbei tatsächlich um einen HCV-spezifischen kontextunabhängigen Effekt handelt.

Die vermehrte Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 in Gegenwart eines subgenomischen HCV Replikons (Genotyp 1b) hat desweiteren rückwirkend Einfluss auf die virale Replikation. In *ATF2-Knockdown* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer gesteigerten RNA- und Proteinexpression des nicht-strukturellen HCV-Proteins NS3 kommt (Abb. 7). Dies könnte bedeuten, dass das Virus aufgrund der verstärkten Aktivierung von ATF-2 (Abb.6) in seiner Replikation eingeschränkt wird, aber sich dennoch auf anderem Wege durch die vermehrte Aktivierung von ATF-2 einen Vorteil verschafft. Dieser besteht darin, dass das Virus nach erfolgter Infektion eine erhöhte Persistenz in der Wirtszelle erreicht, indem es die durch die Virusinfektion bedingte Selbsteliminierung bzw. Sensibilisierung der Wirtszelle gegenüber pro-apoptischen Stimuli verhindert bzw. neutralisiert.

Da ATF-2 an der Modulation von Zellproliferation und -migration beteiligt ist [130], wurde weiterhin der Zusammenhang zwischen Hepatitis C, ATF-2 und Apoptose-regulierenden Mechanismen untersucht.

## 4.2 Modifikation der Apoptosesensibilität gegenüber pro-apoptischen Stimuli durch HCV

Die Apoptose ist ein Prozess, der aktiv gesteuert wird und zu einer Zerstörung der Zellen führt. Es handelt sich hierbei um einen gesteuerten, „programmierten“ Zelltod, zu dessen morphologischen Veränderungen u.a. Zellschrumpfung, erhöhte Endonukleaseaktivität, Chromatinkondensierung, Zytoplasmakondensation, Kernfragmentierung und DNA-Zerfall gehören [33]. Ohne die Apoptose wäre die Entwicklung und das Überleben komplexer Lebewesen nicht gesichert.

Die hier aufgeführten Ergebnisse legen nahe, dass die Infektion mit oder Präsenz von HCV zu einer Sensibilisierung der Wirtszelle gegenüber pro-apoptischen Stimuli führt. Dieser ungünstige Effekt wird durch HCV über eine Aktivierung von ATF-2 zumindest partiell antagonisiert. Hierbei spielt möglicherweise die Tatsache eine Rolle, dass ATF-2 die Expression pro-apoptischer Gene wie PUMA und PPAR $\gamma$  supprimiert. Dementsprechend führt die Herabregulation der Expression von ATF-2 durch spezifische siRNA in Zellen, die das HCV Replikon 1b beherbergen, zu einer deutlich verstärkten Expression dieser Gene. Eine Beobachtung, die auch die erhöhte Sensibilität von Huh9-13 Zellen, bei denen die Expression von ATF-2 durch siRNA unterdrückt wird, gegenüber pro-apoptischen Stimuli erklären würde.

Hierbei ist bereits bekannt, dass ATF-2 nach Aktivierung durch die p38<sup>MAPK</sup> einen Einfluss auf die Zellproliferation und -migration hat und die Transkription einer Reihe von Genen wie Bcl-2 oder Zyklin A und D reguliert, die in die Regulation von Zellproliferation und Apoptose involviert sind [121, 130].

Dass ATF-2 die Expression der beiden pro-apoptischen Faktoren von PUMA und PPAR $\gamma$  unterdrückt, ist in dieser Form bislang noch nicht beschrieben und könnte auch für andere Bereiche der Apoptoseforschung von Relevanz sein.

Die Tatsache hingegen, dass HCV einen Einfluss auf die Apoptose hat, wurde bereits durch andere Arbeiten belegt. Hierbei sind die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen kontrovers und zum Teil widersprüchlich, indem einerseits

apoptotische [68], andererseits anti-apoptotische [69] Effekte von HCV bzw. der verschiedenen HCV Proteine beschrieben wurden.

Die viralen Nicht-Strukturproteine können sowohl anti- als auch pro-apoptotische Effekte auslösen. So konnten Untersuchungen im Zellkulturmodell an HepG2- und Vero-Zellen nachweisen, dass es durch die Expression von HCV NS3 Protein zu einer verstärkten Apoptose- und Caspaseaktivierung kommt [68].

Im Gegensatz hierzu ist für das HCV Protein NS5A beschrieben, dass es mit p53 interagiert und hierdurch die p53-vermittelte Apoptose verhindert [70]. Ferner konnte belegt werden, dass NS5A die Hepatozyten vor dem TNF-induzierten Zelltod schützt, indem es die Aktivierung der Caspase-3 verhindert [71].

Warum es zu solchen kontroversen Beobachtungen kommt, lässt sich nur vermuten. Sowohl abweichende experimentelle Versuchsbedingungen als auch die Verwendung unterschiedlicher Zellkultursysteme und Auswertungsverfahren könnten solche schwankenden Ergebnisse zulassen.

Diese unterschiedlichen Befunde könnten jedoch auch Ausdruck der Tatsache sein, dass die Infektion mit dem Virus für die Wirtszelle ein Stressfaktor ist und dazu führt, dass die Zelle gegenüber pro-apoptotischen Stimuli sensibilisiert wird, gleichzeitig der Virus aber Programme aktiviert, die diese pro-apoptotischen Effekte des Virus neutralisieren sollen, um ein Überleben der erfolgreich infizierten Wirtszelle sicher zu stellen. In wie weit es dem Virus gelingt, über seine Kompensationsmechanismen, die durch die Virusinfektion bedingten pro-apoptotischen Effekte tatsächlich zu neutralisieren, dürfte sehr stark vom Kontext gleichzeitig agierender Signale und Stressfaktoren wie z.B. oxidativem Stress, pH-Wert und Umgebungsosmolarität abhängen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Punkte eine wichtige Erklärung für die zum Teil kontroversen Ergebnisse darstellt.

Die hier ausgeführten Untersuchungen haben verdeutlicht, dass HCV selbst die Expression pro-apoptotischer Gene wie PUMA oder PPAR $\gamma$  heraufreguliert, dies jedoch zumindest partiell über die Induktion der Expression und Aktivierung von ATF-2 gegenreguliert. Hieraus könnte man ableiten, dass HCV über die verstärkte Aktivierung und Expression von ATF-2 einen gewissen Schutz vor der Induktion von Apoptose vermittelt.

PUMA, ein pro-apoptotischer Faktor, soll in diesem Zusammenhang diskutiert und kritisch bewertet werden. Die Transkription von PUMA wird durch das nukleäre p53 beeinflusst [87, 88]. Dieser Transkriptionsfaktor (p53), ein Tumorsuppressorprotein, wird durch verschiedene zelluläre Signale wie onkogenen Stress oder DNA-Schäden induziert. Nukleäres p53 bindet als Tetramer an eine für ihn spezifische DNA-Sequenz und es kommt zur Transkription von *downstream* gelegenen Genen u.a. PUMA, Noxa und Bax, die als Effektorproteine von p53 eine Sensibilisierung der Zelle gegenüber apoptotisch induzierten Reizen vermitteln. [88, 89]. Sowohl PUMA $\alpha$  als auch PUMA $\beta$  besitzen eine ähnliche Aktivität. Sie binden anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder, die dadurch ihren anti-apoptotischen Effekt verlieren [87].

Die Befunde dieser Arbeit machen deutlich, dass die verminderte ATF-2 Expression in Huh9-13 Replikonzellen einen Anstieg der Expression von PUMA auf Transkriptebene zur Folge hat. Dies ist wiederum eine Erklärung dafür, weshalb ATF-2 in Huh9-13 Zellen vermehrt exprimiert und aktiviert wird; es wirkt der pro-apoptotischen Wirtsantwort auf die Infektion mit dem Hepatitis C-Virus entgegen. Da dieser Effekt lediglich auf Transkriptebene nachgewiesen werden konnte, muss zur vollständigen Bewertung dieses Ergebnisses die Umsetzung der mRNA in wirksame Proteine bestätigt werden.

Die Tatsache, dass der *Knockdown* von ATF-2 über siRNA zu einer Zunahme der Sensibilität der HCV infizierten Zelle gegenüber pro-apoptotischen Stimuli führt und gleichzeitig zu einer verstärkten Expression von PUMA und PPAR $\gamma$ , legt jedoch einen funktionellen Zusammenhang dieser Befunde dar.

Durch eine Hochregulierung von ATF-2 kommt es durch das Virus zu einer Herabregulation von PUMA und damit zu einer verminderten Apoptoseinduktion, was unter anderem auch eine verminderte Tumorsuppression zur Konsequenz hätte. Eine Erniedrigung von PUMA im Rahmen einer chronischen, langbestehenden HCV Infektion würde auch die erniedrigte Wirkung von Tumorsuppressoren wie p53 erklären – ein Aspekt, der möglicherweise in der Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms eine Rolle spielt.

Ein weiteres pro-apoptotisches Gen, das in den von mir durchgeführten Untersuchungen weiter analysiert wurde, ist PPAR $\gamma$ . Wie bereits zuvor beschrieben, wird die Expression dieses intrazellulären Transkriptionsfaktors von HCV selbst heraufreguliert. Dies wird

jedoch zumindest partiell über die Induktion der Expression und Aktivierung von ATF-2 gegenreguliert.

Dass PPAR $\gamma$  die Expression verschiedener Gene u.a. der Apoptose reguliert, wurde zuvor bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [104, 105].

So haben *in vitro* Untersuchungen an Hep3B-Zellen eine Induktion der Apoptose durch PPAR $\gamma$  nachweisen können. Dabei kommt es sowohl zu einem Anstieg der rezeptor-, als auch der mitochondrial-vermittelten Apoptose [115].

Denkbar ist somit, dass HCV über eine verstärkte Expression und Aktivierung von ATF-2 zu einer Herabregulation von PPAR $\gamma$  führt und damit auch die pro-apoptotische Effektorfunktion von PPAR $\gamma$  verhindert. Dies wie auch die ATF-2 abhängige Suppression der PUMA-Expression, könnte somit einen Mechanismus darstellen, über den HCV der Elimination der von ihm erfolgreich infizierten Zelle entgegen wirkt.

Die Sensibilisierung der Wirtszelle gegenüber apoptotischen Stimuli könnte somit durch die vermehrte Aktivierung von ATF-2 beeinflusst werden. Durch diese verstärkte Aktivierung von ATF-2 wird somit die durch die Präsenz des HCV Replikons bzw. die Infektion mit HCV hervorgerufene, verstärkte Expression von PPAR $\gamma$  gegenreguliert und abgeschwächt. Dementsprechend ist die Expression von PPAR $\gamma$  in Zellen, die das HCV Replikon beherbergen, bereits heraufreguliert. Diese Heraufregulation der Expression wird jedoch durch den *Knockdown* von ATF-2 noch einmal substantiell verstärkt (Abb. 11).

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die virusbedingte ATF-2 Erhöhung und die daraus resultierenden Folgen für die Sensibilität der Wirtszelle gegenüber Apoptose das Virus zum einen seine Persistenz in der Wirtszelle und deren Überleben sichert, zum anderen aber auch eine apoptosebedingte Tumorsuppression verhindert und damit indirekt die Rate maligner Entartungen, wie die Entstehung hepatozellulärer Karzinome steigert.

Zur Einschätzung der Übertragbarkeit der hier zusammengefassten Befunde (Huh9-13 Replikonsystem) auf die *in vivo* Situation, wurden stichprobenartig Versuche an Lebergewebe wiederholt.

Das Ergebnis der erhöhten Expression von ATF-2 und der erhöhten Expression von PPAR $\gamma$  im Huh9-13 Replikonsystem wurde auch in dem humanen HCV-infizierten Lebergewebe mittels *Realtime* PCR bestätigt (Abb.12).

Bei dem hier verwendeten Replikonsystem, indem nur die Interaktion der Nicht-Strukturproteine mit der Wirtszelle und der Verlauf der Replikation untersucht werden, stellt sich stets die Frage nach einer möglichen Übertragbarkeit auf den lebenden Organismus. Die Tatsache, dass sich auch im Lebergewebe von Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion im Vergleich zu Lebergewebe, welches im Rahmen tumorchirurgischer Eingriffe von Patienten, die nicht mit HCV infiziert waren, gewonnen wurde, eine signifikante Hochregulation von ATF-2 beobachten lässt, legt nahe, dass dieser Mechanismus auch *in vivo* von Relevanz ist. Bei Zutreffen dieser Überlegung wäre zu erwarten, dass die bereits verstärkte Expression von PPAR $\gamma$  im Lebergewebe von Patienten mit chronischer HCV-Infektion bei Deletion von ATF-2 oder Hemmung von dessen Aktivität noch weiter ansteigen würde. Dieser Aspekt muss in künftigen Untersuchungen weiter überprüft werden. Wie oben bereits ausgeführt spielt PPAR $\gamma$  eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose [112]. Dementsprechend konnte in einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung belegt werden, dass die Expression von PPAR $\gamma$  sowohl Metastasierungen als auch Tumorwachstum hemmt [120].

Meine Beobachtungen, dass HCV über einen ATF-2 vermittelten Mechanismus die Expression von PPAR $\gamma$  reduziert, könnte die damit einhergehende, verminderte Reparaturkapazität für DNA-Schäden erklären und somit ein weiterer Faktor sein, über den HCV ein onkogenes Milieu schafft.

Die hier zusammengefassten Ergebnisse meiner Untersuchungen legen somit nahe, dass HCV u.a. über die verstärkte Expression und Aktivierung von ATF-2 Mechanismen aktiviert, die die virusinfizierte Zelle von der Exekution apoptotischer Programme abhält und damit die Persistenz der virusinfizierten Zelle ermöglicht. Wie aus der vorangegangenen, aufgeführten Diskussion ersichtlich, schafft HCV über diese Mechanismen gleichzeitig ein Milieu, welches die Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms begünstigt.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass es in Gegenwart eines subgenomischen HCV Replikons vom Genotyp 1b zu einer verstärkten Expression von ATF-2 auf Transkriptebene kommt und dass dies mit einer gesteigerten nukleären Translokation von aktiviertem ATF-2 einhergeht. Befunde aus *Knockdown*-Experimenten legen nahe, dass Hepatitis C über die Aktivierung von ATF-2 die Expression pro-apoptotischer Gene wie PUMA und PPAR $\gamma$  reduziert und hierdurch einen gewissen Schutz vor der Induktion von Apoptose vermittelt. Übereinstimmend hiermit ergab die Untersuchung, dass die pro-apoptotischen Faktoren PPAR $\gamma$  und PUMA über ATF-2 in ihrer Expression auf Transkriptionsebene reduziert werden.

Übereinstimmend mit der insgesamt verstärkten Expression pro-apoptotischer Proteine in Zellen, die das subgenomische HCV Replikon 1b beherbergen, belegen Untersuchungen zum *PARP cleavage*, dass HCV mit einer Sensitivierung der Wirtszelle gegenüber Apoptose-induzierenden Behandlungen einhergeht.

Diese Daten legen nahe, dass HCV über die verstärkte Expression und Aktivierung von ATF-2 Mechanismen aktiviert, die die virusinfizierte Zelle von der Exekution apoptotischer Programme abhält und zu einer reduzierten Sensitivität derselben gegenüber pro-apoptotischen Stimuli führt.

## Literaturverzeichnis

1. **Organization, W.H.**, *Hepatitis C Fact sheet N°164*; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. July 2013.
2. **Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton**, *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. *Science*, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
3. **Smith, D.B., J. Bukh, C. Kuiken, A.S. Muerhoff, C.M. Rice, J.T. Stapleton, and P. Simmonds**, *Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource*. *Hepatology*, 2014. **59**(1): p. 318-27.
4. **Sultan, M.T., M.M. Rahman, and S. Begum**, *Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection*. *Journal of Bangladesh College of Physicians & Surgeons*, 2009.
5. **Moradpour, D. and F. Penin**, *Hepatitis C virus proteins: from structure to function*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013. **369**: p. 113-42.
6. **Steinmann, E. and T. Pietschmann**, *Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy*. *Viruses*, 2010. **2**(9): p. 2078-95.
7. **Raney, K.D., S.D. Sharma, I.M. Moustafa, and C.E. Cameron**, *Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(30): p. 22725-31.
8. **Hundt, J., Z. Li, and Q. Liu**, *Post-translational modifications of hepatitis C viral proteins and their biological significance*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(47): p. 8929-39.
9. **Appel, N., T. Pietschmann, and R. Bartenschlager**, *Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain*. *J Virol*, 2005. **79**(5): p. 3187-94.
10. **Nielsen, S.U., M.F. Bassendine, A.D. Burt, C. Martin, W. Pumeechockchai, and G.L. Toms**, *Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients*. *J Virol*, 2006. **80**(5): p. 2418-28.
11. **Felmlee, D.J., M.L. Hafirassou, M. Lefevre, T.F. Baumert, and C. Schuster**, *Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins—impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease*. *Viruses*, 2013. **5**(5): p. 1292-324.
12. **Liu, S., W. Yang, L. Shen, J.R. Turner, C.B. Coyne, and T. Wang**, *Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection*. *J Virol*, 2009. **83**(4): p. 2011-4.
13. **Farquhar, M.J., K. Hu, H.J. Harris, C. Davis, C.L. Brimacombe, S.J. Fletcher, T.F. Baumert, J.Z. Rappoport, P. Balfe, et al.**, *Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis*. *J Virol*, 2012. **86**(8): p. 4305-16.
14. **Zeisel, M.B., D.J. Felmlee, and T.F. Baumert**, *Hepatitis C virus entry*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013. **369**: p. 87-112.

15. **Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C.M. Rice, and J.A. McKeating**, *Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7271-6.
16. **Lupberger, J., M.B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, C. Davis, C.J. Mee, M. Turek, et al.**, *EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 589-95.
17. **Diao, J., H. Pantua, H. Ngu, L. Komuves, L. Diehl, G. Schaefer, and S.B. Kapadia**, *Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry*. J Virol, 2012. **86**(20): p. 10935-49.
18. **Barth, H., E.K. Schnober, F. Zhang, R.J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F.L. Cosset, A.H. Patel, H.E. Blum, et al.**, *Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10579-90.
19. **Barth, H., C. Schafer, M.I. Adah, F. Zhang, R.J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T.H. Van Kuppevelt, et al.**, *Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41003-12.
20. **Barth, H., T.J. Liang, and T.F. Baumert**, *Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications*. Hepatology, 2006. **44**(3): p. 527-35.
21. **Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, et al.**, *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. **282**(5390): p. 938-41.
22. **Olaby, R.A., H.M. Azzazy, R. Harris, B. Chromy, J. Vielmetter, and R. Balhorn**, *Identification of ligands that target the HCV-E2 binding site on CD81*. J Comput Aided Mol Des, 2013. **27**(4): p. 337-46.
23. **Harris, H.J., C. Davis, J.G. Mullins, K. Hu, M. Goodall, M.J. Farquhar, C.J. Mee, K. McCaffrey, S. Young, et al.**, *Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry*. J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 21092-102.
24. **Harris, H.J., M.J. Farquhar, C.J. Mee, C. Davis, G.M. Reynolds, A. Jennings, K. Hu, F. Yuan, H. Deng, et al.**, *CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry*. J Virol, 2008. **82**(10): p. 5007-20.
25. **Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz**, *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex*. J Virol, 2002. **76**(12): p. 5974-84.
26. **Schaefer, E.A. and R.T. Chung**, *HCV and host lipids: an intimate connection*. Semin Liver Dis, 2013. **33**(4): p. 358-68.
27. **Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice**, *Replication of hepatitis C virus*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(6): p. 453-63.
28. **Mercer, D.F., D.E. Schiller, J.F. Elliott, D.N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W.R. Addison, K.P. Fischer, T.A. Churchill, et al.**, *Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 927-33.

29. **Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager**, *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. *Science*, 1999. **285**(5424): p. 110-3.
30. **Lohmann, V., F. Korner, A. Dobierzewska, and R. Bartenschlager**, *Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation*. *J Virol*, 2001. **75**(3): p. 1437-49.
31. **Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset**, *Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes*. *J Exp Med*, 2003. **197**(5): p. 633-42.
32. **Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krausslich, et al.**, *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome*. *Nat Med*, 2005. **11**(7): p. 791-6.
33. **Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie**, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
34. **Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann**, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 383-424.
35. **Cerretti, D.P., C.J. Kozlosky, B. Mosley, N. Nelson, K. Van Ness, T.A. Greenstreet, C.J. March, S.R. Kronheim, T. Druck, et al.**, *Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme*. *Science*, 1992. **256**(5053): p. 97-100.
36. **Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H.M. Ellis, and H.R. Horvitz**, *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 641-52.
37. **Ellis, R.E., D.M. Jacobson, and H.R. Horvitz**, *Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1991. **129**(1): p. 79-94.
38. **Green, D.R.**, *Apoptotic pathways: the roads to ruin*. *Cell*, 1998. **94**(6): p. 695-8.
39. **Cho, S.G. and E.J. Choi**, *Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases*. *J Biochem Mol Biol*, 2002. **35**(1): p. 24-7.
40. **Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Kramer, and M.E. Peter**, *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. *Embo j*, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
41. **Kramer, P.H., M. Kaminski, M. Kiessling, and K. Gulow**, *No life without death*. *Adv Cancer Res*, 2007. **97**: p. 111-38.
42. **Guicciardi, M.E. and G.J. Gores**, *Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury*. *Gut*, 2005. **54**(7): p. 1024-33.
43. **Ame, J.C., C. Spenlehauer, and G. de Murcia**, *The PARP superfamily*. *Bioessays*, 2004. **26**(8): p. 882-93.
44. **Yu, S.W., H. Wang, M.F. Poitras, C. Coombs, W.J. Bowers, H.J. Federoff, G.G. Poirier, T.M. Dawson, and V.L. Dawson**, *Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor*. *Science*, 2002. **297**(5579): p. 259-63.
45. **Zimmermann, K.C., C. Bonzon, and D.R. Green**, *The machinery of programmed cell death*. *Pharmacol Ther*, 2001. **92**(1): p. 57-70.

46. **Orrenius, S.**, *Mitochondrial regulation of apoptotic cell death*. *Toxicol Lett*, 2004. **149**(1-3): p. 19-23.
47. **Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang**, *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. *Cell*, 1998. **94**(4): p. 481-90.
48. **Green, D.R. and J.C. Reed**, *Mitochondria and apoptosis*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
49. **Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan**, *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. *Cell*, 1998. **94**(4): p. 491-501.
50. **Fischer, B., D. Coelho, P. Dufour, J.P. Bergerat, J.M. Denis, J. Gueulette, and P. Bischoff**, *Caspase 8-mediated cleavage of the pro-apoptotic BCL-2 family member BID in p53-dependent apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **306**(2): p. 516-22.
51. **Labeledzka, K., A. Grzanka, and M. Izdebska**, [*Mitochondria and cell death*]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2006. **60**: p. 439-46.
52. **Chipuk, J.E., T. Moldoveanu, F. Llambi, M.J. Parsons, and D.R. Green**, *The BCL-2 family reunion*. *Mol Cell*, 2010. **37**(3): p. 299-310.
53. **Riedl, S.J. and Y. Shi**, *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(11): p. 897-907.
54. **Ray, R.B., K. Meyer, R. Steele, A. Shrivastava, B.B. Aggarwal, and R. Ray**, *Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(4): p. 2256-9.
55. **Ruggieri, A., T. Harada, Y. Matsuura, and T. Miyamura**, *Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein*. *Virology*, 1997. **229**(1): p. 68-76.
56. **Machida, K., K. Tsukiyama-Kohara, E. Seike, S. Tone, F. Shibasaki, M. Shimizu, H. Takahashi, Y. Hayashi, N. Funata, et al.**, *Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(15): p. 12140-6.
57. **Saito, K., K. Meyer, R. Warner, A. Basu, R.B. Ray, and R. Ray**, *Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein*. *J Virol*, 2006. **80**(9): p. 4372-9.
58. **Hahn, C.S., Y.G. Cho, B.S. Kang, I.M. Lester, and Y.S. Hahn**, *The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line*. *Virology*, 2000. **276**(1): p. 127-37.
59. **Zhu, N., A. Khoshnan, R. Schneider, M. Matsumoto, G. Dennert, C. Ware, and M.M. Lai**, *Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis*. *J Virol*, 1998. **72**(5): p. 3691-7.
60. **Goh, P.Y., Y.J. Tan, S.P. Lim, S.G. Lim, Y.H. Tan, and W.J. Hong**, *The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage*. *Virology*, 2001. **290**(2): p. 224-36.
61. **Kalkeri, G., N. Khalap, R.F. Garry, C.D. Fermin, and S. Dash**, *Hepatitis C virus protein expression induces apoptosis in HepG2 cells*. *Virology*, 2001. **282**(1): p. 26-37.

62. **Moorman, J.P., D. Prayther, D. McVay, Y.S. Hahn, and C.S. Hahn**, *The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fas oligomerization*. *Virology*, 2003. **312**(2): p. 320-9.
63. **Kao, C.F., S.Y. Chen, J.Y. Chen, and Y.H. Wu Lee**, *Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein*. *Oncogene*, 2004. **23**(14): p. 2472-83.
64. **Otsuka, M., N. Kato, K. Lan, H. Yoshida, J. Kato, T. Goto, Y. Shiratori, and M. Omata**, *Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(44): p. 34122-30.
65. **Lee, S.H., Y.K. Kim, C.S. Kim, S.K. Seol, J. Kim, S. Cho, Y.L. Song, R. Bartenschlager, and S.K. Jang**, *E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis*. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 8226-35.
66. **Zhu, L.X., J. Liu, Y.H. Xie, Y.Y. Kong, Y. Ye, C.L. Wang, G.D. Li, and Y. Wang**, *Expression of hepatitis C virus envelope protein 2 induces apoptosis in cultured mammalian cells*. *World J Gastroenterol*, 2004. **10**(20): p. 2972-8.
67. **Chiou, H.L., Y.S. Hsieh, M.R. Hsieh, and T.Y. Chen**, *HCV E2 may induce apoptosis of Huh-7 cells via a mitochondrial-related caspase pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **345**(1): p. 453-8.
68. **Prikhod'ko, E.A., G.G. Prikhod'ko, R.M. Siegel, P. Thompson, M.E. Major, and J.I. Cohen**, *The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities*. *Virology*, 2004. **329**(1): p. 53-67.
69. **Fujita, T., S. Ishido, S. Muramatsu, M. Itoh, and H. Hotta**, *Suppression of actinomycin D-induced apoptosis by the NS3 protein of hepatitis C virus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **229**(3): p. 825-31.
70. **Lan, K.H., M.L. Sheu, S.J. Hwang, S.H. Yen, S.Y. Chen, J.C. Wu, Y.J. Wang, N. Kato, M. Omata, et al.**, *HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis*. *Oncogene*, 2002. **21**(31): p. 4801-11.
71. **Ghosh, A.K., M. Majumder, R. Steele, K. Meyer, R. Ray, and R.B. Ray**, *Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death*. *Virus Res*, 2000. **67**(2): p. 173-8.
72. **Street, A., A. Macdonald, K. Crowder, and M. Harris**, *The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(13): p. 12232-41.
73. **Erdtmann, L., N. Franck, H. Lerat, J. Le Seyec, D. Gilot, I. Cannie, P. Gripon, U. Hibner, and C. Guguen-Guillouzo**, *The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 18256-64.
74. **Nomura-Takigawa, Y., M. Nagano-Fujii, L. Deng, S. Kitazawa, S. Ishido, K. Sada, and H. Hotta**, *Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(Pt 7): p. 1935-45.
75. **Tsujimoto, Y., L.R. Finger, J. Yunis, P.C. Nowell, and C.M. Croce**, *Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation*. *Science*, 1984. **226**(4678): p. 1097-9.

76. **Cleary, M.L.**, *The bcl-2 gene and protein in malignant lymphomas*. Bull Cancer, 1991. **78**(2): p. 187-93.
77. **Adams, J.M. and S. Cory**, *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1322-6.
78. **Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer**, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 609-19.
79. **Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L.H. Boise, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer**, *Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death*. Cell, 1995. **80**(2): p. 285-91.
80. **Kelly, P.N. and A. Strasser**, *The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy*. Cell Death Differ, 2011. **18**(9): p. 1414-24.
81. **Cheng, E.H., M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten, and S.J. Korsmeyer**, *BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 705-11.
82. **Hinds, M.G. and C.L. Day**, *Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(6): p. 690-9.
83. **Liu, X., S. Dai, Y. Zhu, P. Marrack, and J.W. Kappler**, *The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function*. Immunity, 2003. **19**(3): p. 341-52.
84. **Adams, J.M. and S. Cory**, *Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(5): p. 488-96.
85. **Eberle, J. and A.M. Hossini**, *Expression and function of bcl-2 proteins in melanoma*. Curr Genomics, 2008. **9**(6): p. 409-19.
86. **Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, H.C. Tu, J.R. Jeffers, G.P. Zambetti, J.J. Hsieh, and E.H. Cheng**, *Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1348-58.
87. **Nakano, K. and K.H. Vousden**, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 683-94.
88. **Wu, X. and Y. Deng**, *Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d151-6.
89. **Kawauchi, K. and S.J. Wolf**, *Understanding p53: new insights into tumor suppression*. Expert Rev Anticancer Ther, 2014: p. 1-3.
90. **Petros, A.M., D.G. Nettesheim, Y. Wang, E.T. Olejniczak, R.P. Meadows, J. Mack, K. Swift, E.D. Matayoshi, H. Zhang, et al.**, *Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies*. Protein Sci, 2000. **9**(12): p. 2528-34.
91. **Qiu, W., X. Wang, B. Leibowitz, W. Yang, L. Zhang, and J. Yu**, *PUMA-mediated apoptosis drives chemical hepatocarcinogenesis in mice*. Hepatology, 2011. **54**(4): p. 1249-58.
92. **Lee, K.A., T.Y. Hai, L. SivaRaman, B. Thimmappaya, H.C. Hurst, N.C. Jones, and M.R. Green**, *A cellular protein, activating transcription factor, activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8355-9.

93. **Montminy, M.R. and L.M. Bilezikjian**, *Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene*. *Nature*, 1987. **328**(6126): p. 175-8.
94. **Lin, Y.S. and M.R. Green**, *Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1a- and cyclic AMP-inducible promoters*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(10): p. 3396-400.
95. **Deutsch, P.J., J.P. Hoeffler, J.L. Jameson, J.C. Lin, and J.F. Habener**, *Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive DNA elements*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(34): p. 18466-72.
96. **Roesler, W.J., G.R. Vandenbark, and R.W. Hanson**, *Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(19): p. 9063-6.
97. **Robison, G.A., R.W. Butcher, and E.W. Sutherland**, *Cyclic AMP*. *Annu Rev Biochem*, 1968. **37**: p. 149-74.
98. **Gonzalez, G.A. and M.R. Montminy**, *Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133*. *Cell*, 1989. **59**(4): p. 675-80.
99. **Brindle, P.K. and M.R. Montminy**, *The CREB family of transcription activators*. *Curr Opin Genet Dev*, 1992. **2**(2): p. 199-204.
100. **Habener, J.F.**, *Cyclic AMP response element binding proteins: a cornucopia of transcription factors*. *Mol Endocrinol*, 1990. **4**(8): p. 1087-94.
101. **Duyndam, M.C., H. van Dam, A.J. van der Eb, and A. Zantema**, *The CR1 and CR3 domains of the adenovirus type 5 E1A proteins can independently mediate activation of ATF-2*. *J Virol*, 1996. **70**(9): p. 5852-9.
102. **Fajas, L., D. Auboeuf, E. Raspe, K. Schoonjans, A.M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, M. Laville, J.C. Fruchart, et al.**, *The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 18779-89.
103. **Evans, R.M., G.D. Barish, and Y.X. Wang**, *PPARs and the complex journey to obesity*. *Nat Med*, 2004. **10**(4): p. 355-61.
104. **Wahli, W., O. Braissant, and B. Desvergne**, *Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more*. *Chem Biol*, 1995. **2**(5): p. 261-6.
105. **Barish, G.D., V.A. Narkar, and R.M. Evans**, *PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(3): p. 590-7.
106. **Yang, J., L. Chen, X. Zhang, Y. Zhou, D. Zhang, M. Huo, and Y. Guan**, *PPARs and Female Reproduction: Evidence from Genetically Manipulated Mice*. *PPAR Res*, 2008. **2008**: p. 723243.
107. **Guan, Y.**, *Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(11): p. 2801-15.
108. **Coll, T., R. Rodriguez-Calvo, E. Barroso, L. Serrano, E. Eyre, X. Palomer, and M. Vazquez-Carrera**, *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome*. *Curr Mol Pharmacol*, 2009. **2**(1): p. 46-55.

109. **Kimura, O., Y. Kondo, and T. Shimosegawa**, *PPAR Could Contribute to the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma*. *PPAR Res*, 2012. **2012**: p. 574180.
110. **Chen, L. and G. Yang**, *PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism*. *PPAR Res*, 2014. **2014**: p. 653017.
111. **Tontonoz, P. and B.M. Spiegelman**, *Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma*. *Annu Rev Biochem*, 2008. **77**: p. 289-312.
112. **Koeffler, H.P.**, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(1): p. 1-9.
113. **Schaefer, K.L., K. Wada, H. Takahashi, N. Matsuhashi, S. Ohnishi, M.M. Wolfe, J.R. Turner, A. Nakajima, S.C. Borkan, et al.**, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2251-9.
114. **Koga, H., S. Sakisaka, M. Harada, T. Takagi, S. Hanada, E. Taniguchi, T. Kawaguchi, K. Sasatomi, R. Kimura, et al.**, *Involvement of p21(WAF1/Cip1), p27(Kip1), and p18(INK4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines*. *Hepatology*, 2001. **33**(5): p. 1087-97.
115. **Yu, J., B. Shen, E.S. Chu, N. Teoh, K.F. Cheung, C.W. Wu, S. Wang, C.N. Lam, H. Feng, et al.**, *Inhibitory role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in hepatocarcinogenesis in mice and in vitro*. *Hepatology*, 2010. **51**(6): p. 2008-19.
116. **Palakurthi, S.S., H. Aktas, L.M. Grubisich, R.M. Mortensen, and J.A. Halperin**, *Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation*. *Cancer Res*, 2001. **61**(16): p. 6213-8.
117. **Reka, A.K., H. Kurapati, V.R. Narala, G. Bommer, J. Chen, T.J. Standiford, and V.G. Keshamouni**, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(12): p. 3221-32.
118. **Tsubouchi, Y., H. Sano, Y. Kawahito, S. Mukai, R. Yamada, M. Kohno, K. Inoue, T. Hla, and M. Kondo**, *Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **270**(2): p. 400-5.
119. **Elstner, E., C. Muller, K. Koshizuka, E.A. Williamson, D. Park, H. Asou, P. Shintaku, J.W. Said, D. Heber, et al.**, *Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(15): p. 8806-11.
120. **Shen, B., E.S. Chu, G. Zhao, K. Man, C.W. Wu, J.T. Cheng, G. Li, Y. Nie, C.M. Lo, et al.**, *PPARgamma inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice*. *Br J Cancer*, 2012. **106**(9): p. 1486-94.
121. **Lee, M.Y., H.J. Kong, and J. Cheong**, *Regulation of activating transcription factor-2 in early stage of the adipocyte differentiation program*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **281**(5): p. 1241-7.

122. **Kim, K.H., S.P. Hong, K. Kim, M.J. Park, K.J. Kim, and J. Cheong,** *HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **355**(4): p. 883-8.
123. **Kim, K., K.H. Kim, E. Ha, J.Y. Park, N. Sakamoto, and J. Cheong,** *Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and expression of PPARgamma.* *FEBS Lett*, 2009. **583**(17): p. 2720-6.
124. **de Gottardi, A., V. Paziienza, P. Pugnale, F. Bruttin, L. Rubbia-Brandt, C.E. Juge-Aubry, C.A. Meier, A. Hadengue, and F. Negro,** *Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma mRNA levels are reduced in chronic hepatitis C with steatosis and genotype 3 infection.* *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **23**(1): p. 107-14.
125. **Paziienza, V., S. Clement, P. Pugnale, S. Conzelman, M. Foti, A. Mangia, and F. Negro,** *The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms.* *Hepatology*, 2007. **45**(5): p. 1164-71.
126. **Hassan, M., H. Ghozlan, and O. Abdel-Kader,** *Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth.* *Virology*, 2005. **333**(2): p. 324-36.
127. **Qadri, I., M. Choudhury, S.M. Rahman, T.A. Knotts, R.C. Janssen, J. Schaack, M. Iwahashi, L. Puljak, F.R. Simon, et al.,** *Increased phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and steatosis during hepatitis C virus subgenome replication: role of nonstructural component 5A and CCAAT/enhancer-binding protein beta.* *J Biol Chem*, 2012. **287**(44): p. 37340-51.
128. **Cheong, J., J.E. Coligan, and J.D. Shuman,** *Activating Transcription Factor-2 Regulates Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Transcription through a Stress-inducible Mitogen-activated Protein Kinase Pathway.* *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(35): p. 22714-22718.
129. **Endo, M., L. Su, and T.O. Nielsen,** *Activating transcription factor 2 in mesenchymal tumors.* *Hum Pathol*, 2014. **45**(2): p. 276-84.
130. **Vlahopoulos, S.A., S. Logotheti, D. Mikas, A. Giarika, V. Gorgoulis, and V. Zoumpourlis,** *The role of ATF-2 in oncogenesis.* *Bioessays*, 2008. **30**(4): p. 314-27.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Johannes G. Bode für die Bereitstellung des Themas, die kompetenten, wertvollen Anregungen, die kontinuierliche, freundliche Unterstützung und das Vertrauen in mich.

Herrn Prof. Dr. med. Dieter Häussinger danke ich für die stets konstruktive Begleitung der Arbeiten und die Möglichkeit, die experimentelle Arbeit in den Laboratorien seiner Klinik an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Ralf Bartenschlager danke ich für die Bereitstellung der Zellkultursysteme, Herrn Prof. Dr. Schulte am Esch für die Bereitstellung der humanen Leberproben.

Ich danke zudem allen Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie, vor allem der Arbeitsgruppe Bode für die gute Zusammenarbeit.

Für die hervorragende Unterstützung, den Austausch von Ideen und die Einarbeitung in die experimentelle Thematik möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Sabine Eisenbürger, Frau Dr. Ute Albrecht und Herrn Dr. Christian Ehlting bedanken. Zudem bedanke ich mich bei Frau Dr. Sabine Eisenbürger für die Bereitstellung der in Abb.6 zusammengefassten Daten (mRNA Expression von CREB1, CREB3, CREB5, CREBBP).

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Verlobten, Herrn Dr. Jörg Rinneburger, der mich zu jeder Zeit selbstlos unterstützt hat.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern, die mich stets nach allen Kräften unterstützt und in meinen Unterfangen konstruktiv begleitet haben.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Dortmund, den

---

Michaela Rohr